

ヒト生殖補助医療における培養および超低温保存法の改良

マウス胚を用いた胚培養と超低温保存法および
ウシ卵巣を用いた卵巣組織超低温保存法の改良

2019年

遠山 智絵美

要約.....	1
1. 緒論.....	7
2. 第一章 ヒト胚培養のための無加湿インキュベーターの有用性の検討.....	12
2.1. はじめに.....	12
2.2. 材料および方法.....	14
(1) 培養微小滴中の培地水分蒸発率の検討.....	14
(2) 培養中の浸透圧変化の検討.....	15
(3) 加湿および無加湿インキュベーターにおけるマウス胚体外培養試験.....	15
2.3. 結果.....	17
(1) 無加湿および加湿インキュベーターにおける培養中の培地水分蒸発率および浸透圧変化の検討.....	17
(2) 無加湿および加湿インキュベーターにおけるマウス 2 細胞期胚の胚盤胞発生.....	18
2.4. 考察.....	19
2.5. 小括.....	22
3. 第二章 胚盤胞超低温保存における完全合成保存液の開発.....	23
3.1. はじめに.....	23
3.2. 材料および方法.....	26
(1) マウスと飼育方法.....	26
(2) 試薬.....	26
(3) ヒト胚盤胞の背景.....	26
(4) ヒト胚盤胞の実験前処置.....	27
(5) マウス胚の採取と実験前処置.....	28
(6) 超低温保存液.....	28
(7) 冷却加温方法.....	29
(8) 生細胞率の測定.....	29
(9) 冷却加温胚の酸素消費量測定.....	30
(10) マウス胚移植.....	30
(11) Vitrification solution の物性測定.....	31
(12) 統計処理.....	31
3.3. 結果.....	33
(1) 保管容器から胚が離れるまでの時間.....	33
(2) マウス胚盤胞超低温保存後の生存率.....	34

(3) ヒト胚盤胞超低温保存後の生存率.....	36
(4) HPC 添加の有無と生存率	38
(5) ヒトおよびマウス拡張胚盤胞の酸素消費量測定.....	39
(6) マウス超低温保存胚移植成績.....	40
(7) Vitrification solution の物性測定	41
3.4. 考察.....	43
3.5. 小括.....	45
4. 第三章 卵巣組織超低温保存法の改良と冷却加温後組織の評価方法の確立.....	46
4.1 はじめに.....	46
4.2 材料および方法.....	48
(1) ウシ卵巣.....	48
(2) 凍結液平衡時の物理的条件	48
(3) ガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC/MS)	49
(4) 卵巣組織の超低温保存法.....	49
(5) ウェスタンブロッティング	50
(6) 免疫組織化学染色.....	50
(7) アポトーシス陽性細胞観察	51
(8) 超低温保存後卵巣組織片の細胞密度の計測.....	51
(9) 統計解析.....	52
4.3 結果.....	53
(1) 卵巣組織中の凍害保護物質濃度.....	53
(2) 超低温保存後卵巣組織片における細胞密度.....	55
(3) 超低温保存卵巣組織におけるカドヘリンタンパク質発現量と染色強度	56
(4) 超低温保存卵巣組織におけるアポトーシス陽性細胞.....	58
4.4 考察.....	59
4.5 小括.....	62
5. 総括.....	63
6. 謝辞.....	65
7. 引用文献.....	66

要約

国立社会保障・人口問題研究所が行った 2015 年の調査によると、夫婦全体の 18.2%が不妊の検査や治療を行ったことがあると答えており、不妊に関する検査や治療を受ける患者の数は同研究所の調査開始(2002 年)から増加している。

ヒト生殖補助医療において卵および胚の体外培養及び超低温保存は欠かせない技術で、培養技術により体外受精後の胚は最大 7 日間培養され、良好胚の選別が容易となった。また超低温保存を用いて、移植されない余剰な胚は効率よく保存され 1 回の採卵で複数回の移植を可能とし、採卵あたりの妊娠率が向上した。さらに、生殖補助医療は、がん治療前の妊孕性温存においても多大な貢献をしている。近年では、超低温保存技術は卵や胚の保存だけでなく、卵巣保存でも臨床応用が開始されている。

本研究は生殖補助医療に関する三つの技術の改良を目的として三章から構成されており、第一章では「胚培養環境の改良」、第二章では「胚の超低温保存法の改良」、第三章では「卵巣組織の超低温保存法の効率化」について検討を行った。

はじめに第一章では、培養環境のひとつである湿度に着目し改良を行った。生殖補助医療における培養は、培地の蒸発を防ぐために加湿インキュベーターが一般的に用いられており、加湿により培養器内の湿度は飽和状態となっており、真菌等の微生物が繁殖しやすい環境であるため清掃作業などの管理が煩雑である。一方で、これらの要因を除く無加湿インキュベーターでは、培地からの水分蒸発による培養成績への影響が不明なため、臨床への導入には検討が必要である。

そこで、本研究では検討のために無加湿インキュベーターを開発し (EZ-culture、株式

略語

HPC:	Hydroxypropyl cellulose
SSS:	serum substitute supplement
PMSG:	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
hCG:	human Chorionic Gonadotropin
ES:	Equilibrium Solution
VS:	Vitrification Solution
TS:	Thawing Solution
DS:	Diluent Solution
WS:	Washing Solution
IVF:	In Vitro Fertilization
EG:	Ethylene glycol
DMSO:	Dimethyl sulfoxide

会社アステック、福岡)、広く生殖補助医療で使用されている加湿型インキュベーターの APM-30D (株式会社アステック)と比較した。はじめに無加湿インキュベーターは培地の水分蒸発に影響を与えるか検討するために、100 μ L の微小滴培地を 2 日間培養して水分蒸発率ならびに浸透圧変化を無加湿、加湿インキュベーターで比較した。次に無加湿インキュベーターは胚発生成績に影響を与えるかマウス 2 細胞期胚を 4 日間培養し、胚盤胞発生率を加湿インキュベーターと比較した。

実験の結果、無加湿および加湿インキュベーターにおける 2 日間培養後の培地水分蒸発率はそれぞれ $1.5 \pm 0.0\%$ ($n=3$) および $0.0 \pm 0.1\%$ ($n=3$) であり、浸透圧変化は 1.8 ± 0.3 mOsm/L ($n=9$) および 0.1 ± 0.2 mOsm/L ($n=9$) であった。この浸透圧変化は市販培地のロット間浸透圧差の平均許容範囲である 12.4 mOsm/L よりも低値であった。また、無加湿および加湿インキュベーターで培養したマウス 2 細胞期胚の胚盤胞発生率はそれぞれ 93.1% ($n=2040$) および 91.9% ($n=185$) と良好であり、実験区間に有意差は認められなかった ($P > 0.05$)。

以上の結果から、無加湿インキュベーターの培養後の培地水分蒸発率や浸透圧変化は、胚発生に影響を与えない範囲内であることが明らかとなり、本研究で用いた無加湿インキュベーターがヒト胚の培養成績においても従来の加湿インキュベーターと差の無い事が示唆された。

次に第二章では「胚の超低温保存法の改良」として動物由来物質を含まない卵および胚の超低温保存液の開発を行った。

2016 年の体外受精による治療周期は 42 万周期で、そのうち胚の超低温保存を適応した治療周期数は約 20 万周期と、多くの不妊治療患者が超低温保存胚を用いた治療を受けている。

