

凍結・融解したラット卵巢の卵巢囊内への移植

利部聰・牧田登之・萬場光一・石田哲也

山口大学農学部獣医学科

Transplantation of rat ovary into ovarian bursa
after freezing and thawing

KAGABU Satoshi, MAKITA Takashi, MAMBA Kouichi and ISHIDA Tetsuya

Department of Animal Anatomy, Faculty of Veterinary Medicine,
Yamaguchi, University, Yamaguchi 753

S u m m a r y

A study has been made of the viability of rat ovarian tissue after exposure to -196°C . The ovaries were plunged into LN_2 directly after soaking in the vitrification solution (Rall & Fahy, 1985). After thawing and transplantation, such tissue formed functional grafts in the ovarian bursa of the ovariectomised donors, and ovulated.

生殖期間中の総排卵数は、卵巣に存在する卵細胞のわずか0.01%であり、99.9%が閉鎖卵胞となる (Hirshfield & Midgley, 1978)。卵細胞の効率的採取を目的として、過排卵誘起処理を繰り返し行ってもわずかに増加するだけで、排卵数は卵巣のもつ能力のごく一部を引き出しているにすぎない。近年の発生工学の進歩はめざましく、実験材料である卵子の不足が深刻な問題となりつつある。卵巣の凍結保存-培養-排卵系または凍結保存-移植系を確立すれば、卵巣から多数の卵子を効率よく得られるようになり、卵子不足の解決する可能性がでてくる。卵巣の凍結保存に関連した研究は、1960年代まで多く行われたが、当時はまだ発生工学の今日のような発展はなく、その後この種の研究は少なくなった。

一方、卵子の凍結保存法は改良が積み重ねられ、凍結保護剤を浸透させたあと直接液体窒素に投入する超急速無段階凍結法がRallとFahy(1985)によって確立された。この凍結法を応用してラットの卵巣を凍結し、移植後組織が生着したとの報告がなされた (利部ら、1987)。

RallとFahyの方法は、従来のようにプログラムフリーザーを必要とせず、液体窒素保管器があれば屠場で採取された卵巣もその場で凍結保存することも可能であるので、今後この方法は利用価値が高まると予想される。本研究は、RallとFahyの方法を卵巣の凍結保存法として適応させるために種々な条件下で卵巣を凍結し融解後卵巣嚢内に移植し生着状態・排卵の有無を調べたものである。

材料および方法

供試卵巣

ウイスター・今道系ラット（九動から導入）の交配後22日目の胎児卵巣45個を用いた。麻酔下で卵巣を取出し、ただちに室温に暖めたリン酸緩衝培養液（以下PB1、Quinnら、1982）中で、卵管・卵巣嚢・脂肪塊を除去した後ふたたびPB1で洗浄し供試した。

ガラス化凍結液

RallとFahy(1985)の方法に準じて調整した。0.4%^{w/v}ウシ血清アルブミンを含んだPB1に、凍結保護剤として20.0%^{w/v}DMSO、15.5%^{w/v}アセトアミド、10.0%^{w/v}プロピレングリコール、6.0%^{w/v}ポリエチレングリコール（分子量7800-9000）を添加してガラス化凍結液（以下VS1と略す）とした。

脱水・凍結法

実験1

胎児卵巣をセラムチューブ（住友ベークライト、1.8ml）内で脱水した。VS1 12.5%を含む室温PB1（12.5%VS1）に15分間、室温25%VS1に15分間、さらに氷冷した50%VS1、100%VS1にそれぞれ静置して脱水処理とした。凍結は、0.5ml精液用ストローに移しかえ、直接液体窒素に投入して行った。凍結融解後の卵巣組織内にできる氷晶を観察するため、常法による透過型電子顕微鏡（TEM）での観察を行った。

実験2

凍結保護剤の浸透時間を各V S 1濃度とも30分間とした。その他の方法は、実験1と同様である。

実験3

凍結保護剤の浸透を良くするために卵巣をセラムチューブに入れた状態にしてスターラーで3回/秒、15分間攪拌した。温度設定およびその他の方法は、実験1と同様である。

実験4

Whittingham ら(1979)のマウス胚の凍結方法によった。すなわち0℃で3_MDMSOを添加し-6℃で植氷後-30℃まで0.3-1℃/分で冷却したのち液体窒素で凍結した。

融解・凍結保護剤の除去

実験1-2では、液体窒素中で6-7日間保存した卵巣を、氷水中で激しく振とうして融解した。融解後ただちに氷冷した50%V S 1、25%V S 1にそれぞれ10分間静置後室温P B 1で2回洗浄して凍結保護剤処理とした。実験3では、スターラーで攪拌して除去処理を行った。温度設定は、実験1-2と同様である。また、実験4においては、融解後P B 1で2回洗浄して移植した。

移植

宿主として同系統のウイスター・今道ラットを用い、野口・野口(1982)の方法によって移植した。最初に、卵巣囊の切開部分をできるだけ小さくして、卵巣囊の内部で卵巣門を切断して宿主の卵巣を完全に除去した。次に凍結・融解卵巣を止血剤および支持体としてスポンゼル(山之内製薬)にのせ移植した。卵巣囊切開部は縫合せずにそのまま

