

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成25年9月12日 (2013.9.12)

【公表番号】特表2012-501187(P2012-501187A)

【公表日】平成24年1月19日 (2012.1.19)

【年通号数】公開・登録公報2012-003

【出願番号】特願2011-525249(P2011-525249)

【国際特許分類】

C 1 2 N 15/873 (2010.01)

C 1 2 N 5/073 (2010.01)

A 0 1 K 67/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 15/00 K

C 1 2 N 5/00 2 0 2 B

A 0 1 K 67/02

【誤訳訂正書】

【提出日】平成25年8月5日 (2013.8.5)

【誤訳訂正 1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【発明の詳細な説明】

【発明の名称】ブタ胚をガラス化する高スルーットおよび非侵襲的方法

【技術分野】

【0 0 0 1】

助成金記載

本発明は、国立保健研究機構 (National Institutes of Health) からの助成金番号 R 0 1 R R 0 1 3 4 3 8、および助成金番号 U 4 2 R R 0 1 8 8 7 7 の下、政府の支援により一部が行われた。政府は、発明における一定の権利を有する。

【0 0 0 2】

本発明は、ブタ胚の保存の方法、特にインビトロ産生されたブタ胚を保存する新規および改善された方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

初期哺乳類の胚の凍結保存の成功は、生殖質の保存、ならびに遺伝学の国家的および国際的運動に好機を提供する。残念ながら、ブタ胚は、多くの哺乳類の胚よりも凍結保存が困難であった。ブタ胚が低体温状態に非常に感応性があり、細胞内脂質 (脱脂質) の除去がこの感応性を軽減すると見られるという観察に基づき、ブタ胚の凍結保存の成功へと大きく進歩している [1 ~ 4]。ほとんどの研究は、インビトロ産生された胚よりも発生的に有能であると見なされることから、インビボ産生された胚に焦点を合わせている。機械的脱脂質の代替には、細胞骨格の不安定化 [5]、またはガラス化状態の変化 [6 ~ 8] が含まれる。

【0 0 0 4】

インビボ産生胚の凍結保存に関する先の研究によると、無傷の透明帯を持つブタ卵母細胞または胚を遠心分離後、偏光脂肪滴は、橋様構造を介して卵母細胞の細胞質または胚の卵割球と、結合したままである傾向がある [1 1]。偏光脂肪滴は、その後の培養または

凍結保存手順中、卵母細胞または卵割球へと再分布し得る。囲卵腔が拡大された場合、橋様構造は、遠心分離後破壊され、脂肪滴は、卵母細胞の細胞質または胚の卵割球へ再分布されることはないが、無傷の透明帯内に残る。したがって、インピボ由来胚は、凍結保存前に、脂質再分布を防止するため、遠心分離後即時に、凍結保存される必要がある[12]。

【0005】

先の研究はまた、脂肪滴が、ブタ胚の初期に豊富かつ大きく、胚が、胚盤胞期へ、ならびに胚盤胞期を越えて進むに従い、サイズおよび存在量が次第に減少することを発見した[15、16]。興味深いことに、初期胚の大きな脂肪滴は、後期胚における小さな液滴よりも、容易に遠心分離により除去される。

【0006】

インピトロ受精(IVF)または核移植(NT)による胚由来等の、ブタ胚のインピトロ産生は、疾患モデル、または異種移植に対し潜在性のある臓器ドナーを作成するため使用された。結果として、インピトロ産生胚の効果的凍結保存に対する需要が、著しく増加した。しかしながら、インピトロ産生された(IVP)胚は、ましてやさらに凍結保存に対し感応性があり、したがって、インピボ産生された対応物よりも、凍結保存がさらに困難である[9]。

【0007】

これまでのところ、IVP胚を凍結保存に対して、極めて限られた成功しか達成されていない。2006年、発明者の研究室は、凍結保存されたNT胚[9]より産生された、2リットルの形質転換された子ブタを報告した。後に、Nagashimaら[10]は、凍結保存されたIVF由来胚より産生された子ブタを報告した。しかしながら、IVFまたはNT由来胚のこれら成功報告の双方の凍結保存は、遠心分離および顕微操作を介し、機械的脱脂質を使用した[9、10]。機械的脱脂質は、顕微操作中に透明帯へ損傷を与えるため、病原体の伝染の可能性を実質的に増加させる。それはまた、重労働であり、時間のかかるものである。

【0008】

2つの他のグループ[13、14]は、ブタ単為生殖の胚およびハンドメイドクローン胚の凍結保存の生存性を改善するため、部分的消化酵素およびその後の遠心分離を用いる試みを報告した。具体的に、トリプシン、プロナーゼ、または別の酵素により該透明帯が部分的に消化された場合、それは、サイズにおいて肥大し、卵母細胞形質膜および該透明帯間の空間の量の増加をもたらす。したがって、卵母細胞または胚が遠心分離された場合、脂質が完全に分離するために十分な空間が存在する。しかしながら、部分的な消化酵素処置は、脂質分離のための使用の場合、いくつかの不都合を有する。例えば、酵素(トリプシンまたはプロナーゼ等)は、卵母細胞の単為生殖の活性を誘発し得る。加えて、消化酵素処置は、一貫しては効き得ず、酵素処置の効果が酵素の個々のバッチに過度に依存するため、小グループで厳密に観察かつ監視される必要がある。さらに、どちらのグループも、消化酵素および遠心分離方法の組み合わせを使用する凍結保存胚からの、いずれの子ブタ産生も報告していない。

