

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11207

研究課題名(和文) 若年男児の妊孕性温存に最適な、精巣凍結保存-体外精子形成法確立に関する研究

研究課題名(英文) Establishment of cryopreservation method of immature testicular tissue for fertility preservation of juvenile cancer patients

研究代表者

岡田 弘 (Hiroshi, Okada)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：00177057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：精子形成開始前の小児がん患者の妊孕性温存のために、最も効率的に体外精子形成が可能である精巣組織を凍結する方法を開発するために、マウス精巣を用いて検討を行った。精巣白膜を除去して、凍結保存剤としてStem Cell Keepを用いて、ガラス化法による急速凍結が、凍結保存-融解後に細胞生存率・細胞分裂能ともに最も有用であった。

血液がん患者の治療担当者を対象とした、アンケート調査では治療開始前の精子凍結保存の重要性は認識しているものの、実際の凍結保存には至っていない実態が明らかになった。また、極少数精子凍結方法としての、アガロースゲルカプセル法の有用性も明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児がんの治療成績が向上し、がんを克服した患児に対する支援療法として、妊孕性温存に関する関心が高まっている。現状では、精子形成開始前の男児の妊孕性温存法は、精巣組織を凍結保存し、融解後に体外培養して精子形成を誘導し、得られた成熟精子を体外受精に用いることである。本研究では、白膜除去し凍結保護剤としてStem Cell Keepを用い、ガラス化法による急速凍結する方法が体外精子形成のための精巣組織凍結方法としては適当であると、マウスを用いた動物実験において明らかにした。今後、小児がん患児に実際に使用される技術となるためには、ヒト精巣組織を体外培養して成熟精子を獲得する方法が確立される必要がある。

研究成果の概要(英文)：For the fertility preservation of childhood cancer patient, the only possible way is to freeze juvenile the testicular tissue and induce spermatogenesis in vitro. We investigated eight different procedures to freeze juvenile testicular tissue using mice model. We found vitrification of tunica albuginea tissue removed testicular tissue in Stem Cell Keep as cryo-protectant was suitable.

We also carried out a questionnaire survey to test the literacy of care providers for hematological malignancy. Most of them had knowledge of the necessity of cryopreservation of sperm before treatment. However, the rate of cryopreservation among these patients was revealed low. For cryopreservation of extremely small numbers of sperm, agarose-gel microcapsules were proved to be an appropriate device.

研究分野：生殖医学

キーワード：精巣組織 凍結保存 妊孕性温存 体外精子形成 小児がん 血液がん 精子凍結保存

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

男性がん患者の妊孕性温存法は、国内（がん治療学会）米国（米国臨床腫瘍学会 ASCO）欧州（欧州臨床腫瘍医学会 ESMO）のいずれにおいても、治療開始前の精子凍結保存を挙げている。このことは、がん治療担当医には徐々に知識として浸透してきているが、実際の妊孕性温存に関するリテラシーとその実施に関する実態調査もなされていない。

さらに、精子形成開始前（思春期前：prepubertal）の男児のがん治療に際しての妊孕性温存方法に関しては、精巣組織凍結しこれを融解後に体外培養で精子形成を誘導するという手段があるが、まだ実験段階のものであり確立されていないと報告されている。

また、精巣組織凍結保存・融解後に体外で精子形成が誘導できたとしても、多数の精子を獲得することは困難であるので、極少数精子（数的に1桁）を効率よく凍結する手段の開発を進める必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、以下の3項目を中心に調査・研究を行った。