の状態で腹腔内に戻した。なお、卵巣の移植は片側だけに行った。

移植した卵巣の生着

移植後約6週間目の発情後期に生着を判定した。卵巣は卵巣嚢とともに常法によりパラフィン連続切片にして、非閉鎖卵胞が存在しているものを生着卵巣とみなした。閉鎖卵胞の判定は Braw と Tsafiriri(1980)の基準にしたがった。すなわち、顆粒膜細胞に核濃縮、卵胞腔中に細胞屑が観察されるものは閉鎖卵胞と判定した。

結果

Table1. Viability of frozen ovarian tissue after transplantation in rats

	Ovaries with non-atretic follicles	Ovaries transplanted	Follicles $\geq 50 \mu\text{m}$	Living ovary	Rats ovulated
Exp. 1	13	15	22	5	6
Exp. 2	10	15	19	4	2
Exp. 3	14	15	37	6	3

Table 1 および Fig.1 ~ 4 にその概要を示した。生着卵胞は、卵巣の周辺部に多数観察された。

考 察

ParkesとSmith(1953)は、ラット卵巣を -79°C で凍結後移植して 卵母細胞の再形成を観察して卵巣の凍結保存のさきがけとなった。その後 Deansley(1954,1957)、Greenら(1956)、Parrott(1958)、Parrott とParkes(1960)が 実験動物の卵巣の凍結保存を報告している。最近になってDaniel(1987)がウシ卵巣を凍結し融解後培養して元どおりに回復させた。これらの報告はすべて冷却過程を数段階に分け、それぞれに冷却速度を設定したものであって、操作は簡単であるとはいえない。卵子の凍結保存の分野では凍結法の簡略化が検討されている。ガラス化法により組織を脱水し、そのまま 直接 LN_2 へ投入する超急速無段階凍結法が Rall と Fahy(1985)によって開発され操作が大幅に簡略化された。この無段階凍結法を卵巣の凍結に応用し、皮下移植後生着した組織が観察されている (利部ら、1987)。

これをうけて、本実験では凍結卵巣を卵巣嚢へ移植し生着を試みた。その結果、凍結・融解卵巣は卵巣嚢内で生着し、排卵が観察された個体も認められた。また同時に Whittingham(1979) のマウス胚に用いた3段階凍結法をラット卵巣に応用してみたが、この方法によっても生着し、これら2方法間では卵巣の生着にあきらかな差異がなく、本法は卵巣を短時間に凍結できる方法であることが示唆された。しかし、問題点がないわけではない。6週齢ラットに存在する卵胞は $250\mu\text{m}$ 以上のものでも卵巣当たり28個に達する (利部、1983)が、移植後生着した卵胞はこれに比べて少ないことが指摘できる。また、生着卵胞の多くは、卵巣の周辺部に認められたが、中心部の卵胞はほぼ壊死していた。この原因としては凍結・融解時の卵巣内部の氷晶による障害が考えられたの

で、融解後の卵巣をTEMで観察してみたところ、15分静置区では卵巣の中心部に近づくほど氷晶形成によると思われる空胞が多く見られ、凍結保護剤の浸透が不足しているように考えられた。そこで、保護剤を卵巣中心部まで浸透させる目的で、①静置時間の延長、②スターラーによる攪拌を試みた。その結果双方とも生着に好影響を及ぼさなかった。今後卵巣を細切するなどして凍結保護剤の浸透性を高める方法を検討しなければならない。また、この点に関しては移植卵巣の中心部へ栄養がゆきわたらないことも原因として考えられる。さらに他の原因も考えられるが、本実験の成績から断定はできない。

以上のことより、卵巣の凍結保存に超急速無段階凍結法は、有効な手段であることがあきらかとなり、屠場等の現場で短時間にしかもプログラムフリーザーのような特別な設備がなくても卵巣を凍結保存でき、融解後卵巣嚢内で再び機能を回復できる可能性が示唆された。

- Braw, R.H. and Tsafri, A. (1980). *J. Reprod. Fert.*, 56, 267.
- Daniel, J.C. Jr. and Juneja, S.C. (1987). *Theriogenology*, 27, 220.
- Deanesly, R. (1954). *J. Endocrin.*, 11, 197.
- Deanesly, R. (1957). *Proc. roy. Soc.*, B, 147, 412.
- Green, S.H., Smith, A.U. and Zuckerman, S. (1956). *J. Endocrin.*, 13, 330.
- Hirshfield, A.N. and Midgley, A.R. Jr. (1978). *Biol. Reprod.*, 19, 597.
- 利部 聰 (1983). *日不妊誌*, 28, 505.
- 利部 聰・牧田 登之・萬場 光一 (1987). 昭和62年秋季繁殖学会.
- 野口 基子・野口 武彦 (1982). *実験生殖生理学の展開*, 鈴木 善祐編, ヲトサイエンス社.
- Parkes, A.S. and Smith, A.U. (1953). *Proc. roy. Soc. B*, 104, 455.
- Parrott, D.M.V. (1958). *Study on Fertility*, 9, 137.
- Parrott, D.M.V. and Parkes, A.S. (1956) *Brit. vet. J.*, 112, 550.
- Rall, W.F. and Fahy, G.M. (1985) *Nature*, 313, 573.
- 菅原 七郎 (1986). *図説 哺乳動物の発生工学実験法*, 菅原 七郎編, 学誠センター.
- Whittingham, D.G. (1971). *Nature*, 233, 125.
- Whittingham, D.G., Wood, M., Farrant, J., Lee, H. and Halsey, J. A. (1979). *J. Reprod. Fert.*, 56, 12.

