

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18591811
 研究課題名（和文）性同一性障害患者の卵巣を用いたヒト卵巣組織の凍結保存法の
 発展と確立
 研究課題名（英文）Development of human ovarian tissue cryopreservation technique using
 ovaries derived from gender identity disorder patients
 研究代表者
 高井 泰（TAKAI YASUSHI）
 埼玉医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：60323549

研究成果の概要（和文）：

卵巣組織の凍結による生殖能力の保存は、いまだ確立した方法論ではない。そこで、性同一性障害の治療目的で行われた手術時に、本人の同意のもとに新鮮卵巣組織の提供を受け、各種凍結・融解法が及ぼす卵巣組織への影響を検討した。その結果、再移植手術が容易な大きさである 10mm 四方・厚さ 1mm のヒト卵巣組織片を簡便に採取し、卵巣摘出直後にガラス化凍結保存する Cryotissue 法が可能となった。凍結した卵巣組織片の融解後、免疫不全（NOD-SCID）マウスの卵巣嚢に移植したところ、組織片あたり少なくとも 1000 個前後もの初期卵胞が生着することが確認できた。

研究成果の概要（英文）：

Ovarian tissue cryopreservation and transplantation are becoming increasingly important issues for preserving fertility for young women with cancer as shown by recent successes in restoring ovarian activity and even fertility. Vitrification seems to be a promising technology in ovarian tissue cryopreservation, but it is still in an initial stage. Human ovarian tissue was obtained from consenting female-to-male GID (gender identity disorder) patients in sex reassignment surgery (SRS). Ovarian cortex tissues were cut into slices with the size of 1×10×10 mm, which is suitable for transplantation in clinical situation, and cryopreserved by Cryotissue vitrification protocol. The frozen/thawed human ovarian tissues were xenografted into the ovarian bursa of non-obese diabetic severe combined immunodeficient (NOD-SCID) mice, and at least 1000 viable follicles were observed in each slice two weeks after transplantation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,000,000	0	1,000,000
2007年度	800,000	240,000	1,040,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,400,000	720,000	4,120,000

研究分野：医師薬学

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：卵巣、凍結保存法、性同一性障害、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍治療の著しい進歩は、近年の治療成績の向上と生存率の改善をもたらした。しかし、悪性腫瘍治療のための化学療法や放射線療法は、しばしば、卵巣に不可逆的な変化をもたらし、卵巣に卵胞がもはや存在しない状態を引き起こし、早発閉経をきたす。このため、American Society of Clinical Oncologyは、癌治療に従事する医師に対して、癌治療の結果不妊になる可能性を患者に伝え、希望者には生殖専門医に患者を紹介することを求めている。

女性の未受精卵子の凍結については、急速凍結法などが進歩し既に600例以上の妊娠出産例が報告されているが、この場合、卵子採取までの時間的ロスが原疾患に対する治療開始の遅れにつながる可能性を否定できない。一方、卵巣組織の凍結による生殖能力の保存を用いれば、この問題を回避することが可能であるが、少なくとも数例の妊娠出産例が報告されているものの、いまだ確立した方法があるとはいえない状況にある。

従来の卵巣組織凍結保存法では、専用のプログラムフリーザーを用いる緩慢凍結法が主流であるため、摘出した卵巣を凍結実施施設まで搬送する必要がある。一方、未受精卵子や受精卵の凍結保存では主流となっている急速凍結法（ガラス化法）では専用装置を必要としないため、摘出直後に凍結保存することが可能である。しかしながら、マウスやイヌ等では妊娠出産が報告されているものの、ヒト卵巣組織のガラス化凍結保存による妊娠出産例はいまだ報告されていない。

卵巣組織の凍結では、組織の凍結融解技術とともに、卵子の体外成熟技術の開発が必要となる。これら多くの技術開発のためには、生殖能力保存を実際に必要とする若年者に由来する卵巣組織の入手し研究することが不可欠であるが、実際にはきわめて困難である。本研究では、性同一性障害の治療目的で行なわれた卵巣摘除術に際して、本人の同意のもとにヒト卵巣組織の提供を受けられることが極めて独自である。

2. 研究の目的

1. で述べたように、現在のヒト卵巣組織の凍結保存技術には様々な克服すべき問題点があるが、悪性腫瘍の治療により生殖機能の傷害が懸念される女性にとって切実かつ喫緊の課題である。また、直接の研究対象となる性同一性障害患者にとっても、治療の選択肢と可能性を拡大する上で、決して小さく

