

## マウス体外成熟由来 2 細胞期胚を用いた冷蔵輸送・保存方法の検討

西村愛美<sup>1</sup>、中牟田裕子<sup>2,3</sup>、福本紀代子<sup>2,3</sup>、近藤朋子<sup>2,3</sup>、春口幸恵<sup>2,3</sup>、竹下由美<sup>2,3</sup>、土山修治<sup>2</sup>、  
石川裕子<sup>4</sup>、石束祐太<sup>4</sup>、細井美彦<sup>1,4,5</sup>、三谷 匡<sup>5</sup>、竹尾 透<sup>2</sup>、中潟直己<sup>2</sup>、安齋政幸<sup>5</sup>

### 要旨

遺伝資源としての生殖細胞の保存および輸送方法の確立のために、従来の超低温下による凍結保存に変わる技術として、新たに私たちは初期胚の低温保存および冷蔵輸送方法を開発した。本研究では、排卵に至らない卵巣内に存在する未成熟卵子を用いて得られた体外受精由来 2 細胞期胚の冷蔵輸送方法および産子への発生能を検討した。成熟マウス卵巣内より GV 期卵子を回収し体外成熟後に発生した MII 期卵子 (1,722/1,920:90%) を透明帯穿孔処理により体外受精をおこなったところ 56%(552/992)の受精成績であり、83%(457/552)が 2 細胞期胚へと発生した。これらの胚は、近畿大学先端技術総合研究所 (和歌山) から熊本大学・CARD (熊本) 冷蔵輸送したところ、約 48 時間後における冷蔵保存胚は、100%(240/240)の生存成績であり、それらの一部の胚を移植した結果、10% (21/213)の産子を得た。以上の結果より、体外成熟由来 2 細胞期胚の冷蔵輸送・冷蔵保存が可能であることが示された。

### 1. 緒論

現在、様々な動物種において生殖工学技術の開発が進展し、特に、実験動物であるマウスでは体外受精や初期胚の培養技術は確立されており<sup>①</sup>、効率よく個体を作製することが可能になっている<sup>②</sup>。この体外受精操作に用いられる卵子は、過剰排卵処理にて得られる第二減数分裂中期の卵子を供している<sup>③</sup>。しかし、排卵される卵子は一部であり、卵巣内に存在するその多くの未成熟な卵子は回収されることなく死滅する運命にあるとされており<sup>④</sup>、このような未成熟卵子からの受精卵作出技術の構築が進められている。

一方、これまで開発されている疾患モデルや遺伝子操作動物の多くには、性成熟前に死亡したり性成熟に達しても交尾行動が出来ないために繁殖障害となる系統も多く認められる<sup>⑤</sup>。さらに、マウスにおける体外成熟卵子からの産子作出の報告は、Eppig ら<sup>⑥</sup>によって報告されているものの、その殆ど全てが交雑種系統由来あり<sup>⑦,⑧</sup>、遺伝的に均一な近交系からの受精卵の作出および産子への発生および供給システムの確立が急務である。

私たちは、このような低い繁殖能を呈する遺伝子操作マウスから卵巣を回収することで得られた未成熟卵子から、初期胚を作製することに成功し効率的な産子の作出を報告した<sup>⑨</sup>。また、これまで報告例のない近交系マウスからの未成熟卵子の体外成熟操作<sup>⑩</sup>および産子への発生能を明らかにした<sup>⑪</sup>。本研究では、卵巣内に存在する未成熟卵子の有効利用を目的に、遺伝資源保存のためのバイオリソース研究として新たに開発した冷蔵輸送・冷蔵保存操作を、私たちが開発した近交系マウスを用いた体外成熟由来 2 細胞期胚へも適用し、それらの発生能を検討した。

原稿受付 2011 年 11 月 24 日

1. 近畿大学大学院生物理工学研究科 生物工学専攻 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
2. 熊本大学生命資源研究・支援センター 動物資源開発部門 (CARD) 〒860-0811 熊本市本庄 2-2-1
3. 九動株式会社 〒841-0075 佐賀県鳥栖市立石町惣楽 883-1
4. 近畿大学生理工学部遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930
5. 近畿大学先端技術総合研究所 〒642-0017 和歌山県海南市南赤坂 14-1

