

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592421

研究課題名(和文) 効率の良い卵巣組織凍結・移植法の確立を目指した研究 若年女性癌患者のために

研究課題名(英文) The research that aims at the establishment of an efficient ovarian tissue cryopreservation and transplantation method - For the young female cancer patients

研究代表者

鈴木 直 (Suzuki, Nao)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：90246356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：新しい卵巣組織凍結法であるガラス化法では、高濃度耐凍剤による組織暴露後の凍結の有効性や開放式凍結デバイスによる感染に関する安全性に対する検討が必要となっている。一方、卵巣組織移植の成否を評価する方法は皆無であり、移植卵巣組織片に流入する新たな血管の分布を明らかにすることは大変重要な情報となりうる。本研究では、高分子フィルム(グラファイトシート)を原料とした完全閉鎖型卵巣組織凍結デバイスを作成し、一方既存のRapid-iキットを用いた卵巣組織凍結の評価を行った。さらにラットの新鮮卵巣を用いて検討を行い、超音波画像診断によって血流の再流入を捕らえることに成功した。

研究成果の概要(英文)：The effectiveness of cryopreservation for the primordial follicles in the ovarian tissue and the safety of an open-type device of ovarian tissue cryopreservation using vitrification technique should be necessary to evaluate as a new technology of ovarian tissue cryopreservation. On the other hand, there is no method to evaluate the success or failure of the ovarian tissue transplantation, and, as for clarifying the distribution of a new blood vessel flowing into the transplant ovarian tissues, it can be effective with information important at all.

In this study, we succeeded to prepare the closed-type device of ovarian tissue cryopreservation using vitrification technique that assumed a polymeric film and, on the other hand, evaluated the effectiveness of cryopreservation for the primordial follicles in the ovarian tissue using Rapid-i kit. Furthermore, we succeeded in catching a re-inflow of the bloodstream by echo-wave video diagnosis with the rat fresh ovary.

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：卵巣組織凍結 ガラス化法 若年女性がん患者 卵巣組織凍結用デバイス

1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する集学的治療の進歩に伴ってその治療成績が以前と比べて明らかに向上している一方で、若年女性癌患者は治療寛解後の早発閉経や妊孕能消失などの問題を抱えることとなる。また同様に、SLE 患者の生存率は飛躍的に改善しているが、アルキル化剤を使用することによって引き起こされる卵巣機能廃絶が問題となっており、Erlangen study では 14% [Elizur SE et al: Rheumatology 2008; 47: 1506-1509]、PREGO study では 60% の SLE 患者に早発閉経が発症したと報告されている [Manger K et al: Autoimmunity Reviews 2006; 5: 269-272]。一方 2004 年にベルギーの Donnez らは、25 歳のホジキン病患者から、化学療法施行前に卵巣皮質の一部を凍結保存し、完全寛解後、卵巣の血管近傍の腹膜と右卵管采近傍の腹膜に凍結卵巣組織を融解し自家移植した結果、移植 11 ヶ月後に自然妊娠が成立し世界で初めてヒトでの生児獲得に成功している [Donnez J et al: Lancet 2004; 364: 1405-1410]。この報告以降、最新の情報では本技術によって 30 名超の生児が得られており、欧州においては卵巣組織凍結・自家移植は新しい技術ではあるが既に臨床応用されるべき一般的な技術の一つであると認識されている [Jeruss JS et al: N Engl J Med 2009; 26: 902-911, von Wolf M et al: E J Cancer 2009; 45: 1547-1553]。しかしながら、本技術による生児獲得率の向上に向けて解決すべきあるいは改良すべき問題は依然山積していることから、安全で成功率の高い卵巣組織凍結・移植法を確立するために、動物実験による基礎的研究データの集積が依然必要である。ヒトと同じ霊長類を用いた卵巣組織凍結ならびに自家移植に関する基礎的検討は、臨床応用へ重要な知見となるものと考え、我々はカニクイザルの卵巣皮質を用いて研究を進めてきた。カニクイザルを用いた異所性移植部位に関する検討をした結果、大網へ移植することによって質の高い胚の採取に成功し、顕微授精によって高率に受精卵を得ることに成功している [Igarashi S, Suzuki N et al: Hum Cell 2010; 3: 26-34, Suzuki N et al: Human Reproduction, 2012; 27: 2420-2429]。さらに、大網へ異所性移植した個体は 935 日経過した後もホルモン周期は継続し再度採卵することが可能であったことから、大網は異所性移植部位の候補となりうる事実を明らかにしてきた [Igarashi S, Suzuki N et al: Hum Cell 2010; 3: 26-34]。一方、緩慢凍結法が標準的な卵巣組織凍結法であると欧州では考えられているが、しかし予想以上に生児獲得率が低いことから、卵子凍結で一般的であるガラス化凍結法の応用が期待されている。そこで、我々は独自に卵巣組織凍結デバイスを作成することで新たなガラス化法の開発に成功した結果 [Hashimoto S, Suzuki N et al: BioMedicine Online,

