

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：14202

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659729

研究課題名(和文) カニクイザルを用いた全卵巢組織の凍結融解技術の確立

研究課題名(英文) Establishment of whole ovarian frozen preservation of Macaca

研究代表者

竹林 明枝 (Akie, Takebayashi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：00402735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：カニクイザルの卵巢を凍結融解する前に、マウスの卵巢を摘出して実験をした。マウスの卵巢組織を凍結した後、融解条件の検討のために免疫組織染色をして至適条件の検討を行った。その後、カニクイザル七頭の卵巢をCASを用いて凍結した。現在、液体窒素の中に凍結保存されており、今後、自家移植にむけて調整を行っている。

研究成果の概要(英文)：We performed experiment of mouse ovaries before beginning experiment of macaca ovaries. To make a study of thawing condition, we froze mouse ovaries and performed immunohistochemistry of frozen mouse ovaries. Then, we froze macaca ovaries with CAS. The ovaries are kept in liquid nitrogen. Now we adjust a schedule for autogenous transplantation.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巢凍結

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する診断法や治療法の進歩に伴って、若年がん患者においても5年生存率の改善傾向が認められる。これらの治療成績の改善によりFDAは、悪性腫瘍に対する放射線治療、抗悪性腫瘍薬による治療を受けた生殖生産世代の生存者は、西暦2025年までに60人に1人に達すると推察している。しかしながら、化学療法や放射線療法は卵巣機能が損なわれ、治療終了後の早発閉経など妊孕能消失などの問題を抱えている。そこで、原疾患の治療を行いつつ卵巣機能を温存させる必要がある。卵巣機能温存の方法の1つとして、抗癌剤や放射線治療前に卵巣を体外に取り出し、凍結保存し(卵巣凍結保存)、治療終了後に体内に自家移植するという方法がある。

卵巣凍結の特徴として卵子凍結と比較し

卵巣内に貯蔵されている多くの卵母細胞を卵胞のまま保存できる。がん治療が終了した時点で卵巣を体内に戻すことができるという特徴がある。

卵巣凍結の方法は主に2通りの方法がある。ひとつは摘出した卵巣を細かく細切してから凍結し、融解後残存卵巣の皮質内や後腹膜に埋め込む方法である(前者)。もうひとつの方法は摘出卵巣を細切せず、卵巣全体そのまま凍結する方法である(後者)。とくに、今日多く行われている前者の卵巣凍結保存は卵巣皮質のみを細切して凍結保存する方法である。もし後者の全卵巣を凍結する方法が確立すれば卵巣そのものを保存して融解することができるので移植回数も少なく、移植後の卵巣機能もより生理的であることが予測される。しかし前者の凍結で汎用されている簡便なガラス化凍結法は、後者のような組織のサイズが大きい全卵巣凍結には、相応しくない凍結方法であることが分かっている。

## 2. 研究の目的

霊長類のカニクイザルを用いて全卵巣を

凍結保存して融解後に移植する技術を確立することを目的として実験を開始した。ヒトと同じ霊長類での凍結融解技術は将来のヒトへの臨床応用の基礎的データとして重要な意味をもつと考え、本研究を開始した。

卵巣凍結融解移植を成功させるためには、凍結、融解、移植の各段階で最適な条件を設定する必要があると考えた。そこで、凍結方法としてCAS (Cell Alive System)を用いた凍結方法の検討を行う。CASは磁場の中で細胞を凍結させるシステムで、水分子を振動させながら凍結させるため、通常の凍結の際にみられる氷晶の形成が極めて小さい。よって凍結による細胞膜の破壊を最小限に抑えることが可能である。元来、食品凍結用に開発された機械であるが、良好な結果が得られており、今回、医療分野でも研究することとなった。

## 3. 研究の方法

卵巣は両側を摘出してCASにて凍結して保存する。

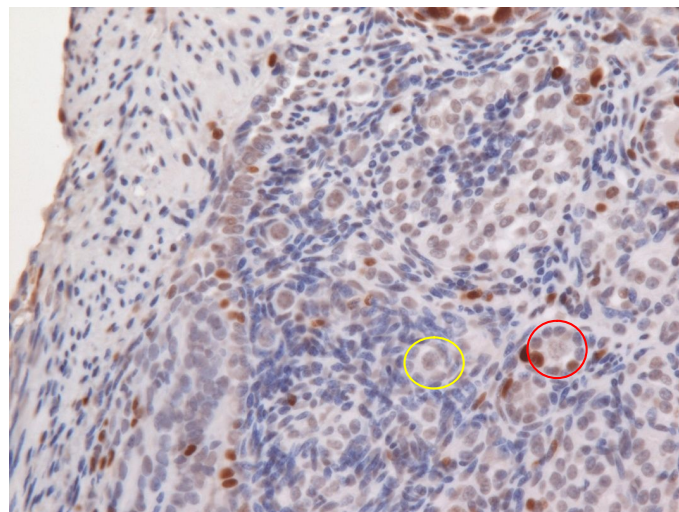
融解方法の検討を行った。これまで、卵巣皮質の融解方法は一般的に37℃急速融解法とされてきたが、4℃の緩慢融解法との比較検討は十分に行われていない。よって、まずは全卵巣凍結後の融解方法およびその至適温度について検討することとした。この検討のために、予備実験として、実験殺されたカニクイザルから卵巣を摘出し、実験を開始したところ、卵巣には評価対象となる原始卵胞・一次卵胞がほとんど存在しなかった。これはサルが高齢であり卵巣内に卵母細胞が枯渇していることによるものと考えられた。そこで、実験方法を確立するためにまず5週齢のマウスの卵巣を用いて実験を行うこととした。24匹のマウスから両側の卵巣を摘出した。卵巣を凍結する凍結群とコントロールとして凍結しない非凍結群に分けた。今回の凍結方法は簡便に凍結できるガラス化法を