## 2. 材料と方法

### 2. 1 供試動物

供試動物として、マウスは成熟齢に達した C57BL/6J(日本クレア(株))を用いた。また胚移植および里親マウスには MCH(ICR) (日本クレア(株))を用いた。これらのマウスは、入荷後 1 週間以上順化をおこない(明期: 7:00~19:00、暗期: 19:00~7:00) 供試した。また飼育条件として、室温  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 50% の飼育環境下において、飼料 (500N: 日本 SLC (株)) および飲水を自由摂取させた。

なお、本実験に際して動物実験の立案および実験動物の飼養と管理については、近畿大学動物実験規定に準じて実施した。

### 2. 2 未成熟卵子の回収

未成熟卵子の回収は、佐東らの報告に従って行った<sup>(10)</sup>。成熟齢に達した C57BL/6J 雌マウスを、妊馬血清性腺刺激ホルモン (あすか製薬 (株)) を 7.5 単位腹腔内投与し、投与後 46 時間後に卵巣を摘出した。続いて、0.1% ヒアルロニダーゼを含んだ mCZB-HEPES 培地中において、注射針を用いて卵巣を細切することで、卵巣から卵丘細胞を含む卵核胞期卵子 (GV 期卵子) を回収した。続いて回収した GV 期卵子は、同培地中にてピペッティングによって卵丘細胞を除去した後、TYH と  $\alpha$ MEM を 1:1 にて混合した TaM 培地に 5% FBS を添加した修正 TaM 培地 (以下、mTaM 培地) に移し、1 ドロップ 50  $\mu\text{L}$  中に 30~50 個の GV 期卵子を炭酸ガスインキュベーター内 ( $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  in air) で、16 時間培養をおこない成熟させた。その後、顕微鏡下で卵子の確認をおこない核膜崩壊が見られたものを、第二減数分裂中期へ発生した体外成熟卵子 (MII 期卵子) とした。

### 2. 3 体外成熟卵子の透明帯レーザー穿孔処理操作

MII 期へ成熟した体外成熟卵子は、レーザー光による透明帯穿孔処理法<sup>(12)</sup> に従い、透明帯に僅かな穿孔処理を施した。mTaM 培地下にて回収した体外成熟由来 MII 期卵子をレーザー穿孔装置 (XYClone: ニッコー・ハンセン(株)) を取り付けした倒立顕微鏡 (IX70: オリンパス(株)) のステージ上に移動させた。続いて卵細胞質と囲卵腔とのスペースが最も広い 1 ヶ所に照準を合わせ、レーザー波長および出力はそれぞれ 1,480nm、300mW とし、照射時間は、120 $\mu\text{sec}$  にて赤色レーザー光を照射した。レーザー穿孔処理後の卵子は、透明帯にそれぞれ直径約 6  $\mu\text{m}$  の穿孔 (図 1, 2) を確認した後、生存卵子は、引き続き mTaM 培地中で媒精直前まで炭酸ガスインキュベーター内で静置した。

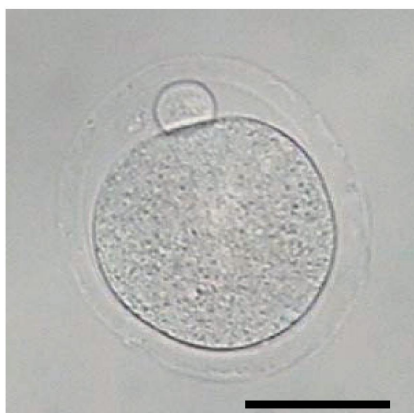


図 1. レーザー穿孔前の MII 期卵子  
Scale bar = 50 $\mu\text{m}$

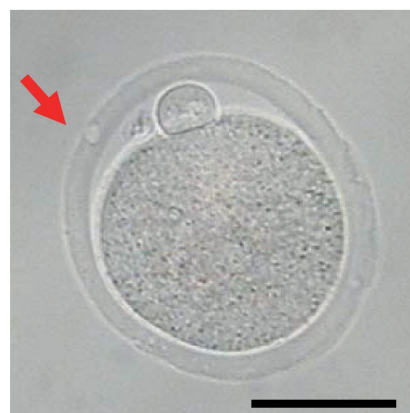


図 2. レーザー穿孔後の MII 期卵子  
矢印は穿孔箇所(直径約 6  $\mu\text{m}$ )を示す。  
Scale bar = 50 $\mu\text{m}$

