

平成 21 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17380169
 研究課題名（和文） 家畜卵巣内卵母細胞の発育開始制御と体外発育法の開発
 研究課題名（英文） Activation of Primordial Oocytes and In Vitro Oocyte Growth in Domestic Animals
 研究代表者
 宮野 隆（MIYANO TAKASHI）
 神戸大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：80200195

研究成果の概要： 家畜の卵巣内には、卵子のもととなる小さな卵母細胞が莫大な数存在している。成体の家畜の卵巣には、これらの卵母細胞の発育開始を抑制する機構が働いており、これによって哺乳類の長い生殖可能期間が保証されていると考えられる。家畜の卵母細胞の発育開始は、FOXO3A と呼ばれる転写因子によって抑制的に制御されており、FOXO3A の発現を一時的に抑制すると、卵母細胞は発育を開始することが明らかとなった。また、卵巣内の発育途上の卵母細胞を 1 ヶ月以上の長期間にわたって体外で培養することが可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	4,800,000	0	4,800,000
2006 年度	2,800,000	0	2,800,000
2007 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2008 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
総 計	13,700,000	1,830,000	15,530,000

研究分野： 生殖生物学

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード： 卵母細胞, 卵胞, 異種移植, 体外培養, FOXO3A, KIT, ウシ, ブタ

1. 研究開始当初の背景

雌の哺乳類では、性周期の間に 1 度だけ決まった数の卵母細胞が卵巣内で成熟し、卵管へと排卵される。一生に排卵される成熟卵（卵子）の総数は、動物の性周期の長さとして、生殖可能な期間を考えればそれほど多くない。優良な家畜の胚を多数生産する方法として、1) 受精卵や胚, 2) 卵巣内の成熟卵, 3) 卵巣内の未成熟卵, 4) と畜場で得られる卵巣内の未成熟卵の採取・利用法が開発されてきた。しかし、これらの方法に用いられる卵は、

いずれも卵巣内で発育（成長）を完了した卵母細胞に限られている。

哺乳類の卵巣内には、魚やカエルと同様に、卵子のもととなる卵母細胞が莫大な数存在している。家畜の卵巣内には数十万個の卵胞が含まれており、その 1 個 1 個には発育開始前あるいは発育途上の小さな卵母細胞が含まれている。卵胞が、原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、三次（胞状）卵胞へと発達する間に、卵胞内部では卵母細胞が直径約 30 μm から 120 μm へと発育する。現在、家畜の生産

に利用されている体外成熟-体外受精-胚移植に用いられる卵巣内の未成熟な卵母細胞は、直径の比較的大きな胞状卵胞内の発育を完了した卵母細胞に限られている。

1996年にEppigとO'Brienは、マウス新生仔の卵巣内の原始卵胞を体外で培養し、原始卵胞内の発育開始前の卵母細胞を最終の大きさへと発育させ、体外成熟、体外受精させた後、雌のマウスに移植して産仔を得ることに成功した[1]。家畜の卵巣内の小さな卵母細胞を用いることができれば、家畜の胚の生産に利用できる卵母細胞数は飛躍的に増加することになるが、これまで体外で発育させた卵母細胞から産仔を得たとの成功例は、1999年の当研究グループの報告[2]と2004年の東北農業センターの平尾ら[3]の2例があるに過ぎない。これらの研究では、いずれもウシの卵巣から採取した直径約0.5 mmの初期胞状卵胞内の直径90~99 μ mの卵母細胞が2週間にわたって体外培養されている。しかし、より小さな二次卵胞やさらに小さな原始卵胞の培養や発育に成功したとの報告はない。また、原始卵胞内の発育開始前の卵母細胞の発育開始制御機構については、マウス以外の動物を用いた研究はほとんどなく、その機構は知られていない。

[1] Eppig JJ, O'Brien MJ. Biol Reprod, 54: 197-207 (1966)

[2] Yamamoto K, Otoi T, Koyama N, Horikita N, Tachikawa S, Miyano T. Theriogenology, 52: 81-89 (1999)

[3] Hirao Y, Itoh T, Shimizu M, Iga K, Aoyagi K, Kobayashi M, Kacchi M, Hoshi H, Takenouchi N. Biol Reprod, 70: 83-91 (2004)