2010; 21: 501-509]、電子顕微鏡による卵母細胞の微細構造の観察によって、ガラス化法が緩慢凍結法より優れた凍結法である結果を得ている [Hashimoto S, Suzuki N et al: BioMedicine Online, 2010; 21: 501-509]。一方、ヒトでは通常の採卵も可能で、さらに自然妊娠も期待できる利点から残存卵巣に移植する同所性自家移植が標準的とされている。しかし、両側卵巣を摘出しなければならない症例や、骨盤内への放射線照射症例など残存卵巣に同所性移植できない症例に対する至適な異所性移植部位の検討が必要である。我々は、大網、卵管間膜、後腹膜などにガラス化凍結法にて凍結した卵巣組織を融解後移植した結果、本法を用いて質の高い胚の採取に成功し、顕微授精によって受精卵の獲得している [Suzuki N et al: Human Reproduction, 2012; 27: 2420-2429]。しかし、これまでに卵巣組織凍結・移植の成否を評価する方法は存在していない。以上の成果を踏まえて、本研究では更なる発展を志向して、卵巣組織凍結法-ガラス化法ならびに移植法の更なる改善を目指した。

2. 研究の目的

我々は、新たな卵巣組織凍結法であるガラス化法の開発を行ってきた [Hashimoto S, Suzuki N et al: BioMedicine Online, 2010; 21: 501-509, Suzuki N et al: Human Reproduction, 2012; 27: 2420-2429]。しかしながら、高濃度の耐凍剤による組織暴露による有効性や開放式凍結デバイスによる感染に関する安全性に対する問題点が、ガラス化卵巣組織凍結法の改善点としてあげられる。さらに、ヒトにおいて本法で生児獲得の報告が未だなされていない事実から、本法の最適化に向けた基礎的実験が必要となっている。一方、これまでに卵巣組織移植の成否を評価する方法は存在しておらず、移植された卵巣組織に流入する新たな血管の分布を明らかにすることは、卵巣組織移植の評価法開発には大変重要な情報となりうる。そこで本研究では、若年女性癌患者の治療克服後の女性としての QOL 向上を志向して、新たな卵巣組織凍結方法の開発 (具体的にはデバイスの改良) ならびに 卵巣組織移植の評価法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新たな卵巣組織凍結方法の開発 (デバイスの改良)

高分子フィルム (グラファイトシート) を原料とした新たなデバイスの開発:
高分子フィルムを原料としたグラファイトシートは、アルミニウムの約 8 倍、銅の約 2-4 倍の熱伝導率を有する素材であることが知られている。そこでグラファイトシートを原料とした新たなデバイスを開発することによって、より熱伝導率が高くなることから、卵巣組織の冷却速度や加温速度の更なる上

昇が見込まれ、その結果より効率の高い新たな卵巣組織凍結方法を開発することが出来る可能性が見込まれた。

a. サル卵巣組織を用いた新たなデバイスの熱伝導率の測定：

測定系：記録計(EB2205、株式会社チノー：連携研究者である橋本周博士所有)に極細シース熱電対(SCHS1-0、株式会社チノー：連携研究者である橋本周博士所有)を取り付けて測定する。

