

平成 21 年 5 月 28 日現在

|   |
|---|
| 研究種目：基盤研究 (B)   |
| 研究期間：2006～2008  |
| 課題番号：18390453   |
| 研究課題名 (和文) 卵巣組織の凍結保存と卵母細胞の培養系での成熟・受精・胚発生に関する研究  |
| 研究課題名 (英文) Studies on in-vitro culture system for oocyte maturation and embryo growth originated from cryopreserved ovaries |
| 研究代表者<br>香山 浩二 (KOYAMA KOJI)<br>兵庫医科大学・医学部・教授<br>研究者番号：00068496   |

## 研究成果の概要：

ガラス化法を応用して、卵巣組織の低温保存法の至適条件を検討し、複数の動物種に有効な条件を確立した。低温保存後、組織を融解し、前胞状期卵胞を培養により発育・成熟させ、体外受精により新鮮組織と遜色のない良好胚を得ることに成功した。偽妊娠マウスに胚を移植することにより、健康な産仔の獲得にも成功した。さらに発育段階の早い卵胞についても効率的な培養法を開発した。この結果は、卵巣の生殖資源としての利用ならびに難治性不妊症の治療法の開発に応用可能である。

## 交付額

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2006 年度 | 8,000,000  | 2,400,000 | 10,400,000 |
| 2007 年度 | 3,700,000  | 1,110,000 | 4,810,000  |
| 2008 年度 | 3,000,000  | 900,000   | 3,900,000  |
| 総計      | 14,700,000 | 4,410,000 | 19,110,000 |

## 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

キーワード：卵巣バンク、生殖補助医療、ガラス化保存法、不妊症、卵巣障害、卵母細胞、卵胞発育、IVG/IVM

## 1. 研究開始当初の背景

生殖補助技術の進歩により、かつては治療が困難であった卵管閉塞性不妊症や男性不妊症に対して有効な治療法が確立された。一方、ガン治療法の進歩により、若年ガン患者の生存率は近年飛躍的に向上した。しかし副作用として、化学療法剤による生殖巣の機能障害は避けがたい。放射線療法もまた、機能不全の原因となる。解決策として精子の液体窒素での凍結保存法はすでに確立し、妊孕性が温存できるのに対し、女性側の妊孕性温存技術の開発は手つかずの状態である。卵巣組織を治療前に凍結保存することで、生殖能力を回復することができれば若年ガン患者の QOL の向上に大変有用である。また、卵胞発育が困難な症例、例

えば早期卵巣不全など、難治性不妊症において、症状の進行を抑制するために卵巣を凍結保存できれば、妊娠の機会を増すことに繋がる。

## 2. 研究の目的

(1) 未熟卵母細胞を多数含む卵巣の凍結保存技術の開発、すなわち「卵巣バンク」の実現のために卵胞および卵母細胞の生存率の良い卵巣組織の**低温保存条件**を検討する。

(2) 凍結保存した卵巣組織をガンの回復後に移植した場合ガン再発の危険があるので、より安全な培養による未熟な前胞状期卵胞の成熟誘導技術の開発が望まれる。そのために**効率の良い培養法**を

開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 実験動物（マウス、ウサギ、ブタ）の卵巣組織を用い、ガラス化凍結保存法の最適保存条件を検討する。ガラス化保存液として、エチレングリコール、DMSO、ショ糖を耐凍剤として用いる。耐凍剤の濃度、前処理時間を検討し、組織学的に卵巣の形態を観察する。

(2) 上記で決定した至適条件を用い凍結保存・融解したマウス卵巣より、直径約 140  $\mu\text{m}$  の中期前胞状卵胞を採取し、コラーゲンコート膜培養による卵胞の発育と、ドロップ培養により卵子成熟を誘導する。成熟卵子は、定法に従い体外受精を実施し、培養により胚の発育を観察する。得られた胚盤胞のクオリティを割球数にて評価する。一方、2細胞期胚を偽妊娠マウスに移植し産仔を生産し、その正常性および性成熟後の妊孕能について検討する。

(3) (2)の実験よりさらに発育段階早期の直径 100  $\mu\text{m}$  未満の初期卵胞の培養系での発育誘導を試みる。一般に初期卵胞は、培養系での卵胞構造の維持が困難なので、卵胞の3次元構造を維持するため、コラーゲンを応用した培養システムを開発する。中期前胞状卵胞まで発育した段階で(2)と同様のコラーゲンコート膜培養に移し、成熟可能な段階まで培養する。また、効果的な成長因子について検討する。

