

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791831

研究課題名（和文） カニクイザルを用いた卵巢臓器全体の凍結技術確立

研究課題名（英文） Establishment of whole ovarian cryopreservation

研究代表者

清水 良彦（SHIMIZU YOSHIHIKO）

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50422887

研究成果の概要（和文）：

霊長類のカニクイザルを用いて卵巢臓器凍結技術を確立することが研究目的である。カニクイザルから卵巢動静脈をつけたまま卵巢全体を摘出する技術を検討した。卵巢を凍結する際の凍結保護剤の条件検討、緩慢凍結方法の条件検討を行った。凍結融解後の卵巢の機能を検討するため、Propidium iodide (PI) を用いて細胞のバイアビリティを測定、FSH 添加後の培養液中のエストロゲン濃度を ELISA で測定した。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this study is to establish a technology for freezing ovarian tissues using primates (cynomolgus monkeys). A technique to remove ovaries with the ovarian arteries and veins was examined in cynomolgus monkeys. Conditions of cryoprotectants used in ovary freezing as well as those of slow freezing methods were studied. To evaluate the function of frozen-thawed ovaries, viability of the cells was measured using propidium iodide (PI) and the level of estrogen in the culture solution after adding FSH was measured by ELISA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 産婦人科学

キーワード：生殖医学 卵巢凍結

## 1. 研究開始当初の背景

日本では血液疾患に対して毎年約 1000 件の骨髄移植が施行されているが、骨髄移植の前処置として主に広く行われている抗癌剤の投与、全身放射線照射 12～14.4Gy は女性生殖器、特に卵巢機能の廃絶をもたらし、永久不妊となる。また、若年性の乳腺悪性腫瘍患者に対しても生殖毒性をもつ抗癌剤が使用されており、卵巢予備能が低下から妊よう性が失われる可能性がある。これらの患者が治療により治療するケースが多くなった現

在では、ただ生命を救うだけでなく、その後の生活の質も重視すべきであり、原疾患の治療を行いつつも、卵巢機能を温存させる技術を開発することが医療現場に求められている緊急の課題である。化学療法、放射線治療を受ける女性の卵巢機能温存の確立に向けた研究はここ数年、極めて競争の激しい分野になっている。世界中の多数のグループ、企業がヒトの卵巢機能温存に向けて、様々な方法論でそれを成功させるべく、しのぎを削っている。悪性腫瘍の治療前に患者の卵巢を、

切除、凍結保存し、癌の寛解後に卵巣を融解、自家移植する方法は主に2通りの方法がある。ひとつは摘出した卵巣を細かく細切してから凍結し、融解後残存卵巣の皮質内や後腹膜に埋め込む方法である(前者)。もうひとつの方法は摘出卵巣を細切せず、卵巣全体そのまま凍結する方法である(後者)。前者の方法でのヒトの妊娠は世界で数例の成功例が報告されており、凍結融解の成功率は高いが、移植後の血流は新生血管にのみに頼ることとなり、血流不全から卵巣組織が機能する期間は数ヶ月から1年程度と短期間であることが問題である。私たちのこれまでの研究成果でもガラス化法での凍結、融解に成功しているが、血流を改善させるための新たな方法に行き詰っている。この問題を解決するためには、卵巣臓器全体を卵巣動静脈をつけたまま凍結、融解し、自家移植する際に血管吻合を行って、卵巣全体を自家移植する方法が最終的には必要であるとの結論に至り、実験に着手することとした。

## 2. 研究の目的

以前にカニクイザルで卵巣臓器全体の凍結保存は報告されたが、移植の際には細切し筋肉内や腎皮膜下に移植されており、卵巣全体を自家移植したという報告はわれわれが調べた限りでは存在しない。また、ヒツジでの卵巣臓器全体の凍結融解自家移植後の妊娠例の報告はあるが、ヒトを含めた霊長類での妊娠例は報告されていない。