## 2. 4 体外成熟由来卵子の体外受精操作

体外受精は豊田らの方法にほぼ準じておこなった<sup>(13)</sup>。同系統の成熟雄マウスの精巣上体尾部より採取した新鮮精子は、2 mM ハイポタウリンを添加<sup>(14)</sup>した修正 HTF 培地（アーク・リソース（株））にて、1.5 時間培養し受精能を獲得させた。次に透明帯穿孔処理を施した体外成熟卵子へ媒精（精子濃度：8.0×10<sup>2</sup>μL）をおこなった。媒精後 6 時間で雌雄前核形成の有無を確認した後、KSOM 培地（アーク・リソース（株））で卵子の洗浄をおこない、引き続き炭酸ガスインキュベーター内で 18 時間培養し 2 細胞期へ発生させた。体外受精 24 時間後に得られた正常な 2 細胞期胚を洗浄後、冷蔵輸送・保存およびガラス化保存に供した。

## 2. 5 冷蔵輸送・保存操作およびガラス化保存操作

体外受精後、2 細胞期へ発生した胚の冷蔵輸送および冷蔵保存操作は、Nishimura らの方法に準じておこなった<sup>(15)</sup>。得られた 2 細胞期胚を M2 培地にて洗浄した後、少量の M2 培地と共に胚をテストチューブへ移し予め冷却した梱包箱へ格納した。冷蔵輸送方法は、梱包箱を保冷状態にてクール宅配便による、近畿大学先端技術総合研究所（和歌山）から熊本大学・CARD（熊本）への冷蔵輸送を実施した。また、到着後のこれらの胚は、胚移植をおこなうまで冷蔵庫内にて約 24 時間保存した。

一方、簡易ガラス化法による 2 細胞期胚の保存操作<sup>(16)</sup>は、2 細胞期胚を 1M DMSO (in PB1) 溶液にて平衡状態にした後、凍結チューブに 5 μL の 1M DMSO と共に胚を移した。続いて 0°C に設定した冷却装置（CHILL HEAT IWAKI）にて 5 分間凍結チューブを冷却した。次に、予め 0°C に冷却したガラス化保存液 DAP213（2 M Dimethyl sulfoxide, 1 M Acetamide, 3 M Propylene glycol in PB1）を 95 μL 添加し、さらに 5 分間冷却した後、液体窒素中（−196°C）に浸漬することにより超急速的におこなった。

## 2. 6 冷蔵輸送・保存操作胚およびガラス化保存胚の胚移植操作

冷蔵輸送された胚の回収方法は、テストチューブから全容量の M2 培地と共に 2 細胞期胚を回収し、予め通気していた KSOM 培地にて 3 回洗浄後、胚の形態学的観察をおこなった。

一方、ガラス化保存した胚については、保管容器から凍結チューブを取り出し室温下にて 20～30 秒静置した後、予め 37°C に温めていた 0.25 M Sucrose (in PB1) 溶液をすばやく、凍結チューブ内に 900 μL 注ぎ、ピペティングにて加温した。回収された 2 細胞期胚を KSOM 培地にて 3 回洗浄後、胚の形態学的観察をおこなった。それぞれの生存胚は、約 1 時間炭酸ガスインキュベーター内で回復培養をおこなった後、偽妊娠第 1 日目のレシピエント雌（Jcl:MCH(ICR)) マウスの卵管内へ移植し<sup>(17)</sup>、産子への発生について検討した。

## 3. 統計学的処理

本実験操作において、冷蔵輸送・保存胚とガラス化保存胚との回収成績、生存成績および移植成績における統計処理は、それぞれ分散分析値を求めた後、Fisher の PLSD により解析した（Stat View-J 5.0）。

## 4. 結果

C57BL/6J マウスに PMSG 投与後 46 時間で卵巣から未成熟卵子を回収し、修正 TaM 培地を用いた体外成熟成績を Table 1. に示す。形態学的に観察し、卵核胞の崩壊を認めたそれらの体外成熟率は 90%（1,722/1,920）と高い体外成熟成績を示した。