ヒト生殖補助医療ではロット差や感染症のリスクを除くために動物由来成分を含まない培養液が使用されおり、超低温保存においても症例数の増加にともない動物由来成分を含

まない保存液の開発が望まれた。そこで、植物由来の水溶性高分子で非動物由来物質のヒドロキシプロピルセルロース (Hydroxypropyl Cellulose, HPC) が従来の凍害保護物質であるヒト血液由来成分の SSS (Serum Substitute Solution, Irvine Scientific, CA, USA) の代替となるか検討を行った。

HPC は、SSS (ヒト血液由来 α または β -グロブリン 10 mg とアルブミン 50 mg、計 60mg の高分子を生理食塩水 1 L に溶解) と同等の 60 mg/mL をミリ Q 水に溶解したものを原液として、1% または 5% (v/v) 濃度で保存液に添加した。SSS は 5% または 20% (v/v) 濃度で保存液に添加した。

マウス胚は、近交系 C57BL/6J マウス胚盤胞 (n=996) と交雑系 C57BL/6JxDBA マウス (n=128) を用いた。ヒト胚を用いた試験は、加藤レディスクリニック倫理委員会にて研究実施の承認が得られており (承認番号 13-06、添付資料 1)、不妊治療終了後に胚の廃棄処分を決定され、研究への使用に同意が得られた患者の余剰胚盤胞 (n=123) を用いた。一部のヒト胚盤胞 (n=48) とマウス胚盤胞 (n=203) は酸性タイロイド液 (Irvine Scientific) を用いて透明帯を溶解し孵化胚盤胞モデル (透明帯無) とした。超低温保存法は Cryotop Safety kit (株式会社北里コーポレーション、静岡) に従い、冷却前に胚を 7.5% エチレングリコール (Ethylene glycol, EG) および 7.5% ジメチルスルホキシド (Dimethyl sulfoxide, DMSO) を含む Equilibration Solution (ES) に 15 分浸漬した後、15% EG、15% DMSO、1 M ショ糖を含む Vitrification Solution (VS) に 90 秒浸漬し保存容器である Cryotop に胚を乗せ液体窒素で冷却して保管した。また、加温は 1M ショ糖を含む Thawing Solution (TS) に 1 分浸漬したのち、0.5 M ショ糖を含む Dilution Solution (DS) に 5 分、199 培地を基本とした Washing Solution (WS) に 3 分浸漬したのち WS で 1 分洗浄した。

検討では、加温後に 2 時間回復培養し、胞胚腔が確認されたものを生存胚と判定し、各保存液を用いて保存した胚の生存率を比較した。また超低温保存後に生存した胚は、ヘキストおよびプロピジウムイオダイドを用いた核の二重染色による生存細胞率の観察およ

び、胚発生率との関連が報告されている酸素消費量[1]を受精卵呼吸量測定装置（HV-406、北斗電工株式会社、東京）で測定した。さらに、HPCの凍害保護作用機序を解明するために保存工程のいずれの段階で作用を持つかの検討、粘度が高くなるほどガラス転移点が高くなり、ガラス化しやすくなる[2]ことから粘度をSSSとHPCで比較した。

また、HPC添加保存液の産仔への影響の検討として、超低温保存したマウス胚の移植試験を行った。精管結紮ICRマウスと同居した翌朝（0.5日）に膣栓が確認された偽妊娠マウスに新鮮またはHPC添加保存液で超低温保存した胚盤胞を移植し、18.5日に帝王切開により出産させ出生率を比較した。

上記の検討の結果、透明帯無処置の交雑系マウス胚盤胞およびヒト胚盤胞の保存後生存率は1%、5% HPC区、5%、20% SSS区すべて100%あった。一方で、近交系マウス胚盤胞、近交系マウス透明帯除去胚盤胞およびヒト透明帯除去胚盤胞の保存後生存率は5% HPC区が5% SSS区よりも有意に高値であった（マウス：94.4%、72.7%、ヒト：94.4%、35.0%、 $P < 0.05$ ）。保存後の生存胚における生細胞率は、実験区間で差が認められなかった（ $P > 0.05$ ）。

ヒトおよびマウスを用いた酸素消費量の測定結果と、マウス胚移植試験における出生率は、どちらも5% HPC区と新鮮区に差はなく（ $P > 0.05$ ）、胚移植試験によって得られた両区の産仔に異常は認められなかった。

HPCの凍害保護作用機序の解明では、HPC添加VSはSSS添加VSよりも粘度が高くガラス化しやすいことが示唆され、またHPCの凍害保護作用は冷却直前のVSの段階で最も作用していることが明らかとなった。さらに、HPCは保管容器表面に胚が接着するのを防ぐことが観察され、これはHPCがSSSよりも早く保管容器に被膜を作るためだと考えられた。

以上の結果から、卵および胚の超低温保存液における凍害保護物質としてHPCが有用であることが示唆された。

第三章では、「卵巢組織超低温保存法の効率化」として組織中への凍害保護物質の浸透が効率的となるプロトコルの開発および凍結融解後の新規の卵巢組織評価法の確立を試みた。

がん治療法の進歩により、がん患者の治療奏功率は向上し、治療後の生活の質についても注目されるようになり、医原性不妊の対策として卵巢組織の超低温保存が臨床で普及し始めた[3]。

卵巢組織の超低温保存では、保存検体の体積が細胞と比較してはるかに大きいにも関わらず、これまで組織への凍害保護物質の浸透性の改善を検討した報告はない。また、超低温保存後の卵巢組織評価には、アポトーシス解析や卵母細胞の形態評価が用いられるが、アポトーシス経路の進行には時間を要するため保存直後の評価には不向きだと考えられる。また形態評価は保存直後でも評価できるが、標本作製工程が細胞の形態に与える影響を完全に除くことは困難だと考えられた。

卵巢組織の超低温保存法にはガラス化法を選択した。ガラス化法では組織内に凍害保護物質を十分に浸透させるため、従来法では40分間保存液へ浸漬する。そこで物理的条件を変更し保存液への浸漬時間を短縮できるか検討した。浸透時の物理的条件はコントロール区の静置、振盪、陰圧、陽圧とした。卵巢組織中の凍害保護物質の濃度はガスクロマトグラフィーで測定した。

検討の結果、陰圧条件下では平衡時間を従来法の半分（20分）に短縮でき、凍害保護物質の浸透効率が向上することが明らかとなった。

また標本作製工程の影響を受けにくい方法として、細胞間結合タンパク質のカドヘリンタンパク質の発現量に着目し、陰圧平衡による超低温保存組織への影響を検討した。はじめに従来から組織評価法として用いられている細胞密度を計測した結果、コントロール区は新鮮区と比較して有意に細胞密度が低値であったが、新鮮区と陰圧区、コントロール区

と陰圧区には差がなかった。一方で、カドヘリンタンパク質発現量はコントロール区よりも新鮮区および陰圧区が有意に高値であった。

以上の結果から、卵巣組織超低温保存における凍害保護物質の浸透は、陰圧にすることで促進され、従来法よりも保存液への平衡時間が短縮できた。さらに陰圧平衡で保存した卵巣組織の超低温保存後の損傷は、細胞密度やカドヘリンタンパク質の発現量の比較から、従来法で保存した組織よりも小さいことが示唆された。カドヘリンタンパク質の発現量の比較は超低温保存法の評価において有用である可能性が示唆された。

