

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390455

研究課題名(和文) ヒト卵巣凍結の臨床応用に向けた基礎的検討～手術及び凍結の技術革新～

研究課題名(英文) Clinical application of human ovarian tissue cryopreservation
～innovation of implantation procedure and freezing method～

研究代表者

久慈 直昭 (KUJI NAOAKI)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80169987

研究成果の概要(和文): 本研究により、交流磁場付加緩速凍結法による凍結融解卵巣由来のマウス産仔(F1)を得、またその妊孕性を確認した。ブタに於いては交流磁場付加緩速凍結法により血管茎付き全卵巣の凍結保存を試みたが、融解後移植卵巣は機能しなかった。交流磁場付加によって溶液の潜熱発生温度の変化はなく、氷晶形成開始温度には磁場付加が影響しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文): The efficacy of magnetic field supplementation was confirmed, since normal litter was born only from magnetic field supplemented cryopreserved ovarian tissue, and those litter were appeared to be fertile. Although ovaries from juvenile porcine were cryopreserved, there is no ovary with function after freeze-thaw, neither from cryopreservation with magnetic field supplementation or that without magnetic field supplementation. Freezing temperature of both distilled water and freezing medium was not moved by magnetic field supplementation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2010年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
総計	10,800,000	3,240,000	14,040,000

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：移植・再生医療、医療・福祉、再生医学

1. 研究開始当初の背景

卵巣凍結の臨床応用は、凍結融解法が完成されていないことと、融解した組織に血流を再開させる方法が確立していないことによる。その解決法として、血管付きの全卵巣組

織凍結保存と、融解後血管吻合が考えられている。一方、食品冷凍保存分野において交流磁場存在下の凍結法(以下本法)を用いることにより、融解後の組織損傷が少なくなると報告されている。

2. 研究の目的

そこで本研究ではヒト卵巣凍結保存への応用を最終目的として、研究期間内に交流磁場付加凍結法の有効性・安全性の検討と、本法を用いた血管茎付ブタ全卵巣の超低温保存を試み、あわせて本法の凍結時障害低減機序の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) マウス・ブタ卵巣組織の凍結保存

マウス卵巣の交流磁場存在下の凍結保存と凍結卵巣の妊孕性検定

3.5および10週齢 C57BL/6J マウス 11匹から卵巣を摘出し、交流磁場存在下・非存在下で 1.4 mol/L DMSO を含む凍結液で凍結した。融解はクライオチューブを室温に 15~20 分間静置し、培養液で洗浄後、形態観察用のホルマリン標本を作成するとともに、ヌードマウスへの移植を試みた。

ブタ卵巣の交流磁場存在下の凍結保存

屠場にて採取したブタ卵巣から 2 時間以内に Kagawa et al. の方法に従いブタ卵巣皮質組織片を作製した。なおこの組織片 (大きさ 1 cm 四方, 厚さ 1 mm) 作製前に、卵巣皮質上に存在する胞状卵胞内に含まれる卵胞液を、26 G の注射針を用いて目視にて取り除いた。

卵巣皮質組織片の凍結および融解は、室温 (22-23 °C) から 10 °C まで毎分 1.0 °C で行い、10 °C にて 1 分保持、10 °C から 7 °C まで毎分 0.5 °C で冷却後、7 °C にて 13 分保持し、この間に植氷処理を行い、7 °C から 55 °C までを毎分 0.5 °C で冷却、その後、液体窒素中に投入、一週間以上凍結保存した。凍結液は PB1 [19] に 10% FCS と 10% 凍害保護物質 (DMSO または EG) を含むものを使用した。融解は、室温にて 20 分から 25 分静置することで行った。

凍結融解卵巣皮質組織片の組織学的評価

は、Paynter らの方法により小型卵胞の形態を組織学的に評価した。

また、凍結融解後の卵巣皮質組織片より抽出した totalRNA から GAPDH 発現量の半定量化を行った。

(2) ブタ血管茎付き卵巣組織の移植と凍結保存

未成熟ブタの片側全卵巣を血管系付きで交流磁場存在下、あるいは非存在下に凍結保存した。1 週間以上の凍結保存後に融解、卵巣部血管と吻合して移植、8-12 週間後採血により卵巣機能回復を確認した。

また、一部の卵巣では保存後の組織片を加温後、組織学的観察、組織片より cDNA を作製して RT-PCR 法により b-actin および GAPDH の遺伝子発現について調べた。

(3) 交流磁場による凍結時障害低減機序の検討

凍結過程において交流磁場が過冷却状態を安定化させるかどうかを検証するため、蒸留水と耐凍剤のそれぞれについて緩慢冷却過程において氷核発生の指標である潜熱発生温度を測定し、これが磁場強度によって変化するかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) マウス・ブタ卵巣組織の凍結保存

