

## 第9回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## イヌ卵巢の凍結保存と移植

鈴木 宏志

帯広畜産大学 原虫病研究センター ゲノム機能学分野  
東京大学大学院 医学系研究科 発生・医療工学講座

はじめに

我が国では、約950頭の盲導犬が実動しているが、その需要は7,800頭ともいわれており、優良な盲導犬の育成・供給体制の構築が急務である。視覚障害者に提供される盲導犬は、毎年120頭程度であり、この数は横ばいが続いており上昇傾向は認められない。我が国の繁殖犬の総数は約150頭、盲導犬が盲導犬の合格率は30-40%と低率である。盲導犬の普及が進まない原因には社会、文化的背景を含めて様々な要因が関与していると思われるが、繁殖学的側面からは、非常に特徴的な盲導犬の繁殖・育成システムが挙げられる。すなわち、盲導犬候補犬は訓練前に例外なく雌雄ともに生殖器摘出術を受けるために、例え優秀な盲導犬に育成されても、その子孫を残す術がない。また、繁殖に供用されている個体では、盲導犬としての訓練、評価を受けることはない。凍結保存精子を用いた人工繁殖は、盲導犬コロニーの質の向上に寄与することが期待できるが、もし、卵巢の凍結保存システムが構築できれば、雌雄両方向からの効率的な盲導犬の育種の実現に貢献することが期待できる。そこで、演者らは、視覚障害者のQOLの向上に資することを目的として、生殖工学を駆使した盲導犬の育成に取り組んでいる。

これまで、盲導犬候補犬の避妊手術の際に摘出された卵巢は廃棄されていたが、この卵巢を凍結保存することができ、そして卵巢移植技術が開発されれば、優秀な盲導犬の子孫を得ることが可能となる。そこで、摘出した卵巢を細切した後、超急速凍結保存法によって-196℃で凍結保存し、融解した卵巢を免疫不全マウスの卵巢に移植したところ、イヌの

卵巢がマウスの卵巢に生着可能である成績を得た[1]。

## イヌ卵巢の超急速凍結保存と移植

イヌ卵巢組織を1mm角に細切し、1M DMSOの中で平衡後、あらかじめ氷上で冷却しておいたDAP213(2M DMSO/1M アセトアミド/3M プロピレングリコール)を95μl添加し、氷上で5分間平衡させた後、チューブを液体窒素に浸漬した。融解は、室温で60秒放置した後、37℃の0.25Mスクロースを添加して行った。凍結融解イヌ卵巢を組織学的に検査した結果、凍結融解後の組織は、すべてのイヌ卵巢組織(n=30)において、非凍結融解組織と比べ、組織学的に正常であった(写真1)。さらに、凍結融解イヌ卵巢(ドナー5ヶ月~9ヶ月齢)を、免疫不全であるNOD-SCID(non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency)マウスの卵巢嚢内に異種移植をし、凍結融解後のイヌ卵巢の生存を検討した。マウス卵巢を移植後のイヌ卵巢への血流確保の為に20%~30%残すように切除し、その卵巢嚢内へ凍結融解イヌ卵巢を入れた。4週間後、取り出した卵巢をHE染色およびPCNA(Proliferating Cell Nuclear Antigen)免疫染色によって組織学的に検査した。その結果、HE染色による組織学検査の結果、すべてのマウス(n=23)でイヌ卵巢とマウス卵巢の生着が見られ、卵巢組織あたりでも46例中39例(85%)の生着が見られた(写真2)。また、イヌ卵巢組織にいくつかの赤血球が認められた。PCNA染色の結果、顆粒膜細胞にPCNA陽性が認められた。これらのことから、凍結融解後のイヌ卵巢が生存し