【0009】

したがって、研究および商業目的に好適である、IVP(IVF由来またはNT由来等)ブタ胚の脂質分離および凍結保存の実践的かつ非侵襲的な方法を開発する必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の一態様において、インピトロ産生された(IVP)(インピトロ受精(IVF)由来または核移植(NT)産生された)ブタ胚の細胞質からの脂質を分離または除去する新規および改善された方法が説明される。本発明の脂質除去方法は、(1)1細胞期または卵割期(胚細胞緊密化前)にIVPブタ胚を産生するステップと、(2)凝縮胚を産

生するために胚を凝縮するステップと、(3)脂質分離胚を産生するために、細胞質から脂質を分離し凝縮胚を遠心分離するステップと、を含む。

【0011】

本発明の方法の一実施形態により、胚の体積は、高浸透圧重量モル濃度処置を介し、凝縮され得る。特に、胚細胞緊密化前の1細胞期または卵割期のIVFまたはNT由来胚を、事前に決定された短期間、前の培養培地よりもより大きな事前に選択された浸透圧重量モル濃度を持つ培地に暴露することができる。培地の浸透圧重量モル濃度は、任意の標準手順に従って、NaCl等の塩、ショ糖、ラフィノース、フルクトース、マンニトール、またはトレハロース等の糖、またはDMSO等の他の有機試薬、あるいはエチレングリコールを培地へ添加することにより、調節することができる。

【0012】

本発明の別の態様において、脂質分離されたIVFまたはNT由来のブタ胚の凍結保存およびその後の移植のための新規および改善された方法が説明される。該脂質分離されたブタ胚は、胚盤胞期、およびガラス化に供するさらなる胚発生後、凍結保存することができる。該ガラス化胚は、加温し、その透明帯を除去し、レシピエント(代理ブタ等)へと移植することができる。

本発明の好ましい実施形態では、例えば以下が提供される：

(項目1)

IVPブタ胚の脂質分離の方法であって、

(a) 胚細胞緊密化前の1細胞期または卵割期にIVPブタ胚を産生することと、

(b) 凝縮胚を産生するために、かかる胚を、短時間、事前に選択された浸透圧重量モル濃度を持つ培地に暴露することと、

(c) 脂質分離胚を産生するために、かかる凝縮胚を、事前に選択された速度で事前に選択された期間、遠心分離することと、を含む、方法。

(項目2)

前記IVPブタ胚が、インピトロ受精、核移植、または他のインピトロ方法を介し産生される、項目1に記載の方法。

(項目3)

前記培地の浸透圧重量モル濃度が、約300mOsmo~約500mOsmoの範囲である、項目1に記載の方法。

(項目4)

前記遠心分離条件が、13,400×gの速度で約6~約20分の範囲である、項目4に記載の方法。

(項目5)

インピトロ産生されたブタ胚の凍結保存および回復の方法であって、

(a) 胚細胞緊密化前の1細胞期または卵割期に、インピトロ産生されたブタ胚を産生することと、

(b) 凝縮胚を産生するために、前記胚を、事前に選択された浸透圧重量モル濃度に短時間、暴露することと、

(c) 脂質分離胚を産生するために、前記凝縮胚を遠心分離することと、

(d) 脂質分離胚盤胞を産生するために、前記脂質分離胚を、胚盤胞期へ培養することと、

(e) ガラス化または凍結により、前記胚盤胞を凍結保存することと、

(f) 加温、再水和、および透明帯の除去により、前記胚盤胞を回復することと、

(g) 前記帯除去胚盤胞を、レシピエントへ移植することと、を含む、方法。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】図1は、本発明の凍結保存および回復過程のフローダイアグラムである。

【図2】図2(a)から(f)は、高浸透圧重量モル濃度処置後のインピトロ受精由来胚の発生の写真である。

【図 3】図 3 (a) から (f) は、高浸透圧重量モル濃度処置後の N T 由来胚の発生の写真である。

【図 4】図 4 は、異なる浸透圧モル濃度 (N a C l またはショ糖により調節された) (列 1) で処置された胚の写真、および遠心分離 (列 2) 後即時のそれらの対応の写真を含む。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 4 】

別途定義されない限り、本明細書で使用するすべての技術的および科学的用語は、本発明が属する技術分野に精通する者によって一般的に理解されるものと同一の意味を有する。本明細書で言及されたすべての発行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、参照することによって、その全体が組み込まれる。

【 0 0 1 5 】

本発明は、先の研究に基づき、初期胚発生段階での脂質除去、または分離が I V P (I V F または N T 由来) プタ胚の凍結保存に対し重要であり、それは部分的酵素消化法による透明帯の膨化に加えて、I V P プタ胚の囲卵腔は、容易な脂質除去 / 分離を可能とするため胚の体積を凝縮することにより、拡大し得ることを教示する。本発明はまた、高浸透圧重量モル濃度処置への I V P 胚の暴露が、胚を凝縮し得るが、胚の活力を保存し得ることを開示する。さらに、本発明の脂質分離方法は、一度に複数の胚を処置するために用いられ、現在の脱脂質手順とは対照的に、それは、それぞれ個々の卵母細胞または胚の顕微操作を必要とするため用いられ得る。

