

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20689020

研究課題名 (和文)

小児血液癌患者の妊孕性温存研究～超微小血管外科技術を応用した患者 QOL 向上～

研究課題名 (英文)

Magnetic resonance influenced (MRI) ovarian organ freezing and transplant for iatrogenic sterility of cancer therapy.

研究代表者

三原 誠 (MIHARA MAKOTO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90384833

研究成果の概要 (和文)：

[目的] 化学療法、また放射線療法の進歩により、近年、小児がん患者の長期生存が可能になった。しかしながらこれらの患者では、治療の晩期合併症としての不妊症が問題となっている。現在女性患者に対して行われている妊孕性温存法では、体外受精による胚の凍結を必要とするため、思春期あるいはそれ以前の患児では事実上、不可能である。そこで我々は、思春期以前の女性患者においても妊孕性の温存を目標とし、また、卵巣性無月経を防ぐための卵巣内分泌機能温存を目指して、従来は困難とされていた卵巣移植、卵巣凍結保存の研究を、超微小血管吻合技術を用いることによって、進めている。[方法] 従来、卵巣の凍結保存と移植は、組織の虚血が問題となり、難しいとされてきた。しかし近年、形成外科分野においては、顕微鏡を用いた微小血管吻合のテクニックが進歩し、現在では 0.3mm 程度の血管吻合が可能である。この技術を用いれば、実験動物 (ラット、豚、カニクイザル) において、卵巣動静脈を顕微鏡下に血管吻合することで、組織虚血を起こすことなく高率に、また効果的に卵巣機能を再獲得することが可能となった。[結果・まとめ] 卵巣移植において、微小血管吻合の技術を用いた研究はこれまでに施行されておらず、世界的にも貴重な実験である。小児がん治療後に卵巣の内分泌機能を温存することができれば、ホルモン治療を必要とすることなく、第二次性徴の発来を期待でき、自然な性周期の回復が可能となる。そして、小児がんを克服した女性患者が将来、その手に我が子を抱くという希望を持ち続けることができる。

研究成果の概要 (英文)：

(Background) Chemotherapy and radiotherapy are essential for treatment of cancer in children and young adults, but these methods often result in testicular failure or reduced ovarian function. One problem in this area is that the ovum is structurally weak, compared with sperm, and the pregnancy rate after frozen ovum storage is very low. Ovarian preservation might be performed before cancer therapy and, in particular, may offer hope for preservation of fertility in young women with cancer. (Method) We hypothesize that this is due to instability of blood flow, and to examine this possibility we have focused on the vascular system and cryopreservation of 5 rats and 2 cynomolgus monkey with MRI whole organ freezing method, magnetic resonance influenced. We are examining the potential of

this technology in transplantation and cryopreservation of the ovary. (Result) We attempted transplantation of a vascularized ovary following a certain period of cryopreservation. The endocrine function of the ovary and the potential for pregnancy were permanently re-acquired following these procedure.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 11,500,000 | 3,450,000 | 14,950,000 |
| 2009年度 | 4,800,000 | 1,440,000 | 6,240,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 16,300,000 | 4,890,000 | 21,190,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学・(J)小児血液学

キーワード：超微小血管外科、磁場下過冷却凍結、卵巣凍結、子宮移植、妊孕性温存、妊孕性再建、小児癌

1. 研究開始当初の背景

小児癌患者（特に小児白血病患者）に対し、化学療法、放射線療法は無くしてはならない治療法である。しかし、これらの治療法の副作用として「医原性不妊症」を高率にもたらす。小児癌治療の成績が向上するに比例して、治療後のQOL向上、特に、妊孕性温存は社会問題となっている。対策として、治療前に精子・卵子凍結保存の研究が進められてきたが、精子と比較し、卵子は構造的に非常に不安定であり、凍結解凍後の妊娠率は非常に低い。2004年頃より、治療前卵子凍結保存の成功例が国際学会誌等で報告され始めたが、上記の理由より成功率は著しく低く（0.02%程度）、現時点では小児癌患者の不妊症治療は、確立できていない。この問題は、一般の人々にも大きな問題としてメディアで取り上げられ始めている。小児白血病の完全寛解率が、80%を超える現代では、早急に、QOL改善を目的とする不妊症治療法を確立しなければならない。

2. 研究の目的

組織保存に関する最大の問題点を、「血流の不安定さ」にあると考え、我々の持つ「超微小血管吻合技術」を用いた卵巣機能保存の研究を進めてきた。組織血流の温存により、「卵子虚血傷害」を防止することは可能となった。