Table 1. C57BL/6J 由来体外成熟卵子を用いた体外成熟成績

GV 期卵子数	MII 期卵子発生数	成熟率 (%)
1,920	1,722	90

Table 2.には、体外成熟後に正常に発生した卵子をレーザー穿孔処理により透明帯穿孔を施した後、体外受精に供試した結果を示した。この体外成熟卵子を用いた同系統雄マウスとの体外受精率は 56% (552/992) であり、その後の 2 細胞期胚への発生は 83% (457/552) であった。

Table 2. C57BL/6J 由来体外成熟卵子を用いた体外受精および初期胚発生成績

供試卵子数	受精卵子数 (%)	多精子卵子数 (%)	2 細胞期胚発生数 (%)
992	552 (56)	13 (1)	457 (83)

図 3 には、これら発生した 2 細胞期胚の冷蔵保存およびガラス化保存を適用したそれぞれの回収成績と生存成績を示した。M2 培地で洗浄した後、同培地を含むテストチューブに移した胚を、近畿大学総合研究所（和歌山）から、熊本大学・CARD（熊本）まで約 24 時間を要し冷蔵で輸送し、冷蔵時間が 48 時間になるまで 4℃で保存したところ、輸送後の冷蔵胚は 100% (240/240) を回収することができ、100% (240/240) の生存率であった。また、これまで多く輸送形態として使用されているガラス化保存操作を用いた、体外成熟由来 2 細胞期胚の加温後における回収成績は、99% (118/119) であり、それらの胚の生存成績は 86% (102/118) であった（図 3.）。なお、両者間における胚の回収および生存性には有意差は認められなかった( $P>0.05$ )。

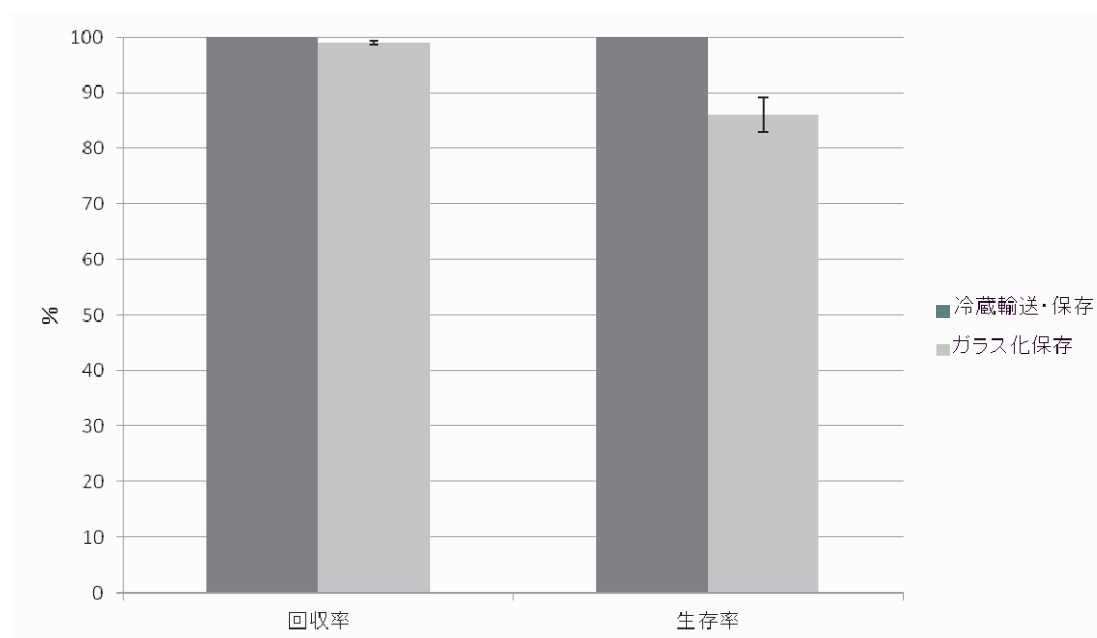


図 3. 体外成熟由来 2 細胞期胚を用いた各保存操作における回収および生存成績

Table 3.には、それぞれの保存条件下における、体外成熟卵子を用いた体外受精由来 2 細胞期胚の移植成績を示した。回収した 2 細胞期胚を KSOM 培地で洗浄し回復培養をおこない形態学的に正常と認められた一部の胚を移植したところ、冷蔵輸送・保存胚では 10% (21/213)。一方、ガラス化-加温後の移植成績は 6% (5/79)の産子率であり、両者間に有意な差は認められなかった( $p>0.05$ )。