【 0 0 1 6 】

参照される図 1 は、本発明の胚を凝縮する方法を介し本発明の凍結保存および回復過程のフローダイアグラムである。図 1 のステップ 1 は、事前に選択された初期発生段階、具体的に、胚細胞緊密化前の 1 細胞期または卵割期で、I V P 胚を提供する。I V F または N T 等のいずれの標準 I V P 手順も、順応し得る。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法の一実施形態により、インビトロ受精過程は、1 つまたは複数のプタ卵巢の胞状卵胞から吸引された卵母細胞と共に開始し得る。該卵母細胞は、ある期間成熟培地で成熟期まで培養され得、かつ剥皮され得る。例示的成熟培地は、0 . 1 % P V A、3 . 0 5 m m o l / L グルコース、0 . 9 1 m m o l / L ピルビン酸ナトリウム、0 . 5 7 m m o l / L システイン、0 . 5 μ g / m L L H、0 . 5 μ g / m L F S H、1 0 n g / m L 上皮成長因子、7 5 μ g / m L ペニシリンおよび 5 0 μ g / m L ストレプトマイシンと共に T C M 1 9 9 (G i b c o、3 1 1 0 0 0 3 5、Grand Island、N Y) を含有し得る。卵母細胞は、加湿空気において 5 % C O ₂、3 8 . 5 °C で、約 4 0 ~ 4 4 時間、成熟培地で培養し得る。成熟後、卵母細胞は、約 4 分等の短時間、0 . 1 % P V A および 0 . 1 % ヒアルロニダーゼを追加した T L - H E P E S [2 0] で、ボルテックスを通して卵丘細胞を除去することにより剥皮され得る。剥皮された卵母細胞は、精子注入前に多くの異なる培地で貯蔵され得る。優れた培地は、0 . 6 m m o l / L N a H C O ₃、2 . 9 m m o l / L H E P E S、5 0 μ g / m l ペニシリン、6 0 μ g / m l ストレプトマイシン、3 0 m m o l / L N a C l および 3 m g / m L B S A [2 6] と共に、T C M 1 9 9 を含有し得る。

【 0 0 1 8 】

いずれの標準精子注入手順も、I V P 胚を産生するために順次し得る。一実施形態により、剥皮された卵母細胞は、極体と共に好適な I V F 培地へ、精子懸濁液と混合されるために、最初に移植され得る。例示的 I V F 培地は、1 1 3 . 1 m m o l / L N a C l、3 m m o l / L K C l、7 . 5 m m o l / L C a C l ₂、5 m m o l / L ピルビン酸ナトリウム、1 1 m m o l / L グルコース、2 0 m m o l / L トリス、2 m m o l / L カフェイン、および 2 m g / m L B S A と共に、修飾されたトリス緩衝培地を含有し得る。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の実施形態によると、NT由来胚は、核移植ドナー細胞および商業的な卵母細胞と共に開始し得る。核移植ドナー細胞は、形質転換された子ブタから収集、もしくは野生型細胞の遺伝子修飾を介して産生され得る。卵母細胞が成熟可能とされた後、0.1% PVAおよび0.1% ヒアルロニダーゼを追加されたTL-HEPESで約4分、ボルテックスにより卵母細胞から卵丘細胞が除去された。これら卵母細胞からの最初の極体および隣接細胞質は、次いで、操作培地中、7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ サイトカラシンBで吸引される。ドナー細胞は、次いで、囲卵空間へ移植される。融合および活性は、融合/活性培地(0.3 M マニトール、1.0 mM CaCl_2 、0.1 mM MgCl_2 、および0.5 mM HEPES等)で、1.2 kV/cmの2つの30 μs 脈拍と共に、同時に達成し得る。あるいは、融合および活性は、まず融合において、低濃度のカルシウムを含む培地(0.3 M マニトール、0.1 mM CaCl_2 、0.1 mM MgCl_2 、および0.5 mM HEPES等)に暴露し、次いで、暗所で、200 μM チメロサルに約10分間、その後、8 mM DTTに30分間暴露して活性化[21]、または任意の他の好適方法で、段階的に達成することができる。

【0020】

精子注入またはNT後、IVP胚は、1細胞期または卵割期(接合体、2細胞または4細胞段階、胚細胞緊密化前)へと培養される。いずれの好適培養手順も順応し得る。一実施形態により、IVP胚(インビトロ受精またはNT由来)は、2細胞段階胚を選択するため、38.5、空气中5% CO_2 で28~30時間、種々の異なる培養培地において培養され得る。例示的培養培地PZM3[27]は、浸透圧モル濃度 288 ± 2 、およびpH 7.3 ± 2 と共に、NaCl 108.0 mmol/L、KCl 10.0 mmol/L、 KH_2PO_4 0.35 mmol/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 mmol/L、 NaHCO_3 25.07 mmol/L、ピルビン酸Na 0.2 mmol/L、Ca(乳酸) $_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0 mmol/L、グルタミン1.0 mmol/L、ヒポタウリン5.0 mmol/L、BMEアミノ酸溶液20 mL/L、MEMアミノ酸溶液10 mL/L、ゲンタマイシン0.05 mg/mL、BSA 3 mg/mLを含有し得る。

【0021】

図1のステップ2は、胚の浸透圧重量モル濃度を上昇させ、胚を凝縮する。いくつかの異なる培地製剤は、浸透圧重量モル濃度を上昇させ、卵母細胞または胚の体積を凝縮するのに用いられ得る。本発明は、異なる濃度(結果として、異なる浸透圧重量モル濃度)でNaClまたはショ糖を使用する例を提供するが、高浸透圧重量モル濃度およびその後の細胞(複数可)の体積の縮みをもたらす他の製剤も機能すべきである。

【0022】

本発明の方法の一実施形態により、浸透圧重量モル濃度は、胚が浸される培地の浸透圧重量モル濃度を調節することにより、上昇し得る。例えば、NaClまたはショ糖は、約300 mOsmo(7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ サイトカラシンBおよび0.1 mg/mL BSAを伴う300~310 mOsmoを伴う保存溶液等)と保存用培地へ、350、400、500、600、および800~850 mOsmo等の種々の浸透圧重量モル濃度で培地を生じさせるため、添加され得る。IVP由来胚は、短時間、約5~10分、遠心分離前に事前に選択された高浸透圧重量モル濃度の培地に暴露され得る。