方法：熱伝導対先端をサル卵巣組織内に挿入し、液体窒素に投入後冷却時の温度変化を測定する。そして、得られたデータから任意の温度域の冷却速度を算出する。同様に、37℃に加熱した融解液に投入して加熱時の温度変化を測定し、加熱速度を算出する。

b. 新たなデバイスによってガラス化凍結保存を行ったサル卵巣組織の電子顕微鏡を用いた微細構造の観察：

ガラス化凍結保存法：0.1% PVA 添加 TCM199 液の中に、37℃で組織片を温めた後、平衡液(4%エチレングリコール+15% SSS+TCM199)で室温 30 分平衡化し、4℃ガラス化液(35% エチレングリコール+5% PVP+0.4M Sucrose+20% SSS+TCM199)へ組織片を移す。氷上 5 分後液体窒素で保管する。なお、融解方法は、35℃温水で融解し、37℃希釈液(0.3M Sucrose+20% SSS+TCM199)で 3 分間静置後、洗浄液(20% SSS+TCM199)で 2 回洗浄し、移植まで 0.1% PVA 添加 TCM199 液で保管する。電子顕微鏡を用いた微細構造の観察：卵巣組織を融解し、2% グルタルアルデヒド(0.1M PBS pH7.4)で 4℃、2 時間固定する。そして、1%グルタルアルデヒド(0.1M PBS pH7.4)で 4℃、1-7 日間固定し、1% の 4 酸化オスミウムで 4℃、2 時間固定する。その後、エタノールで脱水を行った後酸化プロピレンに浸透し、EPON812 に樹脂包埋・重合する。そして薄切切片を作成し電子顕微鏡で微細構造を観察する。

c. 豚卵巣組織を用いた原始卵胞等の形態学的検討：

d. カニクイザルを用いた卵巣組織移植実験(イブバイオサイエンスにて)

対象：カニクイザル(*Macaca fascicularis*)、5-6 歳で月経発来確認済み、雌。

麻酔方法：セレクター(2% 25ml)とケタラル(50mg/ml)を 1:2 に混合、筋注

卵巣摘出：麻酔導入後、臍下から恥骨結合までの間の約 10cm を皮膚縦切開後、筋膜、腹膜を切開し、腹腔内に至る。腸管をガーゼにて上腹部へと圧排後、卵巣固有靭帯ならびに卵巣堤索を処理することによって付属器切除術施行とする。両側付属器切除後、出血無きことを確認し、バイクリル針を用いて閉腹する。

卵巣移植：麻酔導入後、腹腔内に至り、凍結後融解した卵巣組織片を移植する。それぞれ卵巣組織片を移植後、バイクリル針にて 1-2 力所縫合する。移植終了後、出血無きことを確認し、バイクリル針を用いて閉腹する。な

お、移植後、抗生物質のバイトリル 2.5%注射液を 1ml 筋注する。なお、移植成功の有無は、血中エストロジオールならびにプロゲステロン値の測定(株式会社メディックに外注)し確認する。

Rapid-i キットの卵巣組織凍結法への有効利用に関する検討：

受精卵の凍結保存として既に応用され販売されているガラス化デバイスである Rapid-i キット(ビトロライフ社)の卵巣組織凍結法への有効利用を検討する目的で研究を進めた。

具体的には、Rapid-i キットを用いて凍結保存した卵巣を融解し、卵巣摘出したマウス(C57BL/6J、8 週齢)の腎皮膜下に移植することで卵巣機能が回復するのかを検討した。

まず、麻酔下でマウス卵巣摘出を施し、摘出した卵巣を各条件(後述)で凍結保存する卵巣摘出したマウスの腔スミアチェックを行い、性周期が確実に停止しているのを確認する。性周期停止の確認後、凍結保存しておいた卵巣を各プロトコルに従い融解処理し、卵巣摘出したマウスの腎皮膜下へ自家移植して以下の検討項目を観察する。

