

マウス卵巣の凍結保存に関する研究

—とくに DAP213 保存液の処理時間と各種保存液の効果について—

前 田 宣 俊

新潟大学大学院医歯学総合研究科
分子細胞医学専攻分子情報医学講座発生・生殖工学分野
(主任：横山峯介教授)

Study on Cryopreservation of the Mouse Ovary: Effect of Various Cryopreservation Liquid and Operation Time of DAP213

Yoshitaka MAEDA

*Division of Developmental and Reproductive Engineering,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
(Director: Prof. Minesuke YOKOYAMA)*

要 旨

マウスにおける発生工学の発展により、様々な人為的な操作を施した遺伝子改変マウスが多数作成されている。これらの遺伝改変マウスを省力的なかたちで長期間維持するとともに効率的に活用することを目的に、胚や精子を凍結保存しておき、必要に応じて個体に復元して供給する胚・配偶子バンクの整備が進められてきた。しかし、遺伝子改変マウスの中には、繁殖能が著しく低いものや若齢期に何らかの疾患を発症して死亡するために初期胚を得ることが難しく、系統の継代が困難なものも多く含まれている。これらの個体から産仔を得る手段として卵巣移植法が見直され、さらに系統保存法として卵巣の凍結保存が注目されている。

マウスの卵巣移植法は、ほぼ確立された技術である。一方、卵巣の凍結保存法は、いまだ開発途上であり、専用の保存液は開発されておらず、初期胚の凍結保存液やその方法を一部改変して行われているのが現状である。2003年に Migishima らは、マウス初期胚で使用されている DAP213 保存液を用いて卵巣の凍結保存を行い、融解後にレシピエントに移植して再現性のある成績で凍結卵巣由来の産仔を得ることに成功した。しかし、DAP213 保存液への浸漬処理時間の検討は今後の課題として残されていた。なお、凍結保存液に含まれる凍害保護剤には細胞毒性があることが知られており、卵巣の浸漬時間が長すぎると卵細胞等に対する悪影響の危険性が増加し、逆に短ければ凍害保護剤の組織内部までの浸透が不十分となり保護効果が得られないことになる。そのため、DAP213 保存液への浸漬処理時間の検討は重要であると考えた。そこで本研究では、卵巣の DAP213 保存液への至適な浸漬処理時間を組織切片標本により解析したところ、DAP213 保存液に 30 分および 60 分浸漬して凍結した卵巣組織は、未凍結組織と同等な

Reprint requests to: Yoshitaka MAEDA
Animal Resources Branch
Center for Bioresource - based Researches
Brain Research Institute Niigata University
1-757 Asahimachi - dori Chuo - ku,
Niigata 951 - 8585 Japan

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学脳研究所生命科学リソース研究センター
バイオリソース研究部門動物資源開発研究分野
前田 宣 俊

保存状態にあることがわかった。また、これらの条件で凍結・融解した卵巣をレシピエントに移植して得られた産仔数は、未凍結卵巣の成績と比較しても有意差はなく、組織標本による評価と一致した結果を得た。さらに、これまでに報告されている4種類の保存液を用いて凍結・融解し、移植を行った卵巣による平均産仔数を比較したところ、VSED保存液<EFS保存液<DAP213保存液<ESVS保存液<未凍結の順に多くなったが、ESVS保存液とDAP213保存液の間に有意差はなかった。以上の結果より、マウス卵巣の凍結保存において、DAP213保存液へ30分浸漬した条件で良好な成績が得られることが明らかとなった。

キーワード：マウス、卵巣凍結保存、卵巣移植、DAP213保存液、ガラス化法

緒 言

近年、マウスにおける発生工学の発展はめざましく、とくに遺伝子改変個体の作成には大きな貢献を果たしている。一方、作成された遺伝子改変マウスの系統維持には多大な労力とスペース、経費等を必要とする。これらの遺伝資源の省力的な保存と効率的な利用を図るために、初期胚や精子を凍結保存しておき、必要に応じて個体に還元して供給する胚・配偶子バンクが構築されてきた。しかし、初期胚や精子を得るには成熟した個体が必要となるが、何らかの原因で繁殖が困難なものや若齢期に発症して死亡する系統などでは、卵子や成熟した精子を得ることが困難な場合も多く見受けられる。これらの解決策の一つとして卵巣移植法がある。

マウスにおける卵巣移植の歴史は古く、1940年にRobertson¹⁾によって報告がなされている。その後Stevens²⁾が内分泌機能の基礎研究にこの技法を用いるとともに、移植法の改良を行って産仔数を増やすことに成功³⁾している。我が国では、谷岡ら⁴⁾が自然交配の不能な筋ジストロフィーマウスの生産効率を上げることを目的に、この卵巣移植法を応用している。また、米国のジャクソン研究所では、卵巣の凍結保存と組み合わせ、繁殖が難しい50系統以上のマウスを維持している⁵⁾。卵巣移植を行う際には、ドナーとレシピエントの組織適合性を合わせることで、得られた産仔がドナー卵巣由来であるか否かを判別する必要がある。組織適合性については、レシピエントに免疫不全系統であるSCIDマウスを使うことでこ

の問題は解決されており、また産仔がドナー卵巣由来であるか否かについては、現在は遺伝子レベルで判定が可能になったために、以前と比べて卵巣移植が比較的容易に行なえるようになっている。