【0023】

図1のステップ3は、通常、遠心分離を介し、凝縮胚から脂質を分離するものである。例えば、高浸透圧重量モル濃度培地における凝縮胚は、約6~20分、13,400 $\times g$ で遠心分離し得る。遠心分離条件(力または期間)は、胚の活力を保存すると同時に、完全な脂質分離を達成するのに十分である限り、遠心分離力および時間が大きい範囲で変化し得る。短い期間は、該力が増加した場合、特に役立つ。同様に、より低い力が使用される場合、長い期間が必要で有り得る。高浸透圧重量モル濃度への長期暴露は、胚の活力に影響を及ぼし得る。

【0024】

脂質分離は、約12時間の培養後、確認され得、いくつかの場合(それらが比較的重要

であるため、特に、NT由来胚に対し)、第二期の高浸透圧重量モル濃度処置、およびその後の遠心分離は、比較的完全な脂質分離を達成するために適用され得る。胚細胞緊密化前の卵割期で胚が残存する限り、第二期の高浸透圧重量モル濃度処置は、任意で有り得る。

【0025】

脂質分離胚は、次いで、図1の胚盤胞期ステップ4へとさらに発生することを可能とする。具体的に、脂質分離胚は、胚が胚盤胞段階を得るため、PZM3において3～6日培養され得る。

【0026】

図1のステップ5は、さらに発生した胚のガラス化である。胚は、いずれの標準方法/手順を通してガラス化され得る。一実施形態により、さらに発生した胚は、修飾されたオープンドストロー(OPS)法の使用により、胚盤胞期でガラス化され得る。具体的に、さらに発生した胚は、平衡溶液中に短時間(約2分等)配置され得、その後、ガラス化溶液への暴露が続く、次いでOPSストローに積み込まれ、かつ液体窒素へと即時に浸され得る。例示的平衡溶液は、例示的ガラス化溶液が、20%エチレングリコール、および20%DMSOを含有すると同時に、10%エチレングリコール、10%ジメチルスルホキシド(DMSO)を含有し得る。窒素に浸される前の過程は、38.5の加温段階で行われ得る。ガラス化溶液への暴露から窒素に浸すまでの期間は、概して、約25～30秒間と短い範囲である。

【0027】

図1のステップ6～8は、保存胚を回復する、かつかかるものをレシピエントへと移植するステップである。具体的に、ガラス化胚は、若干昇温(約38.5等)である期間、緩衝液(ショ糖等)へと浸すことにより解凍され得る。解凍胚は、透明帯を軟化かつ除去するため0.5%プロナーゼで処置され得る。脂質分離および帯除去胚は、次いでレシピエントまたは代理体の卵管または子宮へと移植され得る。

【0028】

図2(a)～(f)は、高浸透圧重量モル濃度処置(NaClで400mosm)後のIVF由来胚の写真である。図2(a)は、高浸透圧重量モル濃度処置および遠心分離後、数時間培養された胚を表示する。図2(b)および2(c)は、胚盤胞段階での胚を表示する。図2(d)は、ガラス化および加温後の胚を表示する。図2(e)は、それらの透明帯の除去後の胚を表示する。図2(f)は、BRL細胞調整培地においてインビトロ培養後再拡張した胚を表示する。

【0029】

図3(a)～(f)は、NaClまたはショ糖との高浸透圧重量モル濃度処置後のNT由来胚の発生の写真である。図3(a)および3(b)は、高浸透圧重量モル濃度処置および遠心分離後、数時間培養されたNT由来胚を表示し、図3(c)および3(d)は、胚盤胞段階へとさらに培養された胚を表示し、図3(e)は、ガラス化後に加温された胚を表示し、かつ図3(f)は、BRL細胞調整培地においてインビトロ培養後、再拡張した胚を表示する。

【0030】

本発明はさらに、異なる試薬(浸透圧重量モル濃度を調節する)の効果、異なる浸透圧重量モル濃度、および脂質分離の速度上の遠心分離時間を研究した。本発明は、NaClまたはショ糖等の異なる試薬が、脂質分離において同様の効果を有し、脂質分離に対する理想的な浸透圧重量モル濃度は、約350～約500mosmまでの範囲であり、かつ好適遠心分離力/速度で、約6分～約20分の範囲である遠心分離期間はまた、脂質分離速度において陽性作用を有することを発見した。

【0031】

図4は、遠心分離前後に、異なる浸透圧重量モル濃度(NaClまたはショ糖で調節された)で処置されたインビトロ受精胚の写真を表示する。列1は、上昇した浸透圧重量モル濃度(対照との比較)で明らかに表示される凝縮と共に、異なる浸透圧重量モル濃度、

300mOsm(対照)、400mOsm(NaClで調節された)、600mOsm(ショ糖で調節された)、および800mOsm(ショ糖で調節された)で暴露された胚の写真を表示する。列2は、遠心分離後の胚の対応の写真を列挙する。遠心分離後の橋様構造(不完全脂質分離を示唆する)は、該対照においても見られ得、完全脂質分離は、600または800mOsmで処置された胚において、大きな橋様構造が存在すると同時に、400mOsmで暴露された胚において観察され得る。図2は、約400mOsmの浸透圧重量モル濃度が、最も完全な脂質分離を提供し、浸透圧重量モル濃度が600以上へ上昇した場合、脂質分離が邪魔されることを示唆している。