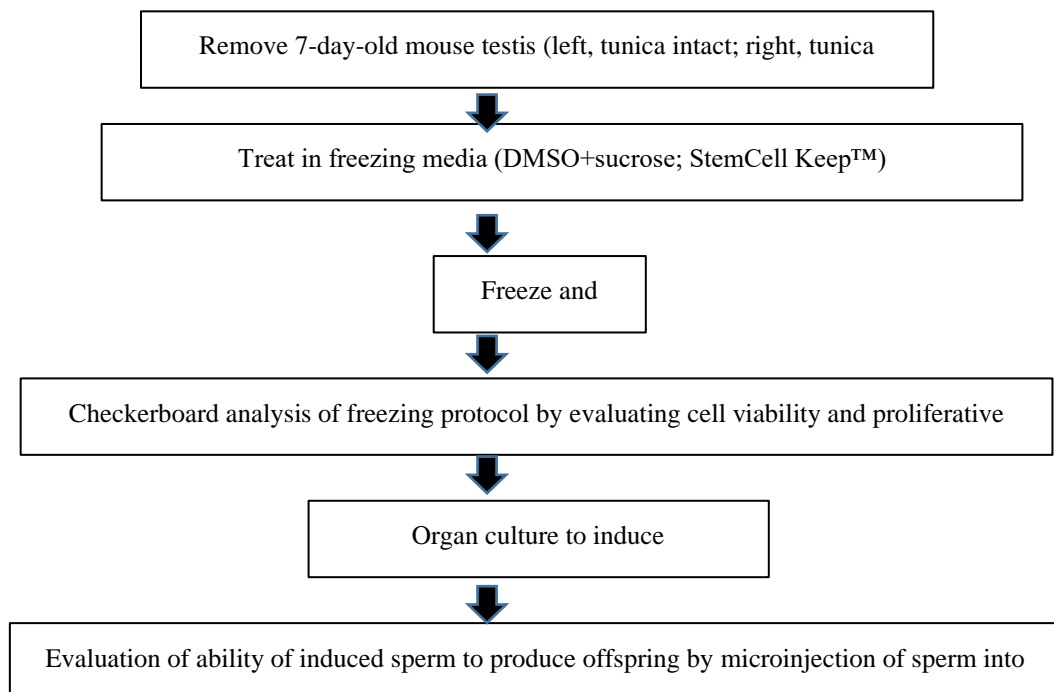
- (1) 小児がん患児の保護者とがん治療担当者の意識調査
- (2) 体外精子形成獲得に向けた、未熟精巣組織技術の確立に関する基礎実験
- (3) 極少数精子の凍結保存方法の確立

3. 研究の方法

(1) 首都圏を中心とした、血液がん治療施設 31 施設に調査協力を依頼し、22 施設から協力を得た。以下に示すアンケート調査を実施した。

- ① 精子凍結保存は必要と感ずるか
- ② 化学療法を導入した患者に対し、精子凍結の説明を行っているか
- ③ 化学療法を導入した患者に対し精子凍結を行った、または依頼した症例数
- ④ 精子凍結保存に関する説明を行ったタイミング
- ⑤ 化学療法を導入した症例数

(2) 7日齢のマウス精巣組織を、白膜除去 vs 白膜温存；凍結保護材として DMSO+sucrose vs Stem Cell Keep；凍結方法を uncontrolled slow freezing vs vitrification（ガラス化法）をそれぞれ組み合わせた8種類で検討した。（概要は下図を参照）



(3)

精子濃度 100 万/ml 以上の患者 10 名と 100 万/ml 未満の患者 6 名から提供された精液から、運動精子を採取し、現在の主流の方法である Cryotop と今回の検討対象である agarose gel microcapsule に 6 個ずつを収納し、凍結保存—融解後に、精子回収率・精子運動率・精子回収時間を比較した。

4. 研究成果

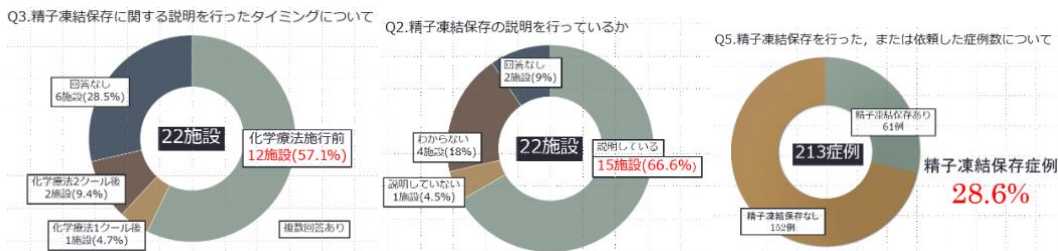
(1) 小児がん患児の保護者とがん治療担当者の意識調査

精子形成開始前の男児の精巣組織を凍結保存し、融解後に体外培養することで精子形成を起こさせる方法について、CCSの保護者とがん治療担当者へ意識調査を計画した。

2017年度に予備調査として、対象となる小児がん患児（男児）で、妊孕性温存に関する相談（カウンセリング）のため、獨協医科大学埼玉医療センターに紹介された患児数は総数3例であり、いずれも急性白血病患児であった。研究期間内に、結論を導き出すに足る症例のアンケートを行う事は、不可能であると判断した。