Table 3. 冷蔵輸送後の C57BL/6J 体外成熟由来 2 細胞期胚の移植成績

試験区	移植胚数	移植匹数	着床匹数	産子数 (%)	雌雄	
					♀	♂
冷蔵輸送・保存	213	11	10	21(10)	8	13
ガラス化-加温	79	4	3	5 (6)	2	3

## 5. 考察

卵巣内未成熟卵子の体外成熟操作は、培地によって大きくその成熟成績およびその後の発生率を左右することが知られている<sup>(18)</sup>。また体外成熟培養は、未成熟卵子周囲に存在する卵丘細胞の有無により培養条件は変化する<sup>(19)</sup>。Miki ら<sup>(20)</sup>は、交雑種系統における裸化卵子を用いて良好な体外成熟成績を示す TaM 複合培地を開発し、浸透圧作用により発生阻害に左右されることなく、内在するミトコンドリアや微小管の分布が改善され、体外での成熟成績および発生能が向上することを報告した。私たちは、TaM 複合培地に少量の FBS を添加した修正 TaM 培地を開発した。これは、FBS 内には様々な成長因子やホルモンが含まれ、卵胞液中に存在する Midkine や Leptin などの成長因子は細胞質成熟を促進することが示されている<sup>(21, 22)</sup>。また、血清中に含まれる Fetuin は透明帯硬化を和らげる効果があると示されており<sup>(23)</sup>、近交系に由来する本実験においても細胞質内変性を抑制し高い成熟成績を得られることが確認された。

マウスなど哺乳類では、卵子側の ZP3 に含まれる O 結合オリゴ糖が精子と透明帯を接着することが知られており、接着が起こることで精子頭部の先体反応が誘導されると示唆されている<sup>(24)</sup>。先体反応ではアクロシン、コラゲナーゼなど多くの加水分解酵素が放出される。特にアクロシンは、先体内容物の放出を促進させることで、先体からのタンパク質の放出が精子の透明帯を通過するために重要であることが示唆されている<sup>(25)</sup>。しかしながら、透明帯を除去した卵子では受精をおこなえることから、透明帯は受精を起こす為に必須な活性化を起こさせるわけではない<sup>(26)</sup>。一方、体外成熟卵子は透明帯の硬化によって受精率が低率になることも示されている<sup>(27)</sup>。本実験では、体外成熟卵子の体外受精成績はレーザー穿孔処理をおこない、精子濃度を  $8.0 \times 10^2/\mu\text{L}$  にすることで、安定して 50%以上の成績を得ることができている。これらは、培地内の精子濃度を濃くすることで、卵子に接着する精子の数の増加に伴い、培地内で透明帯通過を行うための先体内容物の増加が透明帯硬化の起こった体外成熟卵子の透明帯通過を容易にしていると考えられる<sup>(28)</sup>。

遺伝資源の保存と供給に関してマウスやラットでは、胚・配偶子凍結保存技術<sup>(29, 30)</sup>が開発され、飼育スペースや労力などの観点や系統管理<sup>(31)</sup>さらに輸送の簡便性からも有用性が高い<sup>(32)</sup>。しかしながら、ガラス化保存されたマウス胚は、 $-140^\circ\text{C}$ を超えて加温してしまうと胚の生存性が著しく低下するため加温操作

には一定の習熟が必要とされる<sup>(33)</sup>。このような問題点を解決するため、近年では初期胚を冷蔵状態で輸送する技術が普及しつつある<sup>(32)</sup>。この技術は初期胚を 4℃ 下の状態で輸送でき、その後の産子作出が可能であることが報告されている<sup>(34)</sup>。加えて、胚到着後の融解あるいは加温作業を必要としないため、到着後すぐに胚移植することが可能なこと、凍結胚と比較して、輸送コストが安いことが上げられている<sup>(32)</sup>。これらのことを組み合わせることにより依頼者の日程や要望に応えた、初期胚を冷蔵での輸送にて実施することは、依頼者が体外受精操作や得られた初期胚の凍結保存技術などの煩雑な作業をおこなう必要がなく、貴重な胚の死滅や紛失などが軽減され、さらに安定した初期胚の供給が可能になると思われた。