さらには凍結による卵子破壊を防止する技術として「磁場環境下・臓器低温保存システム」を開発し、凍結卵子生存率を飛躍的に向上させた。結果、卵巣を「組織」ではなく、血流が温存された「臓器」として移植・凍結保存し、内分泌機能、妊娠機能の半永久的再獲得が可能となった。

3. 研究の方法

〔我々が開発してきた「超微小血管吻合技術」とは・・・〕
形成外科は、癌患者の再建外科手術（自家組織移植）のための顕微鏡を用いた微小血管吻合のテクニックを有している。この技術によって従来、2.0mm程度の血管吻合が可能とされてきた。我々は、12-0ナイロン糸（50μm針）や、手術用器具の開発を継続的に行うことで、従来の10分の1程度である、0.2-0.3mm程度の血管吻合が可能となった。この革新的な血管吻合技術の開発により、これまで不可能とされてきた組織・臓器の移植が可能となった。この技術は、手先器用な日本人が得意とする技術であり、日本より世界に発信し続けている技術である。

〔本研究の学術的な特色、独創性・革新性〕
今回の研究で特に強調しておきたいのは、他の研究と異なり、「臓器血流」に焦点を当て

ている点である。これまでの研究は、細断した卵巣組織を凍結融解し、血流を考慮せず腹腔内に移植していた。そのため、虚血傷害により組織のバイアピリティが低下すると共に、移植後の経過を追うことが難しかった。今回の研究の非常に独創的な点は、核磁気共鳴現象下での過冷却現象を用いた凍結保存方法により、細胞破壊を最小限とした凍結法であり、さらには、超微小血管吻合法を用いる事で卵巣動静脈を吻合し、移植直後より卵巣組織の血流を安定させる事が可能な点である。加えて、移植部位を腹腔内ではなく、皮下動静脈に血管吻合することで、(経時的に) 卵巣の状況を容易に把握することが可能な点が、研究成果の向上に繋がる。

【関連する国内外の研究動向】 ※日本においては、同種の研究は殆ど行われていない。海外の動きに関して、以下に記載する。同様の実験に関しては、成功例として報告されているが、血流の温存はなされておらず、成功率は非常に低い(0.02%程度)。今回の我々の研究では、血流という点に重点をおいて移植を行う画期的な研究であり、確実に新知見が生まれることが予測できる。以下の卵巣凍結保存に関する論文は2002年度より散見されるようになっている。凍結により、妊娠の可能性は示されたが、今後は、その成功率の向上が課題である。

① これまでの報告では、2004.7月ベルギー・ルーバンカトリック大学にて悪性リンパ腫と診断された28歳女性が、抗癌剤治療前に卵巣の一部を凍結保存し、2年後その卵巣組織を移植し、自然妊娠した。この女性は、悪性リンパ腫の従来の化学療法を受けたが成功せず、高用量治療前に卵巣組織を取り出して凍結する事を希望した。治療後、癌から回復したが閉経状態となった。術後2年目に女性の希望により、解凍組織を左卵巣に移植、断片を右卵巣に注入した。処置から8ヵ月後、月経および卵細胞の成長が見られたため、さらに、1ヵ月後、夫の精子との体外受精を行って、4分割胚を子宮に移植し、出産した事を2005.7月「New England Journal」に報告している。

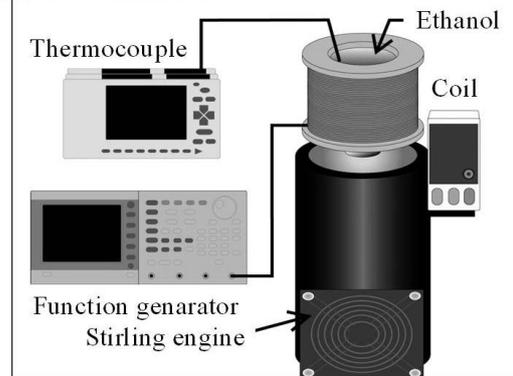
②加えて、2004.3月アメリカ・オレゴン健康科学大学にて、サルの上腕に移植し、卵子を育て、体外受精によって出産を行った事を英科学誌「Nature」にて報告した。メスのアカゲザル7匹から卵巣を取り出し、その一部をそれぞれ腕や腹、腎臓に移植。ヒトの排卵誘発剤を投与して未熟な卵子の成長を促した。3匹のメスの子宮に受精卵を移植した結果、1匹のサルが出産された。この技術が人に応用されると、子宮頸癌患者が癌治療として放射線療法を行う際に、照射範囲外に卵巣を移植する事で妊娠能を温存

