

氏名	すぎもとみき 杉本実紀
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	論農博第2376号
学位授与の日付	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	Studies on Cryopreservation of Mammalian Ovaries (哺乳動物卵巣の超低温保存に関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 宮本元 教授 今井裕 教授 佐々木義之

論文内容の要旨

哺乳動物の卵巣は、未発育な雌性生殖細胞である卵母細胞が発育・成熟して雌性配偶子である卵子となる器官である。卵母細胞は卵巣を構成する体細胞と共に卵胞とよばれる構造を形成しており、これらの体細胞による支持を必要とする。また卵巣は内分泌器官としても重要な機能を果たしている。本論文は、未発育雌性生殖細胞の長期保存および内分泌機能の保存を可能とする哺乳動物卵巣の超低温保存法に関して検討したものであり、内容は次のように要約される。

第1章では、哺乳動物における卵子形成の特徴および卵巣の内分泌器官としての機能について解説し、卵巣の超低温保存の目的および意義について述べるとともに、過去の研究について紹介している。

第2章では、未成熟卵巣の保存の例として、ラット卵巣の超低温保存法について検討している。幼若ラットの卵巣を材料とし、グリセロールを凍害保護物質として用いた緩慢凍結法または細胞・組織の超低温保存において傷害の主要な原因となる氷晶形成を抑制する冷却法であるガラス化法により卵巣を処理し、組織形態を光学顕微鏡観察により検討したところ、グリセロールを用いた緩慢凍結法では保存後の組織に顕著な損傷が認められたが、ガラス化法では保存状態の良好な卵胞が観察された。ガラス化法で保存した卵巣については、透過型電子顕微鏡による観察を行い、超微形態学的レベルで良好に保存された卵胞の存在を示した。また、これらの形態学的検討から、各保存法での傷害の発生要因について考察し、氷晶形成、保護物質の影響等の可能性を示唆している。さらに、ガラス化法で保存された卵巣の保存状態について器官培養法および自家移植法による検討を行い、この方法で保存された卵巣において卵胞が生存・発育しうることを示した。

第3章では、大型動物の卵巣組織の保存の例として、ヤギ卵巣組織の超低温保存について検討した結果について述べている。大型の卵巣においては卵巣全体を保存するよりも、未発育な卵母細胞が分布する皮質表層を保存するほうが効率が良いと推察されることから、卵巣組織片を材料として実験を行った。ラット卵巣で検討したグリセロールを凍害保護物質として用いた緩慢凍結法およびガラス化法に加えて、ジメチルスルフォキシドを保護物質とした緩慢凍結法についても検討した。光学顕微鏡法および電子顕微鏡法により保存状態および傷害の発生原因の形態学的検討を行った結果、グリセロールを保護物質とした緩慢凍結法では、氷晶形成、保護物質の影響による組織の損傷が顕著であったが、ジメチルスルフォキシドを保護物質とした緩慢凍結法またはガラス化法により保存しシヨ糖添加溶液を使用して保護物質を除去した組織では形態の良好な卵胞が観察された。これらの方法で保存された組織を器官培養したところ、生存が推測される卵胞が観察され、ジメチルスルフォキシドを保護物質とした緩慢凍結法で生存率が高い傾向が認められた。

第4章では、卵巣の器官超低温保存における核磁気共鳴顕微鏡法の利用の可能性について述べている。大型の組織・器官の超低温保存においては部位による処理効果の変異の制御が成功率に強く影響すると考えられ、効率よく保存するためには処理過程において組織の状態をを観測し最適化する手段が必要である。そこで、非侵襲的観測法である核磁気共鳴顕微鏡法の利用について検討した。核磁気顕微鏡法によりラット卵巣の観察を行い光学顕微鏡像との対応を検討することにより、胞状卵胞、黄体などの卵巣内部の主要な構造が非侵襲的に観察され、組織構造間で信号強度および測定条件に対する反応に差異が認められることを示した。また、保護物質の分布の観測法について検討し、化学シフトイメージング法によりラット肝

組織内に浸透する凍害保護物質の分布の経時的観測を行った。ジメチルスルフォキシドの浸透過程については半定量的解析を行い、組織内での水および保護物質に勾配が存在し、経時的に変化する過程を示した。

第5章では本研究で得られた結果が総括され、雌性生殖細胞の有効な保存・利用法の確立の可能性が示唆されている。

論文審査の結果の要旨

哺乳動物においては、雌性配偶子である卵子はきわめて少数ずつしか形成されないのに対して、卵巣内には多数の未成熟生殖細胞が卵胞内の卵母細胞として存在するという特徴がある。これらを保存し利用することができれば、家畜、実験動物、ならびに希少野生動物等の系統保存・増殖に有効な手段となりうる。しかし、卵母細胞の発育・成熟のためには周囲の体細胞による支持が必要であるため、卵母細胞のみを保存したのでは成熟卵子にまで発育させることはできない。そこで卵巣組織の構造を維持して保存することが考えられる。卵巣の超低温保存については、マウス以外の多くの動物種では処理法が確立されておらず、より有効な保存法の開発が望まれている。本論文はラットおよびヤギの卵巣組織における超低温保存法を検討すると共に、より広範囲に実用化を行うための技術について検討したものであり、評価すべき主な点は次のとおりである。

1. 小動物の小型卵巣のモデルとなる幼若ラット卵巣の保存においてガラス化法が適用できることを、形態学的検索ならびに器官培養法および自家移植法を用いた生存性検定により示した。とくに超低温保存後のラット卵巣を自家移植することにより、卵胞発育、発情、排卵が生じることを明らかにした。ガラス化法は従来の緩慢凍結法より簡便な処理法であり野外等でも使用しやすいので希少野生動物の卵巣の保存等に特に有用であると考えられる。

2. 大型卵巣の例として検討したヤギ卵巣組織片の保存において、ガラス化法が適用可能であると共に、ジメチルスルフォキシドを凍害保護物質とした緩慢凍結法が適していることを形態学的観察および器官培養法により示した。

3. 卵巣の内部構造の非破壊的観察および組織内での凍害保護物質の分布の観測が、核磁気共鳴顕微鏡法により可能であることを示した。この技術は卵巣の器官超低温保存の実用化を行う際に、動物種および個体間での変異に応じて最適の処理方法を見出すために有用であると考えられる。

以上のように本論文は、哺乳動物卵巣の超低温保存法およびその実用化に有用な技術に関する新たな知見を得たもので、動物生殖科学および生体機構学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成13年2月13日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。