選んだ。さらに凍結群は全卵巣をガラス化法で凍結した後、凍結後融解の際に 4 で融解する緩慢融解群と 37 で融解する急速融解群に分けた。さらに、凍結群・非凍結群とも融解直後と 3 時間培養した後にそれぞれ卵巣の固定を行い、以降の実験に使用した。検体は、ホルマリン固定、パラフィン包埋し、細胞の増殖マーカーである Ki67 を免疫組織染色した。評価は、Teresa Woodruff らの報告 (Fertil Steril 2010) に従い、光学顕微鏡下に 400 倍率で観察し、Ki67 陽性の顆粒膜細胞を含む、形態学的に正常な原始卵胞・一次卵胞の割合を算出し、Fisher 検定を行った。

#### 4. 研究成果

前顆粒膜細胞および顆粒膜細胞に Ki67 が陽性となっている原始卵胞および一次卵胞は活動性のある卵胞と考えられている。このため、Ki67 陽性顆粒膜細胞を含む原始卵胞・一次卵胞の割合を、非凍結群、4 融解群、37 融解群について、融解直後と 3 時間培養後について比較検討した。

融解直後は緩慢融解群の方が急速融解群に比べて Ki67 陽性率は有意に高かった。これにより 4 緩慢融解の方が細胞へのダメージが少ない可能性が示唆される。しかしながら、3 時間培養後の結果を比較検討すると、緩慢融解群と急速融解群ともに Ki67 陽性率は上昇し、かつ同等であった。このことから融解温度は 37 よりも 4 の方が望ましい可能性が示唆された。



(赤 : Ki67 陽性顆粒膜細胞を含む一次卵胞)

(黄 : Ki67 陽性顆粒膜細胞を含まない一次卵胞)

	0 時間培養	3 時間培養
非凍結群	44.8 % (56/125)	35.9 % (52/145)
4 融解群	37.3 % (88/236)*	45.0 % (27/60)
37 融解群	23.0 % (26/113)*	45.1 % (46/102)

#### 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 5 件)

Akie Takebayashi, Fuminori Kimura, Yohei Kishi, Mitsuaki Ishida, Akimasa Takahashi, Akiyoshi Yamanaka, Di Wu, Luyi Zheng, Kentaro Takahashi, Hiroshi Suginami, Takashi Murakami

Subpopulations of macrophages within eutopic endometrium of endometriosis patients.

American Journal of Reproduction Immunology

73: 221-231, 2015. 査読有

Akie Takebayashi, Fuminori Kimura, Yohei Kishi, Mitsuaki Ishida, Akimasa Takahashi, Akiyoshi Yamanaka, Kentaro

Takahashi, Hiroshi Suginami, Takashi Murakami

The association between Endometriosis and Chronic Endometritis PLOS ONE 9,2, e88354 9: 1-7, 2014. 査読有

Akie Takebayashi, Yoshihiko Shimizu, Comparison of the outcome of *in vitro* fertilization after laparoscopic laser ablation surgery versus laparoscopic cystectomy for endometrioma Gynecology and Minimally Invasive Therapy 2; 27-29, 2: 27-29, 2013. 査読有

Wu D, Fuminori Kimura, Akimasa Takashima, Yoshihiko Shimizu, Akie Takebayashi, Nobuyuki Kita, Zhang G, Takashi Murakami.

Intake of vinegar beverage is associated with restoration of ovulatory function in women with polycystic ovary syndrome. Tohoku J Exp Med. 230(1):17-23.

230: 2013. 査読有

Akie Takebayashi, Fuminori Kimura, Akimasa Yamanaka, Akimasa Takahashi, Synichiro Tsuji, Tetsuo Ono, Syoji Kaku, Nobuyuki Kita, Kentaro Takahashi, Hidetoshi Okabe, Takashi Murakami.

Exaggerated placental site, consisting of implantation site intermediate trophoblasts, causes massive postpartum uterine hemorrhage: case report and literature review. Tohoku J Exp Med. Review; 234(1):77-82. 2014 査読有

[学会発表](計 1 件)

竹林明枝、木村文則、貴志洋平、杉並洋、清水良彦、高島明子、高橋顕雅、山中章義、喜多伸幸、高橋健太郎、村上節  
日本産婦人科学会 2013.5.10 ~ 2013.5.12 札幌  
木村文則、竹林明枝、高島明子、喜多伸

幸、高橋健太郎、村上節  
日本産婦人科学会 2014.4.18 ~ 2014.4.20 東京

竹林明枝、木村文則、平田貴美子、高島明子、喜多伸幸、高橋健太郎、村上節  
日本産婦人科学会 2015.4.9 ~ 2015.4.12 横浜

竹林明枝、木村文則、平田貴美子、高島明子、辻俊一郎、郭翔志、高橋健太郎、村上節

日本生殖医学会 2014.12.4 ~ 2014.12.5 東京

竹林明枝、木村文則、石田光明、高橋顕雅、山中章義、高橋健太郎、杉並洋、村上節

日本生殖医学会 2015.4.26 ~ 2015.4.29 横浜

[図書](計 0 件)

[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：  
出願年月日：  
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

竹林 明枝 (TAKEBAYASHI, Akie)  
滋賀医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00402735

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：