2. 研究の目的

家畜の卵巣内の発育開始前あるいは発育途上の卵母細胞から成熟卵を生産する技術を作成することを目的とする。また、原始卵胞内の発育開始前の卵母細胞の発育開始制御機構を明らかにし、原始卵胞内の卵母細胞に発育を開始させる方法を考案する。

3. 研究の方法

(1) 動物

と畜場で採取したブタ(約6ヶ月齢)およびウシ(成体)の卵巣、購入した10~20日齢のブタ新生仔の卵巣を実験に用いた。異種移植用のレシピエントとしては、重症複合免疫不全症マウス(SCIDマウス)を使用した。また、一部の実験では、KIT欠損-Fasノックアウト二重変異マウス、およびその野生型のC57BL/6系マウスを使用した。

(2) 異種移植

ブタおよびウシの卵巣の表層から切り出した原始卵胞を多数含む組織片を、6~8週齢のSCIDマウスの腎臓被膜下に移植した。移

植期間は2~6ヶ月間とし、雄および雌のSCIDマウス、卵巣摘出SCIDマウスの3種類のマウスを用いた。移植後に回収した組織片を固定した後、メタクリレート系樹脂JB-4に包埋し、薄切した。ヘマトキシリン-エオシン染色して、卵胞の発達および卵母細胞の生存性と発育を組織学的に調べた。

(3) 免疫蛍光染色

卵巣におけるKITおよびFOXO3Aの発現と局在を免疫組織学的に調べた。卵巣あるいは卵巣組織片を液体窒素中で凍結した後、クリオスタットを用いて薄切し、抗c-kit抗体、抗ヒトFOXO3A抗体と反応させ、Alexa Fluor 488標識二次抗体を用いて染色した。

(4) 電気泳動およびウェスタンブロット

FOXO3A蛋白質の発現量をウェスタンブロットによって調べた。卵母細胞あるいは卵巣組織サンプルを10% SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した後、PVDF膜に転写し、抗FOXO3A抗体およびhorseradish peroxidase標識二次抗体を用いて、FOXO3A蛋白質を検出した。

(5) siRNA (small interfering RNA) 処理

マウス、ブタおよびウシのFOXO3AのmRNA配列に基づいて、それぞれ3種のFOXO3A siRNAを設計した。siRNAによるFOXO3Aのノックダウンを培養体細胞を用いて確認した後、卵巣あるいは卵巣組織片に適用した。卵巣あるいは卵巣組織片に陽イオン性のリポソームLipofectamine 2000を用いてsiRNAを導入した後、組織染色標本を作製し、導入試薬の卵母細胞に及ぼす影響を調べた。また、Alexa Fluor 546標識FOXO3A siRNAを用いて、卵母細胞へのsiRNAの導入状況を調べるとともに、FOXO3A蛋白質のノックダウンをウェスタンブロットおよび免疫蛍光染色によって調べた。

原始卵胞内の卵母細胞の発育開始におけるFOXO3Aの機能を解析する目的で、siRNA処理によってFOXO3Aをノックダウンした原始卵胞を含む卵巣組織片をSCIDマウスに移植し、卵胞の発達および卵母細胞の発育を調べた。

(6) 二次卵胞の体外培養

卵巣の表層から切り出したウシ二次卵胞をコラーゲンゲルに包埋し、ウシ血清アルブミン、ウシ胎仔血清、ウシ血漿またはウシ卵胞液にさらにFSH(0, 25, 50 ng/ml)を添加した培養液中で4~8週間培養し、卵胞の発達および卵母細胞の発育を調べた。

4. 研究成果

(1) 成体および新生仔卵巣内の原始卵胞内卵母細胞の発育

成体のブタおよびウシの卵巣の表層から原始卵胞を多数含む組織片を切り出し、雄、雌、卵巣摘出雌の3種類のSCIDマウスに最

長6ヶ月間に渡って異種移植した。移植2ヶ月後では、ブタおよびウシの原始卵胞は、いずれのマウスにおいても、発達しなかったが、移植6ヶ月後には、ブタおよびウシの原始卵胞の一部は胞状卵胞へと発達し、内部の卵母細胞もほぼ発育完了の直径(120 μ m)へと発育した。一方、ブタ新生仔の卵巣から採取した原始卵胞の一部は、移植2ヶ月後には胞状卵胞へと発達した(図1)。