このため、同じ血液がんでも、これまでも相談実績の多い成人男性血液がんを対象として、がん治療担当医に妊孕性温存に関する意識と実際の妊孕性温存のための精子凍結保存の有無について調査を行った。首都圏の血液がん治療施設を対象にして、213人に新規血液がん患者の治療に関してアンケート調査を行った。

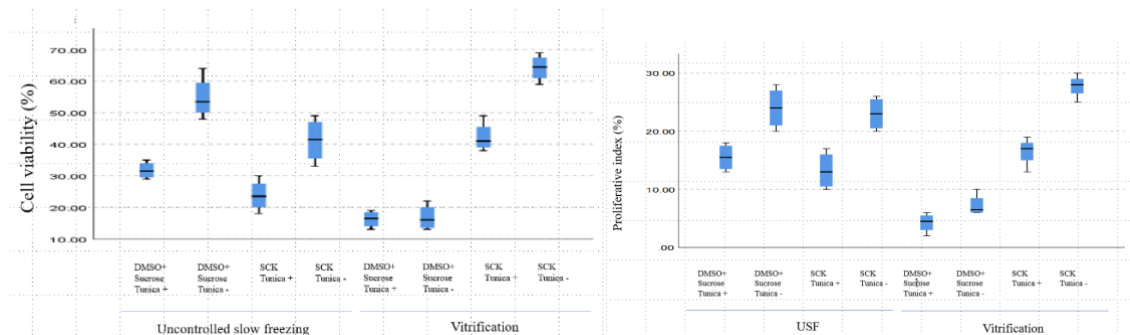
この結果、治療開始前に精子凍結保存が必要であると95.4%が認識していた。患者に対しては66.6%で情報を伝えており、その時期は治療開始前が過半数を占めた。これらの患者の中で、実際に精子凍結保存を行ったのは28.6%にとどまった。男性がん患者に対する妊孕性温存のリテラシーは不十分であると結論された。成果は、Int J Hematol. (2017)105: 349に掲載された。



(2) 体外精子形成獲得に向けた、未熟精巣組織技術の確立に関する基礎実験

5-6日齢マウス精巣組織の凍結保存方法を、①白膜除去/白膜温存のいずれか②凍結保護剤として、DMSO+Sucrose/Stem Cell Keepのいずれか ③凍結速度を uncontrolled slow freezing/ガラス化法のいずれかの組み合わせ8種類について、凍結保存-融解後の細胞生存率と細胞分裂活性を比較した。Uncontrolled slow freezing法の場合は、白膜除去して凍結する場合にはDMSO+Sucroseが良好であった。ガラス化法の場合は白膜除去してStem Cell Keepを用いる方法が、良好であった。

いずれの方法でも、凍結保存-融解後の精巣組織を器官培養法で35日培養すると、成熟精子を得ることができた。この成果は、Int. J. Urol.に投稿済みである。



現在、未熟ヒト精巣組織を器官培養して体外で成熟精子の獲得を目指しているが、マウスの場合のように成熟精子を得ることに成功していない。このため、さらに培養条件の改良中である。

3. 極少数精子の凍結保存方法の確立

生体適合材料である、アガロースゲルでできたカプセルに注目し、極少数の精子を凍結する方法を検討した。その結果、アガロースゲルカプセルに格納した、数個単位の精子は、原精液の精子濃度の高低（100 万/ml 精子以上, Fig 1; 100 万/ml 未満, Fig 2）にかかわらず、回収率 95%以上・改修時の生存率 90%以上と極めて良好であった。