【0032】

本発明はさらに、脂質分離速度、胚の発生、および孵化能力へ与える、異なる浸透圧重量モル濃度および遠心分離条件の影響を定量的に評価した。表1(IVF由来胚、NaClで調節された浸透圧重量モル濃度)、2(IVF由来胚、ショ糖で調節された浸透圧重量モル濃度)、および3(NT由来胚、NaClおよびショ糖の双方で調節された浸透圧重量モル濃度、3つの表すべてが添付されている)に含まれるデータに基づき、脂質分離の好まれる状態は、300以上~約500mOsmまでの範囲、好ましくは約350~約450mOsm、である浸透圧重量モル濃度にIVP胚を暴露し、続いて13,400×g速度で約6~約20分、遠心分離するためである。該遠心分離時間は、遠心分離速度により、短縮または延長され得る。しかしながら、遠心分離時間の延長は、高浸透圧重量モル濃度に胚を長期暴露させ得、それは胚の活力に対し悪影響を有しえる。さらに、表3において、第二期高浸透圧重量モル濃度処置は、総脂質分離速度を上昇させる第一期の処置上で、凝縮に失敗したNT由来胚のために、選出される。第二期高浸透圧重量モル濃度処置は、胚細胞緊密化前の卵割期に胚が未だ在る限り、選出され得る。

【0033】

【表 1】

表 1. I V F の開始から 18～20 時間後の異なる浸透圧重量モル濃度および異なる遠心分離時間で処置後の I V P 胚の脂質分離および発生*

処置		処置された胚の総数	脂質分離胚		胚盤胞期への発達		
浸透圧重量モル濃度	遠心分離時間(分)		番号	%	番号	%	
				平均±標準誤差		/脂質分離平均±標準誤差	/胚総数平均±標準誤差
300	6	216	106	49.1 ± 6.0 ^f	15	14.2 ± 5.8 ^{abc}	6.9 ± 3.5 ^{cd}
350		221	166	75.1 ± 5.3 ^{de}	23	13.9 ± 2.3 ^{abc}	10.4 ± 1.6 ^{bcd}
400		217	182	83.9 ± 4.2 ^{cd}	36	19.8 ± 3.7 ^a	16.6 ± 3.2 ^{ab}
450		223	200	89.7 ± 2.4 ^{ab}	29	14.5 ± 3.8 ^{ab}	13.0 ± 3.5 ^{abc}
500		228	195	85.5 ± 2.2 ^{bc}	35	17.9 ± 3.7 ^{ab}	15.4 ± 3.4 ^{ab}
300	12	200	133	66.5 ± 3.3 ^{de}	24	18.4 ± 3.5 ^{ab}	12.0 ± 2.6 ^{abcd}
350		217	182	83.9 ± 3.0 ^{cd}	33	18.1 ± 3.6 ^{ab}	15.2 ± 3.2 ^{ab}
400		216	187	86.6 ± 3.9 ^{bc}	21	11.3 ± 1.8 ^{abc}	9.7 ± 1.5 ^{bcd}
450		213	192	90.1 ± 3.4 ^{abc}	36	18.8 ± 2.8 ^{ab}	16.9 ± 2.9 ^{ab}
500		211	200	94.8 ± 1.2 ^{ab}	29	14.5 ± 2.9 ^{ab}	13.7 ± 2.7 ^{abc}
300	20	216	153	70.8 ± 5.2 ^{de}	27	17.6 ± 5.0 ^{ab}	12.5 ± 3.9 ^{abcd}
350		212	193	91.0 ± 1.9 ^{abc}	29	15.0 ± 2.9 ^{ab}	13.7 ± 2.7 ^{abc}
400		219	213	97.3 ± 1.6 ^a	27	12.7 ± 1.9 ^{abc}	12.3 ± 1.9 ^{abcd}
450		209	195	93.3 ± 2.2 ^{abc}	21	10.8 ± 2.5 ^{bc}	10.0 ± 2.5 ^{bcd}
500		223	206	92.4 ± 1.5 ^{abc}	12	5.8 ± 1.9 ^c	5.4 ± 1.7 ^d
対照		262	-	-	47	17.9 ± 2.1 ^{ab}	17.9 ± 2.1 ^a

欄内の a、b、c、d、e、f の異なる上付き文字は、異なる P < 0.05 である。

* 6 つの複製物の概要

【0034】

【表 2】

表 2：I V F から 1 8 ～ 2 0 時間後の異なる浸透圧重量モル濃度および遠心分離で 6 分処置後の I V P 胚の脂質分離および発生*

処置		胚総数	脂質分離胚		胚盤胞期への発達		
浸透圧重量モル濃度	化学薬品		番号	%、脂質分離胚 胚総数 平均±標準誤差	番号	%	脂質分離胚 平均±標準誤差
400	NaCl	133	117	88.0±9.1 ^a	14	12.0±6.1 ^{ab}	10.5±3.5 ^{ab}
400	シヨ糖	92	83	90.2±0.6 ^{ab}	14	16.9±8.1 ^a	15.2±7.2 ^a
500		133	97	73.0±8.1 ^b	7	7.2±1.2 ^{ab}	5.3±0.4 ^{abc}
600		94	23	24.5±13.0 ^c	1	4.3±12.5 ^{ab}	1.1±1.2 ^{bc}
800	対照	125	1	0.8±0.8 ^c	0	0 ^b	0 ^c
		144	-	-	20	3.9±3.4 ^{ab}	13.9±3.4 ^a

