

外科的処置による低侵襲的卵巢回収および 得られた未成熟卵子発生能の検討

西村 愛美¹、石 東 祐 太²、杉 本 奈 央²、中 家 雅 隆²、
中 川 隆 生³、東 雅 志³、村 井 仁 志⁴、宮 下 実⁵、
三 谷 匡⁵、細 井 美 彦^{1,2,5}、安 齋 政 幸⁵

要 約

本実験では、麻酔下による外科的処置により卵巢摘出を施すことで、動物個体を処分することなく一部の卵巢組織のみを低侵襲的に回収し、そこから得られる未成熟卵子の発生能を検討した。B6D2F1 (BDF1) 系および ICR 系マウスへ PMSG を 7.5 単位投与し 48 時間後に麻酔処置をおこなった後、供試雌の卵巢を一部切除した (約 2mm 角)。回収した卵巢の胞状卵胞より、GV 期の未成熟卵子を回収し mTaM 培地を用いて体外成熟および体外受精をおこなったところ、いずれの系統においても成熟培養後 M II 期卵へへの発生を認め、体外受精成績はいずれも 65% 以上であった。またいずれの系統においても胚盤胞期胚までの発生を認めた。さらに、卵巢切除を施した各系統マウスにおいて、卵巢切片による卵胞観察像により卵子が確認され、自然交配により産子作出が可能であった。以上の結果より、外科的処置による卵巢の低侵襲的回収技術により得られた未成熟卵子由来の体外受精は可能であり、今後、低繁殖能を呈する系統や遺伝子改変マウスあるいは野生小型げっ歯類などの希少な動物個体を処分することなく、遺伝資源の効率的な保存・増殖方法の提示が期待されると示唆された。

緒 言

現在、世界で確認されている哺乳類 5,490 種類のうち約 21% の種が絶滅の恐れがあると報告されている (レッドリスト 2009 www.incnredlist.org/info/tables/table3a)。この希少な野生動物保護の観点から、それぞれの生物種の生息・生育状況の動向を踏まえて効果的な種の保存に関する研究が進められている⁽¹⁾。哺乳類の中で一番多い生物種であるげっ歯類は、開発による里山や河川の分断化にともなう生息地の減少、また集団の小規模化にともなって近親交配が増加した結果、集団内の遺伝的多様性の減少と遺伝的均一化が起きることによっても、生息数が減少していることが指摘されている⁽²⁾。このため、種の保存に関する活動として、生息域の環境保全^(3,4)と共に、野生のげっ歯類の生理機能や遺伝的多型に関する研究が行われている^(5,6)。一方、通常の繁殖活動でその種を保存することができない小集団では、遺伝的多様性の確保と遺伝的均一化の回避方法として、人工繁殖技術が期待されている⁽⁷⁾。しかしながら、実験動物の遺伝資源の保存・活用で実用化している生殖工学・発生工学技術である胚や配偶子などの生殖細胞の操作技術は、野生の小型げっ歯類においては十分に確立されていない^(8,9)。

本実験では、げっ歯目の遺伝資源の保存および繁殖能の低い近交系や疾患モデルマウスにおける効率的な個体作製技術の確立を目的に、麻酔下による外科的処置により卵巢摘出を施すことで、動物個体を処分することなく一部の卵巢組織のみを低侵襲的に回収し、そこから得られる未成熟卵子の発生能を検討した。

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. 近畿大学生物理工学部 遺伝子工学科 〒649-6493 和歌山県紀の川市西三谷 930

3. 株式会社紀和実験動物研究所 〒640-1473 和歌山県海草郡紀美野町毛原宮 486

4. 富山市ファミリーパーク 〒930-0151 富山県富山市古沢 254

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

材料および方法

1. 供試動物

供試動物として、マウスは成熟齢に達した MCH (ICR) (日本クレア (株)) および B6D2F1 (日本 SLC (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 週間以上の順化を行い (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. 外科的処置による卵巢の低侵襲的回収操作