卵巣の凍結保存は、1960年に凍害保護剤としてグリセリンを用いて-79℃で保存し、組織適合性が一致するマウスに同所移植して産仔を得たParrott⁶⁾による報告がある。その後、緩慢法により1994年にヒツジ⁷⁾、1996年にマウス⁸⁾の卵巣凍結が報告された。また、2003年にMigishimaら⁹⁾がマウス初期胚で実用化されている簡易ガラス化法によって凍結保存した卵巣から再現性のある成績で産仔を得ることに成功した。

受精卵や卵巣などをそのまま凍結すると細胞内に氷晶が形成されることにより、細胞は物理的に破壊され死滅してしまう。そのため凍結保存を行なう際には、氷晶が形成されないように細胞内にグリセリン、DMSO、ethylene glycolなどの凍害保護剤を浸透させ、細胞内の自由水を脱水する方法がとられている¹⁰⁾。初期胚や卵巣の凍結・融解法は、緩慢法とガラス化法に大別される。緩慢凍結法は、胚細胞内に氷晶を形成させないように緩やかな速度で冷却を行ない、細胞内の自由水を脱水するものである。凍結操作に長時間を要するうえ、プログラムフリーザーなどの機器を必要とするが、初心者でも比較的短期間で安定した高い成績を得ることができる。これに対してガラス化法は、胚を高濃度に凍害保護剤を添加した極少量の保存液に浮遊させて直接液体窒素中に投入するもので、実験操作を極めて短時間で終了できるといった利点がある。そのため、現在ではマウス初期

胚の凍結保存はガラス化法が主流となっている。しかし、卵巣の凍結保存法はいまだ開発途中の技術であり、保存液や実験操作法はマウス初期胚用のものをそのまま、あるいは一部改変して行われているのが現状である。これら保存液および保存法の評価法としては、凍結保存卵巣に及ぼす影響を組織学的に解析^{11) - 13)}する方法と、凍結卵巣から得た未成熟卵子を体外培養によって成熟させ、さらに体外受精した後に胚培養を行う方法が多く報告されている。その理由として、ヒトへの臨床応用が背景^{14) - 16)}にあり、体外で发育培養、成熟培養を行なう方向で進められていることが挙げられる。Hasegawa¹⁷⁾らはヒト胚で用いられるガラス化法がマウス卵巣に应用可能であるかを組織学的方法で解析し、平衡化液 (ES 液) およびガラス化保存液 (VS 液) で処理することで、凍結保存卵巣の組織は新鮮組織と遜色のない状態で保持されていたと報告している。また Tokieda¹⁸⁾は EFS 保存液¹⁹⁾ と VSED 保存液の 2 種類のガラス化保存液について、組織学的な検討とともに、体外成熟培養および体外受精を試みている。

卵巣移植と卵巣凍結保存については以上の様な状況にあるが、Migishima²⁰⁾²¹⁾らが報告した DAP213 保存液²⁰⁾²¹⁾を用いた簡易ガラス化法による保存法においても、DAP213 保存液への浸漬時間の検討は今後の課題として残されていた。この方法は、胚の凍結保存に広く用いられていて卵巣凍結への応用が容易であるなど、その利点は多いことから至適浸漬処理条件の検討は重要な課題である。そこで、本研究の実験 1 として、DAP213 保存液への浸漬処理時間を変えた凍結卵巣の組織学的な評価と、各処理を施した卵巣を移植したレシピエントの分娩成績を検討した。さらに実験 2 では、DAP213 保存液とこれまで報告されている 3 種類のガラス化保存液を用いた凍結方法を比較するため、それぞれの方法で凍結した卵巣を移植し産仔数について検討した。

材料および方法

供試動物

実験 1 では、卵巣提供のドナーとして 16 日齢

の C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) C14-Y01-FM1310sb マウス²²⁾ (以下、GFP マウス) のヘミ接合体を使用した。このマウスは、オワンクラゲ由来の遺伝子を導入されたトランスジェニック系統で Green fluorescent protein (GFP) を全身に発現する。また、レシピエントには免疫不全系統である FOX CHASE SCID[®] C.B-17/lcr-scid/scid マウス (日本クレア, 東京, 以下、SCID マウス) の 6 週齢を、交配用のオスマウスには Jcl: MCH (ICR) (日本クレア, 東京) の 10 週齢以上を用いた。

実験 2 では、卵巣提供のドナーとして 16 日齢 GFP マウスのホモ接合体を用いた。レシピエントには GFP マウスと同じ遺伝的背景を持つ C57BL/6J の 6 週齢を、交配用のオスマウスとして Jcl: B6C3F1 (日本クレア, 東京) を 10 週齢以上で用いた。

飼育環境

マウスは、床敷材としてペーパークリーン (日本エスエルシー, 静岡) を入れたプラスチックケージ (外寸: 143 × 293 × 148mm 日本チャールスリバー, 神奈川) に收容し、飼育室内に設置したクリーンラック (日本クレア, 東京) 内の SPF 環境下で飼育・管理した。飼育室は温度 23 ± 2 °C, 湿度 40 ~ 60 %, 照明は 12 時間明, 12 時間暗のサイクルでコントロールした。飼料は CE-2 (日本クレア, 東京), 飲水は水道水を給水ビンに入れ、自由摂取させた。ケージ, 給水ビンなどの飼育器材は高圧蒸気滅菌 (121 °C 20 分) して使用した。