本実験において、ガラス化保存胚と冷蔵輸送・保存操作をおこなったいずれの胚でも、生存成績および産子発生成績に顕著な差は認められず、保存期間が短期間の場合、冷蔵輸送・保存が有用であることを認め、さらに冷蔵輸送では胚の死滅や紛失が殆ど起こらないことを認めた。近年、体外発育・体外成熟由来 2 細胞期胚のガラス化・加温操作後の産子作出報告がされており、2 細胞期胚で保存した場合、胚盤胞期の内部細胞塊数や栄養外胚葉数は変化せずガラス化・加温後も高い産子成績を示している<sup>(35)</sup>。しかしながら、C57BL/6 系統を用いて低温保存処理をおこなわない産子成績と比較すると低率であった<sup>(11)</sup>。これは、近交系マウスを用いた場合、卵子核や細胞質成熟が不完全であると報告<sup>(36)</sup>されているため、体外成熟由来 2 細胞期胚はガラス化保存または冷蔵輸送・保存下における低温ストレスを受けやすく、その後の発生成績に影響した可能性が考えられた。

マウス体外成熟卵子から作成された初期胚を用いた保存操作の殆どは、幼若齢の交雑種マウスが用いられている<sup>(35)</sup>。成熟齢に達した近交系マウスからの体外成熟由来初期胚を用いた冷蔵輸送・保存操作における産子作出の報告は今までになく、今回私たちが初めておこなった。上述のように、爆発的な勢いで作出されている様々な遺伝子操作マウスや疾患モデルマウスの多くの系統には、成熟齢に達し排卵障害や妊孕性を失う場合があり、系統維持と保存そして供給が損なわれる。今回示した卵巣内に存在する未成熟卵子を体外成熟して得られる効率的な 2 細胞期胚の作製方法および冷蔵輸送・保存あるいはガラス化保存におけるその後の個体供給体制が可能であることは、今後の系統維持方法の改善およびバイオリソース化が十分に期待できると思われる。

## 6. 引用文献

- (1) Niwa, K., Araki, M. and Iritani, A. (1980). Fertilization in vitro of Eggs and First Cleavage of Embryos in Different Strains of Mice. *Biol. Reprod.* 22:1155-1159.
- (2) Suzuki O., Asano T., Yamamoto Y., Takano K., Koura M. (1996). Development in vitro of Preimplantation Embryos from 55 Mouse Strains. *Reprod. Fertil. Dev.* 8:975-980.
- (3) 豊田裕, 横山峯介, 星冬四郎. (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究 II. 精子侵入時期に及ぼす精子体外培養の効果. *家畜繁殖誌*. 16:152-157.
- (4) Krysko DV., Diez-Fraile A., Criel G., Svistunov AA., Vandenabeele P., D'Herde K. (2008). Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. *Apoptosis*. 13:1065-1087.
- (5) Sun QY., Liu K., Kikuchi K. (2008). Oocyte-Specific Knockout: A Novel In Vivo Approach for Studying Gene Functions During Folliculogenesis, Oocyte Maturation, Fertilization, and Embryogenesis. *Biol. Reprod.* 79:1014-1020.