これらの結果は、原始卵胞の発達開始あるいは内部の卵母細胞の発育開始に関わる機構は、新生仔と成体では異なり、成体の原始卵胞内の卵母細胞が発育を開始するには長期間を要することを示唆している。

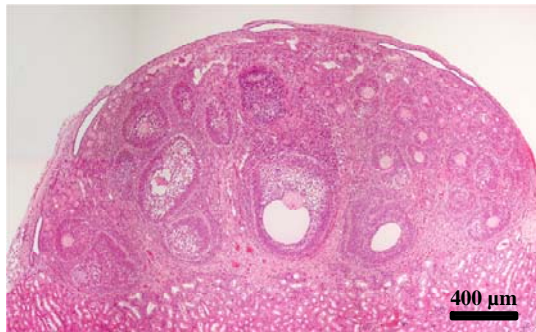


図1 SCID マウスに移植2ヶ月後、胞状卵胞へと発達したブタ新生仔の原始卵胞。下方はマウスの腎臓組織。

(2) 卵母細胞の発育開始と KIT-KL

① ブタ

哺乳類の卵母細胞の発育開始には、レセプターチロシンキナーゼの KIT とそのリガンドである KIT リガンド (KL : stem cell factor) が関わるのがこれまで示唆されている。成体のブタ卵巣の原始卵胞を SCID マウスに2ヶ月間移植しても原始卵胞の発達は認められないが、ブタ新生仔の卵巣から採取した原始卵胞の一部は胞状卵胞へと発達したことから、両者の間で KIT の発現に差がある可能性が考えられた。本実験では、卵母細胞の発育開始における KIT-KL の関与を調べた。

成体のブタ卵巣の原始卵胞と新生仔の原始卵胞では、KIT は卵母細胞の表層に同様に発現していた。成体の卵巣から採取した原始卵胞を KL (50 および 100 ng/ml) で 1~3 日間処理した後に SCID マウスに2ヶ月間移植した。その結果、対照として移植したブタ新生仔の卵巣の原始卵胞の一部は胞状卵胞へと発達し、内部の卵母細胞は発育完了の大きさへと発育したが、成体の卵巣から採取した原始卵胞はまったく発達しなかった。しかし、KL で処理した卵巣組織片中の卵母細胞の生存性は、未処理の卵母細胞に比べて高く維持された。

② KIT 欠損マウス

卵母細胞の発育開始における KIT の関与については、機能的な KIT を欠損した W^v/W^v マウスを用いてさらに検討を進めた。出生後の W^v/W^v マウスの卵巣内には卵母細胞が存在せず、これは KIT を持たないために卵母細胞の発育が起こらないことによると考えられている。 W^v/W^v マウスのアポトーシスレセプター Fas の遺伝子をノックアウトすると卵母細胞が形成されるとの報告[4]を受け、KIT 欠損-Fas ノックアウト二重変異マウス ($W^v/W^v:Fas^{-/-}$) を作出し、卵巣における卵子形成過程を調べるとともに、卵巣を SCID マウスに移植し、その卵子形成過程を調べた。その結果、妊娠13日齢の W^v/W^v マウス胎仔の卵巣内には生殖細胞が存在するが、出生に向かって生殖細胞が急速に消失すること、 $W^v/W^v:Fas^{-/-}$ 二重変異マウスでは、この卵母細胞の消失が部分的に救済され、出生後の卵巣内にも卵母細胞が存在すること、さらに卵母細胞は KIT を持たないにも関わらず発育を開始することが明らかとなった。

これらの結果から、これまで卵母細胞の発育開始に関わると考えられてきた KIT は、発育開始ではなく、卵母細胞の生存性の維持に関わることを示唆された。

[4] Sakata S, Sakamaki K, Watanabe K, Nakamura N, Toyokuni S, Nishimune Y, Mori C, Yonehara S. Cell Death Differ, 10: 676-686 (2003)

