

機関番号：17102

領域設定期間：平成30年度～令和4年度

領域番号：7002

研究領域名（和文） 配偶子インテグリティの構築

研究領域名（英文） Ensuring integrity in gametogenesis

領域代表者

林 克彦（はやし かつひこ）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20287486

交付決定額（領域設定期間全体）：（直接経費）1,176,300,000円

研究成果の概要

本研究は生殖細胞の分化過程を体外培養系で再現する「in vitro gametogenesis」を革新的技術として確立することを目的とした。これを達成するために配偶子の質的向上と様々な動物種への応用を可能にする体外培養系の確立、配偶子の品質を非侵襲的に定量化する技術の開発、生体において配偶子の品質を保証するメカニズムの解明を柱に研究を展開した。その結果、以下の研究成果を得た。(1)配偶子形成を実現する化学的合成培地を決定するとともに、配偶子の質的向上に寄与する物質を同定した。(2)様々な動物の多能性幹細胞から生殖細胞系列を分化誘導する培養系を開発した。(3)卵巣・精巣環境を体外培養系で再構築する培養系を開発した。(4)自家蛍光解析による配偶子の品質評価アルゴリズムを開発した。(5)卵子の染色体分配を可視化するシステムを開発して、染色体分配異常の原因タンパク質を同定した。(6)生体内の生殖細胞集団の細胞クローン（細胞の種類）の動態を解明した、(7)組織内の細胞の位置情報とリンクした遺伝子発現の解析法を開発した。(8)生体内の生殖細胞の品質を維持するタンパク質を同定した。これらの成果は、in vitro gametogenesisの普及を加速させるとともに、配偶子の品質を理解する上での新しい技術と知見を創出した。

研究分野：生殖生物学、発生学、細胞生物学、

キーワード：配偶子インテグリティ、発生能、体外培養、細胞の非破壊的評価、細胞選択

1. 研究開始当初の背景

生殖細胞は次世代の個体を作るという特殊な性質をもつ。その特性を解明するために、多くの基礎研究が展開されてきたと同時に、その利用は体外受精や遺伝子改変動物の作製を可能にして生物学・医学・畜産学・水産学等に大きな影響を及ぼしてきた。長い歴史をもつ生殖細胞研究は、配偶子が作られる過程を体外培養で再現する「in vitro gametogenesis」という技術開発により転機を迎えた。体外培養で配偶子を分化誘導する方法が完成すれば、生殖細胞の分化メカニズムの解明が可能となるほか、体外培養で作られる配偶子を用いた個体の作製などの生殖工学技術の開発に貢献する。これらの研究や技術開発は in vitro gametogenesis がマウスなどの実験動物からヒト、産業動物、絶滅危惧種などへの応用に伴い、重要性や革新性を増大させながら加速するものと考えられた。しかしながら、研究開始当初までに開発されてきた in vitro gametogenesis で作られた配偶子の発生率は、生体内で作られる配偶子に比べて大きく劣る。これは体外培養系において生殖細胞分化のための環境が不完全であり、結果として得られる配偶子の機能性「配偶子インテグリティ」が低いことを意味している。逆に言えば、生体内では配偶子のインテグリティを効率的に構築するシステムが存在することを示唆している。これらに加えて研究開始当初までの in vitro gametogenesis はマウス限定であった。この理由として、配偶子を体外培養系で作るためには胎仔の精巣または卵巣の体細胞が必要であり、胎仔の調達が難しい大動物への応用には困難が伴うことが挙げられる。すなわち、in vitro gametogenesis を広く学術研究および生殖工学技術において普及させるためには、様々な動物において配偶子が作られるメカニズムの理解と、それらを体外培養系で再現する技術開発が必要とされていた。