- 
- (6) Eppig JJ, Schroeder AC. (1989). Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. *Biol Reprod.* 41:268-276.
  - (7) Hasegawa, A., Mochida, N., Ogasawara, T., and Koyama, K. (2006). Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 86:1182-1192.
  - (8) Cross, P.C., and Brinster, R. L. (1970). In Vitro development of Mouse Oocytes. *Biol. Reprod.* 3:298-307.
  - (9) 大本夏未, 西村愛美, 柳美穂, 川辺敏晃, 西山有依, 三谷匡, 安齋政幸. (2010). 遺伝子改変マウス卵を用いた体外成熟による産子獲得の検討. 日本実験技術者協会 関東支部第 35 回懇話会講演要旨集.
  - (10) 佐東春香, 西村愛美, 森田真裕, 古田祐奈, 柳美穂, 安齋政幸. (2009). 近交系 C57BL/6 マウスの未成熟卵子を用いた体外成熟および発生能の検討. *実験動物技術.* 44:43-48.
  - (11) 西村愛美, 大本夏未, 西山有依, 柳美穂, 三谷匡, 細井美彦, 入谷明, 安齋政幸. (2010). C57BL/6 系未成熟卵子を用いた成熟後におけるレーザー穿孔処理・体外受精方法の検討. *近畿大学先端研紀要.* 15:27-35.
  - (12) Anzai M., Nishiwaki M., Yanagi M., Nakashima T., Kaneko T., Taguchi Y., Tokoro M., Shin SW., Mitani T., Kato H., Matsumoto K., Nakagata N. and Iritani A. (2006). Application of laser-assisted zona drilling to in vitro fertilization of cryopreserved mouse oocytes with spermatozoa from a subfertile transgenic mouse. *J Reprod Dev.* 52:601-606.
  - (13) 豊田裕, 横山峯介, 星冬四郎. (1971). マウス卵子の体外受精に関する研究 I. 精巣上体精子による受精成績. *家畜繁殖誌.* 16:147-151.
  - (14) 宮地志織, 安齋政幸, 古田祐奈, 柳美穂, 中島竜之, 川辺敏晃, 金子武人, 中瀬直己. (2008). 各種系統由来ガラス化保存透明帯穿孔卵子を用いた体外受精の検討. *実験動物技術.* 43: 25-29.
  - (15) Nishimura M., Fukumoto K., Nakmuta Y., Hosoi Y., Takeo T., Naomi, N. and Anzai, M. (2011). Transport of 2-cell embryos produced by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) at cold temperatures (4°C). *Memoirs of The Faculty of B.O.S.T. of Kinki University.* 28:109-115.
  - (16) Nakao K., Nakagata N., Katsuki M. (1997). Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim.* 46:231-234.
  - (17) Horgan B., Costantini F., Lacy E. (1986). Manipulating the Mouse Embryo. pp.125-141. Cold Spring Harbor Laboratory.
  - (18) de Araujo CH., Nogueira D., de Araujo MC., Martins Wde P., Ferriani RA., dos Reis RM. (2009). Supplemented tissue culture medium 199 is a better medium for in vitro maturation of oocytes from women with polycystic ovary syndrome women than human tubal fluid. *Fertil Steril.* 91:509-513.
  - (19) Cekleniak NA., Combelles CM., Ganz DA., Fung J., Albertini DF., Racowsky C. (2001). A novel system for in vitro maturation of human oocytes. *Fertil Steril.* 75:1185-1193.
  - (20) Miki H., Ogonuki N., Inoue K., Baba T., Ogura A. (2006). Improvement of cumulus-free oocytes maturation in vitro and its application to microinsemination with primary spermatocyte in Mice. *J. Reprod. Dev.* 52:239-248.

- (21) Ikeda S., Ichihara-Tanaka K., Azuma T., Muramatsu T., Yamada M. (2000). Effects of midkine during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent developmental competence. *Biol Reprod.* 63:1067-1074.
- (22) Craig J., Zhu H., Dyce PW., Petrik J., Li J. (2004). Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.* 145:5355-5363.
- (23) Kalab P., Kopf GS., Schultz RM. (1991). Modifications of the mouse zona pellucida during oocyte maturation and egg activation: effects of newborn calf serum and fetuin. *Biol. Reprod.* 45:783-787.
- (24) Bleil JD., Wassarman PM. (1990). Identification of a ZP3-binding protein on acrosome-intact mouse sperm by photoaffinity crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:5563-5567.
- (25) Fraser LR. (1982). p-Aminobenzamidine, an acrosin inhibitor, inhibits mouse sperm penetration of the zona pellucida but not the acrosome reaction. *J Reprod Fertil.* 65:185-194.
- (26) Baba T., Azuma S., Kashiwabara S., Toyoda Y. (1994). Sperm from mice carrying a targeted mutation of the acrosin gene can penetrate the oocyte zona pellucida and effect fertilization. *J Biol Chem.* 16-269:31845-31849.
- (27) Eppig JJ., Wigglesworth K., O'Brien MJ. (1992). Comparison of embryonic developmental competence of mouse oocytes grown with and without serum. *Mol Reprod Dev.* 32:33-40.
- (28) 西村愛美, 西山有依, 柳美穂, 川辺敏晃, 三谷匡, 細井美彦, 安齋政幸. (2010). C57BL/6 体外成熟卵子を用いた透明帯レーザー穿孔処理後における媒精濃度が体外受精受精成績に与える影響. *J. Mamm. Ova Res.* 27:62.
- (29) Whittingham DG., Leibo SP. and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 178:411-414.
- (30) Rall WF., Fahy GM. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature.* 313:573-575.
- (31) Yoshiki A., Ike F., Mekada K., Kitaura Y., Nakata H., Hiraiwa N., Mochida K., Ijuin M., Kadota M., Murakami A., Ogura A., Abe K., Moriwaki K. and Obata Y. (2009). The mouse resources at the RIKEN BioResource center. *Exp Anim.* 58:85-96.
- (32) Takeo T., Kondo T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Nakagawa Y., Takeshita Y., Nakamuta Y., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Fujikawa R., Nomaru K., Kaneko T., Itagaki Y. and Nakagata N. (2010). Short-term storage and transport at cold temperatures of 2-cell mouse embryos produced by cryopreserved sperm. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 49:415-419.
- (33) Kasai M., Komi JH., Takakamo A., Tsudera H., Sakurai T. and Machida T. (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil.* 89:91-97.
- (34) Takeo T., Kaneko T., Haruguchi Y., Fukumoto K., Machida H., Koga M., Nakagawa Y., Takeshita Y., Matsuguma T., Tsuchiyama S., Shimizu N., Hasegawa T., Goto M., Miyachi H., Anzai M., Nakatsukasa E., Nomaru K., Nakagata N. (2009). Birth of mice from vitrified/warmed 2-cell embryos transported at a cold temperature. *Cryobiology.* 58:196-202.