1. 緒論

家畜や実験動物における体外受精の成功は 1959 年にウサギ[4]、1963 年にハムスター [5]で報告され、顕微授精についても 1976 年にはハムスター卵子での成功が報告されている[6]。ウシにおいては卵子や精子などの配偶子の凍結保存や胚移植技術が開発され、生殖工学技術は畜産業において繁殖技術および効率の向上に多大な貢献をもたらした。これらの技術を基にヒトの生殖補助医療技術も同時に進歩を遂げ、1978 年には Steptoe と Edwards により世界初のヒトの体外受精からの出生児が報告され[7]、1992 年にはヒトにおいて初めて、顕微授精の成功が報告された[8]。一般社団法人日本生殖医学会によると現在日本国内においては約 5 組に 1 組の夫婦が治療を受けないと児を得ることができない不妊症と考えられており、多くの夫婦が生殖補助医療を受けている。日本産科婦人科学会の平成 29 年度登録・調査小委員会報告によると、2016 年に日本で行われた生殖補助医療による出生児は 54,110 名であり 2017 年の日本における出生児 946,065 名[9]の約 5.5%を占め、2018 年の報告によると累積 536,737 名が生殖補助医療を用いて生まれている[10]。また、厚生労働省による「不妊に悩む方への特定治療支援事業」における「特定不妊治療費助成制度の実績・成果の概要」によると、採卵を伴う治療への助成は平成 16 年度が 17,657 件であり、平成 25 年には 148,659 件と約 10 倍になっている。これらのことから、1978 年から臨床に用いられてきた生殖補助医療の需要は年々高まっていることは明らかである。

生殖補助医療において、卵および胚の体外培養は欠かせない技術であり、インキュベーターに関する技術開発は現在も盛んに進められている。ヒトの胚培養におけるインキュベーターは 5~6%CO₂、5%O₂、89~90%N₂にガス濃度を調節可能なマルチガスタイプが用いられており、培地の蒸発を防ぐため加湿されている加湿インキュベーターが初めに普及した[11]。加湿インキュベーターは、庫内に滅菌精製水の入った加湿用水分バットを設

置することで湿度を保ち、内蔵の CO₂ 濃度測定器は湿度が飽和の状態ですら正常に作動する。一方で、高い湿度により加湿インキュベーター庫内は真菌等の微生物が繁殖しやすい条件となるため、培地が微生物により汚染されるリスクが高まることが懸念された。加湿用水分バットは、微生物の発生源となりやすいことが知られている。しかし、ヒト胚培養においては胚発生への影響を考慮して、微生物の増殖を防ぐ薬剤をこのバットに添加することは避けられている。そのため、インキュベーター内の無菌状態を保つには、無菌操作だけでなく、頻りに庫内を滅菌精製水および消毒薬で清掃・滅菌し、汚染リスクを低減する必要がある。この清掃・滅菌作業は、煩雑なため採卵後の卵子を胚移植まで管理・培養する胚培養士の負担となっている。

近年、無加湿でも測定可能な二酸化炭素測定器が開発され普及するようになり、加湿による汚染リスクや清掃作業の煩雑さが無い無加湿インキュベーターの開発が進められた。無加湿インキュベーターは加湿用水分バットをインキュベーター下部に設置する必要がないことから、培養空間を区切ることができ、省エネ、省スペースを実現させ、さらに経時観察のための顕微鏡をインキュベーター下部に容易に内蔵することが可能となった。これらの技術の進歩は施設の効率化において大きな利点となったが、受精から胚盤胞までの体外培養は 6~7 日間の培養期間が必要となるため、無加湿インキュベーターにおける培地の水分蒸発による培地の変化が胚にどのような影響を与えるかを明らかにすることが望まれた。

また、培養後の胚保存方法においても検討を必要とする点がみられる。受精後の胚は一般的に 4~8 細胞期胚または胚盤胞期まで培養された後に子宮に移植される。生殖補助医療では多胎妊娠を避けるため、1 回の移植においては 1 つの胚を移植する単一胚移植が勧められる一方で、1 回の採卵周期で複数個の胚が得られることは多く、移植を行わない余剰胚をいかに効率よく利用できるかは、採卵あたりの妊娠率に大きな影響を与える。余剰胚の超低温保存は患者の採卵の負担を軽減するという利点もあるため、国内で 2016 年に

行われた超低温保存胚を用いた治療周期は、新鮮胚を用いた周期の約 2 倍の 20 万周期と多く、ほとんどの患者へ適用されている。

卵・胚の超低温保存法には大きく分類すると緩慢凍結法とガラス化法の 2 種類がある。胚の凍結保存の初めての成功は緩慢凍結法によるものである[12]。緩慢凍結法は、プロパンジオールなど低濃度の凍結保護物質を含む凍結液に胚を浸漬し、プログラムフリーザーを用いて一定の速度で徐々に冷却する。次に過冷却の温度域（0℃～-20℃付近）で植氷し、冷却速度を一定に保ちながら、胚を脱水すると同時に細胞内の凍害保護物質濃度を上昇させる。最後に-80℃付近まで冷却し液体窒素に浸漬、保存する。緩慢凍結法では主にストローを凍結保存容器として用いる。1971 年および 1972 年に Whittingham らは緩慢凍結法によるマウス胚の凍結保存に初めて成功し[13,14]、1983 年にはヒト体外受精においても導入され[12]、世界中で緩慢凍結法による胚の凍結保存が行われるようになった。

一方、ガラス化法によるマウス胚の凍結保存は緩慢凍結法の確立から 10 年以上後の 1985 年に Rall らにより確立された[15]。ガラス化法は高濃度の凍結保護物質を含む溶液を使用することで、短時間で細胞を脱水し、保存時の卵・胚を含む溶液量を最小限に抑え、室温から直接液体窒素に投入することで超急速冷却し、細胞内外の水分を結晶化させずに固化させ、ガラス化する方法である。ガラス化法は緩慢凍結法に比べ、細胞内氷晶形成が少なく、高い生存性が得られることが報告されている[16]。また緩慢凍結法はプログラムフリーザーを用いて徐々に温度を下げていくため凍結過程に長時間を要するが、ガラス化法は特別な機器を必要とせず、簡易かつ短時間で保存できる利点がある。

生殖補助医療による超低温保存胚を用いた初めての妊娠は 1983 年[12]であり、翌年の 1984 年には超低温保存胚を用いた生殖補助医療による初の出生児が報告[17]された。その後、妊娠率を向上させるために複数の受精卵を移植することによる多胎妊娠の危険性を考慮して、移植胚を減らすと同時に余剰胚を保存する超低温保存研究が行われるようになった。その結果、ガラス化法を用いた超低温保存胚移植は新鮮胚移植と比較して妊娠率が高

いと報告[18]や、卵巣過剰刺激症候群（Ovarian hyperstimulation syndrome : OHSS）の発症率が新鮮胚移植よりも低い[19]との報告がなされた。さらには、子宮への卵巣刺激処置の影響が低くなる周期まで胚を保存し、子宮内環境を整えて妊娠率を向上させる方法についても提案がなされており、超低温保存技術は余剰胚だけでなく、すべての移植胚で妊娠率の向上が期待できる[20]。

生殖補助医療においてこのような超低温保存胚の利用が広まる一方で、保存法はその効果だけでなく、安全性が求められるようになった。保存液に添加される凍害保護物質としては、血清成分が有用であることが報告されている[21]。しかしながら、動物やヒト由来の血液成分には未知のウイルスなどによる感染の危険性やロット間の差異等が考えられるため、動物由来成分を含まない効果の安定した完全化学合成の超低温保存液の開発が望まれている。