2. 研究の目的

本領域研究は、生体内の配偶子産生システムの理解のもと、高い発生能をもつ配偶子の産生とマ

ウス以外の動物にも適用が可能な体外培養系を構築して、*in vitro* gametogenesis を生殖細胞研究の推進や生殖工学技術の開発に資する技術として確立することを目的とした。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、本研究領域では3つの研究グループ(A01、A02、A03)に分ける。A01グループでは、これまでの*in vitro* gametogenesis の開発過程で得られた知見や経験をもとに、培養条件および技術の最適化を行う。これと同時に、配偶子の形成を助ける支持細胞を人工的に作製することにより卵巣や精巣の環境を体外培養系で再構築する。また、これまでマウスで確立された技術を他の動物へ適用する。A02とA03はこれまでにない新しい技術を導入してA01の研究を支える。A02グループは最先端のイメージング技術や情報処理技術を用いて、配偶子の発生成を非侵襲的に予見する。すなわち、これまで結果論的に(個体に発生したかどうかにより)判断されてきた発生成について予見的かつ定量的に判断する新たな技術を開発する。A03グループは生体内で高い発生成をもつ配偶子が作られる過程を理解する。特に「細胞の不均一性と選択」ということに着目して解析する。具体的には体の中の生殖細胞の集団が「いつ、どこで、どのようにして変化しているか?」を知るために、単一細胞で追跡できる実験システムを開発する。また細胞の選択が破綻したときの配偶子の性質の変化について解析する。さらに、これらの解析の結果を*in vitro* gametogenesis と比較することにより、生体内と体外培養系の違いを明らかにする。これら3つの研究グループが緊密に連携することにより、*in vitro* gametogenesis を革新的技術として確立することを目指す。

4. 研究の成果

(1) A01 グループの研究の成果

①マウス卵子とマウス・ラット精子を器官培養により産生できる化学合成培地を開発した。この開発の過程で、体外培養におけるマウスの卵母細胞の成熟や受精卵の発生成率の向上には、エストロゲン受容体 ESR1 の制御、AFP の添加、パルミチン酸やセラミドの合成経路の制御が重要であることを明らかにした。また、培地添加物の質量解析によりマウス・ラットの精子形成には、抗酸化物質とリゾリン脂質が重要であることを明らかにした(図1)。これらの培養条件の検討により、以前では不可能であったラットの円形精子細胞の分化誘導を実現した。さらに並行して精巣の培養において栄養・酸素供給を制御できるマイクロデバイス(微小培養装置)を開発した。これにより体外培養条件下で精子形成をリアルタイムで評価するシステムの構築が可能となった。

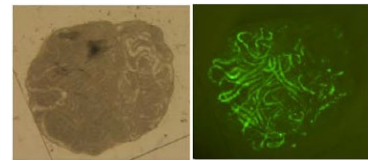


図1ラット精巣の培養方法の確立:化学合成培地で培養したラット精巣(左)には精子の成熟とともに発現する遺伝子の発現が認められる(右、緑)

②マウス卵子の形成過程の解析により、卵巣内の最も未熟な原始卵胞を長期間維持するには低い酸素状態と物理的なストレス状態が必要であることを明らかにした。これらの環境を体外培養系で再現すると、以前では不可能であった原始卵胞の維持が可能となった。

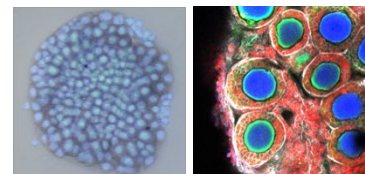


図2 体外でつくられた卵巣:マウスの多能性幹細胞から作られた卵巣(左)。その中には卵胞構造が認められる(右、青;卵母細胞、赤;支持細胞、白;莖膜細胞)

③マウス多能性幹細胞から胎仔の卵巣の体細胞と同等の細胞を分化誘導して卵巣の環境を作ることに成功した。この環境では、同じく多能性幹細胞に由来する始原生殖細胞が卵子に成熟した(図2)。すなわち、この方法では胎仔の組織を使わずに、多能性幹細胞から卵子を作り出すことができる。これによりマウス以外の動物で卵子を作製する方法論が確立した。