MCH (ICR) および B6D2F1 各雌マウスに、妊馬血清性腺刺激ホルモン (あすか製薬 (株)) を 7.5 単位、腹腔内投与を行った後、46 時間目に麻酔処置を施した。麻酔後、マウスの背部を中心線に沿って解剖用バサミを用いて切開し、卵巢を露出させ、エピネフリン注射液 (第一三共 (株)) を数滴卵巢の上に滴下した後、卵巢を部分的に切除した (図 1)。切除後のマウスは、腹壁および外皮を縫合し、麻酔が覚醒するまで保温した。

部分摘出された卵巢は、mCZB-HEPES ⁽¹⁰⁾ 内で一時的に保管した後、体外成熟操作に供試した。また、術後約 2 週間の回復期間を経たマウスは、無作為に選択し同系統の各雄マウスと自然交配することにより、妊孕性の有無を確認した。

3. 凍結切片の作製

部分的に卵巢を摘出されたマウスの一部は、組織学的検査による卵巢の機能を確認した。処置された各マウスは安楽死処置後、完全な卵巢および部分摘出された各マウスの卵巢を回収した (図 2)。回収した卵巢は $1 \times \text{PBS (-)}$ 内で脂肪組織および体液を除去し凍結包埋した。凍結包埋した卵巢は -20°C の冷凍庫にて静置後、凍結ミトクローム (CM1800: LEICA) を用いて、約 $5\mu\text{m}$ の厚さに凍結切片標本を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色 ⁽¹¹⁾ により観察した。

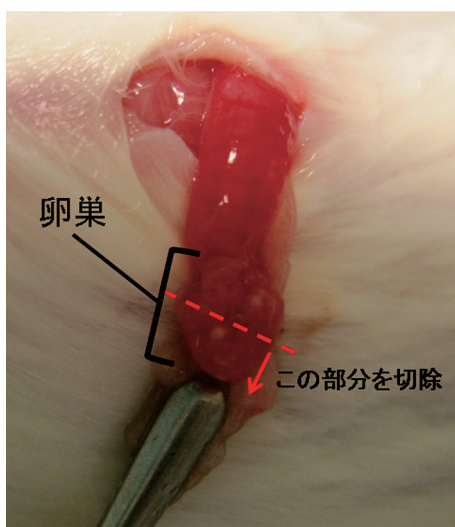


図 1. 卵巢を部分的に摘出する施行前の組織像



図 2. 手術後の一定期間回復させた卵巢組織像
黒色の円: 完全に残っている卵巢
赤色の円: 卵巢の部分摘出後の残りの卵巢

4. 体外成熟操作および体外受精操作

外科的処置により回収した部分摘出卵巢は、mCZB-HEPES 内で体液や脂肪組織の除去を行った後、注射針（26G×1/2：TERUMO）を用いて 0.1%Hyaluronidase in mCZB-HEPES 内で細切した。得られた GV 期卵子は、卵丘細胞を除去した後、mTaM 培地⁽¹²⁾ 内で 16 時間体外成熟培養（37℃、5% CO₂ in air）をおこない、M II 期卵子へ発生を確認した後、体外受精操作に供試した。

M II 期に成熟した体外成熟卵子の体外受精操作は、西村らの方法に準じておこなった⁽¹³⁾。回収した成熟卵子は、レーザー穿孔処理（XYClone：ニッコー・ハンセン（株））を用いて、透明帯に直径約 6μm となるよう穿孔処理を施した。次に、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を 2mM Hypotaurine を添加した mHTF 培地⁽¹⁴⁾ にて 1.5 時間培養し受精能を獲得させ、透明帯穿孔処理を施した卵子へ媒精（媒精濃度：8.0×10² sp/μL）を行った。媒精後 6 時間目に雌雄前核形成を確認した後、KSOM 培地（アーク・リソース（株））へ移し洗浄後、引き続き、胚盤胞期胚への発生を確認した。また 2 細胞期へ発生した胚の一部は、偽妊娠第 1 日目の受容雌（Jcl：MCH（ICR））の卵管内へ移植し、産子への発生能を確認した。

5. 統計学的解析

本実験操作における全ての統計処理については、解析ソフトウェア（Stat View-J 5.0）を用いて、それぞれ分散分析値を求めた後、Fisher の PLSD により解析をおこなった。なお、統計学的有意差は、5%水準以下とした。