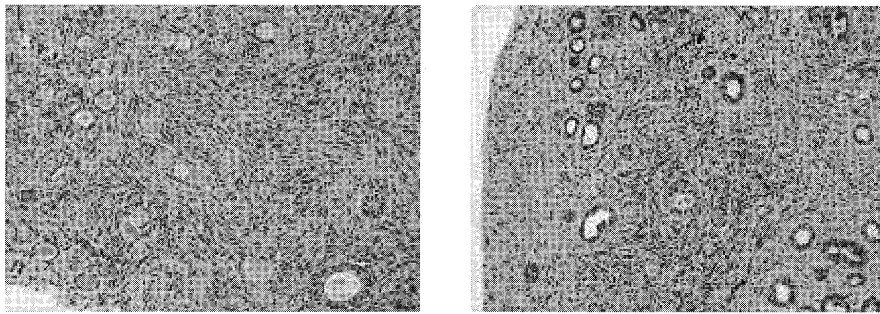


写真1 未凍結融解イヌ卵巣（左）および凍結融解イヌ卵巣（右）

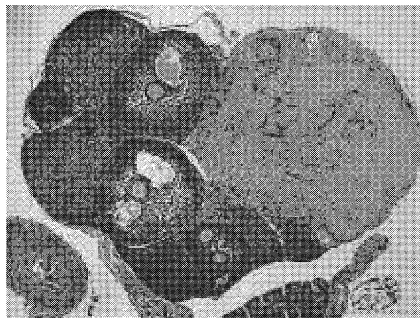


写真2 イヌ卵巣とマウス卵巣の生着  
濃染色：マウス卵巣，薄染色：イヌ卵巣

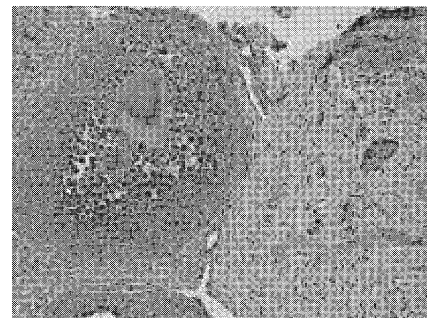


写真3 PCNA免疫染色  
左組織：マウス卵巣，右組織：イヌ卵巣

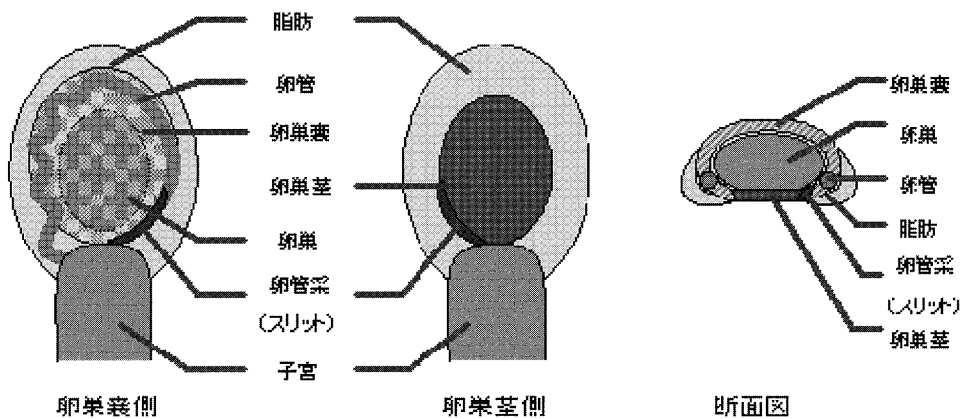


図1 イヌ卵巣および周辺組織の模式図

ており、その機能を発揮する可能性があることが示唆された（写真3）。さらに、凍結融解イヌ卵巣（ドナー7ヶ月齢～1歳3ヶ月齢・ラブラドルレトリバー）を9例の6ヶ月齢～7ヶ月齢のラブラドルレトリバーの卵巣嚢内に同種移植した。イヌの卵巣は、卵巣嚢で包まれており、子宮からつながる卵管が、卵巣嚢を囲むような構造になっている。卵管采部の卵巣嚢が一部開口しており、我々はこの部位をスリットと呼んでいる。さらに卵巣嚢の裏側、卵巣と他組織をつなぐ部位を卵巣茎と呼んでいる

（図1）。術式は、各レシピエントによって様々であるが、基本的には、卵巣茎から切開してレシピエントの卵巣を全部摘出してからドナーの凍結融解卵巣をスポンゼルに付着させて挿入する方法、あるいは卵巣嚢から切開してレシピエントの卵巣の一部を切除した後にドナーの凍結融解卵巣をスポンゼルに付着させて移植する方法の二つであった。現在、イヌの凍結融解卵巣を別のイヌに移植して経過を観察している。

また、アウトリーチ活動のひとつとして、手術を

終えたレシピエントについては、飼育ボランティアを募集して飼育を委託して、本研究への理解を促す活動を実施している。飼育ボランティアとは定期的に連絡をとり、発情出血が観察された時点で大学に搬送し、交配を経て再度、飼育を委託する体制をとって実施している。これまでに十数家族からの応募があり、8頭のレシピエントを委託するに至った。

#### 文献

- 1) Ishijima, T., Kobayashi, Y., Lee, DS., Ueta, YY., Matsui, M., Lee, JY., Suwa, Y., Miyahara, K., Suzuki, H. Cryopreservation of canine ovaries by vitrification. *J. Reprod. Dev.* (2006) 52, 293-299.