検討項目：

a. マウスの腔スミアにより性周期が回復するまでの期間を検討する

b. 血清中の性ホルモン(E2, P4, FSH, LH)の値を測定する

c. 過排卵刺激により卵胞成長が起こるのかを確認する

実験群(n=6)：

(a) Positive Control 卵巣摘出無し

(b) 新鮮卵巣移植 卵巣摘出したマウスへ新鮮な卵巣組織を移植

(c) Rapid-i Vitrolife 純正試薬による凍結処理

(d) Rapid-i Marianna マリアンナ試薬による凍結処理

(e) Negative Control-1 液体窒素で直接凍結し、自然融解した卵巣組織

(f) Negative Control-2 卵巣摘出のみ

(2) 卵巣組織凍結方法の確立と移植の評価法の開発を行う。

卵巣組織凍結・移植の成否を評価する方法は存在しておらず、これまではホルモン値を測定することによって移植後 4 ヶ月経過しなければ成否を判定することが出来なかった。そこで、我々はこれまでに作成した個体を対象に、造影 CT 検査を行うことによって移植された卵巣組織に流入する新たな血管の分布に関する情報を得ることに成功している[Suzuki N et al: Human Reproduction, 2012; 27: 2420-2429]。そこで、これまで我々が開発してデバイスと新たなデバイスを用いた凍結組織を異所性移植した後に、造影 CT と超音波造影剤による超音波画像診断を駆使して、卵巣組織の評価法の開発を試みる。超音波画像診断超音波造影剤(ソナゾイド、

第一三共株式会社)は 0.015ml/kg を投与し、超音波画像装置 (Aplio XG、東芝メディカルシステムズ) を用いる。

4. 研究成果

(1) 新たな卵巣組織凍結方法の開発 (デバイスの改良)

グラファイトシートを用いた卵巣組織凍結デバイスの開発 :

高分子フィルム (グラファイトシート) を原料とした新たなデバイスを開発し、熱伝導率の測定した結果、cooling rate と warming rate はそれぞれ、毎分 10,021、毎分 28,000 であった。コントロールとして用いた銅製の既製品であるクライオティッシュ (北里バイオファルマ) とくらべて、cooling rate ならびに warming rate それぞれ有意に早い結果が得られた [Hashimoto S, Suzuki N, et al. Journal of Reproduction and Development, 2013; 59: 496-9]。次に、豚の卵巣組織を用いてクライオサポート、クライオティッシュ (北里バイオファルマ) そして、高分子フィルム (グラファイトシート) を原料とした新たなデバイスによる凍結・融解を行い、原始卵胞と 1 次卵胞の形態を比較評価した。その結果、高分子フィルム (グラファイトシート) を原料とした新たなデバイスはクライオサポートと遜色がないだけでなく、クライオティッシュ (北里バイオファルマ) と比べても有意に形態学的に良好な原始卵胞ならびに 1 次卵胞が確認された [Hashimoto S, Suzuki N, et al. Journal of Reproduction and Development, 2013; 59: 496-9]。

そこでカニクイザルの卵巣組織を、高分子フィルム (グラファイトシート) を原料とした新たなデバイスを用いて凍結を行い、卵巣組織を融解後、異所性移植を行った。しかしながら、カニクイザル採血により血中ホルモン値の胴体を観察するも、ホルモン周期の再開を確認することができなかった。カニクイザルの個体による影響を考え、さらなる検討を行う予定としている。

Rapid-i キットを用いた、卵巣組織凍結法への応用 :

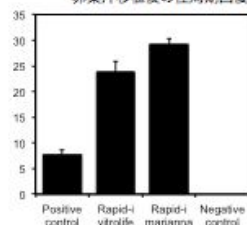
以下の表と図に示す如く、Rapid-i キットによる卵巣組織凍結応用への可能性が示唆された。