結 果

MCH（ICR）および B6D2F1 成熟雌マウスを用いた手術後のマウスにおける、卵巢の機能について形態学的観察をおこなった。（図 3）。ヘマトキシリン-エオシン染色における組織構造について、手術後における部分摘出されたマウス卵巢組織は、完全な卵巢と同様に卵子を形成していることが観察された。また、組織断面からの虚血による卵巢の退行や顕著な退縮は認められず機能していることが示された。さらに、回復したマウスを無作為に選抜し自然交配した結果、いずれの系統において、卵巢を部分摘出した側からも着床痕が確認されたことにより、手術後のマウスにおいても自然交配にて正常に産子が得られることが確認できた（表 1）。

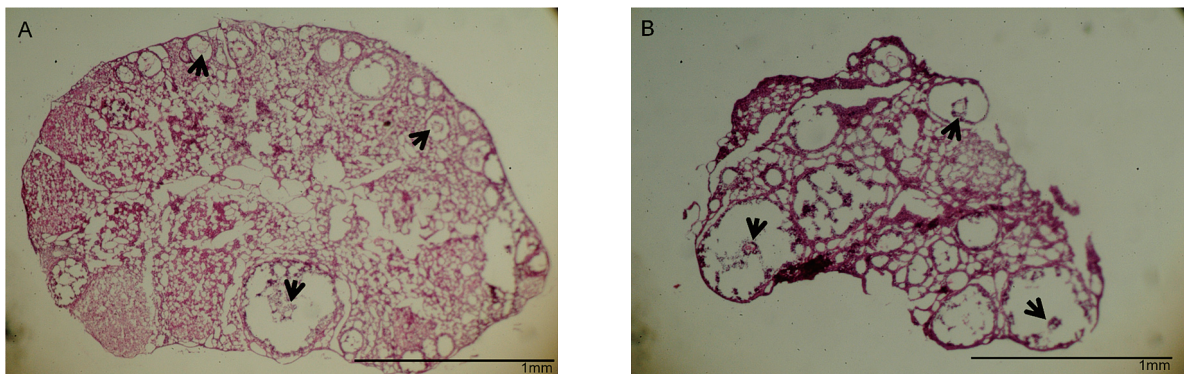


図 3. 外科的処置による低侵襲的卵巢回収を施したマウス卵巢の組織学的解析

A：完全なままの卵巢組織

B：部分摘出を施した卵巢組織

矢印は、卵子が存在していることを示している。

表 1. 外科的処置による低侵襲的卵巣回収を施した各系統マウスの自然交配における産子作出成績

系統	交配匹数	妊娠匹数	着床痕数		産子数	性比	
			完全卵巣側	部分摘出卵巣側		♀	♂
MCH (ICR)	3	3	11	8	14	9	5
B6D2F1	3	3	13	9	22	11	11

各系統から回収した部分摘出卵巣（約 2mm 角）から得られた GV 期卵子を、mTaM 培地にて体外成熟培養した結果を表 2 に示す。MCH (ICR) および B6D2F1 マウスの低侵襲的部分回収卵巣から得られた未成熟卵子の成熟率は、それぞれ、76% (54/71) および 80% (79/99) であり、完全摘出卵巣を用いた対照区 (96%; 112/117, 92%; 141/154) との有意差は認められず ($P>0.05$)、ほぼ同等の成績で成熟可能なことが示された。また、いずれの系統間における成熟率にも有意差は認められなかった ($P>0.05$)。

表 2. 各系統マウスを用いた外科的処置による低侵襲的卵巣回収法から得られた未成熟卵子の体外成熟成績

実験区	系統	卵巣回収匹数	GV 期卵子数	M II 期卵子発生数	成熟率 (%)
部分摘出卵巣	MCH (ICR)	15	71	54	76
	B6D2F1	15	99	79	80
完全摘出卵巣	MCH (ICR)	4	117	112	96
	B6D2F1	4	154	141	92

表 3 には、各系統から部分摘出卵巣から回収し、透明帯穿孔処理を施した体外成熟卵子の体外受精成績を示した。部分摘出され発生させた卵子での体外受精成績は、それぞれ、80% (43/54) および 78% (62/79) であり、完全摘出卵巣して成熟させた卵子との体外受精成績 (66%; 74/112, 82%; 116/141) と比較して、有意な差は認められなかった ($P>0.05$)。