(3) 卵母細胞の発育開始と FOXO3A

成体のブタの原始卵胞内の卵母細胞では、何らかの抑制的な要因によって発育開始が阻害されている可能性がある。転写因子 Foxo3a をノックアウトしたマウスにおいて、出生後の卵巣内の原始卵胞内の卵母細胞が一斉に発育を開始するとの報告[5]を受け、ブタ新生仔および成体の原始卵胞内の卵母細胞における FOXO3A の発現を比較した。ウエスタンブロットおよび免疫組織学的に調べたところ、成体の原始卵胞のほぼすべての卵母細胞の核には FOXO3A が発現しているのに対して、ブタ新生仔ではその発現は低かった。そこで本研究では、ブタおよびウシの成体卵巣内の原始卵胞内の卵母細胞の発育開始における FOXO3A の機能を、siRNA によって FOXO3A をノックダウンすることによって調べた。基礎的な siRNA 導入実験は、マウスを用いて行った。

[5] Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Science, 301: 215-218 (2003)

① マウス Foxo3a

出生後のマウスの卵巣における卵胞の発達と Foxo3a の発現を免疫組織学的に調べた。出生直後および1日齢の卵巣には原始卵胞のみが存在しており、2日齢の卵巣には原始卵胞に加えて一次卵胞が認められた。出生直後の卵巣では Foxo3a の発現はほとんど認めら

れなかったが、1日齢以降の卵巣では、原始卵胞内の卵母細胞の核に *Foxo3a* の発現が認められた。

マウスの *Foxo3a* mRNA の配列から設計した3種の *Foxo3a* siRNA をマウス NIH/3T3 細胞に導入し、*Foxo3a* 蛋白質がノックダウンされることを確認した。次いで、1日齢マウスの卵巣を用いて siRNA の導入試薬 Lipofectamine 2000 が卵母細胞に与える影響、卵巣内への siRNA の導入状況、卵巣での *Foxo3a* 蛋白質のノックダウン作用を調べた。その結果、一定濃度の導入試薬を用いれば、卵巣を丸ごと処理しても卵母細胞に傷害を与えずに *Foxo3a* siRNA を導入できること、蛍光色素で標識した *Foxo3a* siRNA は卵巣内の卵母細胞中へも導入されることが明らかとなった。2種の *Foxo3a* siRNA を用いて、1日齢の卵巣を処理し、その後6日間卵巣を器官培養したところ、対照 siRNA で処理した卵巣に比べて、*Foxo3a* siRNA で処理した卵巣では、発育を開始した卵母細胞の割合が有意に増加した。

以上の結果から、*Foxo3a* siRNA を出生後のマウスの卵巣に導入し、*Foxo3a* をノックダウンすることが可能なが示された。また、*Foxo3a* は、マウスの原始卵胞内の卵母細胞の発育開始を抑制的に制御していると考えられる。

② ブタ FOXO3A

ブタ *FOXO3A* cDNA の部分配列 (1,128 bp) を決定し、得られた塩基配列から設計した3種の *FOXO3A* siRNA をブタ腎上皮細胞 (LLC-PK1) に導入し、*FOXO3A* 蛋白質がノックダウンされることを確認した。次いで、原始卵胞を多数含む6ヶ月齢のブタの卵巣組織片を、蛍光色素で標識した *FOXO3A* siRNA で処理し、原始卵胞内の卵母細胞中に *FOXO3A* siRNA が導入可能であることを確認した。*FOXO3A* に対する2種の siRNA を用いて、原始卵胞内の卵母細胞の *FOXO3A* のノックダウンを試みたところ、どちらの siRNA によっても原始卵胞の核で強く発現する *FOXO3A* のレベルは低下した (図2)。

原始卵胞を含む卵巣組織片を *FOXO3A* siRNA で処理した後、SCID マウスに2ヶ月間移植した。対照 siRNA で処理した移植片では、卵母細胞の発育はほとんど認められなかったが、2種の *FOXO3A* siRNA で処理した後に移植した卵巣組織片では、いずれも約30%の卵胞が二次卵胞以降へと発達し、約15%の卵母細胞は直径76~95 μ mへと発育した。