図3 多能性幹細胞からきたラット:ラットの多能性幹細胞から作られた始原生殖細胞由来のラット(左)とそれらが成長して生んだラット(右)。

④ラット多能性幹細胞から始原生殖細胞を分化誘導して、それらを精巣に移植することにより精子を作製した。さらに得られた精子を顕微授精に用いて産仔を得た(図3)。マウス以外の多能性幹細胞を用いた*in vitro* gametogenesis で産仔を得たのは世界で初めてである。これに加えて、ウサギ、マーモセット、ミナミキタシロサイの多能性幹細胞から始原生殖細胞を分化誘導する方法を確立した(図4)。これらの成果の蓄積は様々な哺乳類の多能性幹細胞を用いた*in vitro* gametogenesis の基盤となる。

(2) A02 グループの研究の成果

①マウス生体内の卵子が発する自家蛍光(タンパク質の構造などより反射する光)のパターンを解析して、青色から緑色を発する光の強さによって卵子のもつ受精能を判定できることを明らかにした。また生体で作られた卵子と体外培養で作られた卵子を比較したところ、同様の青色から緑色の自家蛍光に違いがあることが明らかとなった。またこの青色~緑色の自家蛍光

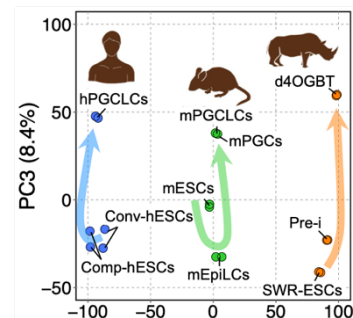


図4 ミナミシロサイの始原生殖細胞の遺伝子発現解析:ミナミシロサイの始原生殖細胞の分化過程の遺伝子発現の変化の方向性(オレンジ矢印)はヒト、マウスとよく似ている。

の分布は卵子内のミトコンドリアの分布とほぼ一致していた。このほか、マウスとニジマスの精巣の中にある細胞において、自家蛍光のみで細胞の種類を区別できる計測技術と分別アルゴリズムを構築した。このアルゴリズムに従ってセッティングした細胞分離装置を用いることにより、目的の細胞を集めることが可能となった。

②卵子のイメージングには蛍光物質を物理的に注入する必要があったが、本研究では注入することなく染色体や紡錘体をイメージングできるシステムを構築した。

③卵子を同時に多数かつ高解像度に解析するイメージングシステムを開発した。このシステムを用いて、卵子の染色体の分離に関わる分子機構を明らかにした(図5)。具体的には、Ndc80 複合体が Prc1 (アンチパラレルな微小管の架橋因子) を動原体に濃縮させることで紡錘体形成を促進すること、動原体で微小管を制御する因子である Prc1 の局在制御が Cdk1 キナーゼを介すること、動原体-微小管接続の安定性が、紡錘体極のインテグリティおよび紡錘体長の制御に必要であることを明らかにした。

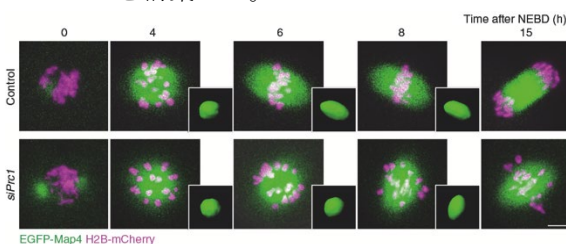


図5 卵子における染色体分配の遅れ: 微小管の制御因子 PRC1 が低下した卵母細胞(下段)では染色体(紫)の分配が遅れる。緑;微小管、上段;対照群

④老化卵子を用いた染色体分配のイメージング、トランスクリプトーム解析、質量解析により、老化卵子と若齢卵子の違いを特徴付ける遺伝子およびタンパク質を明らかにした。

⑤極めて微量の細胞サンプルから遺伝子産物、エピゲノム(ゲノムの化学的修飾)およびタンパク質を定量的に解析する方法(ChIL-seq および iMPAQT 法)を開発した。これらにより、配偶子間の違いを定量的に解析することが可能となった。