マウス卵巣の交流磁場存在下の凍結保存と凍結卵巣の妊孕性検定

3, 5, 10 週齢のマウス卵巣凍結保存に於いては、週齢に係り無く、融解後 45-50% の卵胞が良好な形態を示した。また 10 週齢の卵巣においては、交流磁場存在下の緩速凍結法では 63% の卵胞が良好形態を示したのに対して、交流磁場非存在下では良好形態を示した卵胞は 46% であったが、有意差は認められなかった。

融解卵巣の NOD-SCID マウスへの移植後、移植卵巣に由来する野生色を呈する産仔が

観察されたのは、対照区では5例(100%)、交流磁場存在下凍結群では4例(44%)、交流磁場非凍結群では、移植卵巣由来の産子の娩出は観察されなかった。さらに凍結融解卵巣由来の雌雄のマウス1ペアの交配を試みた結果、8例の産子を得た。以上、CAS条件下で凍結保存した卵巣由来の産子を得ることが可能であり、得られた産子についてその妊孕性を確認することが出来た。

ブタ血管付卵巣組織の移植と凍結保存

血管系付き凍結融解卵巣移植の予備実験

として、ブタ卵巣を対側の卵巣部へ(凍結無しで)移植し、6ヶ月後性周期の回復と卵巣から分泌されるインヒピン値が卵巣抽出ブタより有意に高値であることから、卵胞発育を確認した。しかし、その後に行った血管系付きの全卵巣凍結保存と融解後の血管吻合による移植については、凍結融解後の移植を行ったが生着しなかった。血管茎付き組織の保存には、交流磁場付加を行っただけでは不十分で、さらなる技術改良が必要であることが明らかとなった。

(2) 凍結時障害低減機序の検討

磁場の有無、および0.04-0.30mTeslaまでの磁場強度をかけた場合に、潜熱発生温度、すなわち共晶点に有意差は認められず、氷晶形成開始温度には磁場付加が影響しないことが明らかとなった。

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12件)

Abdel-Ghani, M., Abe, Y., Asano, T., Hamano, S. and Suzuki, H. Effect of bovine cumulus-oocyte complexes-conditioned medium on in-vitro maturation of canine oocytes. *Reprod. Med. Biol.* 10: 43-49, 2011. 査読有

Abe, Y., Suwa, Y., Asano, T., Ueta, Y. Y., Kobayashi, N., Ohshima, N., Shirasuna,

S., Abdel-Ghani, M. A., Oi, M., Kobayashi, Y., Miyoshi, M., Miyahara, K. and Suzuki, H. Cryopreservation of canine embryos. *Biol. Reprod.* 84: 363-368, 2011. 査読有

Kawase, Y. and Suzuki, H. Effect of graft site and gonadotrophin treatment on follicular development of canine ovarian grafts transplanted to NOD-SCID mice. *Reprod. Med. Biol.* 10: 259-266, 2011. 査読有

Hirayama, Y., Inoue, K. and Suzuki, H. Effect of intraperitoneal administration of desialylated erythropoietin on the follicular survival in cryopreserved canine ovaries after xenotransplantation. *J. Mamm. Ova Res.* 28: 143-147, 2011. 査読有

Herbas, M.S., Ueta, Y.Y., Ishibashi, K. and Suzuki, H. Expression of erythropoietic cytokines in alpha-tocopherol transfer protein knockout mice with murine malaria infection. *Parasitol. Res.* 109: 1243-1250, 2011. 査読有

Tachibana, M., Kobayashi, N., Inokuma, H., Suzuki, H. and Watarai, M. Seroepidemiological survey of *Brucella canis* infection in dogs in Japan using the tube agglutination test. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 64: 559-561, 2011. 査読有

Hayashi, S., Asano, T., Kakizaki, R. and Suzuki, H. Beneficial effect of hyperbaric oxygen therapy on the follicular survival of mouse ovary after transplantation. *J. Reprod. Dev.* 58: In press, 2011. 査読有

Aung, K. M., Boldbaatar, D., Umemiya-Shirafuji, R., Liao, M., Xuan, X., Suzuki, H., Galay, R. L., Tanaka, T. and Fujisaki, K. Scavenger receptor mediates systemic RNA interference in ticks. *PLoS ONE.* 6(12): e28407, 2011. 査読有

