

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300158

研究課題名(和文) 魚類の卵子と卵巣の凍結保存法の開発

研究課題名(英文) Development of the cryopreservation method for fish oocytes and ovaries

研究代表者

葛西 孫三郎 (KASAI, MAGOSABURO)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：60152617

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円、(間接経費) 4,140,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の卵子と卵巣のモデルとして、それぞれゼブラフィッシュのstage III中期卵子とstage I卵子を用いて、それらに水・耐凍剤チャンネルと不凍タンパク質を人為的に発現させ、プロピレングリコールベースの保存液を用いてガラス化凍結し、耐凍性が向上するかどうかをしらべた。融解直後は、いずれの卵子の場合も、両方のタンパク質を発現させた場合のみ生存卵子が観察された。しかしながら、1時間培養すると全てが死滅した。魚類の卵子や卵巣の凍結保存に成功するには、さらなる改良が必要である。

研究成果の概要(英文)：We tried to vitrify zebrafish oocytes at middle stage III and stage I successfully as a model of fish oocytes and ovaries, respectively. Oocytes at both stages were injected with cRNAs of water/cryoprotectant channels and anti-freeze proteins for exogenous expression of these proteins, and vitrified with a propylene glycol-based solution. Only oocytes expressing both proteins survived vitrification just after warming. However, the oocytes were dead after 1 h of culture. Further improvement is needed to succeed in the cryopreservation of fish oocytes and ovaries.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：凍結保存

### 1. 研究開始当初の背景

魚類卵子の凍結保存は未だ成功していない。その原因は、哺乳動物の卵子より体積が1,000倍以上大きいこと、表面積/体積比が小さく、細胞の凍結保存に不可欠な水や耐凍剤の出入りに非常に時間を要するためである。そのため、脱水や耐凍剤の浸透が不十分なために起こる細胞内氷晶形成によって死滅すると考えられる。この問題を乗り越えるためには、(1)細胞膜の水透過性と耐凍剤透過性を大きく向上させる(2)不凍物質等を細胞内に蓄積させて細胞内氷晶形成と成長を抑制する(3)サイズが哺乳動物卵子に近い、未熟な小さい卵子を用いる、などが有効と考えられる。研究代表者は、LHサーージ後の成熟途上のメダカ卵子に水・耐凍剤チャンネルであるアクアポリン3(以下AQP3)のcRNAを注入して一過性にチャンネルを発現させることにより、成熟能・受精能・発生能にあまり影響を与えずに、細胞膜透過性を大幅に増加させることに成功した。しかし、凍結・融解時に細胞内氷晶を完全に防ぐまでには至らなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ゼブラフィッシュを用い、細胞膜透過性が高く、サイズが成熟卵子と比べて小さい未熟卵子(stage III 中期卵子)と卵巣片のモデルとして極めて未熟で小さい卵子(stage I 卵子)を用いて、それらにAQP3と不凍タンパク質(以下AFP)を蓄積させることによって、初めて魚類卵子の凍結保存に成功することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) stage III 中期卵子におけるAQP3とAFPの発現による耐凍性向上

卵巣から単離したStage III 中期卵子(直径0.65~0.69mmの卵胞)にラットAQP3 cDNAから合成したAQP3 cRNAとウインターフラウンダー由来AFPペプチド cDNAから合成したAFP cRNAのいずれかあるいは両方を注入し、25の0.5%BSA添加90%v/v L-15液(pH 9.0)(以下LM液)で12時間培養した。耐凍剤には魚類の卵子や胚に対する毒性が低いプロピレングリコール(以下PG)とメタノール(以下MeOH)を用いた。まず、25の10%v/v PG添加LM液に卵子を60分間浸し、その体積変化から2-parameter formalismを用いてPG透過性をしらべた。また、一部の卵子は、氷冷下で超音波ホモジナイザーを用いてホモジナイズ(1サンプルあたり卵子10個)し、氷点降下型浸透圧計を用いてその10,000 x g上清の浸透圧を測定し、氷点が降下したかどうかをしらべた。次に、卵子を25の5%v/v PG、5%v/v MeOH、0.2 M sucroseおよび10%w/v Ficoll PM-70を含むLM液(前処理液)で1~2時間処理した後に、25の15%v/v PG、15%v/v MeOH、0.2 M sucroseおよび10%w/v Ficoll PM-70を含むLM液(ガラ