(3) A03 グループの研究の成果

①100 万種類以上の細胞を個別に標識できるバーコード解析により生殖細胞集団の変遷を追跡した結果、初期の生殖細胞の発生における細胞クローン(細胞の種類)の減少と、後期における細胞クローンの保存を見出した。初期の生殖細胞の削減は配偶子形成能を獲得した生殖細胞を選別する過程である可能性が示唆された。

②成体のマウスの精子形成では、精子幹細胞が限られた細胞増殖因子(増殖を促すタンパク質)を取り合いながら増殖していることが明らかとなった。これに加えて、精子幹細胞が異なる細胞状態を常に行き来することによって不均一な集団を作ること、最も未分化な亜集団(Pivap+)は最も分裂頻度が低いことを明らかにした(図5)。これらの解析に基づいて作られた数理モデルは実際の観察と一致した。これらの解析によりマウスの雄の生殖細胞集団が「いつ」変化するかに関して一定の理解を得た。

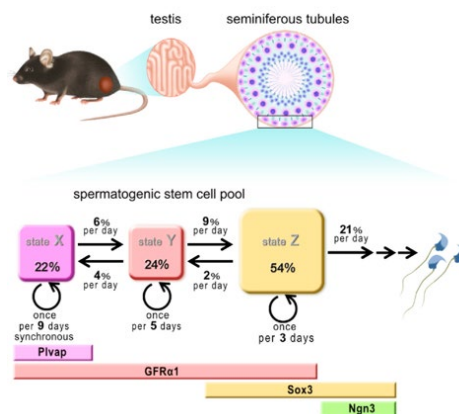


図5 マウス精子形成における幹細胞集団の変遷: マウス精巣内の精子幹細胞は複数の細胞状態(State)を行き来することによって不均一な集団を維持している。それぞれの State を区別する遺伝子発現も明らかとなった。

③組織の中の空間的な位置情報を維持したまま単一細胞の遺伝子発現を解析する方法を開発した。具体的には、固定した組織切片から回収した細胞の遺伝子増幅法を開発して、新鮮な単一細胞と同等の感度で遺伝子発現解析(RNA-seq)を行える技術を確認した。この技術の実証実験として、同一卵胞内の異なる領域に位置する顆粒膜細胞が異なる遺伝子を示すことを示した。この開発により生殖細胞集団が「どこで」変化するかを突き止める技術基盤を確立した。

④ショウジョウバエの生殖細胞系列にゲノムの損傷を人為的に導入する実験系を構築して、生殖細胞の品質維持機構について解析した。その結果、ゲノムに損傷をもつ生殖細胞の排除には Myc の発現低下が必要であることを明らかにした。また Myc を強制発現するとゲノム損傷を許容する生殖細胞が作られ、配偶子のインテグリティが低下することが明らかとなった(図6)。これにより生殖細胞が「どのようにして」変化するかの一端を明らかにした。

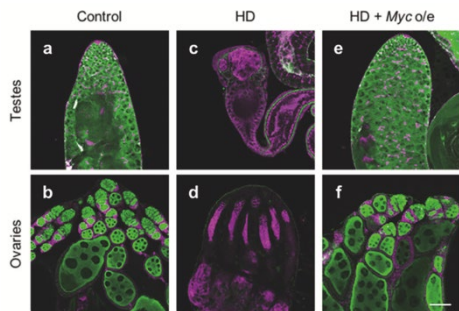


図6 Myc によるショウジョウバエの生殖細胞の選別: 野生型(左、上;精巣、下;卵巣)と比較して、人工的にゲノムの損傷を導入したショウジョウバエでは生殖細胞(緑)が排除されている。これに Myc を強制発現させると生殖細胞が排除されなくなる(右)。尚、Myc を強制発現した生殖細胞では DNA の損傷が許容されているため、妊孕性の低い配偶子が産生される。

⑤ショウジョウバエを用いて、交尾や栄養状態などの外的刺激に応じて生殖幹細胞の増殖を制御する神経内分泌シグナルを明らかにした。これは外的要因により生殖細胞の産生が制御されていることを示す具体的な例である。

