

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：72611

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23650244

研究課題名(和文) 電圧を用いた実験動物の組織・臓器の長期超低温保存の基礎的研究

研究課題名(英文) A basic study of long-term storage of experimental animal tissue and organ with voltage cryopreservation method.

研究代表者

江藤 智生 (Eto, Tomoo)

公益財団法人実験動物中央研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：30370175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：実験動物の組織・臓器を、電圧を加印しながら冷却して、超低温下で長期保存する方法を研究した。開発した電圧冷却機器で5000Vを加印しながら室温から-15℃又は-30℃まで冷却した後に液体窒素内で保存した。融解は、室温の同機器内に試料を静置して行った。保存した卵巣と精巣からの配偶子又は産子は確認出来なかった。しかし移植した組織の一部は生存した為、超低温下での組織・臓器の保存の可能性が考えられた。また卵黄と卵白を保存したところ、融解後に蛋白質が不可逆性の卵黄のみ元の形質に戻らなかった。そのためタンパク質等の細胞内物質保護の必要性が示唆された。今後の臓器保存の研究は、細胞内物質の保護に焦点が絞られる。

研究成果の概要(英文)：We have studied the high voltage cryopreservation method of organ or tissue. In the experiment, used the ovaries or testes of the mouse. And egg yolk was also frozen. The organs of mice were cooled to -15 or -30 degree C with application of 5000 V, and then placed in liquid nitrogen for cryopreservation. For thawing, the organs were placed at room temperature and a voltage of 5,000 V was applied. Testes or ovaries were transplanted into the recipient after thawing. It was not possible to obtain gametes from the ovaries or testes were cryopreserved. However, part of the organization were alive. After thawing, egg yolk that contains the irreversible protein at low temperature remained to be packed. Results of this study, the possibility of organ preservation has been suggested. However, can not preservation of complete traits.

The experiments of organ preservation in the future, it is necessary to study the protection of intracellular material.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：組織・臓器の保存 実験動物 保存 超低温保存 Cryobiology 卵巣 精巣 電圧

1. 研究開始当初の背景

実験動物の組織・臓器は、医学や薬学およびバイオテクノロジー全般の研究や系統保存の材料として使用されている。これらを長期間保存できれば、生体内での維持による老化や変異等を防ぐことができ、均一な試料の確保が可能になる。また、組織や臓器は培養細胞と違い全体をそのまま保存することで、はじめて生体の一部としての機能が保持され、実験や系統保存等の試料として有効になる。しかし、一般的に臓器/組織の保存は4程度で数時間から数日しかできない。またDMSO等の細胞浸透性耐凍剤を使用して超低温で長期保存する方法では、耐凍剤が浸透できるわずかに数ミリ厚の組織の保存しかできない。そのため既存の保存法から脱却し、新たな方法の模索を行う必要がある。食品業界では、一定の電圧を冷却機器の庫内に通電させて、生花や食材を数日から数年間低温保存(4~-10程度)する方法が試用されている。この方法を応用すると、肉厚の組織や臓器を冷却する際の氷による物理的な細胞の破壊を防ぐことが出来るかもしれない。しかしその一方で、電圧下で超低温まで冷却した際に、細胞内の核酸やタンパク質等が電圧のみで保護でき、保存後に再び正常な機能を開始できるか不明である。そこで、電圧をかけながら試料を冷却して低温保存する方法を応用して、実験動物の組織・臓器をそのままの形状で、超低温下で長期保存する方法の研究を考えた。

2. 研究の目的

電圧を加印した冷却機器内で実験動物の組織・臓器を冷却して、超低温下で長期保存できる方法を研究する。実験動物の組織・臓器の長期保存が行えると、生体内での維持による経時的な老化や変異等を防ぐことができ、系統保存や生命現象の機能解明に有効な試料となる。また保存技術は臓器移植や再生医療への応用が考えられる。しかしDMSO等の細胞浸透性耐凍剤を使用する既存の保存方法では、数ミリの肉薄な組織の一部しか保存できないため、新たな保存方法を模索する必要がある。近頃食材や生花等を、電圧をかけた保冷庫内で低温保存する方法が試用されている。この技術を応用して組織・臓器を細切せずにそのまま超低温保存する方法を検討した。