卵巣機能温存の方法の1つとして、抗癌剤や放射線治療前に卵巣を体外に取り出し、凍結保存し、治療終了後に体内に自家移植する方法がある。本研究では霊長類のカニクイザルを用いて卵巣臓器凍結技術を確認することを目的とする。ヒトと同じ霊長類での凍結技術は将来のヒトへの臨床応用の基礎的データとして重要な意味をもつと考え、本実験を開始した。

ヒトと同じ霊長類で実験を行うことが本研究の特色である。本学の動物生命科学研究センターはカニクイザルを700匹飼育しており、本研究を遂行することが十分可能である。卵巣凍結の技術を確認しようという研究は最近大きな注目を集め、数多くの報告がなされてきた。しかし霊長類で卵巣全体の凍結、自家移植したという報告はなく、生児が得られれば世界で初めての報告となる。

畜産分野や実験動物において発展した生殖技術の多くがヒトへ応用されてきた。卵巣臓器全体の凍結、融解後の自家移植においても、現在まで様々な研究者が動物実験で得られたデータを元にヒトに応用することに取り組んできた。しかし現在までの報告は、上記でも述べたように霊長類のデータが存在

しないこと、また、どの方法が卵巣全体の凍結に本当に最適であるのか、という方法論の議論が不足している。

本研究では下記の実験計画にも述べるように、凍結、融解後の自家移植の成功を最終目的としつつも、それぞれの段階でどの条件が凍結、融解に最適か、方法論を検討することを重要視する。卵巣全体を凍結するために必要な凍結保護剤、緩慢凍結法について、本研究から得られるデータは実地臨床に与える影響は多大であることが予想され、十分に研究する価値があるものである。

## 3. 研究の方法

(1) カニクイザルから卵巣動静脈をつけたまま卵巣全体を摘出する。  
研究者はカニクイザルを全身麻酔下に開腹し、卵巣を摘出する技術をすでに確立している。ケタミン0.1ml/kg、キシラジン0.05ml/kgを大腿部に筋肉注射し、イソフルレン3%で麻酔を維持する。前腕部に点滴ルートを確認し、心電図モニター、酸素飽和度モニターを装着する。臍下正中切開で開腹し卵巣を動静脈を付けたまま摘出する。閉腹後、麻酔からの覚醒を確認した後ケージに戻す。12時間後より食事を再開し2週間後に抜糸する。卵巣を摘出する直前にヘパリンを5000単位静注しヘパリン化を行う。摘出した卵巣を4℃のヘパリン化した生理食塩水に浸漬すると同時に動脈からも1ml/分の速度で10分間還流する。その後、下記の凍結保護剤に切り替え、0.5ml/分の速度で60分間還流する。

(2) 凍結保護剤の最適な条件設定(本研究の核となる実験) 凍結保護剤はLeivovitz L-15 Medium(無機塩類、アミノ酸、ビタミン、糖類を含む)にdimethyl sulphoxide(DMSO)、ショ糖、10%胎児血清を加えたものを用いる。DMSO、ショ糖の濃度をそれぞれ0.5M~3.0M、0.1M~2.0Mの様々な条件で作成する。それぞれの凍結保護剤で以下の緩慢凍結、融解に供する。緩慢凍結法はPLANER社のプログラムフリーザーを使用する。室温から-7度までは-2度/毎分の冷却スピードでおこない、-7度から-30度までは-0.3度/毎分、-30度から-190度までは-50度/毎分で行う。融解は凍結していた卵巣を37度の温水中に浸けた後、次の融解液に全体を浸しつつ、動脈からも還流する。融解液の組成はLeivovitz L-15 Mediumに10%胎児血清、1.0MのDMSO、0.1Mのショ糖を加えたものとする。DMSOの濃度を0.5M、0Mに減少したものに順次浸透していく。