生殖補助医療で普及した卵・胚の超低温保存は、がん患者における妊孕性温存にも用いられるようになり[21]、近年は卵巣組織の超低温保存が普及しつつある。卵巣組織の超低温保存は、当初より悪性腫瘍患者などの妊孕性温存を対象として研究が行われており[21]、これまでに80症例以上が報告されている[22]が、American Society of Clinical Oncology から発行されているガイドライン2013によると、臨床においては推奨レベルではなく研究段階であると定義されており、保存法も施設ごとに異なるため、最適な方法については検討が必要だと考えられる。また、超低温保存後の卵巣組織の評価については移植後の組織や卵胞の形態評価が用いられているが、移植後の組織では超低温保存による影響よりも虚血の影響が大きいとの報告[21]や、卵胞の形態評価では組織全体を客観的に評価することが困難であると考えられるため、解析方法についても検討の必要性があると考えられた。

以上の背景から、本論文の第一章ではヒト卵・胚の体外培養における安全性を向上させる目的で、無加湿インキュベーターの開発および有用性の検討を行った。これまで、無加

湿による培地および胚発生成績への影響は不明であるため、本実験ではヒト胚培養において無加湿インキュベーターが有用であるか、無加湿インキュベーターで培養した培地の水分蒸発率、浸透圧変化、およびマウス胚の発生成績を加湿インキュベーターと比較検討した。

第二章では、ヒト胚培養では完全無血清培地の使用が望まれているため、卵・胚の超低温保存液において凍害保護物質として添加されているヒト血清を、非動物性物質に代替することで完全無血清の胚の超低温保存液の開発を試み、ヒト胚およびマウス胚を用いてその有用性を検討した。

第三章では、妊孕性温存の手段の一つとして近年普及しつつある卵巣の超低温保存における、最適な保存法を開発するため、現在最も有用であると考えられているガラス化法を基本として組織への凍害保護物質の浸透率の改善を行った。さらに、保存後の組織の超低温保存による損傷を、高感度に検出できる解析方法の確立を目的に検討を行った。

2. 第一章 ヒト胚培養のための無加湿インキュベーターの有用性の検討

: 培地の水分蒸発、浸透圧変化の測定およびマウス胚を用いた胚盤胞発生試験

2.1. はじめに

ヒトやマウスの胚培養では、1 胚あたり 2~100 μL の微小滴培地で、drop 培養を行う微小滴培養法[23][24]が一般的で、それぞれの培地をディッシュ上に独立させ、さらに水分蒸発を防ぐために培地の上からミネラルオイルを重層させる方法が用いられる。

インキュベーターにおいては、 CO_2 濃度を正確に測定するために飽和湿度が必要であったが、近年は湿度を必要としない赤外線センサーを用いているためミネラルオイルを重層させるヒト胚の培養には加湿が不要と考えられた。これらの理由から本章では、加湿用水分バットを設置しない「無加湿インキュベーター」(図 2-1.)の開発に取り組んだ。

日本産科婦人科学会の報告によれば、日本における 2016 年の不妊治療周期数は約 40 万周期であり、1998 年の約 6 万件と比較し約 7 倍に増加した。一方で、体外受精・胚移植等の登録施設数の増加は不妊治療周期数の増加と比較すると穏やかであり、1998 年の 400 施設から 2016 年には

598 施設と約 1.5 倍の増加に留まっている。これは、各施設における治療周期数の増加を示しており、1 施設当たりの平均治療周期数を算出すると、1998 年の約

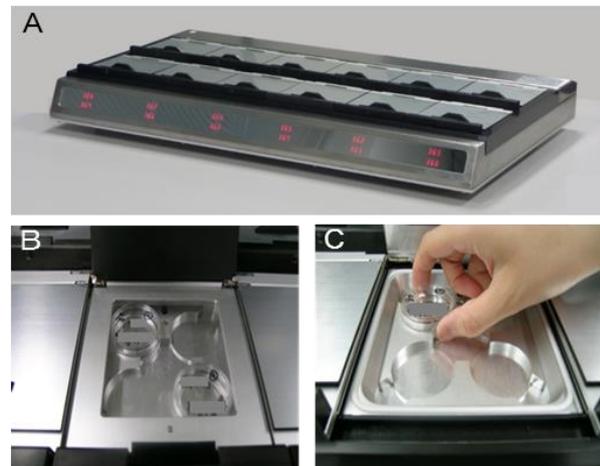


図 2-1. 無加湿インキュベーター

(A)開発した無加湿インキュベーターの外観。(B)外蓋を開けた様子。培養スペースが区切られているため、1 箇所での出し入れの際に、他のスペースの気相に影響を与えることなく、ディッシュごとの気相を安定化させることができる。(C)中蓋を開けディッシュを取り出す様子。ディッシュの位置が固定されるため、出し入れの際に他のディッシュと接触するリスクが低く、保管場所の管理がより容易となった。

160 周期から 2016 年には約 670 周期に増加している[10]。このような背景から、限られた施設の広さに対して、より多くの検体を培養することができるよう無加湿インキュベ

ターの設計においては1枚のディッシュに必要とする培養スペースを最小限にし、インキュベーターの省スペース化を実現した。

本実験で使用した生殖補助医療において広く利用されている小型加湿インキュベーター（内容量：32 L、内形寸法 32×30×33 cm）は、庫内に最大約 40 枚の直径 35 mm ディッシュ（351008, Falcon）を収容する事ができるが、無加湿インキュベーターでは 48 枚のディッシュを 4 枚のディッシュごとに区切られた培養空間で培養するよう設計されている（図 2-1.）。無加湿インキュベーターは培養空間が区切られているためディッシュの識別が容易であり作業が円滑に行える。また、空間あたりの扉の開閉回数も最低限なためディッシュ周囲の培養環境がより安定し、二酸化炭素および窒素ガスの消費量が加湿インキュベーターと比較して少ない。

このように多くの利点がある無加湿インキュベーターだが、一方で無加湿による培養中の培地の水分蒸発や胚発生に及ぼす影響に関する知見は少ない。

そこで、本章では無加湿インキュベーターにおける培養中の培地水分蒸発率と浸透圧変化を測定し、さらにマウス胚を用いた胚盤胞発生試験を行い、無加湿インキュベーターのヒト胚培養における有用性を検討した。

2.2. 材料および方法

(1) インキュベーター

加湿インキュベーターとして株式会社アステック社の APM-30D、非加湿インキュベーターとして同社の EZ Culture を用いた。

(2) 培養微小滴中の培地水分蒸発率の検討

培地水分蒸発率を測定するために、直径 35 mm ディッシュ (351008, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) に 100 μ L の Medium199 (M2154, MERCK, Kenilworth, NJ, USA) 微小滴培地を 6 個、等間隔になるようにマイクロピペットで配置し、3.5 mL のミネラルオイル (151694, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) を培地に重層した。作成したディッシュは、無加湿および加湿インキュベーター中に静置して 48 時間培養した。

水分蒸発率は、培養前のディッシュの総重量 (=ディッシュ+微小滴培地+ミネラルオイル) と培養後のディッシュ総重量を電子天秤 (PB303-S, Mettler Toledo International Inc., Columbus, OH, USA) を用いて測定し、差を求め、差が培養前の水分重量 (微小滴培地の重さ 600 μ L \approx 600 mg) の何%であったか算出して示した。

無加湿および加湿インキュベーターで培養したディッシュの重量変化が水分蒸発のみによるものか確認するために、ディッシュのみを無加湿または加湿インキュベーターに静置した区、およびディッシュとミネラルオイルを無加湿または加湿インキュベーターに静置した区を設け、48 時間経過前と後の重量を測定し、培地からの水分蒸発以外の重量変化を水分蒸発率と同様の測定方法で確認した。