Abdel-Ghani, M., Shimizu, T., Asano, T. and Suzuki, H. In vitro maturation of canine oocytes co-cultured with bovine

and canine granulosa cell monolayers. *Theriogenology*.77:347-355,2011. 査読有

久慈直昭, 井上治, 福永朝子, 菅原かな, 小川誠司, 奥村典子, 山田満稔, 浜谷敏生, 吉村泰典. 【不妊診療のすべて】ART(生殖補助医療) 精子・卵子・卵巣の凍結保存とその安全性. 産婦人科治療: 102 巻増刊: 495-500,2011. 査読無

マウス単一卵子の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析とその応用. 持丸佳之, 久慈直昭, 山田満稔, 奥村典子, 高野光子, 浜谷敏生, 他 5 名. 日本産科婦人科学会雑誌 62 (2): 344,2010. 査読無

交流磁場発生装置を用いたブタ卵巣の超低温保存. 持丸佳之, 久慈直昭, 高野光子, 山田満稔, 浜谷敏生, 他 3 名. 日本産科婦人科雑誌. 61(2): 635,2009. 査読無

〔学会発表〕(計 11 件)

Oi, M., Yamada, K., Hayakawa, H. and Suzuki, H. X,Y 精子選別によるイヌの雌雄産み分け技術の開発 - FISH 法によるイヌ精子の性別法法の確立 - .第 26 回動物生殖工学研究会. 2011 年 12 月 4 日. 北里本館, 東京.

Suzuki, H. Puppies from frozen embryos. 第 104 回日本繁殖生物学会. 2011 年 9 月 13 日-17 日. いわて県民情報交流センター・アイーナ, 盛岡 (岩手県)

Herbas, S.M., Maggloire, N. and Suzuki, H. Murine *Plasmodium* virulence is affected due to oxidative stress status of the host. 17th Japanese-German cooperative symposium on protozoan diseases. 2011 年 9 月 12 日-14 日. Nara Women's University, Nara.

Suzuki, H. Follicular loss of cryopreserved canine ovary after xenotransplantation and its solution. the 12th International Congress on Reproductive Biomedicine(招聘講演). 2011 年 9 月 7 日-9 日. Royan Institute, Tehran, The Islamic Republic of Iran.

Suzuki, H. Cryopreservation of canine embryos. the 12th International Congress on Reproductive

Biomedicine(招聘講演). 2011 年 9 月 7 日-9 日. Royan Institute, Tehran, The Islamic Republic of Iran.

Suzuki, H., Hayashi, S. and Asano, T. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the follicular loss of ovarian tissues after transplantation. 44th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction.(招聘講演). 2011 年 7 月 31 日-8 月 4 日. Portland, Oregon, USA. Ohshima, N., Kobayashi, N., Shirasuna, S., Suwa, Y. and Suzuki, H. 盲導犬適性と性格関連遺伝子多型との関連性. 北海道実験動物研究会・日本実験動物技術者協会北海道支部合同学術集会. 2011 年 7 月 9 日. 北海道大学 (北海道)

Hayashi, S., Asano, T. and Suzuki, H. マウスの卵巣移植における高圧酸素療法の効果. 北海道実験動物研究会・日本実験動物技術者協会北海道支部合同学術集会. 2011 年 7 月 9 日. 北海道大学 (北海道)

Osamu INOUE, Naoaki KUJI, Tomoko FUKUNAGA, Seiji OGAWA, Kana SUGAWARA, Mitsutoshi YAMADA, Toshio HAMATANI, Hideji HANABUSA, Yasunori YOSHIMURA and Shingo KATO. Processing of semen from an HIV-1 positive male and its use in the IVF-ICSI procedure -clinical efficacy. 27th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology, Stockholm, Sweden, 3-6 July, 2011.

Hayashi, S., Asano, T. and Suzuki, H. マウスの卵巣移植における高圧酸素療法の卵胞数減少抑制効果について. 第 52 回日本哺乳動物卵子学会. 2011 年 5 月 21 日-22 日国際医療福祉大学本校

Naoaki Kuji, et al. "Global gene expression analysis in single oocytes from young and aged mice" European Society of Human Reproduction and Embryology. 2009 年 7 月 1 日. Amsterdam, Holland.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等: なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久慈 直昭 (KUJI NAOAKI)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80169987

(2)研究分担者

鈴木 宏志 (SUZUKI HIROSHI)
帯広畜産大学・原虫病研究センター・
教授
研究者番号：60333473

柏崎 直巳 (KASHIWAZAKI NAOMI)
麻布大学・獣医学部・教授
研究者番号：90298232

(3)連携研究者

浜谷 敏生 (HAMATANI TOSHIO)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：60265882

持丸 佳之 (MOCHIMARU YOSHIYUKI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：80445238

高野 光子 (TAKANO MITSUKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20445240