凍結卵巣片の腎皮膜下への移植後の性周期の回復

実験群	回復期間 (日)	
	Mean ± SD	n
新鮮卵巣移植	7.75 ± 0.8	n=4
Rapid-i vitrolife	23.75 ± 2.2	n=4
Rapid-i marianna	29.25 ± 1.1	n=4
Negative control-1	N.D.	n=3

N.D., not detected

卵巣片移植後の性周期回復までの



さらに、卵巣組織凍結・融解組織片を用いて電子顕微鏡にて原始卵胞の細胞膜、核膜ならびにミトコンドリアの形態などを検討し評価した結果、我々が開発したクライオサポートによる電子顕微鏡像と遜色ない結果が得られた。

(2) 卵巣組織凍結方法の確立と移植の評価法の開発 :

より侵襲の少ない評価法を開発する目的で、超音波造影剤 (ソナゾイド、第一三共株式会社) を用いた超音波画像診断を導入することによって、ラットの新鮮卵巣を用いて検討を行った結果、血流の再流入を捕らえることに成功した。今後、既存のデバイス (我々が開発したクライオサポートならびにクライオティッシュ (北里バイオファルマ)) そして新たなデバイス (高分子フィルム (グラファイトシート) を原料とした新たなデバイスならびに Rapid-i キット) を用いて、超音波画像診断による、移植評価を進める。

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 17 件)

(1) Hashimoto S, Suzuki N, Amo A, Yamochi T, Hosoi Y, Morimoto Y. Good thermally conducting material supports follicle morphologies of porcine ovaries cryopreserved with ultrarapid vitrification. J Reprod Dev. 2013 ;59(5):496-9. Epub 2013 Jun 17. 査読有

[学会発表] (計 97 件)

(1) 鈴木直, 生殖補助医療技術の新展開～生殖細胞・生殖巣の凍結保存, 公開シンポジウム 子を授かる～生殖補助医療の現状と未来～, 岡山大学医学部 JF ホール (岡山県), 2013/12/22

(2) 鈴木直, 卵巣組織凍結・移植の Up to date, 第 25 回茨城不妊臨床懇話会, つくば国際会議場 (茨城県), 2013/11/24

(3) Suzuki N, Ovarian tissue cryopreservation: from basic research to clinical practice, The 1st Symposium of Korean Society for Fertility Preservation ' (KS FP 2013), Seoul, Korea, 2013/11/23

(4) 鈴木直, 卵巣組織凍結・移植の最前線, 第 58 回日本生殖医学会学術講演会・総会, 神戸国際会議場 (兵庫県), 2013/11/15

(5) Suzuki N, Current topics on fertility preservation of cancer patient- ovarian tissue vitrification for clinical application., The 9th conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, 2013/11/13, 神戸国際会議場 (兵庫県)