⑥ マウスを用いて卵母細胞のストックとして機能する原始卵胞の維持には細胞内の顆粒構造 (P-body 様顆粒) の形成が必要であることを明らかにした。また顆粒の形成に必要な遺伝子 *Ddx6* の変異体は原始卵胞が早期枯渇して、早期閉経と同様の現象が認められることを明らかにした(図7)。

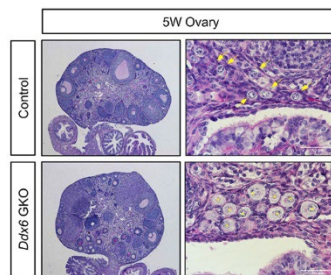


図7 *Ddx6* 欠損マウスに見られる早期閉経:野生型(上段)には卵母細胞のストックである原始卵胞が多く認められる(矢印)。一方 *Ddx6* 欠損マウスの卵巣(下段)では原始卵胞が肥大化する様子が認められる。これらはやがて消失して、早期閉経と同様の現象が認められる。

5. 主な発表論文等 (受賞等を含む)

- Murakami K, (14 authors), *Hayashi K. Generation of functional oocytes from male mice in vitro. *Nature* Mar 15. (2023)
- Feng X, (10 authors), *Ogawa T. In vitro spermatogenesis in isolated seminiferous tubules of immature mice. *PLoS One*.18(4):e0283773. (2023)
- Ibayashi M, Aizawa R, Mitsui J, *Tsukamoto S: Lipid droplet synthesis is associated with angiogenesis in mouse ovarian follicles. *Biol Reprod* 108:492-503 (2023)
- *Kato Y., Saga Y. Antagonism between DDX6 and PI3K-AKT signaling is an oocyte-intrinsic mechanism controlling primordial follicle growth. *Biology of Reproduction* in press (2023)
- Kurogi Y, (9 authors), *Niwa R. Female reproductive dormancy in *Drosophila melanogaster* is regulated by DH31-producing neurons projecting into the *corpus allatum*. *Development in press* (2023)
- Hoshino R, (3 authors), *Niwa R. Circulating fructose regulates a germline stem cell increase via gustatory receptor-mediated gut hormone secretion in mated *Drosophila*. *Sci Adv* 9:eadd5551 (2023)
- Hayashi M, (14 authors), *Hayashi K. Robust induction of primordial germ cells of white rhinoceros on the brink of extinction. *Sci Adv*. 8: eabp9683 (2022)
- Oikawa M, (12 authors), *Kobayashi T Functional primordial germ cell-like cells from pluripotent stem cells in rats. *Science*. Apr 8;376(6589):176-179. (2022)
- Naitou Y, (6 authors), *Hayashi K. Dual role of *Ovol2* on the germ cell lineage segregation during gastrulation in mouse embryogenesis. *Development* 149: dev200319 (2022)
- *Saito K., *Yamanaka S, *Siomi MC: Lint-O cooperates with L(3)mbt in target gene suppression to maintain homeostasis in fly ovary and brain. *EMBO rep*. 23:e53813, 2022
- Okano C, Takabe K, Hirayama T, Nomura N, *Yawata Y. Three-dimensional morphology of bacterial community developed on the index-matched materials. *Sci Rep*, 11:19508. (2022)
- Uchida A, (12 authors), *Kanai Y. SOX17-positive rete testis epithelium is required for Sertoli valve formation and normal spermiogenesis in the male mouse. *Nat Commun*. 13(1):7860.(2022)