ス化保存液)で10分間処理し、0.5 ml ウシ精子凍結用ストローを用いてガラス化凍結した。25の水にストローを浸して融解し、卵子を25の0.2 M sucrose添加LM液(耐凍剤除去液)に5分間浸して耐凍剤を除去した。そして卵子の形態と30 µg/ml propidium iodide添加LM液での染色(PI染色)により生存性をしらべた。さらに25のLM液で1時間培養した後に卵子の形態とPI染色により生存性をしらべた。

#### (2) stage I 卵子におけるAQP3とAFPの発現による耐凍性向上

卵巣から単離したstage I 卵子(直径0.16~0.20 mmの卵胞)にAQP3 cRNAとAFP cRNAのいずれかあるいは両方を注入し、25のLM液で12時間培養した。そして、25の10%v/v PG添加LM液に卵子を60分間浸し、その体積変化からPG透過性をしらべた。次に、卵子を25の前処理液で2~5分間処理した後に、25のガラス化保存液で1分間処理し、0.25 ml ウシ精子凍結用ストローを用いてガラス化凍結した。25の水にストローを浸して融解し、卵子を25の耐凍剤除去液に5分間浸して耐凍剤を除去した。そして融解直後と25で1時間培養した後に生存性をしらべた。

#### (3) stage III 中期卵子の体外培養法の開発と、AQP3とAFPの発現量向上による耐凍性向上

0~100 nMのInsulin-like growth factorと20 IU/mLヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを添加した25のLM液でstage III 中期卵子を12時間あるいは24時間保持した後、0.03 nM 17 $\alpha$ ,20 $\beta$ -dihydroxy-pregnen-3 one(以下DHP)添加LM液で3時間培養して成熟を誘起した。PI染色して生存性をしらべ、半透明化した生存卵子を成熟卵子とみなした。

一部の成熟卵子はピンセットで卵胞膜を除去し、成熟雄から採取した精子と受精させた。26で1時間培養し、卵割が観察された卵子を正常に受精したとみなした。さらに3日間培養して、孵化したものを正常な発生能を保持しているとみなした。

また、一部の卵子は、採取直後にAQP3 cRNAとAFP cRNAを注入し、最も良い保持条件で24時間培養し、上記のstage III 中期卵子と同じ方法でPG透過性をしらべた。また、上記と同じ方法でガラス化凍結し、融解後の生存性をしらべた。

### 4. 研究成果

#### (1) stage III 中期卵子におけるAQP3とAFPの発現による耐凍性向上

AQP3 cRNAを注入した卵子ではPG透過性は無処理卵子の値より有意に高かった。また、AFP cRNAを注入した卵子では無処理卵子より細胞質画分の浸透圧がやや低下(約10 mOsm/kg)し、AFPが発現したと考えられた。

無処理卵子をガラス化凍結すると、融解後に生存した卵子は見られなかった(図1)。一方、AQP3とAFPの両方を発現させた卵子では、融解直後には一部の卵子が生存していた。しかしながら、1時間培養すると全ての卵子は死滅した(図は示さず)。