* 3 つの複製の概要
欄内の a、b、c の異なる上付き文字は、異なる P < 0. 0 5 である。

【表 3】

表 3. 融合後 14～18 時間で異なる浸透圧重量モル濃度および遠心分離処置時間後の N T 胚の脂質分離*

処置	胚総数			脂質分離胚				脂質分離胚盤胞		
				1 次高浸透圧重量モル濃度処置および遠心分離		1 次+2 次高浸透圧重量モル濃度処置および遠心分離		番号	番号	% (番号±標準誤差)
	浸透圧重量モル濃度	高浸透圧重量モル濃度培養地作成に使用された化学薬品	遠心分離時間(分)	胚の活性および融合	番号	%	番号	%	脂質分離胚	胚総数
400	シヨ糖	低カルシウム+Thi+DTT	6	電気	336	63.3±2.5 ^d	444	83.6±0.9 ^c	73	16.4±2.1 ^{ab}
400	シヨ糖	電気	6	電気	546	66.7±1.7 ^{bcd}	671	82.0±1.4 ^c	115	17.1±0.8 ^{ab}
400	NaCl	電気	6	電気	67	61.5±0.4 ^{cd}	89	81.7±0.2 ^c	22	24.7±2.5 ^a
400	NaCl	電気	12	電気	88	74.6±5.1 ^{abc}	100	84.7±0.7 ^{bc}	20	20.0±6.8 ^{ab}
400	NaCl	電気	20	電気	415	75.5±2.3 ^{ab}	491	89.3±1.7 ^{ab}	62	12.6±2.3 ^b
350	NaCl	電気	20	電気	570	80.1±2.9 ^a	653	91.7±0.7 ^a	116	17.8±2.5 ^{ab}
対照					-	-	-	-	8	13.3±3.3 ^b

* 2 つ～6 つの複製物の概要

欄内の^a、^b、^c、^dの異なる上付き文字は、異なる $P < 0.05$ である。

【0036】

表 4 は、高浸透圧重量モル濃度処置、遠心分離、およびガラス化によって保存された I V F 由来胚に関する妊娠および子孫データを評価する。表 4 に含まれるデータの中で、9 つの代理体のうち 3 つが妊娠を確立し、正常な子孫を産生した。1 つの代理体は、350 m O s m の浸透圧重量モル濃度で処置した胚を受容し、5 匹の子ブタ、オス 3 匹およびメス 2 匹を産生し、1 つの代理体は、400 m O s m で処置した胚を受容し、4 匹の子ブタ、オス 2 匹およびメス 2 匹を産生し、1 つの代理体は、450 m O s m で処置した胚を受容し、3 匹の子ブタ、オス 1 匹およびメス 2 匹を産生した。

【0037】

【表 4】

表 4. ガラス化および加温後の高浸透圧重量モル濃度処置および遠心分離から導かれた I V P 胚の移植

ET の日付	浸透圧重量モル濃度 (mOsm)	化学薬品	遠心分離 (分)	移植胚の数	加温およびガラス化後帯除去	レシピエント	妊娠	子ブタの数	注記
6/14/2007	350	NaCl	6	25	+	O089	+	5	オス 3 匹 メス 2 匹
6/14/2007	350	NaCl	6	50	-	O090	-	19 日目に発情期に戻る。	
6/28/2007	350	NaCl	6	50	-	O105	-	27 日目に発情期に戻る。	
7/5/2007	400	NaCl	6	25	+	O082	-	21 日目に発情期に戻る。	
7/13/2007	400	NaCl	6	25	+	O112	+	4	メス 2 匹 オス 2 匹
11/1/2007	450	NaCl	20	25	+	O174	-	25 日目に発情期に戻る。	
11/8/2007	450	NaCl	20	25	+	O188	+	3	メス 2 匹 オス 1 匹
11/9/2007	450	NaCl	12	25	+	O128	-	24 日目に発情期に戻る。	
12/12/2007	450	NaCl	12	25	+	O185	+	20 日目に発情期に戻る。	

【 0 0 3 8 】

表 5 は、高浸透圧重量モル濃度処置、遠心分離、およびガラス化後の N T 由来胚の移植、妊娠、および子孫のデータを一覧にする。3 つの胚の移植を行い、記録した。それぞれの移植について、透明帯をプロナーゼ処置によって軟化または除去した 8 0 ~ 9 0 個の胚を代理体に移植した。4 0 0 m O s m o で処置し、6 分間遠心分離した胚を受容した 3 つの代理体のうちの 2 つ、ならびに 3 5 0 m O s m o で処置し、2 0 分間遠心分離した胚を受容した 1 つが、妊娠を生じ、前者については 1 匹のオスの子ブタを産生した。表 4 および 5 のデータは、本発明の方法が、特に好ましい範囲の浸透圧重量モル濃度（約 3 5 0 ~ 約 4 5 0 m O s m ）を適用するとき、I V P 胚のための凍結保存方法に成功することを示す。

【 0 0 3 9 】

【表 5】

胚移植の日付	高浸透圧重量モル濃度処置			移植胚の数	加温およびガラス化後帯除去	レシピエント		子ブタの数	注記
	mOsm	化学薬品	遠心分離(分)			番号	妊娠		
8/24/2007	400	ショ糖	6	83	+	O141	+	1 (オス)	
11/16/2007	400	NaCl	6-20	80	+	O184	-	-	周期の 22 日目 に回復
12/6/2007	350	NaCl	20	90	+	O214	+		周期の 19 日目 に回復

* 生殖器官感染症にかかったため、上記データにおいて、若雌ブタ 1 匹は含まれない。

表 5. ガラス化および加温後の NT 胚の移植

【 0 0 4 0 】

本発明をその具体的な実施形態に関連して説明したが、さらに改良することが可能であることを理解されたい。本特許出願は、概して本発明の原理に従い、本発明に関連する技術分野内で既知または慣例の実践内に入り、本明細書の上記および以下の添付の特許請求の範囲内に記載される本質的特徴に適用され得るような、本開示からの逸脱を含む、本発明のいずれの変形、使用、または適合をも網羅することを意図する。