表 3. 各系統マウスを用いた外科的処置による低侵襲的卵巣回収法から得られた体外成熟卵子の体外受精成績

実験区	系統	供試卵子数	受精卵子数 (%)	多精子卵子数 (%)	2 細胞期胚数 (%)
部分摘出卵巣	MCH (ICR)	54	43 (80)	1 (2)	37 (86)
	B6D2F1	79	62 (78)	2 (3)	57 (92)
完全摘出卵巣	MCH (ICR)	112	74 (66)	3 (3)	63 (85)
	B6D2F1	141	116 (82)	9 (6)	98 (84)

各系統マウスを用いた外科的処置による低侵襲的卵巣回収法から得られた体外成熟由来胚の発生成績を表 4 に示す。各系統の部分摘出卵巣区において、それぞれ、32% (12/37) および 63% (36/57) であった。完全摘出卵巣区においては、それぞれ 46% (27/59) および 58% (57/98) であった。この各系統間において、部分摘出卵巣区と完全摘出卵巣区の胚盤胞期胚への発生成績には、有意な差は認められなかった ($P>0.05$)。

表 4. 各系統マウスを用いた外科的処置による低侵襲的卵巣回収法から得られた体外成熟由来胚の発生成績

実験区	系統	発生成数 (%)			
		2 細胞期	4 細胞期	桑実期	胚盤胞期
部分摘出卵巣	MCH (ICR)	37	29 (78)	25 (68)	12 (32)
	B6D2F1	57	49 (86)	46 (81)	36 (63)
完全摘出卵巣	MCH (ICR)	59	47 (80)	47 (80)	27 (46)
	B6D2F1	98	88 (90)	84 (86)	57 (58)

表 5 には、MCH (ICR) マウスを用いた外科的処置による低侵襲的卵巣回収法から得られた、体外成熟由来胚の移植成績を示した。部分摘出卵巣および完全摘出卵巣から得られた体外成熟卵子の移植成績は、それぞれ、18% (5/28) および 19% (9/47) であり、いずれの産子作出成績に有意な差は認められなかった ($P>0.05$)。

表 5. 外科的処置による低侵襲的卵巣回収法から得られた体外成熟由来胚の移植成績

実験区	移植胚数	着床数	産子数	性比	
				♀	♂
部分摘出卵巣	28	12 (43)	5 (18)	0	5
完全摘出卵巣	47	20 (43)	9 (19)	3	6

考 察

卵巣は、虚血期間に大部分の卵胞を失うことが示されている⁽¹⁵⁾。原卵胞および卵巣皮質ストロマ細胞は虚血状態に後、時間ごとにアポトーシス増加していることが示されてされており、ストロマ細胞や顆粒膜細胞、成長卵胞は原始卵胞に比べて代謝が高いため、虚血に対して敏感であるとされている⁽¹⁶⁾。本実験では、卵巣の低侵襲的な回収法により、生体より卵巣を回収し、そこから未成熟卵子を得ることができた。しかしながら、安楽死後すぐに未成熟卵子を取り出した完全卵巣区と比較すると、麻酔下にて卵巣を取り出した部分摘出卵巣区では成熟成績が低下した。私たちは、ホルモン投与後 46 時間で胞状卵胞まで成長させてから GV 期を回収しているため、手術後の虚血状態により、成長卵胞およびストロマ細胞が虚血状

態になることによるアポトーシスの増加が成熟成績を低下させた可能性が考えられるものの、体外受精成績および発生成績に顕著な差は認められなかったことから、卵巢の虚血状態による発生成績は、その後の発生成績に影響をおよぼさない可能性を示唆した。

卵巢移植において、卵巢組織内の卵子や卵胞が移植後に退行することや、野生型のレシピエント卵巢由来の卵胞に成長を抑制されることがあることが示唆されている^(17, 18)。これらのレシピエント卵巢の影響を受けないためには、レシピエント卵巢を完全に取り除いたほうが良いが、Huang らはレシピエント卵巢を完全に取り除いた場合に産子を得る割合が低くなるとし、レシピエント卵巢が移植片の生着を補助していることを示した⁽¹⁹⁾。これらのことは、生体内で卵巢を部分的に取り除いても、レシピエント卵巢が機能していることを示している。本実験でも、卵巢を部分的に摘出しても、残りの卵巢は機能していることを示し、自然交配による産子獲得が可能であることを確認できた。