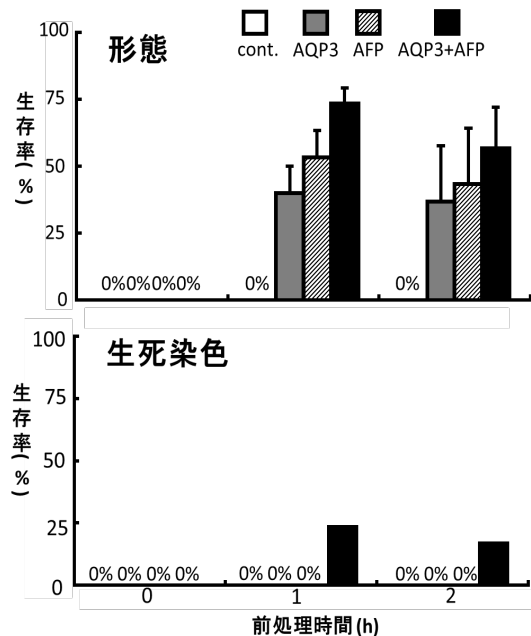


図1 stage III 卵子のガラス化凍結後の生存性

25°Cの前処理液で処理した後、ガラス化保存液で10分間処理した。  
Cont., 水注入卵子; AQP3, AQP3 cRNA注入卵子; AFP, AFP cRNA注入卵子;  
AQP3+AFP, AQP3 cRNAとAFP cRNA注入卵子

(2) stage I 卵子における AQP3 と AFP の発現による耐凍性向上

AQP3 cRNA を注入した卵子では PG 透過性は無処理卵子の値より有意に高かった。

無処理卵子をガラス化凍結すると、融解後に生存した卵子は見られなかった(図2)。

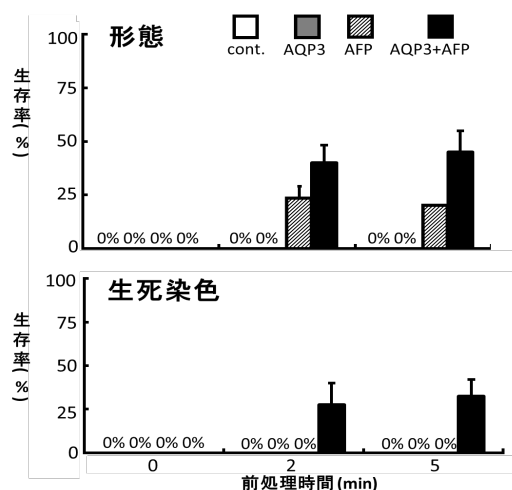


図2 stage I 卵子のガラス化凍結後の生存性

25°Cの前処理液で処理した後、ガラス化保存液で1分間処理した。  
Cont., 水注入卵子; AQP3, AQP3 cRNA注入卵子; AFP, AFP cRNA注入卵子;  
AQP3+AFP, AQP3 cRNAとAFP cRNA注入卵子

一方、AQP3 と AFP の両方を発現させた卵子では、融解直後には一部の卵子が生存していた。しかしながら、1時間培養すると全ての卵子は死滅した(図は示さず)。

(3) stage III 中期卵子の体外培養法の開発と、AQP3 と AFP の発現量向上による耐凍性向上

10 nM IGF を添加して24時間保持した場合、最も生存率(約60%)と成熟率(約60%)は高かった。また、成熟した卵子の卵割率(約60%)は、保持せずに直接成熟させた場合(約60%)と差はなかった。しかしながら、直接成熟させた場合も10 nM IGF 存在下で24時間保持した場合も、孵化まで発生した受精卵はなかった。AQP3 cRNA と AFP cRNA を注入して24時間保持すると、12時間保持した場合よりPG透過性が高く、より多くのAQP3が発現したと考えられた(図3)。