### 4. 研究成果

(1) ガラス化保存液での前処理時間が卵巣組織の形態に大きく影響した。図1に示すように、処理時間が2分の場合、組織内部の傷害が著明であった。処理時間の延長により形態は改善し、1  $\text{mm}^3$  のマウス卵巣組織では処理時間を30分とすることにより、新鮮組織と遜色ない形態が得られた。ウサギやブタの卵巣では5  $\text{mm}^3$  の組織片することにより良好な結果が得られた。耐凍剤の組織へ浸透が生存性に大きく影響したと考えられる。

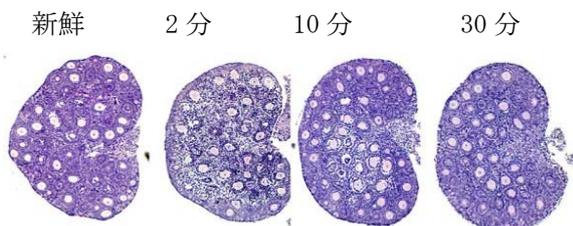


図1 耐凍剤で前処理する時間と卵巣組織の生存性との関係

(2) 凍結保存したマウス卵巣から前胞状期卵胞（直径 140  $\mu\text{m}$ ）を単離し、培養により発育・成熟させ、受精可能な成熟卵子を得る条件を確立した。また、成熟卵子を体外受精より受精させ偽妊娠マウスに移植して産仔を得ることに成功した（図2）。本結果は、凍結卵巣由来卵巣から前胞状期卵胞を回収し、培養により発育・成熟させ、得られた卵子からの産仔を誕生させた最初の報告である。

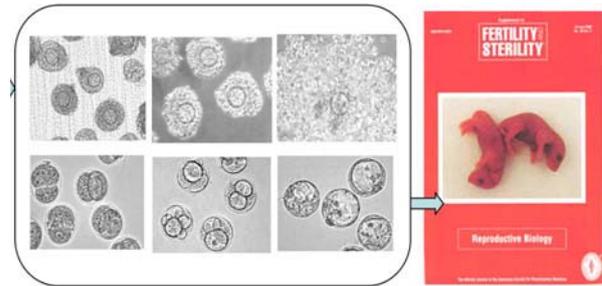


図2 培養による卵胞の発育と成熟および受精胚の産仔への成育

図3にガラス化凍結保存法により低温保存した卵巣由来の卵胞の発育率について新鮮卵巣由来と比較して示した。本実験では卵胞として、卵母細胞-顆粒膜細胞複合体（OGCs）を用いた。発育率がやや低下したがその後の成熟率、受精率、胚発育率は、新鮮卵巣由来のOGCsと有意差がなかった。

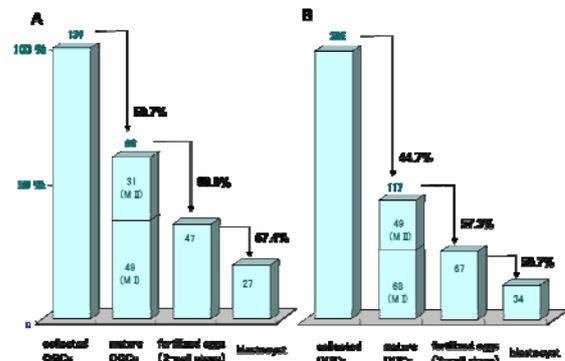


図3 新鮮および凍結卵巣由来卵胞の発育・成熟および胚発育の比較

A: 新鮮卵巣、B: ガラス化保存卵巣

(3) 発育段階の早い前胞状期卵胞（直径 100  $\mu\text{m}$  未満）を単離し、培養により発育・成熟させ、受精可能な卵子を得る条件を確立した。この実験では、コラーゲンを培養とコラーゲンコート膜培養を組み合わせる2ステップ培養法が効果的であった。得られた成熟卵子は体外受精により受精し高率に胚盤胞まで発育し、さらに産仔への発育が可能であった。培養成績を表1に示した。

表1

### 初期2次卵胞 と前胞状期卵胞の培養成績の比較

| 卵胞種類                        | 使用卵胞 | 培養期間        | 発育卵胞            | 成熟卵子 (M-II)    | 受精胚 (2PN)     | 分娩胚          |
|-----------------------------|------|-------------|-----------------|----------------|---------------|--------------|
| 前胞状期卵胞 (140 $\mu\text{m}$ ) | 134  | 7日 (1ステップ)  | 120/134 (89.5%) | 80/134 (59.7%) | 47/80 (58.8%) | NA           |
| 初期2次卵胞 (100 $\mu\text{m}$ ) | 56   | 7日 (1ステップ)  | 0/56 (0%)       | NA             | NA            | NA           |
| 初期2次卵胞 (100 $\mu\text{m}$ ) | 123  | 16日 (2ステップ) | 91/123 (73.9%)  | 54/123 (43.9%) | 11/54 (20.3%) | 8/11 (72.7%) |

NA: Not applicable

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 11 件)