- (35) Motohashi HH., Sankai T., Kada H. (2011). Live offspring from cryopreserved embryos following in vitro growth, maturation and fertilization of oocytes derived from preantral follicles in mice. J. Reprod. And. Dev. Epub ahead of print.
- (36) Marín Bivens CL., Grøndahl C., Murray A., Blume T., Su YQ., Eppig JJ. (2004). Meiosis-activating sterol promotes the metaphase I to metaphase II transition and preimplantation developmental competence of mouse oocytes maturing in vitro. Biol. Reprod. 70:1458-1464.

## 英文抄録

### Investigation of transport and preservation at cool temperature using mice 2-cell stage embryos produced by *in vitro* maturation

Manami Nishimura<sup>1</sup>, Yuko Nakamuta<sup>2,3</sup>, Kiyoko Fukumoto<sup>2,3</sup>, Tomoko Kondo<sup>2,3</sup>, Yukie Haruguchi<sup>2,3</sup>, Yumi Takeshita<sup>2,3</sup>, Syuuji Tsuchiyama<sup>2</sup>, Yuuko Ishikawa<sup>4</sup>, Yuuta Ishizuka<sup>4</sup>, Yoshihiko Hosoi<sup>1,4,5</sup>, Tasuku Mitani<sup>5</sup>, Toru Takeo<sup>2</sup>, Naomi Nakagata<sup>2</sup> and Masayuki Anzai<sup>5</sup>.

We developed transport and preservation at cool temperature of early embryo for substitution of traditional vitrification technique to establish preservation and transport method of Bio Resource as for gamete. This study was investigation of transport and preservation at cool temperature and development of live youngs using mice 2-cell stage produced by *in vitro* matured oocytes. *In vitro* matured oocytes (90%:1,722/1,920) obtained from C57BL/6J ovary were fertilized using laser optimal system (56%: 552/992). Fertilized eggs were developed to 2-cell stage (83%:457/552). Sampling tubes containing 2-cell stage embryos produced by *in vitro* fertilization were send to the Center for Animal Resources and Development (CARD), Kumamoto University, Kumamoto from the Institute of Advanced Technology, Kinki University, Wakayama. At CARD, the embryos were recovered from the sampling tubes. The rate of viable 2-cell stage embryos after transport was 100% (240/240). Collected 2-cell stage embryos were transferred into the oviducts of pseudopregnant females on the day that a vaginal plug was found (Day 1 of pseudopregnancy). Two cell stage embryos transferred to oviducts were developed to live youngs (10%: 21/213).

1. Division of Biological Science, Graduate School of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University. Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.

2. Division of Reproductive Engineering, Center for Animal Resources and Development (CARD), Kumamoto University. Kumamoto, 860-0811, Japan.

3. Kyudo Co., Ltd. Tosu, Saga, 841-0075, Japan.

4. Development of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University. Kinokawa, Wakayama, 649-6493, Japan.

5. Institute of Advanced Technology, Kinki University. Kainan, Wakayama, 649-0017, Japan.