これらの結果は、*FOXO3A* はブタの原始卵胞内の卵母細胞の発育休止に関わっており、*FOXO3A* siRNA 処理によって *FOXO3A* の発現を一時的に抑制すれば、卵母細胞はその休止から解除され、発育を開始することを示唆している。

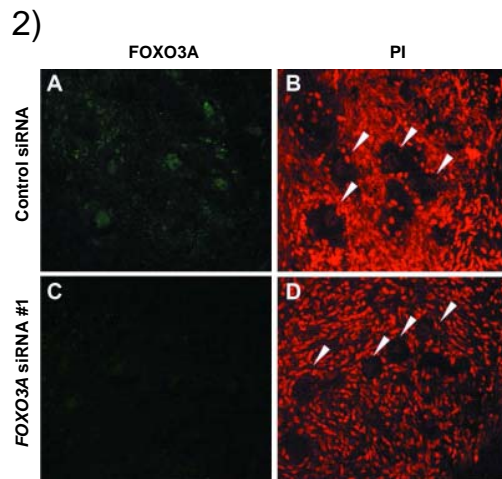
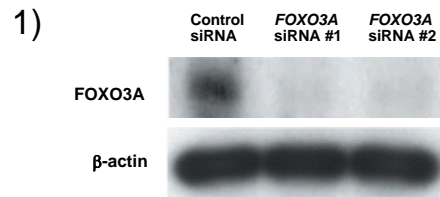


図2 原始卵胞を含むブタ卵巣組織片を *FOXO3A* siRNA で処理した後、抗 *FOXO3A* 抗体を用いたウェスタンブロット (1) および免疫蛍光染色 (2) によって *FOXO3A* 蛋白質がノックダウンされることを確認した。核を PI で染色した (2B, 2D)。矢印は原始卵胞内の卵母細胞を示す。

③ ウシ FOXO3A

ウシ *FOXO3A* cDNA の部分配列 (1,412 bp) を決定し、得られた塩基配列から設計した3種の *FOXO3A* siRNA をウシ腎上皮細胞 (MDBK) に導入したところ、*FOXO3A* の mRNA および蛋白質はいずれもノックダウンされた。*FOXO3A* は、原始卵胞内の卵母細胞の核で強く発現していたが、卵巣組織片を *FOXO3A* siRNA で処理すると、*FOXO3A* mRNA および *FOXO3A* 蛋白質レベルはともに低下した。

原始卵胞を含む卵巣組織片を *FOXO3A* siRNA で処理した後、SCID マウスに1ヶ月間移植した。対照 siRNA で処理した移植片では、卵母細胞の発育は認められなかったが、*FOXO3A* siRNA 処理後に移植した卵巣組織片では、一部の原始卵胞が一次卵胞へと発達した。

これらの結果は、*FOXO3A* はウシの原始卵胞内の卵母細胞の発育休止に関わっており、原始卵胞内の卵母細胞の *FOXO3A* の発現を一時的に抑制すれば、卵母細胞はその休止から解除され、発育を開始することを示唆している。

(4) 二次卵胞の長期体外培養

ウシ卵巣内の発育途上の卵母細胞を含む直径150~200 μ mの二次卵胞を、ウシ血清ア

ルブミン, ウシ胎仔血清, ウシ血漿またはウシ卵胞液を添加した培養液にさらに FSH を添加した培養液中で4週間培養し, 卵胞の発達と卵母細胞の発育を調べた。卵胞の生存率は, ウシ血漿を添加した培養液 (FSH 0 または 25 ng/ml) 中において 60%以上と高く維持され, 生存している卵胞からは正常な形態を示す卵母細胞が回収された。卵母細胞の直径は, 培養前の直径約 60 μ m から約 90 μ m へと有意に増加した。さらに, ウシ血漿添加培養液を用いて, 二次卵胞を 6~8 週間培養した。培養6週後, 卵母細胞の直径は約 100 μ m へと増加したが, 6週以降, 卵母細胞のさらなる発育は認められなかった。