3. 研究の方法

電圧をかけながら超低温まで冷却および長期保存する際の、細胞内外への氷晶形成による細胞の物理的な破壊および、細胞内の核酸や蛋白などの変性/破壊の阻止について検討した。電圧を加印しながら冷却するためには、電圧冷却機器であるフィールテクノロジー社の「FT-BIOFZ-1」を使用した。

(1) 卵巣の保存

組織や臓器を長期間保存するには、-150以下で保存する必要性が考えられるが、高電圧を加印した食品保存は-10程度の温度域までしか実績はない。そのため超低温まで冷却した際の組織や臓器の様相を確認するために、臓器を使用した検討から始めた。摘出直後のマウスB6-GFP系統のホモ遺伝子型の卵巣を、空のクライオチューブに導入し、5000Vの高電圧を加印しながら室温から-0.5/minの速度で-15から-30まで冷却した後に、液体窒素に浸漬して1日から7日間保存した。保存した卵巣は5000Vで加印しながら室温まで加温した直後に、ワイルドタイプのメスに卵巣移植した。加温後に卵巣の形態を、肉眼または実体顕微鏡下で観察した。一部の卵巣は、さらにGFP蛍光下での顕微鏡観察と組織標本作製して臓器内の観察を行った。卵巣移植2週間後から、レシピエントメスとBDF1系統オスを連続交配して後代検定を行った。

(2) 蛋白変性の確認

マウス卵巣保存の検討により、臓器内の一部の細胞種は、電圧を加印させながら凍結すると、融解後も生存することが示唆された。しかし全体の細胞が生存出来る訳ではない。その要因として、低温下での蛋白変性が考えられる。鶏卵の卵白は低温下で固まるが室温に戻すと再び元の形態になる。しかし卵黄は、低温下で不可逆的に変性する蛋白を持つため、再び温めても元の形質に戻らない。この特性を利用して、鶏の未受精卵を冷却して蛋白変性の可能性を確認した。

(3) 精巣の保存

採取直後のBDF1系統の精巣をチューブに入れて、電圧冷却機器に導入、5000Vを加印しながら室温から-30まで-0.5/minで冷却後に液体窒素に入れて3週間保存した。保存した精巣の融解は、液体窒素からクライオチューブを取り出し、直ぐに5000Vを加印した室温の電圧冷却機器内に移し10分間静置して行った。融解した精巣の一部は、分割してからアガロースゲルに乗せて体外培養を行った。また一部はマウスC57BL/6系統に移植した。

4. 研究成果

(1) 卵巣の保存

超低温保存後に加温した卵巣の外観を観察すると、形態は保存前に近く組織液の流出もほぼ見られなかった。後代検定では9/10ペアが出産して、出産メス1匹当たり平均10匹の産子が得られた。しかし、GFP蛍光個体は確認出来

なかった。移植2週間および4週間後に移植部位を観察したところ、高電圧を無加印で冷却した実験区では、肉眼での卵巣の存在は確認できなかった。また一部では卵巣移植部位に赤黒く変色した組織塊が見られたが、移植した卵巣が判定できなかった。加印して冷却した実験区では、移植2週間及び4週間後の肉眼での観察では移植部位に卵巣が確認できた。そのため卵巣を摘出してGFP蛍光を確認したところ、移植2週間後の卵巣はGFP蛍光した (Fig.1)。しかし移植4週間後の卵巣では、GFP蛍光している卵巣は確認出来なかった。