ない意義を有すると考えられる。

性同一性障害患者より切除された卵巣は通常の組織学的検査に用いられる以外は廃棄されていたが、本研究では余剰部分から豊富な卵巣組織の提供を受け、種々の方法や実験条件で卵巣組織の凍結・融解を行い、残存卵子数の算出およびアポトーシス関連遺伝子群の発現を検討することで、ヒト卵巣にとって最適な凍結・融解方法の確立を目指す。

また、ヒト卵巣組織を免疫不全 SCID マウスに異種移植し、一定期間後の卵巣組織を同様に検討することで、ヒト卵巣にとって最適な条件の確立を目指す。

更に、ヒト卵巣組織の体外培養を行い、これまでに知られている種々の卵子生存因子を培養系に添加し、一定期間の培養後の卵巣組織を同様に検討することで、ヒト卵巣にとって最適な体外培養系の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) 卵巣組織の入手

埼玉医科大学総合医療センターおよび関連病院において、性同一性障害の治療目的で行なわれたFTM(Female to Male Transsexuals)症例に対する性別適合手術時に、本人の同意のもとに卵巣の提供を受けた。いずれも20-40代の身体的性別が女性の患者である。各例において、術前の採血を行い、LH、FSH、エストラジオール、テストステロンなどの内分泌学的背景を検討した。

摘出された左右卵巣の病理学的検討に提出した残りを研究に用いた。研究開始当初は氷冷生理食塩水中で研究室まで運び、Cryotissue法の導入後は手術室で直ちに、卵巣組織片を採取した。

(2) 卵巣組織の評価および凍結

凍結前の卵巣の厚さ8 μ mの連続切片を作成し、諸家の報告に従って、卵胞数を計測した。更に、卵巣断面を積分して卵巣組織の体積を求め、1mm³あたりの卵胞数を求めた。

卵巣組織から0.5mm角(Cryotop法)、1.0mm角(DAP法)または10mm四方・厚さ1mm(DAP法およびCryotissue法)の卵巣組織片を作成した。Cryotop法では、平衡液(エチレングリコール(EG)、ジメチルスルホキシド(DMSO)含有)に室温で20分間卵巣組織を浸漬した後、凍結液(EG、DMSO、ショ糖含有)に3分間浸漬してからCryotopに収容し、液体窒素に投入した。DAP法では、DMSOを含むPBI培地に4で5分間卵巣組織片を浸漬した後、冷却したDAP213液(DMSO、アセト

アミド、プロピレングリコール含有)を加えて4で5分間処理し、銅板あるいはアルミ板に載せて液体窒素に投入した。Cryotissue法では、平衡液(エチレングリコール(EG)ジメチルスルホキシド(DMSO)含有)に26で25分間卵巣組織片を浸漬した後、凍結液(EG、DMSO、ショ糖含有)に15分間浸漬してから銅板上に載せ、液体窒素に投入した。

(3)凍結卵巣組織の融解及び異種移植(図1) 凍結後に急速融解した卵巣組織は、移植に適した大きさに細片化し、免疫不全マウス(NOD-SCIDマウス)の背部皮下あるいは卵巣嚢内に麻酔下で移植した。この卵巣組織異種移植の2週間後に再摘出し、卵巣組織片の生着を評価し、さらに残存卵胞数を計測し、残存卵胞密度を求めた。

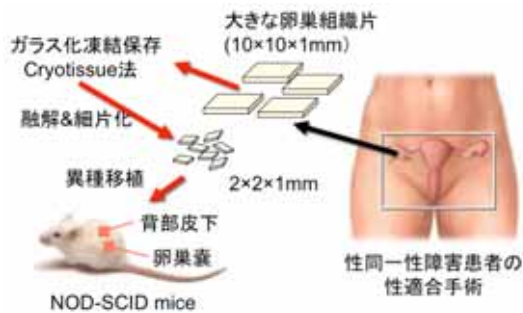


図1 ヒト卵巣組織のガラス化凍結保存と免疫不全マウスへの異種移植(現行法)

4. 研究成果

(1)2006年4月から2010年3月までに、76名(30.5±5.4歳)の性同一性障害患者から書面による同意を得て卵巣を採取し、Cryotop法で18症例、DAP法で35症例、Cryotissue法で33症例の卵巣を凍結保存した(一部重複あり)。

(2)性同一性障害患者はテストステロン製剤の投与がおこなわれており、卵巣摘出時にいずれも無月経または稀発月経であったが、23-29歳では62±32(37-98)個/mm³(平均±標準偏差、最小-最大;以下同じ)、30-37歳では47±43(2-88)個/mm³、40-44歳では2±2(1-4)個/mm³の原始卵胞を凍結前の卵巣組織片に認めた(表1)。