- Yoshino T, (13 authors), *Hayashi K: Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells. *Science* 373: eabe0237 (2021)
- *Kobayashi T, (11 authors), Surani MA*. Tracing the emergence of primordial germ cells from bilaminar disc rabbit embryos and pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 37:109812. (2021)
- Kobayashi T, (12 authors), *Hirabayashi M. Blastocyst complementation using *Prdm14* deficient rats enables efficient germline transmission and generation of functional mouse spermatids in rats. *Nat Commun* 12:1328 (2021)
- Tanimoto R, (4 authors), *Obata Y. Blocking estrogen-induced AMH expression is crucial for normal follicle formation. *Development*. (2021) 148, dev197459.
- *Hamazaki N, (11 authors), *Hayashi K. Reconstitution of the oocyte transcriptional network with transcription factors. *Nature* 589: 264–269 (2021)
- Mishina, T, (8 authors), and *Kitajima TS. Single-oocyte transcriptome analysis reveals aging-associated effects influenced by life stage and calorie restriction. *Aging Cell* 20(8): e13428. (2021)
- Courtois A, Yoshida S, Takenouchi O, Asai K, and *Kitajima TS. Stable kinetochore-microtubule attachments restrict MTOC position and spindle elongation in oocytes. *EMBO Reports* e51400. (2021)
- Higuchi K, Matsumura T, Akiyama H, Kanai Y, Ogawa T, *Sato T. Sertoli cell replacement in explanted mouse testis tissue supporting host spermatogenesis. *Biol Reprod*. ioab104 (2021)
- Matsumura T, (8 authors), *Ogawa T. Rat in vitro spermatogenesis promoted by chemical supplementations and oxygen-tension control. *Sci Rep*. Feb 10;11(1):3458. (2021)
- Takashima T, Fujimaru T, *Obata Y. Effect of in vitro growth on mouse oocyte competency, mitochondria and transcriptome. *Reproduction*. 162, 307-318. (2021)
- Sasaki K, Takaoka S, *Obata Y. Oocyte-specific gene knockdown by intronic artificial microRNAs driven by *Zp3* transcription in mice. *J Reprod Dev*. 67, 229-234. (2021)
- Honda M, *Oki S, (5 authors), *Ohkawa Y. High-depth spatial transcriptome analysis by photo-isolation chemistry. *Nat Commun*. 12(1):4416 (2021)
- Ibayashi M, Aizawa R, Mitsui J, *Tsukamoto S: Homeostatic regulation of lipid droplet content in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 162: R99-R109 (2021)