培地および凍結保存液, 融解液の調製

実験 1 で用いた modified Whitten 培地²³⁾ (以下、mW 培地), PB1 培地²⁴⁾ は、いずれも純水 (Water for embryo transfer, embryo tested, Sigma-Aldrich, USA) を用いて自家調整し、アンプル封入したものを 4 °C 冷蔵庫で保管して使用した。凍結保存に用いた 1M Dimethyl Sulphoxide (DMSO) および DAP213 保存液, 融解用として用いた 0.25M Sucrose 液も同様に自家調製した。

実験2に用いた mW 培地, PB1 培地, DAP213 保存液, 1M DMSO 液, 0.25M Sucrose 液, 1M Sucrose 液は, 実験1と同様に自家調製した。また, ES液・VS液・FS液および EFS10・20・40液・10% ethylene glycol 液および VSED 保存液・TS 液は自家調製した。

DAP213 保存液による卵巣の凍結と融解

凍結法: DAP213 保存液を用いた卵巣凍結は, Migishima ら⁹⁾の簡易ガラス化法を部分的に修正して行なった。すなわち, 頸堆脱臼法によりマウスを安楽死させた後, 卵巣・卵管・子宮をまとめて摘出し, 氷上で冷却した mW 培地中で卵巣嚢を切開して卵巣を取り出した。実験1では, 35mm プラスチックシャーレ内に 1M DMSO 液の 100 μ l ドロップを2個作り, レシピエント1頭分となる2個の卵巣片を1個目のドロップに90秒間浸漬した後, 2個目のドロップに移して180秒間浸漬した。これを5 μ lの1M DMSO 液を入れたクライオチューブに移し, ただちに0 $^{\circ}$ Cのチルヒートで冷却した。卵巣を1M DMSO 液に入れ, チルヒートで冷却を開始するまでを5分以内に行なった。冷却開始5分後に0 $^{\circ}$ CのDAP213 保存液を95 μ l加え, 5, 10, 30および60分間の浸漬処理を行なった後, 液体窒素中に投入して凍結保存した。実験2では, 実験1と同様の方法で行なったが, 16日齢の卵巣を1mm角になるようメス刃を用いて1/2または1/3に切断した。また, DAP213 保存液への浸漬処理の時間を30分とした。

融解法: 液体窒素タンクから取り出したクライオチューブをタンク内の気相中につるしたアルミ缶に60秒間置き, チューブ内の液体窒素を気化させた。つぎにチューブの蓋を取り, 室温に60秒間置いた後, 0.25M Sucrose 液900 μ lを加えて融解し, 攪拌してから卵巣をシャーレに回収した。その後, さらにPB1培地とmW培地でそれぞれ2回洗浄した。

ES 液, VS 液による卵巣の凍結と融解

凍結法: ヒト胚に用いられるガラス化法を用いてマウス卵巣を凍結保存した Hasegawa ら¹⁷⁾の

方法を一部改変し, 平衡化液 (ES液: FCS 10.0ml, Streptomycin 2.50mg, Penicillin 3.75mg, Ethylene glycol 3.75ml, DMSO 3.75mlを TCM 199液 32.5mlに混合) とガラス化保存液 (VS液: Sucrose 8.56g, FCS 10.0ml, Ethylene glycol 7.50ml, Streptomycin 2.5mg, Penicillin 3.75mg, DMSO 7.50mlを TCM199液 50mlに混合。以下, このES液, VS液を併せてESVS保存液と表記), および融解液 (TS液: FCS 10.0ml, Sucrose 17.155gを TCM199液 40.0mlに混合) を調製した。頸堆脱臼により安楽死させた GFP マウスから卵巣を摘出し, 1mm角を越えないようメス刃を用いて1/2または1/3に切断した。1頭分の卵巣を室温のES液に入れ15分間平衡化した後, 35mmシャーレに入れ4 $^{\circ}$ Cに冷却したVS液に移して30分浸漬した。この卵巣をポリエステルシート (7mm \times 30mm) に載せ, 直接液体窒素中に投入して凍結した。さらに液体窒素中で冷却したクライオチューブに卵巣を載せたポリエステルシートをすばやく入れ, 再度液体窒素中で冷却した後, 液体窒素タンク中で保存した。

融解法: 液体窒素タンクからクライオチューブを取り出し, インキュベータ内で37 $^{\circ}$ Cに温めたTS液に卵巣を載せたポリエステルシートを入れ融解した。そのまま10分保持した後, 卵巣をシャーレに回収し, mW培地で洗い, 直ちに移植した。

EFS 保存液による卵巣の凍結と融解

凍結法: Tokieda らの方法¹⁸⁾ (以下, EFS保存液と表記) に準じて行なった。すなわち, FS液 (PB1 BSA (-) 14.0mlに Ficoll 70 6.00g, Sucrose 3.424g, BSA 0.06gを溶解) を調製し, これにethylene glycolを加え, EFS10液 (FS液にethylene glycol 10%添加), EFS20液 (同20%), EFS40液 (同40%) を調製した。摘出した卵巣を室温のPB1培地で洗浄し, 1mm角になるよう1/2または1/3に切断した。この卵巣を室温のEFS10液に15分, 4 $^{\circ}$ CのEFS20液に15分, 4 $^{\circ}$ CのEFS40液に5分浸漬した後, 少量のEFS40液とともにクライオチューブに入れ, 液体窒素中で凍結して保存した。