【 0 0 4 1 】

参考文献

1. Polge C, Wilmut I, Rowson LEA. The low temperature preservation of cow, sheep, and

- pig embryos. *Cryobiology* 1977; 11: 560.
2. Wilmut I. The low temperature preservation of mammalian embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1972; 31: 513 - 514.
3. Dobrinsky JR. Cellular Approach to Cryopreservation of Embryos. *Theriogenology* 1996; 45: 17 - 26.
4. Nagashima H, Kashiwazaki N, Ashman RJ, Grupen CG, Seamark RF, Nottle MB. Removal of Cytoplasmic Lipid Enhances the Tolerance of Porcine Embryos to Chilling. *Biology of Reproduction* 1994; 51: 618 - 622.
5. Dobrinsky JR, Pursel VG, Long CR, Johnson LA. Birth of piglets after transfer of embryos cryopreserved by cytoskeletal stabilization and vitrification. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 564 - 570.
6. Berthelot F, Martinat-Botte F, Perreau C, Terqui M. Birth of piglets after OPS vitrification and transfer of compacted morula stage embryos with intact zona pellucida. *Reproduction, Nutrition, Development* 2001; 41: 267 - 272.
7. Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Higgins A, Nottle MB. Piglets born from centrifuged and vitrified early and peri-hatching blastocysts. *Theriogenology* 2002; 57: 2155 - 2165.
8. Misumi K, Suzuki M, Sato S, Saito N. Successful production of piglets derived from vitrified morulae and early blastocysts using a microdroplet method. *Theriogenology* 2003; 60: 253 - 260.
9. Li R, Lai L, Wax D, Hao Y, Murphy CN, Rieke A, Samuel M, Linville ML, Korte SW, Evans RW, Turk JR, Kang JX, Witt WT, Dai Y, Prather RS. Cloned transgenic swine via in vitro production and cryopreservation. *Biology of Reproduction* 2006; 75: 226 - 230.
10. Nagashima H, Hiruma K, Saito H, Tomii R, Ueno S, Nakayama N, Matsunari H, Kurome M. Production of live piglets following cryopreservation of embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction* 2007; 76: 900 - 905.
11. Nagashima H, Cameron RD, Kuwayama M, Young M, Beebe L, Blackshaw AW. Survival of porcine delipated oocytes and embryos after cryopreservation by freezing or vitrification. *Journal of Reproduction and Deve*

lopment 1999; 45: 167 - 176.

12. Cameron RDA, Beebe LFS, Blackshaw AW, Keates HL. Farrowing rates and litter size following transfer of vitrified porcine embryos into a commercial swine herd. *The rriogenology* 2004; 61: 1533 - 1543.

13. Esaki R, Ueda H, Kurome M, Hirakawa K, Tomii R, Yoshioka H, Ushijima H, Kuwayama M, Nagashima H. Cryopreservation of porcine embryos derived from in vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction* 2004; 71: 432 - 437.

14. Du Y, Zhang Y, Li J, Kragh PM, Kuwayama M, Ieda S, Zhang X, Schmidt M, Bogh IB, Purup S, Pedersen AM, Villemoes K, Yang H, Bolund L, Vajta G. Simplified cryopreservation of porcine cloned blastocysts. *Cryobiology* 2007; 54: 181 - 187.

15. Norberg HS. Ultrastructural aspects of the preattached pig embryo: cleavage and early blastocyst stage. *Z. Anat. Entwicklun gsgesch* 1973; 143: 95 - 114.

16. Kikuchi K, Ekwall H, Tienthai P, Kawai Y, Noguchi J, Kaneko H, Rodriguez-Martinez H. Morphological features of lipid droplet transition during porcine oocyte fertilisation and early embryonic development to blastocyst in vivo and in vitro. *Zygot e* 2002; 10: 355 - 366.

17. Nagashima H, Kato Y, Yamakawa H, Matsumoto T, Ogawa S. Changes in freezing tolerance of pig blastocysts in peri-hatching stages. *Jpn J Animal Reproduction* 1989; 35: 130 - 134.

18. Nagashima H, Yamakawa H, Niemann H. Freezability of porcine blastocysts at different peri-hatching stages. *Theriogenology* 1992; 37: 839 - 850.

19. Li R, Hosoe M, Shioya Y, Bou S. The preliminary research on freezing viability of bovine in vitro fertilized embryos. *Chinese J Scientia Agricultura Sinica* 2002; 35: 1125 - 1129.

20. Tao T, Machaty Z, Boquest AC, Day BN, Prather RS. Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into in vitro matured oocytes. *Animal Reproduction Science* 1999; 56: 133 - 141.

21. Machaty Z, Wang WH, Day BN, Prather RS. C

complete Activation of Porcine Oocytes Induced by the Sulfhydryl Reagent, Thimerosal. *Biology of Reproduction* 1997; 57: 1123 - 1127.

22. Niemann H, Rath D, Wrenzycki C. Advances in biotechnology: New tools in future pig production for agriculture and biomedicine [Review]. *Reproduction in Domestic Animals* 2003; 38: 82 - 89.

23. Prather RS, Hawley RJ, Carter DB, Lai L, Greenstein JL. Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenology* 2003; 59: 115 - 123.

24. Lai LX, Kolber-Simonds D, Park KW, Cheong HT, Greenstein JL, Im GS, Samuel M, Bonk A, Rieke A, Day BN, Murphy CN, Carter DB, Hawley RJ, Prather RS. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295: 1089 - 1092.

25. Du Y, Kragh PM, Zhang X, Purup S, Yang H, Bolund L, Vajta G. High overall efficiency of porcine handmade cloning (HMC) combining partial zona digestion and oocyte trisection with sequential culture. *Cloning and Stem Cells* 2005; 7: 199 - 205.