26. Y. Nakamura, D.J. Jörg, Y. Kon, B.D. Simons and *Yoshida S: Transient suppression of transplanted spermatogonial stem cell differentiation restores fertility in mice. *Cell Stem Cell* 28, 1443-1456 (2021)
27. Asaoka M, (6 authors), *Kobayashi S. Offspring production from cryopreserved primordial germ cells in *Drosophila*. *Communications Biology*, 4, 1159. (2021)
28. Ota R, Hayashi M, Morita S, Miura H, and *Kobayashi S. Absence of X-chromosome dosage compensation in the primordial germ cells of *Drosophila* embryos. *Scientific Reports*, 11, 4890. (2021)
29. Imura-Kishi K, (8 authors), *Kanai Y. Low retinoic acid levels mediate regionalization of Sertoli Valve in the terminal segment of mouse seminiferous tubules. *Sci Rep*.11(1): 1110.(2021)
30. Maruoka M, (6 authors), *Suzuki J. Caspase cleavage releases a nuclear protein fragment that stimulates phospholipid scrambling at the plasma membrane. *Mol Cell* 81:1397-1410, (2021)
31. Iwasaki-Takahashi Y, (9 authors), *Yoshizaki G. Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout. *Commun. Biol.* 3: 308 (2020)
32. Kobayashi T, Kobayashi H, (8 authors), Kurimoto K, *Hirabayashi M. Germline Development in Rat Revealed by Visualization and Deletion of *Prdm14*. *Development*. 147: dev183798. (2020)
33. Sanjo H, (13 authors), *Ogawa T. Antioxidant vitamins and lysophospholipids are critical for inducing mouse spermatogenesis under organ culture conditions. *FASEB J.*, June 2. (2020)
34. Yoshida S, (11 authors), *Kitajima TS. Prc1-rich kinetochores are required for error-free acentrosomal spindle bipolarization during meiosis I in mouse oocytes. *Nature Commun.*, doi:10.1038/s41467-020-16488-y. (2020)
35. Hirayama T, Takabe K, Kiyokawa T, Nomura N, *Yawata Y, Reconstruction of Single-Cell Innate Fluorescence Signature by Confocal Microscopy, *Journal of Visualised Experiments* 159, (2020)
36. Ota R and *Kobayashi S. Myc plays an important role in *Drosophila* PM-hybrid dysgenesis to eliminate germline cells with genetic damage. *Communications Biology*, 3, 185. (2020)
37. Morita S, Ota R, Hayashi M and *Kobayashi S. Repression of G1/S transition by transient inhibition of miR-10404 expression in *Drosophila* primordial germ cells. *iScience*, 23, 100950. (2020)
38. Nagaoka S, Nakaki F, (9 authors), Kurimoto K, Hayashi K, Nakamura T, Yamamoto T, and *Saitou M. ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice. *Science*, 367, eaaw4115 (2020)
39. Hayashi Y, (8 authors), *Matsui Y. Proteomic and metabolomic analyses uncover sex-specific regulatory pathways in mouse fetal germline differentiation. *Biol Reprod*. 103: 717-735. (2020)
40. Ichida K, (6 authors),, *Yoshizaki G. Specific visualization of live type A spermatogonia of Pacific bluefin tuna using fluorescent dye-conjugated antibodies. *Biol Reprod*, 100, 1637-1647. (2019)
41. *Nagamatsu G, Shimamoto S, Hamazaki N, Nishimura Y, *Hayashi K. Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Sci Adv*. 5:eaav9960. (2019)
42. Shimamoto S, (6 authors),, *Hayashi K. Hypoxia induces the dormant state in oocytes through expression of Foxo3. *PNAS* 116:12321-12326. (2019)
43. Oka M, Mura S, (7 authors), Ohkawa Y “Chromatin-bound CRM1 recruits SET-Nup214 and NPM1c onto HOX clusters causing aberrant HOX expression in leukemia cells.” *Elife* 8. Pii: e46667. (2019)
44. Sasaki K, Hara S, Yamakami R, Sato Y, Hasegawa S, Kono T, Morohaku K, *Obata Y. Ectopic expression of DNA methyltransferases DNMT3A2 and DNMT3L leads to aberrant hypermethylation and postnatal lethality in mice. *Mol Reprod Dev*. 86, 614-623. (2019) **Top Downloaded Paper 2018-2019 in Mol Reprod Dev.**
45. *Yawata Y, (4 authors), *Nomura N.. Intra and inter species variability of single-cell innate fluorescence signature of microbial cell, *Applied and Environmental Microbiology* 85, e00608-19 (2019)
46. Kitadate Y, (20 authors), *B.D. Simons and *Yoshida S: Competition for Mitogens Regulates Spermatogenic Stem Cell Homeostasis in an Open Niche. *Cell Stem Cell* 24, 79-92 (2019)
47. *Kato Y, (5 authors), *Saga Y. ELAVL2-directed RNA regulatory network drives the formation of quiescent primordial follicles. *EMBO Reports*, 20:e48251, (2019)
48. *Asaoka M, (2 authors), *Kobayashi S. Maternal Nanos inhibits Importin- α 2/Pendulin-dependent nuclear import to prevent somatic gene expression in the *Drosophila* germline. *PLoS Genetics*, 15, e1008090 (2019)
49. Sekii K, (7 authors), *Shigenobu S, *Kobayashi K. Transcriptomic analysis reveals differences in the regulation of amino acid metabolism in asexual and sexual planarians. *Sci Rep* 9:6132. (2019)
50. Ding Y, Kaido M, Llano E, Pendas AM and *Kitajima TS. The post-anaphase SUMO pathway ensures the maintenance of centromeric cohesion through meiosis I-II transition in mammalian oocytes. *Current Biology* 28(10): 1661-1669. (2018)

ホームページ等

<https://www.gamete-integrity.com/>