【原著論文 4 件】

1. Calongos, G., Hasegawa, A., Komori, S., Koyama, K. (2009) Harmful effects of anti-zona pellucida antibodies in folliculogenesis, oogenesis and fertilization. *J. Reprod. Immunol.*, 79, 148-155. 査読有
2. Calongos, G., Hasegawa, A., Komori, S., Koyama, K. (2008) Comparison of urinary and recombinant follicle-stimulating hormone in in vitro growth, maturation, and fertilization of mouse preantral follicles. *Fertil. Steril.*, 89, 1482-1489. 査読有
3. Hasegawa, A., Kanazawa, N., Koyama, K. (2007) Contribution of zona pellucida proteins to ovarian folliculogenesis. *Reprod. Immunol. Biol.*, 221, 1-7. 査読有
4. Hasegawa, A., Sawai, H., Mochida, N., Ogasawara, T., Koyama, K. (2006) Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation and in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 86, 1182-1192. 査読有

【総説 7 件】

5. 赤谷(長谷川)昭子, 香山浩二 : 卵子の体外発育と体外成熟, 産婦人科治療, 9, 12-17. 2008
6. 赤谷(長谷川)昭子, 香山浩二 (2008) 卵巣組織の凍結保存と生殖補助医療への応用, 兵庫医大医学会雑誌, 33, 55-60.
7. 赤谷(長谷川)昭子, 香山浩二 (2008) 卵子の体外発育と体外成熟, 産婦人科治療, 9, 12-17.
8. Hasegawa, A., Mochida, N., Kasumi H., Komori, S., Koyama, K. (2007) Ovarian Tissue Banking. *J. Mamm. Ova Res.*, 24, 8-13. 査読有
9. Hasegawa, A., Koyama, K., (2007) In vitro growth and maturation of mouse oocyte-granulosa cell complex from cryopreserved ovaries and achievement of pup birth. *Repro. Med. Biol.*, 6, 77-83. 査読有
10. 香山浩二 (2007) 卵巣の凍結保存, 医学の歩み, 223, 115-121. 査読有
11. Koyama, K., Hasegawa, A. : Premature ovarian failure syndrome may be induced by autoimmune reaction to zona pellucida proteins. *Reproductive Medicine and Endocrinology*, 3, 94-97. 2006. 査読有

〔学会発表〕(計 19 件)

【招請講演・シンポジウムなど 6 件】

1. 赤谷(長谷川)昭子 (2008) 初期卵胞発育培養法に関する検討. (シンポジウム) 第 53 回日本生殖医学会総会・学術講演会, 10.23-24, 神戸.
2. Hasegawa, A., Mochida, N., Kasumi, H., Komori, S., Koyama, K. (2007) Possible role of zona pellucida proteins in ovarian follicle development. (Invited) X international congress of reproductive immunology, 6.10-14, Croatia.
3. 赤谷(長谷川)昭子, 香山浩二 (2007) Preantral follicle の体外発育と成熟: 動物実験を中心に 第 2 回日本生殖医療エンジニアリング研究会学術集会, シンポジウム 2. 25, 東京.
4. 赤谷(長谷川)昭子, 香山浩二 (2007) 卵巣組織の凍結保存と生殖医療への応用, 第 7 回 RMB (生殖医学・生物学) 研究会シンポジウム, 1. 13, 東京.
5. 赤谷(長谷川)昭子, 持田菜穂子, 香山浩二 (2006) 卵巣組織の凍結保存. (シンポジウム) 第 24 回 日本ヒト細胞学会, 7. 29-31, 東京.
6. 赤谷(長谷川)昭子, 持田菜穂子, ジャニーナ・カロンゴス, 香山浩二 (2006) 生殖補助医療に用いられる培養液の検討. (シンポジウム) 第 47 回日本哺乳動物卵子学会, 5. 27-28, 東京.

【一般講演 13 件】

7. 持田菜穂子, 赤谷(長谷川)昭子, 熊本香名子, 小森慎二, 香山浩二 (2008) 2 段階 IVG (In Vitro Growth) によるマウス初期卵胞の発育誘導. 第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 12. 6-7, 富山.
8. 持田菜穂子, 赤谷(長谷川)昭子, 小森慎二, 香山浩二 (2008) マウス初期発育卵胞の 2 段階 IVG (In Vitro Growth) による発育誘導と卵母細胞の成熟. 第 53 回日本生殖医学会総会・学術講演会, 10. 23-24, 神戸.
9. Wada, R., Hasegawa, A., Mochida, N., Komori, S. and Koyama, K. (2008) Development of early growing mouse follicles by the two-step culture method. 6th European Congress of Reproductive Immunology, 6. 30-7. 3, Moscow, Russian Federation.
10. Kinuta, T., Komori, S., Hasegawa A., Mochida, N. and Koyama, K. (2008) A two-step culture system for development of mouse early preantral follicles. 41st Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction (SSR 2008), 5. 27-30, Hawaii, USA.
11. 赤谷(長谷川)昭子, 楊 信志, 小森慎二, 香山浩二 (2008) 透明帯の卵胞発育および受精における役割-透明帯欠損マウスを用いた検討-. 第 49 回日本哺乳動物卵子学会, 5. 17-18, 名古屋.
12. 持田菜穂子, 赤谷(長谷川)昭子, 小森慎二, 香山浩二 (2008) マウス初期発育卵胞の 2 段階 IVG