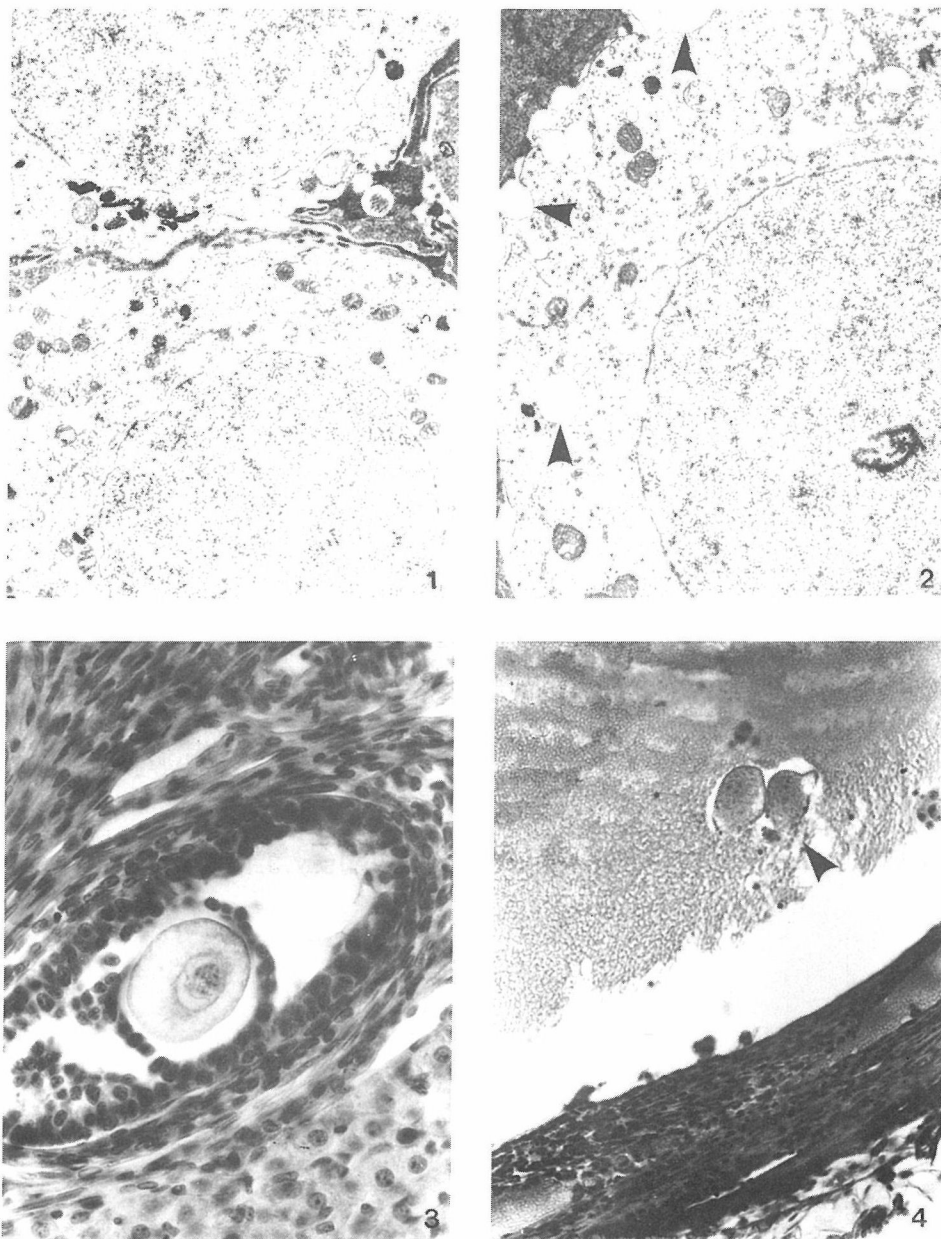


Fig. 1 In the segment of intact rat ovary, there appeared to be no additional damage.

Fig. 2 In the specimens which had been freezed and thawed, varying amount of vacuoles (allow) were seen.

Fig. 3 Six week after homioplasmic-transplantation into ovarian bursa, follicles appeared non-atretic.

Fig. 4 An example of the ovulated ovum(allow) in transplanted ovary.