融解法：液体窒素タンクからクライオチューブを取り出し、チューブ内の液体窒素を捨てた。凍結卵巣の入ったクライオチューブに4℃に冷却したEFS20液を1000 μ l加え、4℃のチルヒートで10分間保持した。シャーレにあけて卵巣を回収し、室温のEFS10液に入れ、10分保持した後、室温のPB1培地に移し、さらに10分置いてからレシピエントに移植した。

VSED 保存液による卵巣の凍結と融解

凍結法：EFS 保存液と同様に Tokieda らの方法¹⁸⁾ (以下、VSED 保存液と表記) に従い凍結した。摘出した卵巣を室温の10% EG液 (PB1 18.0ml に ethylene glycol 2.0ml を添加) に入れ15分間浸漬した。つぎに10% EG液とVSED 保存液 (PB1 : EG液 : DMSO = 2 : 1 : 1) を等量混和した1/2VSED 保存液に移し室温で6分間保持した。その後VSED 保存液に3分間浸漬し、少量のVSED 保存液と共にクライオチューブに移し、液体窒素中で凍結した。

融解法：液体窒素タンクからクライオチューブを取り出し、チューブ内の液体窒素を捨てた後、37℃に温めた0.5M Sucrose液 (1M Sucrose液とPB1培地を等量混和) を加えて融解した。そのまま炭酸ガスインキュベータ内に10分間保持した後、シャーレにあけて凍結卵巣を回収し、PB1培地で3回洗浄して直ちに移植した。

凍結卵巣の組織学的評価

16日齢卵巣を用い、DAP213 保存液浸漬時間を5, 10, 30および60分として凍結し、7日間保存した。これらの卵巣を融解し、ブアン液で固定した。その後、定法に従いパラフィン包埋を行い、5 μ m厚の連続切片とし、マッソントリクローム染色を行なった。この組織標本を光学顕微鏡で観察し、DAP213 保存液への浸漬処理時間における卵巣内の卵母細胞および結合組織におよぼす影響を調べた。

卵巣移植

卵巣移植手術は実体顕微鏡下で行なった。麻酔

は、50mg/mlのペントバルビタールナトリウム溶液 (ネプタール, 大日本住友製薬, 大阪) を0.85%生理食塩液で10倍希釈し、体重から投与量²³⁾ を求めてレシピエントマウスの腹腔内に投与した。手術可能な麻酔状態に入ったことを確認し、毛刈りと手術部位を酒精綿で消毒した後、皮膚および筋層を切開し、卵巣を手術布の上に引き出した。ノエス剪刀で卵巣周囲の脂肪表面を切開した後、剪刀先端を開くように使い脂肪層に穴をあけ、卵巣嚢を破り卵巣を引き出して約2/3を切除した。卵巣嚢内にドナー卵巣を置き、切開した脂肪部分をピンセットで圧着した後、腹腔内に戻した。ドナー卵巣が小さく、切除した卵巣面と密着が難しいと判断した場合は、スポンゼル (アステラス製薬, 東京) を卵巣に少量載せて移植した。最後に皮膚を縫合クリップで縫合した。なお、レシピエントマウスは、麻酔から覚醒するまで37℃の恒温器で保温した。

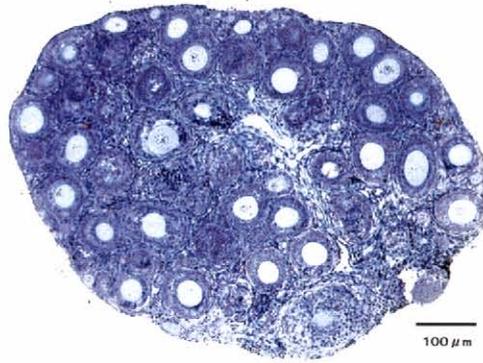
交配と産仔の由来の判定

卵巣を移植したレシピエントは、手術2週間後にオスマウスと同居させ、交配を開始した。実験1では、移植卵巣由来の産仔が有色となるように、交配にはアルビノ系のJcl : MCH オスを用いた。実験2では、ドナー卵巣にGFPホモマウスを用い、移植卵巣由来の産仔が蛍光励起用青色光の照射により緑色を呈することを指標に判別した。なお、実験1, 2ともに妊娠、分娩中もオスとの同居を続け、追いかけて交配を行なった。

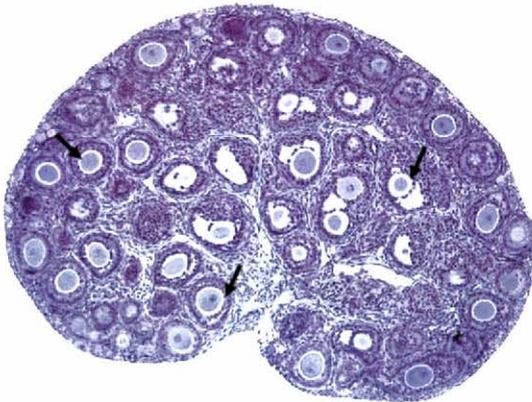
結 果

実験 1

はじめに卵巣の凍結保存における前処理としてのDAP213 保存液への浸漬時間が、卵巣内の卵母細胞および結合組織へ及ぼす影響を組織学的に検討した。DAP213 保存液への浸漬時間を5, 10, 30および60分とした16日齢個体における卵巣の凍結保存後の組織像を図1に示した。未凍結卵巣(A)では、卵巣周辺部に原始卵胞と一次卵胞が、中央部には二次卵胞と胞状卵胞が多数存在してい