(3) 培養中の浸透圧変化の検討

培地水分蒸発率の検討と同様の培養条件を用いて、培地の浸透圧変化を無加湿または加湿インキュベーター中に静置して測定した。

培養前後に各区の培地を 10 μ L 採取し、浸透圧測定機(vapro5520, WESCOR Inc, South Logan, UT, USA)を用いて浸透圧(mOsm/L)を測定し、静置前後の差を浸透圧変化として示した。さらに、市販されている培地(4社4種類)の浸透圧を調査し、製品間およびロット間の差異を調査した。

(4) 加湿および無加湿インキュベーターにおけるマウス胚体外培養試験

加湿および無加湿インキュベーターにおいて、体外培養後の胚盤胞発生率に差があるか否か、ヒト胚用のインキュベーター設定温度、酸素・二酸化炭素濃度(37°C, 5%CO₂, 5%O₂)において発生培養可能なマウス胚を用いて比較試験を行った。マウスの飼育および実験は、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン[25]に従い実施した。

マウス胚は、B6D2F1 雌マウス(5週齢)に Equine Chorionic Gonadotropin (eCG、あすかアニマルヘルス株式会社、東京) 5 IU を腹腔内投与し、48 時間後に human Chorionic Gonadotropin (hCG、持田製薬株式会社、東京) 5 IU を腹腔内投与して過排卵処理を施し、hCG を投与した同日夜に同系の雄マウスと交配させ、翌朝膣プラグが確認された個体を頸椎脱臼により安楽死させた後、卵管還流により膣プラグ確認の翌日に、2細胞期胚を回収した。回収した 2細胞期胚は Cryotop vitrification kit (VT-501、株式会社北里コーポレーション、静岡) で超低温保存し、試験開始まで保管した。加温は試験当日に Cryotop thawing kit (VT-502, 株式会社北里コーポレーション)を用いて行い、2時間の回復培養後に 2割球ともに明瞭な細胞膜が確認できた場合に生存と判定して培養試験に用いた。これらのマウス 2細胞期胚は、3.5 mL のミネラルオイルを重層した 20 μ L の KSOM+AA (MR-121-D、MERCK)微小滴培地を用いて加湿または無加湿インキュベータ

一内に3日間静置し体外培養を行い、培養後に胞胚腔が確認されたものを胚盤胞として、無加湿($n=2040$)および加湿インキュベーター($n=185$)における胚盤胞発生数を観察し、結果は胚盤胞発生率で示した。

(5) 統計処理

水分減少率、浸透圧変化の測定は各試験区で3回反復して行い、結果は平均値と標準誤差で示した。水分減少率、浸透圧変化、胚盤胞発生率はカイ二乗検定を用いて統計処理を行い、 $P < 0.05$ のときに有意差があるものと判定した。

2.3. 結果

(1) 無加湿および加湿インキュベーターにおける培養中の培地水分蒸発率および

浸透圧変化の検討

無加湿および加湿インキュベーターにおける 48 時間培養後の培地水分蒸発率は無加湿インキュベーターが $1.5 \pm 0.0\%$ 、加湿インキュベーターが $0.0 \pm 0.1\%$ であり、無加湿インキュベーターが有意に高値であった ($P < 0.05$, 図 2-2.A)。また、各試験区における微小滴の浸透圧変化は無加湿インキュベーターでは $1.8 \pm 0.3 \text{ mOsm/L}$ であり、加湿インキュベーターの $0.1 \pm 0.2 \text{ mOsm/L}$ と比較して有意に高値であった ($P < 0.05$, 図 2-2.B)。ディッシュのみを 48 時間各インキュベーターに静置した場合の重量変化は無加湿・加湿インキュベーターともに $0.0 \pm 0.0\%$ 、ディッシュとオイルを 48 時間各インキュベーターに静置した場合の重量変化は無加湿インキュベーターが $0.1 \pm 0.1\%$ 、加湿インキュベーターが $0.1 \pm 0.0\%$ と、インキュベーター間で差は認められなかった ($P > 0.05$)。

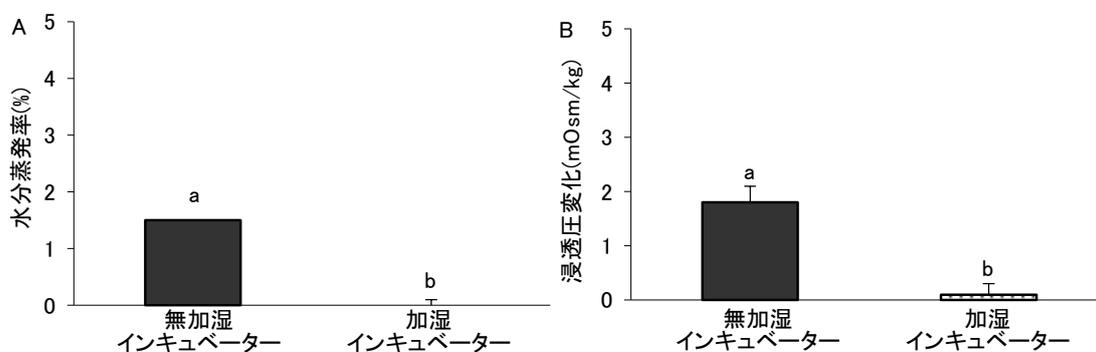


図 2-2. 無加湿インキュベーターと加湿インキュベーターの比較

35 mm ディッシュに 100 μL 微小滴培地 6 個とミネラルオイルを重層させ 24 時間培養し、培養前後の水分蒸発率および浸透圧の差を示した。

24 時間培養後の培地の水分蒸発率(A)および浸透圧変化(B) (各区 n = 9)

a, b : 異なる文字間に有意差がある ($P < 0.05$)。

さらに、市販培地 18 種 (表 2-1) を調査した結果、同一製品のロット間の浸透圧差の許容範囲は平均で 12.4 mOsm/L であった。

表 2-1. 市販培地の浸透圧許容値 (mOsm/L)

Irvine Scientific 社	下限	上限	Cooper Surgical 社	下限	上限
製品名			製品名		
HTF	272	288	HTF	260	270
C-HTF	272	288	Cleavage Medium	260	270
P-1	282	298	Blastocyst Medium	260	270
C-P-1	282	298	HTF	260	270
ECM	282	295	Cleavage Medium	260	270
C-ECM	282	295	Blastocyst Medium	260	270
MultiBlast Medium	281	291	Medium with HEPES	260	270
C-MBM	281	291			
Single Step Medium	280	295			
M-HTF	272	288			

(2) 無加湿および加湿インキュベーターにおけるマウス 2 細胞期胚の胚盤胞発生

超低温保存後のマウス 2 細胞期胚生存率は、92.6% (2225/2402)であった。得られた 2 細胞期胚 2225 個を無加湿および加湿インキュベーターに無作為に分け、3 日間体外培養を行った結果を表 2-2 に示す。加湿インキュベーターの胚盤胞発生率は 91.9%

(170/185)、無加湿インキュベーターの胚盤胞発生率は 93.1% (1900/2040)で、試験区間の発生率に有意差は認められなかった ($P > 0.05$, 表 2-2)。

表 2-2. 加湿または無加湿インキュベーターにおけるマウス 2 細胞胚培養結果

実験区	供試胚数	胚盤胞数(発生率、%)
無加湿インキュベーター	2040	1900 (93.1)
加湿インキュベーター	185	170 (91.9)