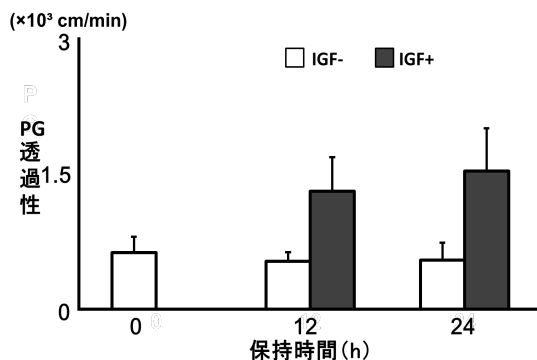


図3 10 nM IGF存在下で保持した卵子のPG透過性

しかしながら、ガラス化凍結・融解後、1時間培養すると全ての卵子が死滅した。

(4) 結論

ゼブラフィッシュ未成熟卵子に水・耐凍剤チャンネルと不凍タンパク質を発現させることによって、卵子の耐凍性はある程度向上した。また、ゼブラフィッシュ stage III 中期卵子を24時間保持できる培養法を開発し、より多くのAQP3を発現させることに成功した。しかしながら、魚類卵子の凍結保存に成功するには至らなかった。さらなる改良が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Kazutoshi Nishijima, Mai Tanaka, Yusuke Sakai, Chihiro Koshimoto, Masatoshi Morimoto, Teruo Watanabe, Jianglin Fan, Shuji Kitajima. Effects of type III antifreeze protein on sperm and embryo cryopreservation in rabbit. *Cryobiology*, (in press). doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.04.014  
Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Yunosuke Matsuura, Kazuaki Yamasaki, Sayaka Moriguchi-Goto, Chihiro Sugita, Takashi Iwakiri, Nozomi Okuyama, Chihiro Koshimoto, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Songji Zhao, Yuji Kuge, Yujiro Asada. Increased metabolite levels of glycolysis and pentose phosphate pathway in rabbit atherosclerotic arteries and hypoxic macrophage. *PLoS One*, 9, e86426, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0086426

Kazutoshi Nishijima, Shinji Yamaguchi, Mai Tanaka, Yusuke Sakai, Chihiro Koshimoto, Masatoshi Morimoto, Teruo Watanabe, Jianglin Fan, Shuji Kitajima. Effects of cholesterol-loaded cyclodextrins on the rate and the quality of motility in frozen and thawed rabbit sperm. *Experimental Animals*, 63, 149-154, 2014.

doi: 10.1538/expanim.63.149

Delgado M. Valdez Jr., Bo Jin, Ryoma Tsuchiya, Shinsuke Seki, Naoya Saida, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. A trial to cryopreserve immature medaka (*Oryzias latipes*) oocytes after enhancing their permeability by exogenous expression of aquaporin 3. *Journal of Reproduction and Development*, 59, 205-213, 2013.

doi: 10.1262/jrd.2012-179

Bo Jin, Ryu-ichi Higashiyama, Yu-ichi Nakata, Jun-ichi Yonezawa, Shangdan Xu, Masashi Miyake, Sei-ichi Takahashi, Kazuhiro Kikuch, Ken-ichi Yazawa, Shuhei Mizobuchi, Saori Niimi, Mizuho Kitayama, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige. Rapid movement of water and cryoprotectants in pig expanded blastocysts via channel processes: its relevance to their higher tolerance to cryopreservation. *Biology of Reproduction*, 89, 1-12, 2013.

doi: 10.1095/biolreprod.112.107250

Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Songji Zhao, Yunosuke Matsuura, Chihiro Sugita, Takashi Iwakiri, Nozomi Okuyama, Kazuyo Ohe, Chihiro Koshimoto, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Yuji Kuge, Yujiro Asada. Arterial <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose uptake reflects thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor-κB in rabbit atherosclerotic lesions. *Circulation Journal*, 77, 2626-2635, 2013.

doi: 10.1253/circj.CJ-12-1463

Bo Jin, Keiji Mochida, Atsuo Ogura, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige.

Equilibrium vitrification of mouse embryos at various developmental stages. *Molecular Reproduction and Development*, 79, 785-794, 2012. doi: 10.1002/mrd.22113

Shinsuke H. Sakamoto, Satoshi N. Suzuki, Yousuke Degawa, Chihiro Koshimoto, Ryo O. Suzuki. Seasonal habitat partitioning between sympatric terrestrial and semi-arboreal Japanese wood mice, *Apodemus speciosus* and *A. argenteus* in spatially heterogeneous environment. *Mammal Study*, 37, 261-272. 2012.

doi: 10.3106/041.037.0401

Bo Jin, Yasunori Kawai, Takao Hara, Shoko Takeda, Shinsuke Seki, Yu-ichi Nakata, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai, Keisuke Edashige.

Pathway for the movement of water and cryoprotectants in bovine oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*, 85, 834-847, 2011.

doi: 10.1095/biolreprod.110.088641

[学会発表](計 23 件)

新見沙織, 北山みずほ, 竹下純隆, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. プタ卵子

の低温傷害に温度感受性 TRP チャンネルは関与しているか. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.

北山みずほ, 中田裕一, 新見沙織, 平川猛, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. Mitochondrial permeability transition pore の開口によるマウス卵子の耐凍性向上の試み. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.