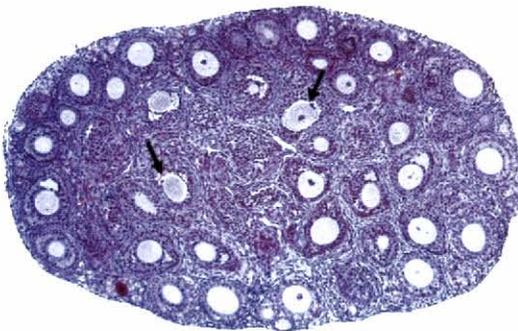
A: 未凍結卵巣



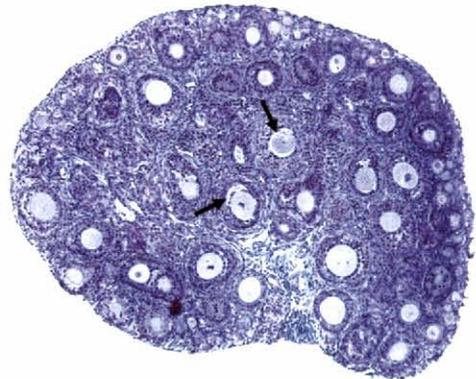
B: 5分浸漬



C: 10分浸漬



D: 30分浸漬



E: 60分浸漬

図1 DAP213保存液に浸漬した卵巣組織像

未凍結卵巣(A)には卵胞内に間隙は観察されない。5分(B)、10分(C)の浸漬では表層部の原始卵胞、一次卵胞が良好な状態で保存されていたが、内部の二次卵胞に間隙(矢印)がみられる。30分の浸漬(D)では中心部で軽度の間隙や核の損傷(矢印)が観察されたが、変性範囲は小さくなっている。60分の浸漬(E)では中心部の狭い範囲に30分浸漬と同程度の変性(矢印)がみられる他は、未凍結と遜色ない保存状態であった。

表1 各種の時間 DAP213 保存液へ浸漬処理された凍結保存卵巣由来の産仔成績

処理(分)	Dn 卵巣由来産仔**				産仔数	
	Rc 数*	分娩 Rc 数	分娩 Rc 数	総産仔数***	Dn 由来 (平均)	Rc 由来 (平均)
未凍結	7	6	6	38	16 (2.7)	22 (3.7)
5	9	8	1	48	1 (0.1)	47 (5.9)
30	9	8	6	44	9 (1.1)	35 (4.4)
60	11	10	8	60	27 (2.7)	33 (3.3)

* レシピエント ** ドナー

***: レシピエント卵巣を残しているため、ドナー、レシピエント各卵巣由来の仔が混ざって生まれる。

ることが観察され、卵母細胞および核には異常を示す変性は認められなかった。5分浸漬卵巣 (B) では、卵巣周辺部の原始卵胞や一次卵胞には変性はなかったが、卵巣内部の広範囲の領域に存在する二次卵胞や胞状卵胞には透明帯と卵胞上皮細胞に変性による間隙が観察された。10分浸漬卵巣 (C) では、5分浸漬と同様に間隙が観察されたが、変性の認められる範囲はやや狭くなり、周辺部の原始卵胞や一次卵胞は未凍結卵巣と同程度に保存されていた。30分浸漬卵巣 (D) では、中央部の狭い範囲に変性が認められたが、周辺部は未凍結と同等に保存され、形態的な損傷は観察されなかった。60分浸漬卵巣 (E) では、中心部の極めて狭い範囲に卵母細胞の変性が若干認められたが、卵巣全体としては未凍結卵巣と遜色なく良好な形態が保存されていた。

つぎに16日齢の卵巣を用い、DAP213保存液への浸漬処理時間を5分、30分および60分として凍結保存し、融解した卵巣を移植したレシピエントの産仔数の比較を行なった。この結果を表1に示した。60分浸漬群におけるドナー卵巣由来の平均産仔数は2.7頭で、対照とした未凍結群と同等であった。ついで30分浸漬群では1.1頭、5分浸漬群では0.1頭となった。ドナー卵巣由来の産仔数を χ^2 乗検定で比較したところ、未凍結群と5分浸漬群、5分群と30分群、5分群および60分群で有意差 ($P < 0.05$) があった。

実験2

実験2では、保存液別の卵巣移植結果について検討した。表2に各凍結卵巣を移植したレシピエントの繁殖成績を、また表3にはレシピエントの分娩成績を示した。なお、確実な繁殖能を確保することを目的にレシピエント卵巣を残しているため、産仔はGFP遺伝子を持つドナー卵巣由来 (GFP) と、レシピエント卵巣由来 (野生型: Wt) の両方が混じって生まれてきた。対照群として、未凍結卵巣を移植した3頭のレシピエントは、すべてがドナー卵巣由来のGFP産仔を分娩した。そのGFP産仔の平均頭数は1~3産次において4.3~7.3頭となり、野生型であるレシピエント由来の平均産仔数3.7頭を上回った。DAP213保存液では、9頭のレシピエントのうち、1産目、2産目は6頭が、3産目は5頭がGFP産仔を分娩した。3産目までまったくGFP産仔を生まなかったものは1頭、毎回生んだのは2頭であった。GFP平均産仔数は1産目が1.9頭、2産目が0.9頭および3産目は1.7頭であった。EFS保存液では1産目で10頭中2頭が、2産および3産目ともに9頭中4頭のレシピエントがGFP産仔を分娩した。3産目までにGFP産仔を分娩したレシピエントは6頭であった。1産目から分娩回数を重ねるに従いGFP産仔数は増えてきたが、GFP平均産仔数は少なく0.2頭~1.3頭の幅であった。ESVS保存液では1産目で10頭中8頭、2産目では9頭中7頭および3産目では9頭中5頭のレシピエントが