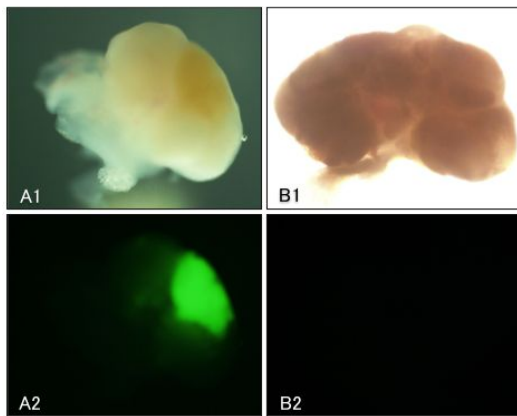


Fig.1 電圧を加印して凍結した卵巣の移植後のGFP蛍光
A1: 移植2週間後の卵巣, A2: 移植2週間後の卵巣のGFP蛍光, B1: 移植4週間後の卵巣, B2: 移植4週間後の卵巣のGFP蛍光

さらに移植3ヶ月後の卵巣の組織標本を作製した。GFP蛋白質を染色した標本を確認したところ、卵巣組織の中に、高電圧下で冷却して液体窒素内で1から7日間超低温保存したGFP卵巣由来の細胞が確認出来た (Fig.2)。

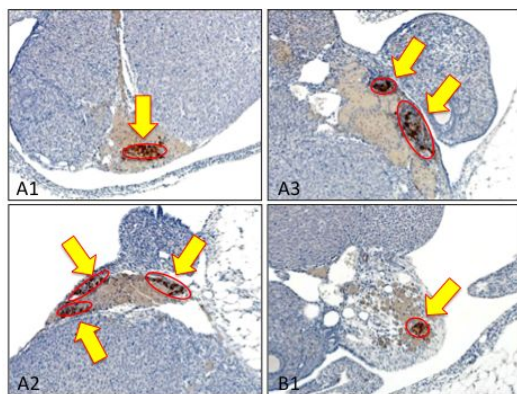


Fig.2 電圧を加印して凍結した卵巣の移植3ヶ月後の後の組織標本 GFP蛋白質の染色標本を作製した。切片標本内に、GFP染色された細胞が確認出来た。A1,12,A3: 液体窒素下での保存1日, B1: 保存7日。

これらより、無加印で超低温保存した卵巣は移植2週間以内で急激に退行するが、加印すると短期間だが生存することが示唆された。また移植3週間後でも高電圧凍結した卵巣細胞

は、少数であるが存在出来ることも示唆された。電圧を加印して超低温保存した卵巣の卵巣移植後2週間のGFP蛍光を見ると、一部の組織は蛍光していない (Fig.1)。そのためドナーの卵巣が再成長したことが示唆される。しかし、電圧を加印しない卵巣を移植すると卵巣自体が確認出来ない。これはドナーの卵巣も成長していないことが考えられる。そのため、卵巣移植後に電圧を加印した卵巣から何らかの卵巣を構成する細胞の成長因子が放出され、ドナー卵巣の成長を補助した可能性がある。以上の結果より、電圧を加印して卵巣を凍結する方法は、臓器の一部を保存出来ることが考えられた。しかし卵巣移植を行うと、ドナーの支持組織とレシピエントの組織が融合する可能性があり、保存臓器の生存の判定が困難になることも示唆された。そのため違う臓器を使用した検討を考えた。

(2) 蛋白変性の確認

鶏の未受精卵に 5000V を加印しながら室温から -0.5 /min の速度で -30 まで冷却した後 1 時間保持して、0.5 /min の速度で室温まで同電圧を加印しながら加温した。 -30 下では卵白も卵黄も固形化した。加温して室温の状態では、卵白は冷却前のゲル状の状態に復帰した。しかし卵黄は、電圧を加印しても元の状態には復帰せず、柔らかいが固形の状態のままだった。電圧を加印しながら冷却しても、低温下で非可逆的に変性する蛋白質の一部の種類は、変性からの保護は出来ないことが示唆された。