長谷川らは、繁殖障害を伴う筋ジストロフィー症疾患モデルマウス (C57BL/6-dy/dy) を、卵巢移植による個体生産技術を構築し、この卵巢移植を繰り返すことによって系統を維持することを可能にした⁽²⁰⁾。また、Migishima らは GFP トランスジェニックマウスを用いて卵巢のガラス化保存をおこない、加温後、それら組織の卵巢移植を経て正常産子の獲得に成功している⁽²¹⁾。しかし、本法の条件は、供されるマウス系統を安楽死処分により卵巢を回収し、それら卵巢を同系統あるいは免疫不全マウスの卵巢へ移植する。また移植される雌マウスは、性周期の同期されない幼弱齢へ移植され、その後 4 週間以上の成熟期を経て交配による個体生産を開始する。このため、本法では個体の維持と供給に貴重なマウス個体を実験に供されることなく維持のみにて別にコロニーの樹立が必要であるとされている。さらに横山らは、IL-2 トランスジェニックマウスを卵巢移植にて系統維持する際、卵巢移植により産子の獲得を試み、導入遺伝子の伝達は自然交配により 20% (10/49) の効率であったが⁽²²⁾、これらの系統の再構築には 7 産の分娩を要し、さらに分娩能力が必要な受容雌マウスの維持と長期間を経て飼育維持されるために飼育環境および作業効率の省力化の観点から実用的ではない。また、西中川らは、卵巢除去下のマウスにおける卵巢と乳腺機能の関連について、卵巢の完全除去によって乳腺が退縮し血管分布に異常を示すことが示されており⁽²³⁾、卵巢から分泌されるプロゲステロンを含む生理活性物質の産生が阻害され、正常発達の亢進とその後の実験に影響をおよぼす可能性を示唆している。

本実験における、外科的処置による低侵襲的な卵巢の部分摘出術により得られた未成熟卵子由来の体外受精および産子獲得が可能であることは、低繁殖能を呈する近交系や遺伝子操作マウスあるいは小型げっ歯類などの希少な動物個体を処分することなく生理機能を維持することを可能にし、今後、遺伝資源の効率的な保存・増殖方法が期待されると共に、本技術の開発により短時間に個体生産が可能であることから、作業効率の省力化の観点からも有用性が高いと考えられる。

謝 辞

本実験に関して、適切なご助言を賜りましたニッコー・ハンセン株式会社、岸禎一氏に感謝申し上げます。

参 考 文 献

1. Charlesworth D, Willis JH. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nat Rev Genet.* 10, 783-796.
2. 佐藤哲也. (1993). ストックファームとしてのサファリパークの役割と意義. *畜産の研究.* 47, 76-82.