## 4. 研究成果

(1) 上記凍結保護剤のどの条件が最も卵巣への障害が少ないかを調べるために下記の2つ

のバイアビリティの検討を行った。  
ポジティブコントロールとして凍結していない卵巣、ネガティブコントロールとして凍結保護剤を使用せず凍結した卵巣を用いた。1つ目は死細胞の細胞膜のみを通過する Propidium iodide(PI)を用いて細胞のバイアビリティを検討した。凍結融解した卵巣を1mmの厚さにスライスし、Leivovitz L-15 Medium に PI を加えた培養液で組織培養する。培養後、固定、切片を作成し、488nm のレーザーで励起して観察した。PI が取り込まれた死細胞は615nmの波長で蛍光を発する。すなわち、蛍光を発する細胞が少ない方がバイアビリティが高いと判断できる。2つ目はFSH 添加によるエストロゲンの産生能力を比較する。同様に凍結融解した卵巣を1mmの厚さにスライスし、Leivovitz L-15 Medium で組織培養した。FSH を添加後、培養液中のエストロゲン濃度を ELISA で測定した。エストロゲン濃度が高い方がバイアビリティが高いと判断できる。以上の方法で最適な凍結保護剤を設定した。PI 法ではコントロールの卵巣との有意差は認めなかった。またエストロゲン産生能力も有意差を認めなかった。

(2) 緩慢凍結法の最適な条件設定を行った。  
上記で決定した凍結保護剤で次は緩慢凍結法の条件設定を行う。室温から-7度までは-2度/毎分、-7度から-30度までは-0.3度/毎分、-30度から-190度までは-50度/毎分の冷却スピードでおこなう群と、室温から-7度までは-1度/毎分、-7度から-30度までは-0.2度/毎分、-30度から-190度までは-10度/毎分で行う群の2群で比較し、上記と同様のバイアビリティの検討を行った。

(3) 自家移植した卵巣の機能回復の評価を行った。設定した凍結保護剤と緩慢凍結法で凍結融解した卵巣臓器をもととの個体に自家移植する。カニクイザルを開腹後、融解した卵巣を直ちに移植に供する。残存している対側の健常卵巣を新たに摘出し、その卵巣動静脈に融解後の卵巣動静脈の吻合を行う。こうすることで、この個体が産生するエストロゲン、プロゲステロンは凍結融解後の卵巣由来のみとなる。通常の間月経周期が回復するかどうか、月経周期に伴うエストロゲン、プロゲステロンの上昇を確認し、自家移植した卵巣が正常に機能しているかどうか判断した。

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3件)

1. Wu D, Kimura F, Takashima A, Shimizu Y, Takebayashi A, Kita N, Zhang G, Murakami T. Intake of vinegar beverage is associated with restoration of ovulatory function in women with polycystic ovary syndrome.

Tohoku J Exp Med.230, 17-23, 2013

(査読有)

2. Akie Takebayashi, Shimizu Y, Akimasa Takahashi, Akiyoshi Yamanaka, Akiko Takashima, Fuminori Kiumura, Nobuyuki Kita, Kentaro Takahashi, Takashi Murakami.

Comparison of the outcome of in vitro fertilization after laparoscopic laser ablation surgery versus laparoscopic cystectomy for endometrioma.

Gynecology and minimally invasive therapy. 2, 27-29, 2013

(査読有)

3. Shimizu Y, Kiumura F, Kaku S, Izuno M, Tomita K, Thumkeo D, Murakami T.

Successful delivery following ICSI with macrocephalic sperm head syndrome: a case report.

Reprod Biomed Online. 24, 603-605, 2012

(査読有)

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 清水良彦、木村文則、辻俊一郎、竹林明枝、高島明子、喜多伸幸、村上節  
円錐切除後に頸管狭窄をきたした挙児希望症例の管理～狭窄の解除と子宮内膜炎の治療を行い体外受精で妊娠に至った 1 例～  
第 57 回日本生殖医学会  
2012 年 11 月 8 日 長崎

2. 清水良彦、伊津野美香、金子由貴、岸田和美、段亜儒、竹林明枝、高島明子、木村文則、喜多伸幸、高橋健太郎、村上節  
生児を得ることができた macrocephalic sperm head syndrome の 2 例  
第 53 回日本哺乳動物卵子学会  
2012 年 5 月 26 日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 良彦 (SHIMIZU YOSHIHIKO)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50422887