(3) 精巣の保存

凍結融解後に体外培養した精巣は、電圧を加印・非加印した区共に、1~2 週間後には変色して臓器の形態が崩れた。培養後の精巣をミンスして倒立顕微鏡下で観察を行ったが、鞭毛のある精子を確認することは出来なかった。オスマウスに移植した精巣は、3 週と 5 週後にレシピエントを安楽死してから摘出した。観察の結果、加印した精巣の外部周辺に血管の縦走が確認できた (Fig.3)。

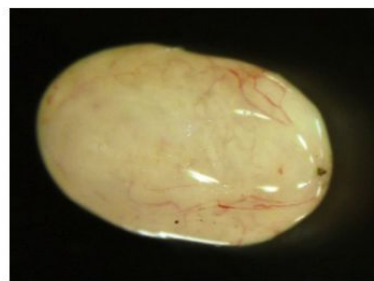


Fig.3 電圧を加印して凍結した精巣の組織標本 精巣の表面に複数の血管の走行が確認された

次に、移植した精巢の切片標本を作製した。精巢の外部の多くは、移植 3 週後と 5 週後共に細胞が石灰化を起こしていた(Fig.4)。内部の精母細胞は、細胞の形態はある程度維持されていたが核が消失されており、かつ精子が確認出来ないため、機能は維持されていないことが示唆された。しかし、支持細胞または間細胞の一部は生存し、赤血球も確認されたため血管はある程度維持されていることが分かった。

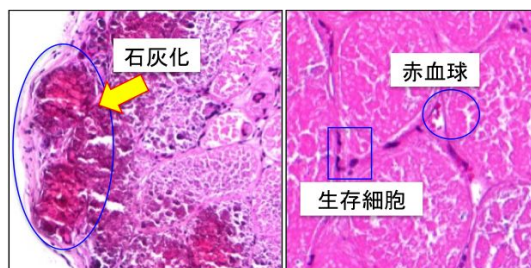


Fig.4 電圧を加印して凍結した精巢の組織標本

電圧を加印して冷却・保存した卵巣と精巣を融解後に生体内に移植すると、支持組織・細胞の一部が生存する事が確認された。これらより、超低温下での組織・臓器の保存の可能性が考えられた。しかし、移植後 2 週間後から後代検定を行っても、GFP 卵巣由来の産子を得る事は出来なかった。また生体に移植した精巣からも、鞭毛を有する成熟した精子を確認することは出来なかった。これは卵母細胞や精粗細胞等へのダメージが考えられる。そのため、電圧を加印して冷却しても、卵巣内の全種類の細胞が生存するわけではなく、一部の細胞腫のみ生存することも示唆された。融解後の臓器の外観は変色や変形、また組織液の著しい漏出は見られなかった。また精巣の切片標本でも、凍結融解しても細胞が破壊されない事が示唆された。これらより臓器に電圧を加印すると、細胞内外の水分子を振動させ、低温下でも水分子が氷晶形成と成長が阻害でき、その結果体積が大きな組織や臓器でも均一に氷晶形成が阻害できることが考えられた。しかし、融解後に臓器全体の機能を復帰させることは出来なかった。要因として考えられる点は、冷却保存時の氷晶形成による細胞の破壊よりも低温下の蛋白変性等、つまり細胞内物質の保護が充分でなかったことが示唆された。これは、鶏卵の冷却実験から想定できる。今回の研究により、組織・臓器の保存について、研究の焦点がより核心に近づいたと考えられた。そのため以降の研究では、例えば臓器冷却前に凍害保護剤を入れた溶液を臓器に環流する等を行い、細胞内物質

を保護することを検討したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Eto Tomoo, KAMISAKO Thutomu,
Cryopreservation of Mouse ovaries using
High Voltage, Federation of European
Laboratory Animal Science Association
(FELASA),
2013 年 6 月 10 日～13 日, Barcelona, Spain.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

江藤 智生 (ETO Tomoo)

公益財団法人実験動物中央研究所・実験動物研究部・室長

研究者番号：30370175