平川猛, 佐々木智世, 北山みずほ, 竹下純隆, 新見沙織, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. ラット胚における水および耐凍剤に対する透過性と透過経路. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.

住友弘明, 竹下純隆, 新見沙織, 北山みずほ, 平川猛, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 水・耐凍剤チャンネルおよび不凍タンパクの発現によるゼブラフィッシュ Stage III 卵子の耐凍性向上の試み. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.

竹下純隆, 住友弘明, 山内健嗣, 新見沙織, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 水・耐凍剤チャンネルと不凍タンパクの発現によるゼブラフィッシュ Stage I 卵子の耐凍性向上の試み. 第 106 回日本繁殖生物学会大会, 2013 年 9 月 12~17 日, 東京農工大学農学部府中キャンパス, 府中市.

郡七海, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 赤木悟史, 保地眞一, 松川和嗣. ウシ線維芽細胞の培養時期が細胞周期および凍結乾燥後の DNA 損傷に与える影響. 第 117 回日本畜産学会大会, 2013 年 9 月 9~10 日, 新潟大学五十嵐キャンパス, 新潟市.

Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Mizuho Kitayama, Saori Niimi, Chihiro Koshimoto, Kazutsugu Matsukawa, Magosaburo Kasai. Aquaporin 9 plays a significant role in the channel-dependent movement of Me<sub>2</sub>SO and acetamide in mouse morulae. \* The 50th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 28-31, 2013. North Bethesda Marriott and Conference Center, Bethesda, Maryland. Kazutsugu Matsukawa, Nanami Kori, Shinichi Hochi, Satoshi Akagi, Keisuke Edashige, Magosaburo Kasai, Pasqualino Loi. Production of bovine blastocysts by nuclear transfer using freeze-dried fibroblast cells. The 46th Annual Meeting of the SSR, July 22-26, 2013, Montréal, Palais des congrès de Montréal, Montreal, Quebec.

佐々木智世, 平川猛, 北山みずほ, 越本知大, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 平衡ガラス化法によるラット胚の凍結保存. 第 60 回日本実験動物学会総会, 2013 年 5 月 15~17 日, つくば国際会議場, つくば市.

竹中由布, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 松川和嗣. アスコルビン酸 2 リン酸の発生培地への添加がウシ体外受精胚の発生に及ぼす影響. 第 116 回日本畜産学会大会. 2013 年 3 月 27 日~30 日, 安田女子大学 7, 9 号館, 広島市.