また、回収にかかる時間はアガロースゲルカプセルを用いる凍結保存方法が CryoTop を用いるより短時間で精子回収が可能であった。

この成果は Systems Biology of Reproductive Medicine に投稿中である。

Fig. 1 a

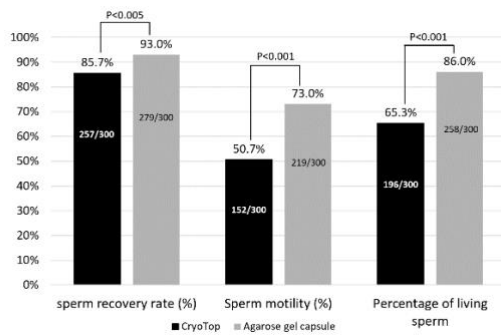


Fig. 1 b

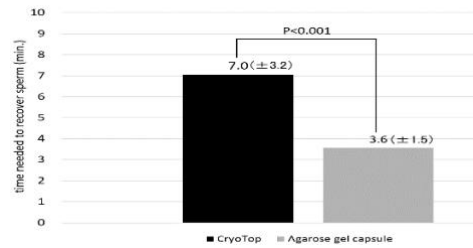


Fig. 2 a

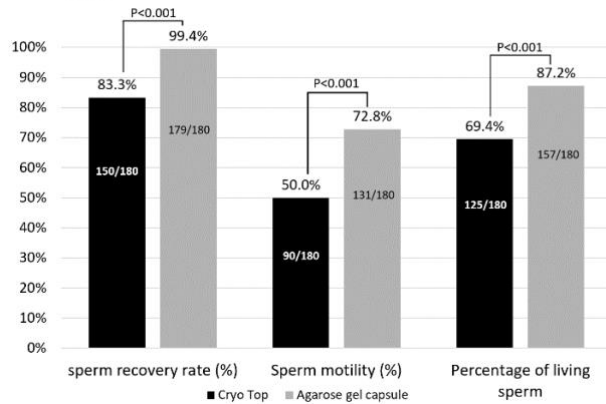
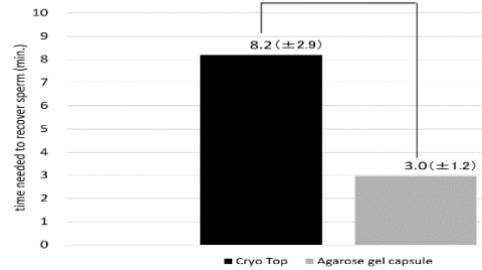


Fig. 2 b



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 岡田 弘	4. 巻 72
2. 論文標題 精巢内細胞の凍結保存	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 臨床婦人科産科	6. 最初と最後の頁 438-442
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡田 弘	4. 巻 38
2. 論文標題 加齢と精子	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Physician	6. 最初と最後の頁 773-775
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡田 弘	4. 巻 67
2. 論文標題 男性不妊に対する治療ストラテジー	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 産婦人科の実際	6. 最初と最後の頁 885-890
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 慎武、田中貴士、西尾浩二郎、新井学、岡田弘、野崎美和子、楯靖	4. 巻 63
2. 論文標題 男性側生殖医療の立場からみたがん・生殖医療の現状と問題点	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 癌の臨床	6. 最初と最後の頁 360-366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 A questionnaire survey on attitude toward sperm cryopreservation among hematologists in Japan. Kobayashi T, Shin T, Nishio K, Shimomura Y, Iwahata T, Suzuki K, Miyata A, Kobori Y, Arai G, Okada H.	4. 巻 105
2. 論文標題 A Questionnaire Survey on Attitude Toward Sperm Cryopreservation Among Hematologists in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Hematology	6. 最初と最後の頁 349-352
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-016-2134-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡田 弘
2. 発表標題 小児・若年がん患者の忍容性温存の現状とその後の生殖医療
3. 学会等名 第36回小児内分泌・代謝研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田 麻衣
2. 発表標題 精巢内精子凍結におけるアガロースカプセル法の有用性の検討
3. 学会等名 第59回日本卵子学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩端 威之
2. 発表標題 不妊治療に用いる新規精子輸送容器-トランスポーターSの有用性の検討-
3. 学会等名 第36回日本受精着床学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 弘
2. 発表標題 多職種連携による精子・精巣凍結
3. 学会等名 第36回日本受精着床学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小堀善友、岡田弘
2. 発表標題 小児及びAYA世代の男性がん患者に対する妊孕性温存と対策
3. 学会等名 第105回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福島麻衣、鈴木啓介、宮田あかね、岩端威之、下村之人、宋成浩、岡田弘
2. 発表標題 小児がん患者の妊孕性温存を目指した理想的な精巣組織凍結方の開発
3. 学会等名 第26回小児泌尿器科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 慎武、福島麻衣、田中貴士、岩端威之、鈴木啓介、大野田晋、宮田あかね、寺井一隆、小堀善友、杉本公平、岡田弘
2. 発表標題 思春期前男児に対する妊孕性温存のアプローチとしての精巣組織凍結保存
3. 学会等名 第35回日本受精着床学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小堀善友、岩端威之、大坂晃由、安田友佳、井上泰之、中山哲成、南哲司、瀬戸口誠、井手久満、新井学、徳本直彦、宋成浩、岡田弘
2. 発表標題 獨協医科大学埼玉医療センターにおける妊孕性温存目的精子・精巢組織凍結保存の現状
3. 学会等名 第100回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	小堀 善友 (Yoshitomo Kobori) (50566560)	獨協医科大学・医学部・准教授 (32203)	