(6) Suzuki N, Ovarian tissue vitrification and transplantation on fertility preservation- from animal lab to clinical application, 2013 Oncofertility Conference, 2013/9/9, Chicago,U.S.A.
(7) 鈴木直, 若年がん患者に対する卵巣組織凍結 - 新たながん・生殖医療の実践, 第 8 回埼玉県産科婦人科医会平成 25 年度前期学術集会, 2013/6/29, 埼玉県県民健康センター (埼玉県)
(8) 鈴木直, がんと生殖に関する最近の話題 ~ 若年女性の QOL 向上を志向して ~, 第 9 回 TAMA カンファレンス, 2013/5/23, ホテルモリノ新百合ヶ丘 (神奈川県)
(9) Suzuki N, Vitrification of ovarian tissue, The International Ovarian Conference 2013, 2013/3/9, Taipei, Taiwan
(10) Suzuki N, Ovarian tissue vitrification and transplantation: from preclinical study to clinical application, The International Conference on Preservation of Fertility for Cancer Patients 2013, 2013/2/3, Hong Kong, China
(11) 鈴木直, ガラス化法による卵巣組織凍結の実践, 第 15 回日本 IVF 学会学術講演会, 2012/9/30, 大阪府 (大阪国際会議場)
(12) Suzuki N, Ovarian tissue vitrification: the option of the future?, Fertility Preservation from endometriosis to ovarian tissue cryopreservation, 2012/9/21, ブリュッセル, ベルギー
(13) Suzuki N, Influence on placental function depending on the change of coagulation and fibrinolytic system during pregnancy-Current situation for thromboprophylaxis in Japan, IFPA Meeting 2012 (第 18 回国際胎盤学会), 2012/9/19, 広島県 (広島国際会議場)
(14) Suzuki N, Ovarian Tissue Transplantation: From Animal Lab to Clinical Practice, 第 4 回アジア太平洋生殖医学会 (ASPIRE2012), 2012/9/2, 大阪府 (グランキューブ大阪 (大阪国際会議場))
(15) 鈴木直, 若年がん患者の QOL 向上を目指したがん・生殖医療の実践, 第 30 回日本受精着床学会総会・学術講演会 (JSF12012), 2012/8/31, 大阪府 (グランキューブ大阪 (大阪国際会議場))
(16) 鈴木直, 若年がん患者に対する妊孕性温存の可能性 ~ 新たながん・生殖医療の実践 ~, 第 8 回東京受精・胚培養研究会学術講演会, 2012/7/15, 東京都 (東京国際フォーラムホール)
(17) 鈴木直, 乳癌患者に対する妊孕性温存療法 - 新しいがん・生殖医療の知見から -, 第 20 回日本乳癌学会学術総会, 2012/6/29, 熊本県 (テトリアくまもとビル)
(18) Suzuki N, Fertility preservation in cancer survivors with cryopreservation of ovarian tissue, 第 4 回日韓 ART カン

ファレンス, 2012/3/23, 大阪府 (大阪大学中之島センター)
(19) 鈴木直, 妊孕性温存とがん・生殖医療, 横浜市産科婦人科医会平成 24 年 3 月例会, 2012/3/22, 神奈川県 (ホテルキャメロットジャパン)
(20) 鈴木直, 妊孕性温存を希望する若年がん患者に対する生殖医療について - 最近の知見, 日本生殖医療心理カウンセリング学会第 9 回学術集会, 2012/2/19, 福岡県 (ソラリア西鉄ホテル)
(21) 鈴木直, がん患者の妊孕性温存 - 当院のがん・生殖医療外来の実際, 平成 23 年度埼玉県不妊専門相談センター事業研修会, 2012/2/4, 埼玉県 (大宮法科大学院大学)
(22) Suzuki N, Fertility preservation in cancer survivors, Serono Symposia International, 2011/12/7, 神奈川県 (パシフィコ横浜)
(23) Suzuki N, Fertilized-ova from vitrified ovarian grafts in monkeys: Development of a new vitrification technique, ESHRE Campus 2011, 2011/10/9, Cairns, Australia
(24) 鈴木直, 若年がん患者の QOL 向上を志向した新たな生殖医療 - がん・生殖医療科学 (Oncofertility) について -, 第 13 回横浜 ART 研究会プログラム, 2011/8/27, 神奈川県 (横浜ベイシェラトンホテル)

〔図書〕(計 3 件)

(1) 杉下陽堂, 橋本周, 星名真理子, 川越雄太, 吉岡伸人, 高江正道, 洞下由記, 五十嵐豪, 津田千春, 矢持隆行, 竹之下誠, 細井美彦, 河村和弘, 森本義晴, 鈴木直, 医歯薬出版, 卵巣組織凍結・移植 - 新しい妊孕性温存療法の実践, 2013, 46-59
(2) 橋本周, 鈴木直, 河村和弘, 杉下陽堂, 森本義晴., 医歯薬出版., がん・生殖医療妊孕性温存の診療, 2013, 166-175
(3) 鈴木直, 医歯薬出版株式会社, 生殖卵巣学 臨床への進展, 2011, 249-259

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 直 (SUZUKI, NAO)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：90246356

(2) 研究分担者

石塚 文平 (ISHIZUKA, BUNPEI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号：80097336

(3) 連携研究者

なし