26. Kragh PM, Du Y, Corydon TJ, Purup S, Bolund L, Vajta G. Efficient in vitro production of porcine blastocysts by handmade cloning with a combined electrical and chemical activation. *Theriogenology* 2005; 64: 1536 - 1545.

27. Collins JL, Baltz JM. Estimates of mouse oviductal fluid tonicity based on osmotic responses of embryos. *Biology of Reproduction* 1999; 60: 1188 - 1193.

28. Li RF, Whitworth K, Lai LX, Wax D, Spate L, Murphy CN, Rieke A, Isom C, Hao YH, Zhong ZS, Katayama M, Schatten H, Prather RS. Concentration and composition of free amino acids and osmolalities of porcine oviductal and uterine fluid and their effects on development of porcine IVF embryos. *Molecular Reproduction & Development* 2007; 74: 1228 - 1235.

29. Hwang I-S, Park M-R, Moon H-J, Shim J-H, Kim D-H, Yang B-C, Ko Y-G, Yang B-S, Cheong HT, Im GS. Osmolarity at early culture stage affects development and expression of apoptosis related genes (Bax-a and Bcl-x

1) in preOimplantation porcine NT embryos. Molecular Reproduction & Development 2008; 75: 464 - 471.

30. Dobrinsky JR. Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos. Theriogenology 57 (1 Special Issue 2002; 57: 285 - 302.

31. Beebe LFS, Cameron RDA, Blackshaw AW, Keates HL, Nottle MB. Assisted hatching improves post-warming in vitro viability of vitrified porcine embryos. Reproduction, Fertility & Development 2004; 16: 164.

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】特許請求の範囲

【訂正対象項目名】全文

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

インビトロ産生されたブタ胚の脱脂質のための方法であって、

300mOsmより上から約600mOsmまでの浸透圧重量モル濃度を有する培地中で、インビトロ産生されたブタ胚をインキュベートして、凝縮胚を産生することと、

該凝縮胚を遠心分離して細胞質から脂質を分離し、脂質分離胚を産生することと、を含む、方法。

【請求項2】

前記インビトロ産生されたブタ胚を凍結保存することをさらに含み、ここで、該保存が、

前記脂質分離された胚を胚盤胞期まで培養して、脂質分離胚盤胞を産生することと、

該胚盤胞をガラス化または凍結により凍結保存して、凍結保存胚を産生することとを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記凍結保存された胚の回復およびレシピエントへの移植をさらに含み、ここで、該回復および移植は、

該凍結保存された胚を加温および再水和することと、

該胚から透明帯を除去することと、

該胚をレシピエントへ移植することと

を含む、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

インビトロ産生されたブタ胚の脱脂質、凍結保存および回復のための方法であって、

300mOsmより上から約600mOsmまでの浸透圧重量モル濃度を有する培地中で、インビトロ産生されたブタ胚をインキュベートして、凝縮胚を産生することと、

該凝縮胚を遠心分離して細胞質から脂質を分離し、脂質分離胚を産生することと、

該脂質分離された胚を胚盤胞期まで培養して、脂質分離胚盤胞を産生することと、

該胚盤胞をガラス化または凍結により凍結保存して、凍結保存胚を産生することと、

該凍結保存された胚を加温および再水和することと、

該胚から透明帯を除去することと、

該胚をレシピエントへ移植することと

を含む、方法。

【請求項5】

前記培地が、300mOsmより上～約500mOsm、約350mOsm～約500mOsm、約350mOsm～約450mOsm、約350mOsm、約400mOsm

、または約 500 mOsm の浸透圧重量モル濃度を有する、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記培地の前記浸透圧重量モル濃度が、塩、糖、または有機試薬の添加によって調節される、請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記塩が塩化ナトリウムであるか、前記糖がスクロース、ラフィノース、フルクトース、マンニトールまたはトレハロースであるか、前記有機試薬がジメチルスルホキシド(DMSO)もしくはエチレングリコールである、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記培地の浸透圧重量モル濃度が、塩化ナトリウムまたはショ糖の添加によって調節されて、約 350 mOsm、約 400 mOsm または約 500 mOsm の浸透圧重量モル濃度を有する培地が産生される、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記培地が、塩化ナトリウムまたはショ糖の添加によって調節されて、約 400 mOsm の浸透圧重量モル濃度を有する培地が産生される、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記胚が、インビトロ受精または核移植によって産生される、請求項 1～9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記培地中でインキュベートされる前記胚が、胚細胞緊密化前の 1 細胞期または卵割期にある、請求項 1～10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記胚が、前記培地中で約 5～10 分間の期間にわたってインキュベートされ、そして該胚が 13,400 × g で約 6～20 分間にわたって遠心分離される、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

複数の胚が同時に脱脂質される、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

インビトロ産生されたブタ胚の脱脂質において使用するのに適したキットであって 300 mOsm より上で約 600 mOsm までの浸透圧重量モル濃度を有する培地とインビトロ産生されたブタ胚を該培地中でインキュベートして凝縮胚を産生するため、および該胚を遠心分離して細胞質から脂質を分離して脂質分離された胚を産生するための、指示書を含む、キット。

【請求項 15】

前記培地が、300 mOsm より上～約 500 mOsm、約 350 mOsm～約 500 mOsm、約 350 mOsm～約 450 mOsm、約 350 mOsm、約 400 mOsm、または約 500 mOsm の浸透圧重量モル濃度を有する、請求項 14 に記載のキット。

【誤訳訂正 3】

【訂正対象書類名】図面

【訂正対象項目名】図 1

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【図 1】

【図 1】