3. 河野昭一. (1999). 北アルプス立山における自然環境の破壊と保全. 日本生態学会誌. 49, 313-320.
4. 杉村乾. (1994). 環境科学の視点から見た奄美大島の野生鳥獣種の保護. チリモス. 5, 20-26.
5. 土屋公幸. (2011). ネズミを友に半世紀. 哺乳類科学. 51, 101-106.
6. K. Moriwaki, N. Miyashita, A. Mita, H. Gotoh, K. Tsuchiya, H. Kato, K. Mekada, C. Noro, S. Oota, A. Yoshiki, Y. Obata, H. Yonekawa, T. Shiroishi. (2009). Unique Inbred Strain MSM/Ms Established from the Japanese Wild Mouse. Exp Anim. 58, 123-134.
7. 入谷明. (1992). 繁殖技術最前線. どうぶつと動物園. 44, 12-17.
8. H. Suzuki, N. Nakagata, M. Anzai, K. Tsutiya, M. Nakura, S. Yamaguchi, Y. Toyoda. (1993). Transport of wild mice genetic material by in vitro fertilization, cryopreservation, and embryo transfer. Lab Anim Sci. 46, 687-688.
9. 中潟直己、上田進、山内一也、土屋公幸、岡本正則、松田洋一、安齋政幸、東貞宏、豊田裕 (1995). PMSG-hCG 処理による野生ねずみ類の排卵誘起. 哺乳動物卵子学誌. 12, 13.
10. Kawasumi M, Unno Y, Matsuoka T, Nishiwaki M, Anzai M, Amano T, Mitani T, Kato H, Saeki K., Hosoi Y, Iritani A, Kishigami S, Matsumoto K. (2009). Abnormal DNA methylation of the Oct-4 enhancer region in cloned mouse embryos. Mol Reprod Dev. 76, 342-350.
11. 榎本真、林裕造、田中寿子編. (1980). 実験動物の病理組織. ソフトサイエンス社. pp94-97.
12. 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.
13. 西村愛美、中牟田裕子、福本紀代子、近藤朋子、春口幸恵、竹下由美、土山修治、石川裕子、石束祐太、細井美彦、三谷匡、竹尾透、中潟直己、安齋政幸. (2012). 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. 近畿大学生物理工学部紀要. 29, 33-42.
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、中潟直己. (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. Candy CJ, Wood MJ, Whittingham DG. (1997). Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. J. Reprod. Fert. 110, 11-19.
16. Kim SS, Yang HW, Kang HG, Lee HH, Lee HC, Ko DS, Gosden RG. (2004). Quantitative assessment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. Fertil Steril. 82, 679-685.
17. Liu J, Van der Elst J, Van den Broecke R, Dhont M. (2002). Early massive follicle loss and apoptosis in heterotopically grafted newborn mouse ovaries. Hum Reprod. 17, 605-611.
18. Spears N, de Bruin JP, Gosden RG. (1996). The establishment of follicular dominance in co-cultured mouse ovarian follicles. J. Reprod. Fert. 106, 1-6.
19. Huang KY, de Groot SA, Woelders H, van der Horst GT, Themmen AP, Colenbrander B, Fentener van Vlissingen JM. (2009). Functionality of cryopreserved juvenile ovaries from mutant mice in different genetic background strains after allotransplantation. Cryobiology. 60, 129-137.
20. 長谷川孝徳、横山峯介. (1991). 動物実験法. 東京化学同人. pp367-371.
21. Migishima F, Suzuki-Migishima R, Si-Young Song, Kuramochi T, Azuma S, Nishijima M, Yokoyama M. (2003). Successful cryopreservation of mouse ovaries by vitrification. Biol. Reprod. 68, 881-887.
22. 横山峯介. (1994). 遺伝子導入動物研究の展開. クバプロ. pp24-33.
23. 西中川駿、大塚閏一. (1973). 卵巣除去下におけるマウス乳腺の血管分布について. 日本獣医学雑誌. 35, 481-486.

英文要旨

Study of fertilization and development using immature oocytes derived
from the ovary was removed surgically

Manami Nishimura¹, Yuta Ishizuka², Nao Sugimoto², Masataka Nakaya²,
Takao Nakagawa³, Masashi Azuma³, Hitoshi Murai⁴, Minoru Miyashita⁵,
Tasuku Mitani⁵, Yoshihiko Hosoi^{1, 2, 5} and Masayuki Anzai⁵

Abstract

This study, the developmental potential of immature oocytes collected low invasive by the surgical manipulation under the anesthesia was examined. Mice were used B6D2F1 (BDF1) strain and ICR strain of matured mice. Mice are injected PMSG. After 48 hours, a part of ovaries (about 2mm) were extirpated under the anesthesia. Oocytes were collected from a part of ovary collected under the anesthesia. Oocytes are transferred maturation medium (mTaM with 5%FBS) and matured in 5% CO₂ incubator for 16 hours. In vitro matured oocytes were drilled by laser optimal system (XYClone ; Nikko-Hansen Co., Ltd.). In vitro matured oocytes drilled zona pellucida was performed *in vitro* fertilization and confirmed embryonic development. In vitro fertilization rate that used *in vitro* matured oocytes was over 65% in each mice strain. Embryo development was developed to the blastocyst stage in each mice strain. In addition, oocytes were confirmed in the follicle images of the ovary slice after it had passed between convalescences in each mice strain removed the ovary.

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

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

3. Kiwa Laboratory Animal Co, Ltd., Wakayama 640-1473, Japan.

4. Toyama Municipal Family Park Zoo. Toyama 550-0002, Japan

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