マウス 2 細胞期胚 (B6D2F1) を採取し 3 日間培養した後の胚盤胞発生率

2.4. 考察

本章では、無加湿と加湿インキュベーターにおける 100 μ L の微小滴培地の水分蒸発率、浸透圧の変化およびマウス 2 細胞期胚の体外発生成績を比較検討した。体外培養後の培地の浸透圧変化は、無加湿インキュベーター区で 1.8 ± 0.3 mOsm/L、加湿インキュベーター区で 0.1 ± 0.2 mOsm/L と無加湿で有意に高値 ($P < 0.05$) となったが、市販培地を調査した結果、培養液の浸透圧は製品によって最大 31 mOsm/L の差があり、同一製品のロット間の浸透圧差の許容範囲の平均は 12.4 mOsm/L であった。本実験の無加湿インキュベーターで得られた 1.8 mOsm/L の浸透圧変化は、市販培地のロット差より低い値を示した。また、マウス 2 細胞期胚を無加湿および加湿インキュベーターで 3 日間体外培養を行った結果、両区の胚盤胞発生率に差は認められなかった。したがって、無加湿インキュベーターにおける浸透圧変化は、胚の体外発生に影響を与えないことが明らかとなった。

培養中に胚が受けるストレスを低減させることは、良好な発生成績を得るための基本であり培地中の pH を安定させることはストレスの低減につながる[26]。胚培養において pH はインキュベーター内の二酸化炭素濃度と培地の重炭酸濃度で調整されており、インキュベーターの二酸化炭素濃度が減少すると培地はアルカリ性に偏る。ヒト胚はアルカリ性に耐性が低い[27]ことから、二酸化炭素濃度を一定に保つことは培養条件において重要な点の一つだと考えられる。

本実験で使用した加湿インキュベーターは、一台で 35 mm ディッシュ約 40 枚を培養することが可能である。加湿インキュベーターでは、同じ培養空間に異なる患者用のディッシュを培養するため、観察時には扉開閉回数がディッシュの数だけ増加する。そのため、開閉の度に庫内に外気が流入し、設定した値に酸素や二酸化炭素濃度が回復するのに時間を要してしまう。外気の流入によりインキュベーター内の気相が不安定なることを避けるため、インキュベーターの開閉回数が低減されるよう工夫することで、胚培養成績が向上す

るとの報告がある[28]。本試験では、加湿、無加湿インキュベーターともに扉の開閉は培養開始時と培養終了時のみとし、条件を統一したためマウス胚培養試験の結果に差が認められなかった可能性が考えられた。一方で臨床においては扉の開閉回数を最小限にし、二酸化炭素濃度を一定に保つことが可能な無加湿インキュベーターは、加湿インキュベーターと比較して胚発生成績を向上させる可能性があることが示唆された。

また、無加湿インキュベーターは培養している患者ごとに培養空間が区切られているため（図 2-1）、ディッシュの出し入れの際に他のディッシュに接触したり、患者のディッシュを取り違えたりする危険性が少ないという利点が考えられた。さらに、無加湿インキュベーターでは加湿インキュベーターのようにディッシュの上部に空間を設ける必要がないため、培養空間を加湿インキュベーターの 32L から最小限の約 0.3L まで縮小することが可能となり、気相をつくるための窒素ガスや二酸化炭素ガスの消費量を低減できる。さらに、インキュベーターの大きさを小型化することが可能となった。このことから無加湿インキュベーターは維持コストや設置スペースについても加湿インキュベーターと比較して利点をもつ。

湿度による微生物汚染のリスクについては、無加湿インキュベーターは微生物の発生源ともなりうる加湿用水分バットの設置がなく、庫内の湿度も加湿インキュベーターよりはるかに低い為、微生物が繁殖する可能性が低いと考えられた。そのため清潔度が保ち易いという利点も挙げられた。さらには、培養空間が個別に仕切られているため、インキュベーター庫内の清掃も個別に行うことができ、従来の加湿インキュベーターのように 1 台のインキュベーターを清掃のために使用停止にする必要がなく、日常業務の負担を軽減できた。

本研究は、無加湿インキュベーターによる培地の変化は胚の発生成績に悪影響を及ぼさないことを明らかにした初めての報告である。無加湿インキュベーターは省スペース、作

業の円滑さ、清潔度の確保に利点をもち、生殖補助医療におけるヒト胚培養に有用であると考えられた。

2.5. 小括

本章により、無加湿インキュベーターにおける培地の水分蒸発量および浸透圧変化は、加湿インキュベーターと比較して高値であったが、その変化は市販培地の製品間およびロット間の差よりも十分に小さく、マウス胚培養成績に影響を与えないことが明らかとなった。

3. 第二章 胚盤胞超低温保存における完全合成保存液の開発

3.1. はじめに

ヒト卵と胚における超低温保存法には、緩慢凍結法とガラス化法の2種類がある。ガラス化法は高濃度の凍害保護物質を含む保存液に細胞を浸漬し、冷却・加温を超急速に行うことで細胞をガラス化させ、細胞内に氷晶形成をせずに保存することから、高い生存率が得られることが報告されている[16][29][30]。そのため、近年では多くのヒト生殖補助医療施設において、胚および卵の超低温保存にはガラス化法が用いられている[31]。

卵と胚の超低温保存においては、保存液に凍害保護物質としてエチレングリコール (ethylene glycol, EG)、ジメチルスルホキシド (dimethylsulfoxide, DMSO) プロパンジオール (propane-1-2-diol, PrOH) などの不凍液や水溶性高分子が添加されている[32][32][33]。ガラス化法の一つである Cryotop 法 (Cryotop safety kit、北里コーポレーション) では保存液に凍害保護物質として EG と DMSO、高分子としてヒト血清から精製された α -または β -グロブリン 10 mg、アルブミン 50 mg を生理食塩水 1 L に溶解した serum substitute supplement (SSS, Irvine Scientific, CA, Santa Ana, USA) が添加されている[34][34]。ヒト卵を Cryotop 法で超低温保存した場合の加温後生存率は 90~97% と高く、その後の受精率や妊娠率は新鮮卵子と同等であると報告されている[34][35]。しかし、SSS 非添加の保存液では加温後のウシ胚盤胞生存率が低下することが明らかとなり[36]、凍害保護物質として SSS の添加は保存液に必須であると考えられている。一方で、SSS のようなヒト血液由来成分を使用することは、製品のロット差、未知の感染性ウイルスが混在する可能性などの欠点がある。これまでに保存液に添加された SSS に起因する感染症の報告はないものの、これらのリスクを軽減するためにヒト生殖補助医療においては、完全合成の培養液および超低温保存液の使用が望まれている。このような背景から、これまでに血清成分の代替物質として Polyvinylpyrrolidone (PVP)、Ficoll、または

デキストランなどを保存液に添加し血清と同等の生存率が得られるとの報告[37]がある一方で、これらの添加物が精子や胚の発生に悪影響を与えるとの報告[38]があることから、いまだに普及している完全合成の保存液はない。

本章では、SSS の代替となる添加物を用いた完全合成の保存液を開発することを目的として、はじめに予備実験を行い分子量が SSS と類似する 6 種の候補物質の凍害保護作用をマウス胚で検討した。その結果、候補物質のうち医薬品や食品添加物として広く使用されている非動物由来の非イオン性水溶性セルロースであるヒドロキシプロピルセルロース (HPC、日本曹達株式会社、東京) が凍害保護効果を持つことが明らかとなった。HPC は 1971 年に日本薬局方に収載され、2005 年に本邦の食品添加物として指定され、諸外国においても使用されている安全性の高い物質である。HPC は、セルロースの水酸基を酸化プロピレンでエーテル化することで得られる多数のヒドロキシプロピル基(-OCH₂CH(OH)CH₃)を持つ水溶性セルロースである。また HPC の分子量は 4500~100000 Da であり、SSS の分子量 66000 Da と近似している。これらのことから検討では HPC を SSS の代替物質の候補とした。