年齢(歳)	23-29 (n=3)	30-37 (n=3)	40-44 (n=3)
原始卵胞	62±32 (37-98)	47±43 (2-88)	2±2 (1-4)
1次卵胞	23±5 (19-26)	20±16 (5-37)	1±1 (0-2)
前胞状卵胞	9±2 (8-11)	8±7 (0-14)	1±1 (0-2)

平均±標準偏差(卵胞/mm³)

表1 ヒト卵巣の卵胞密度(凍結保存前)

(3)研究の開始当初では動物実験に準じて0.5-1mm角の卵巣細片としてヒト卵巣皮質組織を凍結保存した。研究データの蓄積に伴い、ヒトでの再移植手術を想定し、卵巣組織片の大きさを徐々に大きくし、最終的には10mm四方・厚さ1mmのシート状として凍結保存することができた。

(4)40歳未満の女性の場合、(2)で得られたデータから計算すると、このシート状の卵巣組織片には、5,000-10,000個程度の初期卵胞が含まれていることになる。1人の女性からは4-8枚程度の組織片が採取できるため、20,000-80,000個程度の初期卵胞を凍結保存することができた。

(5)ヒト卵巣組織を0.5-1mm角の卵巣細片として凍結保存し、数週間後に融解して免疫不全マウスの卵巣嚢内に異種移植した。異種移植の4週間後に摘出された組織片の生着を評価したところ、Cryotop法では12.5%(8個中1個)の組織片が生着したが、DAP法では70.0%(10個中7個)の組織片が生着した(P<0.05)。さらに7個の生着した組織片のうち、4個で卵胞を認めた。このため、Cryotop法よりもDAP法がヒト卵巣組織の凍結保存に適していると考えられた。

(6)(3)に述べたように卵巣組織片をシート状にした場合、DAP法で凍結後、融解した卵巣組織では、全卵子の1/3~1/6位の頻度で色調・形態が不良な卵子を認め、SCIDマウスに移植した組織片では卵胞を認める事ができなかった。

(7)一方、Cryotissue法で凍結後、融解した卵巣組織では、色調・形態が不良な卵子の明らかな増加は認めず、67±7個/mm³の初期卵胞を認めた。これを免疫不全マウスの卵巣嚢内および皮下に移植し、異種移植の2週間後に摘出された組織片の生着を評価したところ、全組織片の生着が確認され、それぞれ10±5個/mm³および3±2個/mm³の初期卵胞を認めた(図2および図3)。

(8)Cryotissue法で凍結したヒト卵巣を移植した場合、組織片あたり1,000個前後、即ち、凍結前の少なくとも1/10~1/5程度の初期卵胞を生着させることができることが明らかとなった。

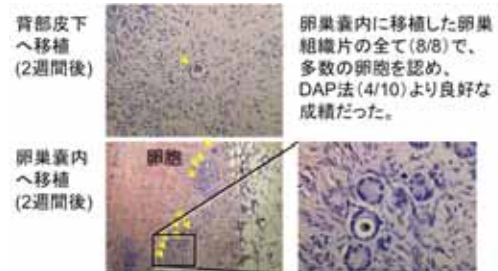


図2 Cryotissue法で凍結したヒト卵巣組織の異種移植後の顕微鏡所見

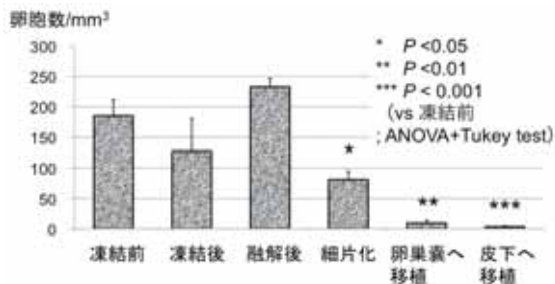


図3 Cryotissue法で凍結したヒト卵巣組織における卵胞密度

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16件)

Chambers GM, Sullivan EA, Ishihara O (他2名): The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries. Fertil Steril 91:2281-2294, 2009 (査読有).

de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG (他5名、7番目): World collaborative report on Assisted Reproductive Technology, 2002. Hum Reprod 24:2310-2320, 2009 (査読有).

Kubo M, Ijichi N, Ikeda K (他3名、5番目): Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor gamma during adipocytic differentiation. Biochim Biophys Acta 1789:71-77, 2009 (査読有).

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J (他5名、4番目): The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. Hum Reprod 24:2683-2687, 2009 (査読有).

Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J (他5名、4番目): International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. Fertil Steril 92:1520-1524, 2009 (査読有).

石原理: 日本における性同一性障害の診療. 日産婦誌 60:N-163-7, 2008 (査読なし).

Kobayashi A, Miyake H, Hattori H (他8

名、10番目): In vitro formation of capillary networks using optical lithographic techniques. Biochem Biophys Res Commun 358:692-697, 2007 (査読有).