表2 各種保存液を使用して凍結した卵巣を移植されたレシピエントの繁殖成績

凍結液	産次	Rc 数	Dn 卵巣由来産仔			* 総産子数	産仔数	
			分娩 Rc 数	分娩 Rc 数	分娩 Rc 数		Dn 由来 (平均)	Rc 由来 (平均)
未凍結	1	3	3	3	26	15 (5.0)	11 (3.7)	
	2	3	3	3	24	13 (4.3)	11 (3.7)	
	3	3	3	3	33	22 (7.3)	11 (3.7)	
ESVS	1	10	10	8	67	24 (5.0)	43 (4.3)	
	2	9	9	7	76	20 (4.3)	56 (6.2)	
	3	9	9	5	72	21 (7.3)	51 (5.7)	
DAP213	1	9	9	6	64	17 (1.9)	47 (5.2)	
	2	9	9	6	80	8 (0.9)	72 (8.0)	
	3	9	9	5	72	15 (1.7)	57 (6.3)	
EFS	1	10	10	2	59	2 (0.2)	57 (5.7)	
	2	9	9	4	69	5 (0.6)	64 (7.1)	
	3	9	9	5	78	12 (1.3)	66 (7.3)	
VSED	1	10	10	4	59	10 (1.0)	49 (4.9)	
	2	10	10	3	95	3 (0.3)	92 (9.2)	
	3	9	9	2	86	3 (0.3)	86 (9.6)	

*: レシピエント卵巣を残しているため、ドナー、レシピエント各卵巣由来の仔が混ざって生まれる。

GFP産仔を分娩した。3産目までにすべてのレシピエントがGFP産仔を分娩し、毎回GFP産仔を生んだレシピエントは4頭であった。GFP平均産仔数は2.2～2.4頭となり、未凍結の対照群より低いものの、他の保存法より多い値を示した。VSED保存液では、10頭中1産目4頭、2産目3頭、3産目は9頭中2頭がGFP産仔を分娩したが、EFS保存液と同様にGFP平均産仔数は0.3～1.0頭と低く推移した。各保存法による分娩レシピエントの延べ数とGFP産仔総数を χ^2 乗検定で比較した。未凍結と各保存液の間、およびESVS保存液とEFS保存液、ESVS保存液とVSED保存液、DAP213保存液とVSED保存液の間に有意差($P < 0.05$)があった。

初産でGFP産仔を生んだレシピエントにおける卵巣移植から分娩までの平均日数を表4に示した。未凍結卵巣を移植した対照群の初産までの平均日数は43.3日となり、3頭すべてがGFP産仔

を分娩した。DAP213保存液の平均日数は39.7日で9頭中6頭が分娩、ESVS保存液では、平均日数は38.9日で10頭中8頭が分娩した。EFS保存液の平均日数は42.0日で10頭中2頭、VSED保存液では平均日数は42.8日で10頭中4頭であった。

考 察

実験1

DAP213保存液は、簡易ガラス化法による胚凍結保存液として汎用されているが、凍害保護剤として用いられているDMSO、AcetamideおよびPropylene glycolは細胞毒性のあることが知られている。このため初期胚においては、浸漬時間は5分と短時間であり、また0℃に冷却することで毒性をできるだけ低く抑えている。Migishimaらの報告では胚と同様に5分の浸漬時間で行なって

表3 凍結卵巣を移植したレシピエントの分娩成績

保存液	産次	GFP/産仔数*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cont	1	4/9	6/7	5/10							
	2	4/10	4/9	5/5							
	3	7/10	7/10	8/10							
ESVS	1	0/5	1/7	0/8	4/5	3/7	4/5	8/10	1/3	3/8	3/8
	2	1/5	0/5	3/8	1/9	-	1/9	7/12	1/5	4/13	4/13
	3	0/9	1/6	0/8	5/9	-	5/9	7/10	0/5	3/8	3/8
DAP213	1	0/5	0/7	-	2/8	1/6	2/8	0/7	4/9	5/11	5/11
	2	0/9	1/9	-	2/6	0/9	2/6	0/9	1/8	1/11	1/11
	3	0/10	3/9	-	0/7	1/6	0/7	2/10	0/4	7/13	7/13
EFS	1	0/7	0/4	0/5	0/3	1/8	0/3	0/6	0/7	0/9	0/9
	2	0/5	0/5	1/3	1/10	1/13	1/10	-	0/4	2/10	2/10
	3	0/8	0/11	2/8	1/9	6/12	1/9	-	0/12	1/2	1/2
VSED	1	3/4	0/11	1/2	0/2	0/5	0/2	2/8	0/7	0/9	0/9
	2	1/11	0/11	1/4	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/12	0/12
	3	0/8	0/11	2/12	0/10	0/5	0/10	0/8	0/8	0/8	0/8