本章では、HPC がヒト生殖補助医療の胚凍結保存液における新しい凍害保護物質として SSS の代替となりうるか、ヒト胚盤胞、交雑系マウス胚盤胞および、耐凍性の低い近交系マウス胚盤胞と透明帯を除去したヒトおよび近交系マウス孵化胚盤胞を用いて超低温保存後の胚盤胞生存率を比較し、HPC の凍害保護物質としての効果を検討した。さらに加温後生存胚の質の評価として生細胞率および、着床能と関連があると報告されている胚の酸素消費量[39]を検討した。HPC 添加保存液の安全性の確認にはマウス胚を用いた移植試験を行い、得られた産仔の正常性について検討した。

卵や胚の超低温保存液における SSS や HPC の凍害保護作用については、これまで報告がないことから、HPC の凍害保護作用機序の解明として、冷却加温のいずれの段階で保護作用を持つのか検討し、またガラス化のしやすさと相関がある粘度[40]の測定を行った。

さらに、予備実験において HPC 添加保存液では、胚の保存容器への接着が抑制される現象が観察されたため、その原因が界面吸着の速さ（保存容器への被膜形成の速さ）によるものと仮定し、界面に吸着している物質の割合が多いほど低下する表面張力値を経時的に測定し SSS 添加保存液と比較した。

3.2. 材料および方法

本章では、HPC が凍害保護物質として SSS を代替できるか以下の検討を行った。はじめに、HPC と SSS の凍害保護作用比較するため、マウスおよびヒト胚盤胞を HPC または SSS 添加保存液を用いて超低温保存し、冷却加温後の生存率および生細胞率を比較した。次に HPC 添加保存液で超低温保存したマウス胚の移植試験を行い、新鮮胚移植と比較することで HPC の安全性を検討した。最後に保存液への HPC 添加の有無による超低温保存後の生存率の変化、HPC 添加 VS 溶液の粘度測定および表面張力測定をおこなうことで、HPC の凍害保護作用の解明をおこなった。以下に各検討で用いた材料および方法を示す。

(1) マウスと飼育方法

本実験では C57BL/6J 雌マウス（三協ラボサービス株式会社、東京、日本）から購入し個別アイソレーターを用いて試験開始まで飼育した。飼育環境は明期 12 時間（午前 7 時-午後 7 時）、暗期 12 時間（午後 7 時-午前 7 時）の人工照明、室温 22~25℃の環境条件下にて飼育した。すべてのマウスの飼養管理および実験は Guide for the Care and Use of Laboratory Animals[41] に基づき KLC 再生医療研究所にて行った。

(2) 試薬

会社名の記載がない試薬は MERCK より購入した。

(3) ヒト胚盤胞の背景

ヒト胚盤胞を用いるすべての試験は、日本産科婦人科学会の会告「ヒト精子・卵子・受精卵を取り扱う研究に関する見解」に従い、加藤レディスクリニック院内倫理委員会で審議を行い承認された後（承認番号：13-06、別紙 1 参照）、研究実施責任者および実施者、

研究計画書、患者への説明書類、同意書、倫理委員会議事録および審査記録を日本産婦人科学会へ登録を行った。加藤レディスクリニックは日本産科婦人科学会見解に基づく諸登録施設において体外受精・胚移植臨床実施、ヒト胚および卵子の凍結保存と移植、顕微授精、医学的適応による未受精卵子、胚（受精卵）および卵巣組織の凍結・保存の実施施設として登録されている。

本研究では、加藤レディスクリニックにて2005年5月から2012年の7月の間に治療を終了された39歳以下の患者の、直径160-180 μm 、培養5または6日目の廃棄が確定した拡張胚盤胞（123個）を使用した。胚提供患者には研究の説明を行い、研究目的での廃棄胚盤胞の使用に同意を得た。実験は2013年5月から6月の期間に加藤レディスクリニック先端生殖医学研究所にて行った。

(4) ヒト胚盤胞の実験前処置

ヒト廃棄胚盤胞は凍結保存されているため、試験に用いる胚はすべて保管状態からCryotop safety kit（北里コーポレーション）のプロトコルに従い、液体窒素中に保管されている胚を1.0 mol/L スクロースを含む37°Cのthawing solution（TS）に浸漬して加温し、そのまま1分間平衡し、次に0.5 mol/L スクロースを含む室温のdiluent solution（DS）に3分間平衡処理し、続いてスクロースを含まない室温のwashing solution（WS）で5分間平衡し、その後新しいWSに胚を浸漬し洗浄（1分間）した。胚は上記の加温処理後に胚盤胞培地（Quinn's Advantage® Blastocyst medium, Origio, Denmark）にて2時間培養（37°C、5% CO₂、5% O₂、90% N₂）させた。培養2時間後、胞胚腔が再拡張したものを生存胚として試験に用いた。生存した胚は無作為に2グループに分け、一方を酸性タイロッド液に30秒浸漬し、透明帯を除去して孵化胚盤胞モデル（透明帯除去胚盤胞）として用いた。

(5) マウス胚の採取と実験前処置

4-5 週齢の C57BL/6J 雌マウス 56 頭に過排卵処置として 5 IU equine chorionic gonadotropin (eCG、あすかアニマルヘルス株式会社、東京) を午後 6 時ごろに腹腔投与し、48 時間後に 5 IU のヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG、持田製薬株式会社、東京) を腹腔投与した。hCG 投与日の夕刻から雌マウスを、C57BL/6J または CBA 雄マウスと同一ケージ内に同居させて交配し、C57BL/6J の近交系胚または B6CBA (C57BL/6J × CBA) の交雑系胚を得た。hCG 投与から 44~48 時間後、頸椎脱臼によりマウスを安楽死させ、採取した卵管から 2 細胞期胚を回収し KSOM+AA 培地にて 37°C、5% CO₂ で 72 時間培養した。培養後に得られた胚盤胞は、無作為に 2 グループに分け、一方を酸性タイロイド液に 30 秒浸漬し、透明帯を除去した孵化胚盤胞モデル (透明帯除去胚盤胞) として用いた。マウス胚盤胞は各試験まで KSOM+AA 培地 (MERCK) にて培養した。

(6) 超低温保存液

ヒドロキシプロピルセルロース (HPC) 溶液として医薬品グレードの SL-HPC (分子量 8~12 万、日本曹達株式会社) を Milli-Q 水に溶解した。HPC 溶液の濃度は、比較対象とした SSS の主成分である α -または β -グロブリンとアルブミンの総量と同濃度である 60 mg/mL 濃度とし、HPC 溶液は TS を除く凍結融解液に 1 または 5% (v/v) 濃度で添加した。HPC は温度が高くなると溶解性が低下し、凝集する性質があるため、加温して利用する TS へ HPC を添加すると白濁することから、TS への添加は行わなかった。凍結融解液は Medium 199 (M0650) を基本培地として、7.5% (v/v) エチレングリコール (EG) および 7.5% (v/v) ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む equilibrium solution (ES)、15% (v/v) EG および 15% (v/v) DMSO、0.5 mol/L スクロースを含む vitrification solution (VS)、1.0 mol/L スクロースを含む TS、0.5 mol/L スクロースを含む DS、スクロースを含まない WS を用いた。また従来法である比較対象の SSS 添加凍結融解液には、SSS を 5