(5) まとめ

ブタおよびウシ卵母細胞の発育開始における本研究結果をまとめると, 以下の発育開始制御モデルが考えられる (図3)。出生後早い時期の卵巣内に存在する原始卵胞内の卵母細胞は, 図3の①あるいは②の経路のいずれかに進む。①では, 卵母細胞は発育を開始し, 卵胞も卵母細胞の発育に伴って発達する。一方, ほとんどの卵母細胞は, FOXO3A の発現を伴う②の経路へと進み, 動物が性成熟に達した後も卵巣内に大量に存在する原始卵胞のプールを形成する。このプールの形成は, おそらく哺乳類の長い生殖可能期間を保証するために必要と考えられる。一旦, 発育を休止した卵母細胞は, もとの状態にはなかなか戻れないが, FOXO3A の発現を一時的に抑制すれば, 卵母細胞はその休止状態から解除されて③→①の経路へと向かい, 発育を開始する。FOXO3A siRNA を用いれば, 人為的に卵母細胞をこの経路へと誘導することができるが, 生体内で FOXO3A の発現を低下させる要因は不明であり, 今後さらに検討を進める必要がある。

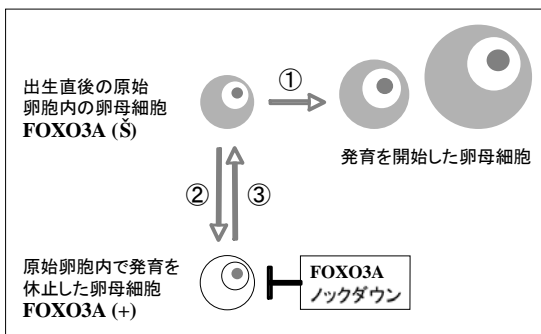


図3 原始卵胞内卵母細胞の発育開始制御モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- ① Moniruzzaman M, Zengyo M, Lee J, Miyano T. Knockdown of FOXO3A

induces primordial oocyte activation in pigs. *Reproduction* (2009, 対応中) 査読有

- ② Moniruzzaman M, Bao R-M, Taketsuru, H, Miyano T. Development of vitrified porcine primordial follicles in xenografts. *Theriogenology* (2009, in press) 査読有

- ③ Miyano T, Moniruzzaman M, Ogushi S. Basic physiology of growth and maturation of pig oocytes. *Proceedings of the 5th International Symposium "Present and Future of Transgenic Cloned Pig Research"*. pp.9-14 (2008) 査読無

- ④ Moniruzzaman M, Miyano T. KIT-KIT ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles. *J Reprod Dev*, 53(6): 1273-1281 (2007) 査読有

- ⑤ Miyano T, Moniruzzaman M. KIT controls the survival rather than the growth of mammalian oocytes. *Proceedings of the 4th Annual Conference of the Asia Reproductive Biotechnology Society*, pp.35-41 (2007) 査読無

- ⑥ Miyano T, Ogushi S, Bui HT, Lee J. Meiotic resumption and spindle formation of pig oocytes. *J Mamm Ova Res*, 24(3): 92-98 (2007) 査読有

- ⑦ Moniruzzaman M, Sakamaki K, Akazawa Y, Miyano T. Oocyte growth and follicular development in KIT-deficient Fas-knockout mice. *Reproduction*, 133(1): 117-125 (2007) 査読有

- ⑧ 宮野 隆. 家畜卵母細胞の体外発育. *日本胚移植学雑誌*, 28(1): 29-32 (2006) 査読無

- ⑨ Miyano T, Moniruzzaman M, Manabe N. Bringing up small oocytes from farm animals. *Proceedings of the 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference*, pp.45-50 (2005) 査読無

〔学会発表〕 (計 19 件)

- ① 善行 舞, Moniruzzaman M, 宮野 隆. ブタ原始卵胞内卵母細胞における FOXO3A の機能. 日本畜産学会第 110 回大会, 2009 年 3 月 27~29 日, 藤沢.

- ② Miyano T, Moniruzzaman M, Ogushi S. Basic physiology of growth and maturation of pig oocytes, 5th International Symposium of "Recent Progress in Animal Biotechnology", Chugnam National University, 2008 年 10 月 17 日, Daejeon, Korea.

- ③ Miyano T, Moniruzzaman M, Hirao Y, Manabe N. Ex-vivo growth and

maturation of oocytes in farm animals. 1st World Congress on Reproductive Biology, 2008年5月24~25日, Kona, Hawaii.