*: レシピエント卵巣を残しているため、ドナー、レシピエント各卵巣由来の仔が混ざって生まれる。

表4 初産で GFP 産子を産んだレシピエントにおける卵巣移植から分娩までの平均日数

	Rc 数	GFE を分娩した RC 数	平均日数*
未凍結	3	3/3	43.3 (34-49)
ESVS	10	8/10	38.9 (34-50)
DAP213	9	6/9	39.7 (36-58)
EFS	10	2/10	42.0 (34-47)
VSED	10	4/10	42.8 (36-51)

*: 卵巣移植後 14 日の開腹期間を含む

いるが、卵巣は体積も大きく複数の細胞で構成されていることから、この条件が適しているのか検討するのは重要な課題である。実験1の組織学的評価では、浸透度を把握するため16日齢卵巣をそのまま凍結保存して解析を行なったところ、DAP213 保存液への浸漬時間が長くなるに従い、変性の認められる範囲は狭まった。5分と10分の

浸漬では表層の原始卵胞や一次卵胞には変性が認められないが、内部の卵母細胞には透明帯と卵胞上皮細胞との間に間隙が確認されることから、耐凍剤が十分に浸透していないことが窺われた。30分になると、中心部の細胞には間隙や核の損傷が認められるが、間隙は狭く軽度になっていた。60分では30分と同様の変性が認められる範囲は中

心部に限られ、その他の部分は未凍結卵巣と遜色ない状態で保存されていたことから、保存液が内部まで十分に浸透し、細胞内の水分と置換されたと考えられた。

前述の通り、組織学的には良好に保存される浸透時間が推定できたが、卵巣細胞が正常に機能する能力が保持されているかは不明であるため、つぎにレシピエントに卵巣を移植し産仔が得られるかを検討した。移植卵巣由来の産仔数については、5分浸漬群は他の時間と比べ有意に少なく、60分と30分浸漬群の間に有意差がなかった。この結果は組織学的な評価と一致するものであった。

Hasegawaら²⁵⁾はESVS保存液での浸透時間について詳細に検討し、2分では表層部のみが正常性を保ち、内部は広範囲に障害を受けているが、10分、20分、30分と処理時間が長くなるにつれて、内部の障害範囲が縮小したことを報告している。そして1mm³のマウス卵巣組織に凍害保護剤が十分に浸潤するには30分必要であり、60分処理でもほとんど差がないことから、凍害保護剤での処理はできるだけ短時間にするべきとし、30分が最適であると結論している。実験1でも同様の組織像を得ており、その卵巣移植の結果とも一致したが、ここでは浸透度を観察するため16日齢卵巣をそのまま浸漬して組織標本としている。卵巣の大きさは長径で1.5mm程度であったので、1/2または1/3に切断して1mm以下にし、30分の浸漬を行った。これによって十分な浸透が得られるとともに処理時間を短縮し、凍害保護剤の毒性を減少させることができると推察された。

実験2

実験1の結果を踏まえ、実験2では卵巣を1/2または1/3に細切して用いることとし、DAP213保存液での浸漬処理時間は30分とした。卵巣を移植されたレシピエントの繁殖成績において、未凍結の対照群ではドナー卵巣由来がレシピエント卵巣由来の産仔数を上回り、またレシピエント全頭がドナー由来を分娩していた。これは移植が的確に行なわれ、ドナー卵巣が生着して機能している結果であると推測された。ドナー卵巣由来の産

仔数をみると、ESVS保存液とDAP213保存液で多いのに対して、EFSとVSEDでの数は少なく、両者間には有意差があった。EFS保存液ではドナー卵巣由来の産仔が得られたレシピエントが1産次2頭、2産次および3産次が4頭で、産仔数も2、5、12頭と分娩を重ねるに従い増加した。一方、VSED保存液ではドナー卵巣由来の仔を産んだレシピエントが4、3、2頭と減少し、ドナー卵巣由来産仔も10、3、3頭と減少する傾向がみられた。EFS保存液はethylene glycolとFicoll, sucrose, VSED保存液はethylene glycolとDMSOという単純な組成である。凍害保護剤の浸透は卵細胞の発育段階や卵巣内の細胞の種類によって、その速度が異なることが知られ²⁶⁾²⁷⁾、卵母細胞、または原始卵胞などが選択的に保存され、生着したドナー卵巣の発育に時差が生じている可能性が考えられた。また各保存液において、初産でGFP産仔が得られたレシピエントにおける交配から初産までの平均日数は41日前後であった。分娩したレシピエントの頭数には差があるが、いずれの保存液でも早いものは34-36日であり、オスと同居させた直後に交尾していることが確認できた。初産までの日数には各実験群ともほぼ同様で、保存液の影響はないと判断した。

実験終了後にドナー卵巣由来の仔を産まなかった卵巣を観察したところ、すべてのレシピエントでGFP蛍光を発する組織を観察できた。Tokiedaら²⁰⁾は、EFSおよびVSEDを用いて凍結保存した実験では8細胞期の桑実胚以上に発生が進まなかったが、ホルモン産生能については未凍結卵巣と凍結融解した卵巣で有意差は認められなかったとしている。本実験の結果では、移植卵巣により生着はしたが排卵機能などに何らかの問題があった可能性が推察された。今回の実験では移植後の組織検索は行なっていないが、GFP蛍光を観察できていながら、十分な機能を果たしていないドナー卵巣の状態については興味深いところであり、今後の課題としたい。