することが可能になる。この実験でもわかるように、移植された卵巣自体の血流が不安定なため、卵細胞の成長が抑制され、7匹のアカゲザルから、1匹出産されたのみである。

4. 研究成果

本研究代表者(三原 誠)は、東京大学情報理工学部との医工連携研究により、これまで未解明であった「変動磁場と過冷却状態発生

- ①医療現場・研究現場で使いやすいサイズ*
- ②精密な温度制御・均一な磁場発生が必要
- ③耐久性・安全性・低価格・省エネルギー
- ④軽量(30kg以内)



の関連性」に関して、至適変動磁場周波数を解明(後述)し、安定的な過冷却状態の発生を可能とした。今回我々は、(予備研究で得た成果をもとに)変動磁場環境下に発生する過冷却現象を利用し、細胞破壊を最小限に抑える臓器(細胞)凍結技術を確認させる。また、虚血傷害を解決する「Super Microsurgery(超微小外科)」と、臓器代謝を最大限に抑制する「過冷却保存技術」の融合は、国内外において未だ実施されていない斬新且つ独創的な研究である。また、医工連携の下に、臨床で用いている最先端の外科技術「Super Microsurgery(超微小外科)」と、細胞・臓器凍結技術である「磁場下過冷却凍結技術」を融合し、国際的な研究体制を構築しながらスピードアップを図ることで、比類なき研究を実施可能である。特にバイオリソース(iPS細胞・がん幹細胞・がん微小環境)保存技術の確立は、再生医療・癌医療領域におけるイ

ンフラ技術となる可能性が高く、その結果、今後の我が国のライフイノベーションに大きく貢献しうる可能性が高い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. T Niino, Takashi Nakagawa, Shuhei Noguchi, Tatsuro Kawai, Takeyoshi Dohi, Mihara M(correspondence)
Whole Ovary Cryopreservation Applying Supercooling under Magnetic Field. ACSC. 2010 1(2): in print / 査読有り / 変動磁場下過冷却凍結によるブタ卵巢凍結と卵子生存率解析
2. Mihara M, Nakagawa T, Noguchi S, Fujii K, Owada T, Niino T. Development of Pathology Specimen preparation Method by Supercooling Cryopreservation under Magnetic Field. ACSC. 2010 1(2): in print / 査読有り / 変動磁場下過冷却凍結による病理凍結切片作成法の技術開発
3. Mihara M, Takuya Iida, , Takahiro Asakage2, Kensuke Kawai3
Supermicrosurgery and Head and Neck Reconstruction in Children. ACSC. 2010 1(2): in print / 査読有り
/ 超微小外科技術を応用した小児頭頸部再建法の開発
4. Takumi Yamamoto, Mihara M, Mitsunaga Narushimal, Isao Kohshimal
Development of New Composite Tissue Allotransplantation Models. ACSC. 2010 1(2): in print / 査読有り
/ 実験動物における新しい複合組織移植モデル開発
5. Mihara M, Hisako Hara, Mitsunaga Narushimal, Takuya Iidal, Takuya Higashinol, Gentaro Isao Koshima
Possibility of Application of Metabolomics Analysis for Supermicro Surgery on Children. ACSC. 2010 1(2): in print / 査読有り / 小児再建手術におけ

る遊離皮弁の皮弁代謝解析と術後モニタリング確立

6. Mihara M, Takashi Nakagawa, Shuhei Noguchi
Biometrics and Identification System Using Information from the Physical Features. ACSC. 2010
1(2) in print / 査読有り / 耳介を用いた個人認証技術の開発
7. Mihara M(correspondence), Nakanishi M, Nakashima M, Narushima M, Koshima I. Utility and anatomical examination of the DIEP flap's three-dimensional image with multidetector computed tomography. Plast Reconstr Surg. 2008 Jul;122(1):40e-41e. / 査読有り
/ MDCT を用いた皮下脂肪の微小血管解剖解析
8. Mihara M(correspondence), Nakanishi M, Nakashima M, Narushima M, Gonda K, Koshima I.
Distal phalanx replantation using the delayed venous method: a high success rate in 21 cases without specialised technique. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008;61(1):88-93. Epub 2007 Apr / 査読有り
/ 超微小外科を用いた指尖部再接着手術 21 症例
9. Ong WC, Nakagawa T, Noguchi S, Mihara M. (correspondence)
Super-microsurgery for vascularized ovarian transplantation. ACSC. 2009 1(1):30-33 / 査読有り
/ 超微小外科技術を用いたラット卵巢移植モデルの開発
10. Mihara M (correspondence), Nakagawa T, Noguchi S, Fujii K, Ohwada T, Kawai T.
MRI, Magnetic resonance influenced, organ freezing methd under magnetic field.
ACSC. 2009 1(1):34-37 / 査読有り
/ 磁場下過冷却凍結技術を用いた臓器凍結後の組織科学的検討
11. Fukushima T, Nakagawa T, Noguchi S, Mihara M. (correspondence)