Kurokawa A, Azuma K, Mita T (他8名、9番目): 2-Methoxyestradiol reduces monocyte adhesion to aortic endothelial cells in ovariectomized rats. Endocr J 54:1027-1031, 2007 (査読有).

Perez GI, Jurisicova A, Wise L (他8名、7番目): Absence of the proapoptotic Bax protein extends fertility and alleviates age-related health complications in female mice. Proc Natl Acad Sci U S A 104:5229-5234, 2007 (査読有).

Seki H, Matuoka K, Inooku H, Takeda S: TNF-alpha from monocyte of patients with pre-eclampsia-induced apoptosis in human trophoblast cell line. J Obstet Gynaecol Res 33:408-416, 2007 (査読有).

Takai Y, Matikainen T, Jurisicova A, (他11名): Caspase-12 compensates for lack of caspase-2 and caspase-3 in female germ cells. Apoptosis 12:791-800, 2007 (査読有).

Hayashi T, Matsuoka K, Saitoh M (他2名、4番目): Influence of alpha-tumor necrosis factor and beta-interleukin-1 on production of angiogenic factors and thymidine phosphorylase activity in immortalized human decidual fibroblasts in vitro. J Obstet Gynaecol Res 32:15-22, 2006 (査読有).

Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y (他7名、7番目): Elevated Serum Bisphenol A Levels under Hyperandrogenic Conditions may be Caused by Decreased UDP-glucuronosyltransferase Activity. Endocr J 53:485-491, 2006 (査読有).

高井泰: 【早発閉経】 内分泌攪乱物質と早発閉経. HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY 13:145-152, 2006 (査読なし).

石原理, 高井泰, 伊東宗毅: 性同一性障害とホルモン療法. 産婦人科治療 93:444-448, 2006 (査読なし).

石原理: 性同一性障害におけるホルモン療法 その作用と問題点. 性差と医療 3:209-231, 2006 (査読なし).

[学会発表](計7件)

新海愛子, 梅沢優子, 徳留嘉寛(他3名、4番目): ヒト卵巣組織凍結・再移植のフロトコル確立と移植部位の虚血軽減法の開発. 日本薬学会第130年会; 3月28-30日; 岡山; 2010.

Takai Y, Shinkai A, Hashimoto F, Asano T, Suzuki H, Kagawa N, Kuwayama M, Seki H, Takeda S, Ishihara O: Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. 卵巣に関する国際カンファレンス2009; 12月5日; 東京; 2009.

高井泰, 新海愛子, 梅沢優子, 関博之, 鈴木宏志, Aidiresi A, 竹田省, 香川則子, 桑山正成, 井上太綬, 石原理: ヒト卵巣組織のガラス化凍結保存とマウスへの異種移植. 第27回日本受精着床学会総会・学術講演会; 8月6-7日; 京都; 2009.

高井泰: 若年悪性腫瘍患者の妊孕能温存法 卵子・卵巣組織の凍結保存の実践-. 第12回不妊専門相談センター研修会(埼玉不妊治療研究会); 3月21日; さいたま; 2009.

高井泰: 若年悪性腫瘍患者の妊孕能温存-GnRHアナログによる卵巣保護や卵子・卵巣組織の凍結保存-. 坂戸鶴ヶ島産婦人科医会; 2月19日; 坂戸; 2009.

Takai Y: Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. The 35th Annual Meeting of the Japan Society for Low Temperature Medicine; 11月22日; Tokyo; 2008.

高井泰, 林直樹, 関博之, 竹田省, 石原理: ヒト卵巣組織のガラス化凍結保存とマウスへの異種移植. 第60回日本産科婦人科学会総会・学術講演会; 4月12-15日; 横浜; 2008.

Suekuni K, Takai Y, Suzuki H, Takamatsu A, Harashina T, Hayashi N, Seki H, Takeda S, Ishihara O: Vitrification and xenografting of human ovarian tissue. 卵巣に関する国際カンファレンス2007; 11月2-3日; 箱根; 2007.

[図書](計3件)

石原理: 性同一性障害. 看護のための最新医学講座(第2版) 婦人科疾患(日野原重明、井村裕夫監修) 中山書店:148-155, 2006.

石原理: 性分化異常. 今日の治療指針2006(山口徹、北原光夫、福井次矢 総編集) 医学書院:889-890, 2006.

石原理: 性同一性障害と生殖医療. 図説ARTマニュアル改訂第2版(森崇英、久保春海、岡村均編集) 永井書店:460-465, 2006.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高井 泰(TAKAI YASUSHI)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号:60323549

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

石原 理(ISHIHARA OSAMU)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号:70176212

竹田 省(TAKEDA SATORU)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号:20143456