マウス系統保存への卵巣凍結と卵巣移植法の応用を考えた場合、移植成績が安定して産仔を得られることが必要である。しかもできるだけ早い産

次で多数の産仔が得られることが、これらの方法をより有効なものにするという観点から、産仔成績の良かった ESVS 保存液、DAP213 保存液が優位になる。しかし DAP213 保存液を用いた凍結法は、保存液、融解液ともにマウス胚凍結保存で汎用されるものをそのまま使用できるという利点がある。卵巣移植法は長い歴史を有しているが、近年はいろいろな改良が加えられて著しく汎用性が増している。例えば、免疫不全である SCID マウスをレシピエントに用いることで組織適合性の異なる系統間での移植を可能にしたことはその一つといえる。このことは、系統育成中の遺伝的背景が複雑かつ明瞭でない遺伝子改変マウスの維持・保存には重要なツールとなり得ることが期待される。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導を賜りました横山峯介教授に深謝いたします。またマウス卵巣の組織標本を作製していただくとともに、組織学的な評価で貴重なご助言をいただいた麻布大学獣医学部・山本雅子教授に感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Robertson GG: Ovarian transplantation in the house mouse. *Pro Soc Exp Biol Med* 44: 302 - 304, 1940.
- 2) Stevens LC: Survival of ovarian grafts in castrate and unilaterally ovariectomized female mice. *Transplant bull* 3: 45 - 46, 1955.
- 3) Stevens LC: A modification of Robertson's technique of homoiotopic ovarian transplantation in mice. *Transplant bull* 4: 106 - 107, 1956.
- 4) 谷岡功邦, 塚田今紀江, 江崎孝三郎: マウスの卵巣移植技術. *実験動物* 22:15 - 20, 1973.
- 5) Szein J, Sweet H, Farley J and Mobraaten L: Cryopreservation and orthotopic transplantation of mouse ovaries: New approach in gamete banking. *Biol Reprod* 58: 1071 - 1074, 1998.
- 6) Parrot D: The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J Reprod Fertil* I: 230 - 241, 1960.
- 7) Gosden R, Baird DT, Wabe JC and Webb R: Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at - 196 °C. *Hum Reprod* 9: 597 - 603, 1994.
- 8) Cox S-L, Shaw J and Jenkin G: Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. *J Reprod Fertil* 107: 315 - 322, 1996.
- 9) Migishima F, Suzuki - Migishima R, Song Si-Young, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M and Yokoyama M: Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. *Biol Reprod* 68: 881 - 887, 2003.
- 10) Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T: A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89: 91 - 97, 1990.
- 11) Kagabu S and Umezu M: Transplantation of cryopreserved mouse, Chinese hamster, rabbit, Japanese monkey and rat ovaries into rat recipients. *Exp Anim* 49: 17 - 21, 2000.
- 12) Sugimoto M, Maeda S, Manabe N and Miyamoto H: Development of infantile rat ovaries autotransplanted after cryopreservation by vitrification. *Theriogenology* 53: 1093 - 1103, 2000.
- 13) Salehnia M, Abbasian M E and Rezazadeh VM: Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertil Steril* 78: 644 - 645, 2002.
- 14) Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O and Gosden RG: Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? *Fertil Steril* 69: 1 - 7, 1998.
- 15) Gosden RG, Mullan J, Picton HM, Yin H and Tan SL: Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. *Hum Reprod Update* 8: 105 - 110, 2002.
- 16) Hasegawa A, Mochida N, Kasumi H, Komori S and Koyama K: Ovarian tissue banking. *J Mamm Ova Res* 24: 8 - 13, 2007.
- 17) Hasegawa A, Hamada Y, Mehandjiev T and Koyama K: In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocyte from

- vitrified ovarise. *Fertil Steril* 81: 824 - 830, 2004.
- 18) Tokieda Y, Ishiwata I, Segino M, Ishikawa H and Sato K: Establishment of a novel method for cryopreservation and thawing of the mouse ovary. *Hum Cell* 15: 230 - 237, 2002.
- 19) Kasai M, Komi JH, Takakamo A, Tsudera H, Sakurai T and Machida T: A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* 89: 91 - 97, 1990.
- 20) Nakagata N: High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *J Reprod Fertil* 7: 479 - 483, 1989.
- 21) Nakao K, Nakagata N and Katsuki M: Simple and efficient vitrification procedure for cryopreservation of mouse embryos. *Exp Anim* 46: 231 - 234, 1997.
- 22) Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T and Nishimura Y: Green mice as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 407: 313 - 319, 1997.
- 23) 野村達次監修, 勝木元也編: 発生工学実験マニュアル・トランスジェニックマウスの作り方. 講談社サイエンティフィック, 1987.
- 24) Whittingham DG: Embryo in the future of developmental genetics. *Genetics* 78: 395 - 402, 1974.
- 25) Hasegawa A and Koyama K: In vitro growth and maturation of mouse oocyte - granulosa cell complex from cryopreserved ovaries and achievement of pup birth. *Reprod Med Biol* 6: 77 - 83, 2007.
- 26) Candy CJ, Wood MJ and Whittingham DG: Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovarise. *J Reprod Fertil* 110: 11 - 19, 1997.
- 27) Pedro PB, Zhu SE, Makino N, Sakura T, Edashige K and Kasai M: Effects of hypotonic stress on the survival of mouse oocytes and embryos at various stages. *Cryobiology* 35: 150 - 158, 1997.

(平成22年1月19日受付)