枝重圭祐. 動物生殖細胞の凍結保存技術

の開発研究。第6回ラットリソースリサーチ研究会/第1回実験動物科学シンポジウム(招待講演)2013年2月1日京都大学百周年時計台記念館,京都市。  
Atsushi Yamashita, Yan Zhao, Songji Zhao, Yunosuke Matsuura, Chihiro Sugita, Takashi Iwakiri, Kazuyo Ohe, Chihiro Koshimoto, Keiichi Kawai, Nagara Tamaki, Yuji Kuge, Yujiro Asada. <sup>18</sup>F-FDG uptake reflects thrombus formation and tissue factor expression via nuclear factor-κB in rabbit atherosclerotic lesions. American Heart Association, Scientific Session. Nov. 3-7, 2012, JW Marriott Los Angeles at LA Live, Los Angeles, California.  
西本あずさ, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 保地眞一, 松川和嗣. 予備凍結および保存温度が凍結乾燥ウシ体細胞のDNA損傷および核移植後の発生に及ぼす影響. 第105回日本繁殖生物学会大会. 2012年9月5日~8日, 筑波大学大学会館, つくば市。  
山内健嗣, 住友弘明, 有村隼, 新見沙織, 佐々木智世, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 水・耐凍剤チャンネルを発現させた未熟なゼブラフィッシュ卵子の耐凍性. 第105回日本繁殖生物学会大会. 2012年9月5日~8日, 筑波大学大学会館, つくば市。  
新見沙織, 杉岡篤, 佐々木智世, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. ガラス化凍結したマウス卵巣内の胞状卵胞内卵子の受精能と発生能. 第105回日本繁殖生物学会大会. 2012年9月5日~8日, 筑波大学大学会館, つくば市。  
有村隼, 北山みずほ, 関信輔, 佐々木智世, 新見沙織, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. マウス囊実胚でのDMSOとAcetamideの透過におけるAquaporin 9の役割. 第105回日本繁殖生物学会大会. 2012年9月5日~8日, 筑波大学大学会館, つくば市。  
Keisuke Edashige, Shinsuke Seki, Hayato Arimura, Kan Matsuo, Yu-ichi Nakata, Bo Jin, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. The role of aquaporin 9 in the movement of DMSO and acetamide in mouse morulae. SSR's 45th Annual Meeting of Society of the Study of Reproduction. August 12-15, 2012. The Alumni Hall at the Hetzel Union Building, The Pennsylvania State University, University Park, Pennsylvania.  
田仲梨絵, 有村隼, 松川和嗣, 葛西孫三郎, 枝重圭祐. 未熟なゼブラフィッシュ卵子の低温生物学的特性. 第104回日本繁殖生物学会大会, 2011年9月15日~17日, いわて県民情報交流センター・アイーナ, 盛岡市。  
長谷川由貴, 濱本圭祐, 保地眞一, 長尾さや子, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 松川和嗣. 凍結乾燥したウシ顆粒膜細胞の核移植に由来する胚盤胞の作出. 第104回日本繁殖生物学会大会, 2011年9月15日~17日, いわて県民情報交流センター・アイーナ, 盛岡市。  
長尾さや子, 濱本圭祐, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 保地眞一, 松川和嗣. ウシ体細胞の凍結乾燥後の保存法がDNA損傷度および核移植後の発生に及ぼす影響. 第114回日本畜産学会, 2011年8月26日~27日, 北里大学十和田キャンパス, 十和

田市.

- ②① Keisuke Edashige, Yohei Yamaji, Shinsuke Seki, Kazutsugu Matsukawa, Chihiro Koshimoto, Magosaburo Kasai. Developmental ability of vitrified mouse oocytes expressing water channels. The 48th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, July 24-27, 2011, The LaSells Stewart Center on the campus of Oregon State University, Corvallis, Oregon.
- ②② 枝重圭祐. EFSを用いた胚の凍結保存. LASセミナー2「胚・精子の凍結保存」. 第58回日本実験動物学会総会, 2011年5月25~27日, タワーホール船堀, 江戸川区.
- ②③ 持田慶司, 長谷川歩未, 枝重圭祐, 葛西孫三郎, 小倉淳郎. 緩慢融解が可能な新規マウス胚ガラス化保存法の開発. 第58回日本実験動物学会総会, 2011年5月25~27日, タワーホール船堀, 江戸川区.

〔図書〕(計3件)

葛西孫三郎. メディカルレビュー社, HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY Vol. 20 No. 2. 吉村泰典編, 生殖系列細胞の凍結の歴史と意義, 2013, 11-14頁.  
枝重圭祐. 日本冷凍空調学会, 冷凍空調便覧IV巻, 食品・生物編, 第8章動物細胞および動物組織 8・2 精液 8・2・2 水産動物, 2013, 332-333頁.  
枝重圭祐. 日本冷凍空調学会, 冷凍空調便覧IV巻, 食品・生物編, 第8章動物細胞および動物組織 8・3 動物胚と卵子 8・3・2 水産動物, 2013, 338-339頁.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 孫三郎 (KASAI Magosaburo)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 6 0 1 5 2 6 1 7

(2) 研究分担者

枝重 圭祐 (EDASHIGE Keisuke)  
高知大学・教育研究部総合科学系・教授  
研究者番号: 3 0 1 7 5 2 2 8

越本知大 (KOSHIMOTO Chihiro)  
宮崎大学・フロンティア科学実験総合センター・教授  
研究者番号: 7 0 2 9 5 2 1 0

松川 和嗣 (MATSUKAWA Kazutsugu)  
高知大学・教育研究部総合科学系・准教授  
研究者番号: 0 0 5 3 2 1 6 0

(3) 連携研究者

なし