(In vitro growth)による発育誘導と卵母細胞の成熟. 第49回日本哺乳動物卵子学会, 5. 17-18, 名古屋.

13. Hasegawa, A., Mochida, N., Komori, S. and Koyama, K. (2007) Early follicle development using a two-step culture system. The international Ovarian Conference 2007, 11. 2-3, Hakone.
14. Calongos, G., Hasegawa, A., Komori, S. and Koyama, K. (2007) Comparison of urinary and recombinant FSH in-vitro growth, maturation and fertilization of mouse preantral follicles. The International Ovarian Conference 2007, 11. 2-3, Hakone.
15. 持田菜穂子, 赤谷(長谷川)昭子, 霞 弘之, 小森慎二, 香山浩二 (2007) マウス初期発育卵胞の2段階 IVF (In Vitro Growth) による発育と成熟. 第25回日本受精着床学会総会・学術講演会, 8. 30-31, 仙台.
16. Horiuchi, I., Hasegawa, A., Kasumi, H., Mochida, N., Komori, S. and Koyama, K. (2007) Live birth from parenteral follicle oocytes in cryopreserved mouse ovaries after IVG, IVM and IVF. X International Congress of Reproductive Immunology, 6. 10-14, Opatija, Croatia.
17. 持田菜穂子, 赤谷(長谷川)昭子, 霞 弘之, 小森慎二, 香山浩二 (2007) マウス初期発育卵胞の2段階 IVG (In vitro growth) による発育と成熟および卵子受精能. 第48回日本哺乳動物卵子学会, 5. 26-27, 甲府.
18. 赤谷(長谷川)昭子, 持田菜穂子, 霞 弘之, 小森慎二, 香山浩二 (2007) 透明帯タンパクの卵胞および卵母細胞発育における役割. 第48回日本哺乳動物卵子学会, 5. 26-27, 甲府.
19. 赤谷(長谷川)昭子, 霞 弘之, 持田菜穂子, 小森慎二, 香山浩二 (2007) マウス凍結保存卵巣由来未発育卵母細胞の培養による発育誘導と産仔への発生について. 第132回日本生殖医学会関西支部集談会・第34回関西アンドロロジーカンファレンス, 3. 3, 大阪.

[図書] (計 5 件)

1. Koyama, K., Ito K., Hasegawa, A. (2007) The role of male reproductive tract CD52 (mrt-CD52) in reproduction. "Gamete Biology: Emerging Frontiers in Fertility and Contraceptive Development" (ed. by Gupta SK, Koyama K, Murray JF), Soc Reprod Fertil Suppl., 63, 103-10.
2. Hasegawa, A., Koyama, K. (2007) Contribution of zona proteins to oocyte growth. "Gamete Biology: Emerging Frontiers in Fertility and Contraceptive Development" (ed. by Gupta SK, Koyama K, Murray JF), Soc Reprod Fertil Suppl., 63, 229-35.

3. 赤谷(長谷川)昭子, 香山浩二 (2007) 受精, 「図説よくわかる臨床不妊学入門」, pp2-12, (柴原浩章・森本義晴・京野廣一: 監修) 中外出版, 東京.
4. 香山浩二 (2007) 体外受精への移行タイミング, 「図説よくわかる臨床不妊学入門」, pp238-248, (柴原浩章・森本義晴・京野廣一: 監修), 中外出版, 東京.
5. 香山浩二 (2006) 精子免疫, 新編「精子学」, pp398-413, (毛利秀雄・星 元紀 監修), 東京大学出版, 東京.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

香山 浩二 (KOYAMA KOJI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 00068496

##### (2) 研究分担者

赤谷 長谷川昭子 (AKATANI-HASSEGAWA AKIKO)  
兵庫医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50212402

小笠原 利忠 (OGASAWARA TOSHITADA)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 30213995

霞 弘之 (KASUMI HIROYUKI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 00289068

熊本 香名子 (KUMAMOTO KANAKO)  
兵庫医科大学・医学部・ポストドクター  
研究者番号: 10469322

##### 研究協力者

持田 菜穂子 (MOCHIDA NAHOKO)  
ジャンニーナ カロンゴス (GIANNINA CALONGOS)