- ④ 柏木 弥生, 宮野 隆. Foxo3a によるマウス卵母細胞の発育開始制御. 日本畜産学会第109回大会, 2008年3月27~29日, 水戸.
- ⑤ 竹鶴 裕亮, 高城 明日香, 浜脇 淳, 吉川 基一, 宮野 隆. ガラス化したウシ二次卵胞の体外培養による卵母細胞の発育. 日本畜産学会第109回大会, 2008年3月27~29日, 水戸.
- ⑥ 宮野 隆. 卵母細胞の発育機構. 第2回学術シンポジウム「動物生命工学の新潮流」～クローン・生殖・再生への挑戦～, 2008年3月20日, 和歌山.
- ⑦ Miyano T, Moniruzzaman M. KIT controls the survival rather than the growth of mammalian oocytes. The 4th Annual Conference of the Asia Reproductive Biotechnology Society, 2007年11月24~28日, Singapore.
- ⑧ 赤澤 由起子, Moniruzzaman M, 李 智博, 酒巻 和弘, 宮野 隆. マウス卵子形成過程におけるデスレセプター-Fas の関与. 第25回日本受精着床学会学術講演会, 2007年8月30~31日, 仙台.
- ⑨ 宮野 隆. 哺乳類卵母細胞の発育・成熟実験からみえてきたこと. 第132回日本生殖医学会関西支部集談会・第34回関西アンドロロジーカンファレンス, 2007年3月3日, 千里.
- ⑩ Bao RM, Yamasaka E, Moniruzzaman M, Hamawaki A, Yoshikawa M, Miyano T. Development of vitrified bovine secondary and primordial follicles in SCID mice. The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2007年1月7~9日, Kyoto.
- ⑪ Moniruzzaman M, Lee J, Miyano T. Growth of primordial oocytes from infant and adult porcine ovaries in xenografts. The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2007年1月7~9日, Kyoto.
- ⑫ Takajo A, Bao RM, Hamawaki A, Yoshikawa M, Miyano T. Long-term culture of bovine secondary follicles in media containing BSA, FCS, plasma, and follicular fluid. The 33rd Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2007年1月7~9日, Kyoto.
- ⑬ Phan TC, Miyano T. Maturation competence of growing pig oocytes after short-term growth culture. The 3rd

Annual Conference of Asian Reproductive Biotechnology Society, 2006年11月29日~12月3日, Hanoi, Vietnam.

- ⑭ 包 栄梅, 浜脇 淳, 吉川 基一, 宮野 隆. ウシ原始卵胞のガラス化保存と異種移植による発達. 第99回日本繁殖生物学会大会, 2006年9月7~9日, 名古屋.
- ⑮ 宮野 隆. 卵母細胞の人為的発育と体外成熟. 第47回日本哺乳動物卵子学会, 2006年5月27~28日, 東京.
- ⑯ Miyano T. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. International Congress on Gamete Biology: Emerging Frontiers on Fertility and Contraceptive Development, 2006年2月22~25日, New Delhi, India.
- ⑰ Miyano T, Moniruzzaman M, Manabe N. Bringing up small oocytes from farm animals, The 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference, 2005年11月2~7日, Bangkok, Thailand.
- ⑱ Miyano T. Artificial oocyte growth in domestic species. The 4th Symposium of the Society for Biology of Reproduction and Joint Polish-Japanese Seminar, 2005年9月22~24日, Kraków, Poland.
- ⑲ 宮野 隆. 家畜卵母細胞の体外発育, 第12回日本胚移植研究会大会, 2005年8月18~19日, 奈良.

〔図書〕(計 1 件)

- ① Miyano T, Manabe N. Nottingham University Press. Oocyte growth and acquisition of meiotic competence. in "Gamete Biology: Emerging Frontiers on Fertility and Contraceptive Development", Society of Reproduction and Fertility Supplement 63, Edited by Gupta SK, Koyama K, Murray F. (2007) pp.531-538 in total 548 pages.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮野 隆 (MIYANO TAKASHI)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 80200195

(2) 研究分担者

李 智博 (LEE JIBAK)
神戸大学・自然科学研究科・COE 研究員
研究者番号: 50372660
(2005~2006年度分担)