- Temporary ovarian transplantation for iatrogenic sterility. ACSC. 2009 1(1):38-41 /査読有り
 /医原性不妊症解決のための一時的卵巣移植法の開発
12. Samanpachin K, Nakagawa T, Noguchi S, Mihara M. (correspondence)
 Super-Microsurgery for testis organ transplantation and cryopreservation. ACSC. 2009 1(1):42-45 /査読有り
 /超微小外科技術を用いたラット精巣移植モデルの開発
 13. Halim AS, Nakagawa T, Noguchi S, Mihara M. (correspondence)
 Uterus transplatation and ovarian cryopreservation for fertility reconstruction. ACSC. 2009 1(1):46-49 /査読有り /
 妊孕性再建のための子宮移植モデル開発
 14. Koshima I, Narushima M, Mihara M. Uchida G, Nakagawa M. Short pedicle thoracodorsal artery perforator (TAP) adiposal flap for three-dimensional reconstruction of contracted orbital cavity. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2008 Apr 24. /査読有り /胸壁穿通枝皮弁による眼科再建術式の開発
 15. Narushima M, Koshima I, Mihara M. Uchida G, Gonda K. Intravascular stenting (IVaS) for safe and precise supermicrosurgery. Ann Plast Surg. 2008 Jan;60(1):41-4. /査読有り /血管内ステント法を用いた超微小血管吻合法の開発
 16. Ogata F, Narushima M, Mihara M. Azuma R, Morimoto Y, Koshima I. Intraoperative lymphography using indocyanine green dye for near-infrared fluorescence labeling in lymphedema. Ann Plast Surg. 2007 Aug;59(2):180-4. /査読有り / ICGを用いたリンパ管造影法の開発
 17. Nagase T, Gonda K, Inoue K, Higashino T, Fukuda N, Gorai K, Mihara M. Nakanishi M, Koshima I. Treatment of lymphedema with lymphaticovenular anastomoses. Int J Clin Oncol. 2005 Oct;10(5):304-10. Review. /超微小血管外科技術を用いたリンパ管静脈吻合術開発
 18. Narushima M, Mihara M. Yamamoto Y, Iida T, Koshima I, Mundinger GS. The intravascular stenting method for treatment of extremity lymphedema with multiconfiguration lymphaticovenous anastomoses. Plast Reconstr Surg. 2010 Mar;125(3):935-43. /査読有り /リンパ管静脈吻合術における血管内ステント法の有用性
 19. Koshima I, Narushima M, Mihara M. Uchida G, Nakagawa M. Cross-face nerve transfer for established trigeminal branch II palsy. Ann Plast Surg. 2009 Dec;63(6):621-3. /査読有り /顔面神経麻痺に対する血管柄付神経移植法の開発
 20. Mitsunaga N, Mihara M. Koshima I, Gonda K, Takuya I, Kato H, Araki J, Yamamoto Y, Yuhei O, Todokoro Digital artery perforator (DAP) flaps: modifications for fingertip and finger stump reconstruction. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2009 Sep 1. /査読有り /指尖部再建のための指動脈穿通枝皮弁開発
 21. Koshima I, Narushima M, Mihara M. Uchida G, Nakagawa M. Fascicular turnover flap for nerve gaps. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2009 Apr 22. /査読有り /神経欠損に対する神経反転法の臨床応用
 22. Intravascular stenting (IVaS) method for fingertip replantation. Narushima M, Mihara M. Koshima I, Gonda K, Takuya I, Kato H, Nakanishi K, Yamamoto Y, Araki J, Ann Plast Surg. 2009 Jan;62(1):38-41. /査読有り /指尖部再接着術における血管内ステント法の有用性

[学会発表] (計 20件)

[その他]
ホームページ等 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三原誠 (MIHARA MAKOTO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90384833