または 20% (v/v)濃度で添加した。

HPC が凍結保護物質として ES、VS、DS、WS のいずれの段階で効果的に作用しているかを検討するために、HPC 添加の有無が異なる組み合わせの凍結融解液で近交系マウス胚盤胞を冷却加温し、生存率を比較した。

(7) 冷却加温方法

胚盤胞の超低温保存は Cryotop Safety kit の操作手順に従った。胚を ES に 15 分間平衡し、次に VS に 1 分 30 秒平衡した後、保管容器である Cryotop の先端のシートに最少容量の保存液と共に胚を移し、すばやく液体窒素に浸漬し冷却した。加温時は、胚を -196°C の液体窒素から 37°C の TS に浸漬し、1 分間平衡後、室温にて DS に 3 分、WS に 5 分間平衡し、最後に WS で約 1 分間洗浄した。凍結融解後の胚は胚盤胞培地 (ヒト) または KSOM+AA 培地 (マウス) にて 2 時間回復培養を行った。生存率は培養 2 時間後に胞胚腔の再拡張が確認されたものを生存胚として供試胚に対する割合を求めた。

また、予備実験において HPC 添加凍結融解液では融解工程の TS 溶液中で Cryotop 表面から胚が剥がれやすい現象が観察されたため、胚が剥がれるまでの所要時間を計測し、SSS 添加凍結融解液と比較した。

(8) 生細胞率の測定

冷却加温後に生存と判定された胚盤胞における生細胞率をヘキスト (Hoechst 33342、14533) とプロピジウムイオダイド (PI、P4170) の二重核染色により算出した。核染色は、胚を 10 mg/mL のヘキストおよび PI を溶解した M2 培地 (MR-015-D、MERCK) で 10 分間 37°C の条件で培養した。ヘキストは生細胞と死細胞のどちらの核も染色するが、PI は細胞膜透過性がなく死細胞にのみ取り込まれるため、励起光を照射させると蛍光顕微鏡で生存細胞の核はヘキストで青く光り(蛍光波長: 461 nm)、死細胞の核は PI で赤く光

る(蛍光波長：617 nm)ことから生死の判別が可能となる。染色後の胚は PBS(-)で洗浄し、ガラスボトムディッシュを用いて BIOREVO (BZ-9000、株式会社キーエンス、大阪)で観察を行い、胚盤胞の生細胞数および死細胞数を計測した。

(9) 冷却加温胚の酸素消費量測定

形態評価終了後、3時間の培養(37°C、5% CO₂)を行い、超低温保存または新鮮ヒトおよびマウス胚盤胞の酸素消費量を阿部らの報告[42]を用いて走査型電気化学顕微鏡(scanning electrochemical microscopy、SECM、HV-406、北斗電工株式会社、東京)にて測定した。胚盤胞を ERAM-2 培地(IFP0401R、機能性ペプチド研究所、山形)で満たしたすり鉢上のマイクロウェルディッシュの底辺に置き、半径を測定し電極を胚の透明帯直近に移動させ、酸素が還元可能な-0.6 V vs. Ag/AgCl に電位を保持した後、透明帯近傍を鉛直方向に自動的に走査し、酸素消費量の濃度勾配を1つの胚盤胞につき内部細胞塊側の栄養外胚葉部分および、反対側の栄養外胚葉部分の二箇所直接測定した。酸素消費量は球面拡散の理論式[42]を用いて算出した。

(10) マウス胚移植

胚盤胞の体内発生能を比較し、安全性を検討するために、5% HPC 添加保存液で超低温保存したマウス胚盤胞、または新鮮胚盤胞を各5頭の偽妊娠マウス(ICR、8週齢)に子宮移植した。偽妊娠マウスは精管結紮雄マウス(DBA/2)と交配させ、翌朝(0.5 day post coitum (dpc))に膣プラグが確認された個体とした。胚移植は2.5 dpcに偽妊娠雌マウスに Avertin® (250 mg/kg)を腹腔内投与し、各卵管に6個の胚盤胞をガラスピペットで移植した(12胚/頭)。胚移植後16日目(18.5 dpc)に胚移植マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後、帝王切開し、胎仔の数および重量と胎盤重量を測定し、得られた産仔は里親のもとで保育した。産仔は、性成熟後(雌：5週齢、雄：8週齢)交配させ、得られた産仔の

数を平均値 ± 標準誤差で示し試験区ごとに比較した。

(11) Vitrification solution の物性測定

VS の物性測定として、粘度、動的および静的表面張力を測定した。粘度は 5% または 20% SSS、および 1% または 5% HPC 添加 VS 溶液においてキャノンフェンスケ法(コベルコ科研株式会社、神戸市)を用いて測定した。測定時の条件は 25°C、ASTM D445 と D446 基準に沿って行った。各サンプルの測定値は 4 回の平均値 ± 標準偏差で示した。

表面張力は 5%、20%、100% SSS および、1%、5% HPC 添加 VS 溶液について最大泡圧法 (BP-D5、協和界面科学株式会社、新座市) を用いて測定した。測定条件は室温 (22 ± 2°C)、湿度 34 ± 3%、空気を排出させるガラスプローブは測定毎にエタノールで洗浄し、蒸留水ですすいでからエアブローにて乾燥させた。測定は 1 サンプルにつき 3 回行い、動的表面張力のライフタイムの終点(5000 ms)の表面張力の平均値および標準誤差を静的表面張力値として示した。動的表面張力は測定開始 20 秒から 4000 秒までの平均値 (n=3) をグラフで示した。

(12) 統計処理

統計処理には StatView statistical software package (Abacus Concepts Inc., Berkley, CA, USA) を用いた。胚盤胞の生存率、酸素消費量、マウス胚盤胞移植後の着床率は chi-square 検定を用いて試験区の比較を行った。数値が 5 以下の場合には、Fisher's exact probability 検定を用いた。細胞の生存率と粘度は one-way analysis of variance (ANOVA) で処理し、Fisher's PLSD post hoc multiple comparison 検定を用いて、 $P < 0.05$ の場合に有意差があると判定した。

別紙 1

倫理審査結果通知書

加藤レディースクリニック倫理委員会
第 13-06 号 平成 25 年 5 月 13 日

申請者(実施責任者)
加藤 恵一 殿

加藤レディースクリニック 倫理委員会
委員長 入谷 明



受付番号 13-06

課題名 ヒドロキシプロピルセルロース添加ヒト卵子・胚凍結保存液の
有用性の検討

実施責任者 加藤恵一

先に倫理申請のあった上記課題に係る実施計画を平成 25 年 5 月 13 日の倫理委員
会で審議し、下記の通り判定した。

記

判定	非該当	承認	条件付承認
	変更の勧告	不承認	
理由または勧告			

1. 申請内容のいずれかに変更が生じた時には速やかに本委員会宛に変更の届出を提出すること
2. 本委員会より実施についての報告を求めた際には、速やかに応じること

3.3. 結果

(1) 保管容器から胚が離れるまでの時間

予備実験にて HPC 添加保存液では加温時に保管容器である Cryotop のシート上から胚がはがれるまでの時間が短くなることが観察されたため、SSS 添加保存液との比較を行った。5%HPC 添加保存液では加温工程である TS 液への浸漬から 11.3 ± 1.1 秒 ($n=20$) で Cryotop 表面から胚が離れた。一方、5%または 20% SSS 添加保存液では 60 秒以上 ($n=10,10$) 経過しても Cryotop 表面に胚が接着したままであった (図 3-1.)。HPC 区では胚が Cryotop 表面から離れるまでの時間が SSS 区よりも有意に短かった ($P < 0.05$)。

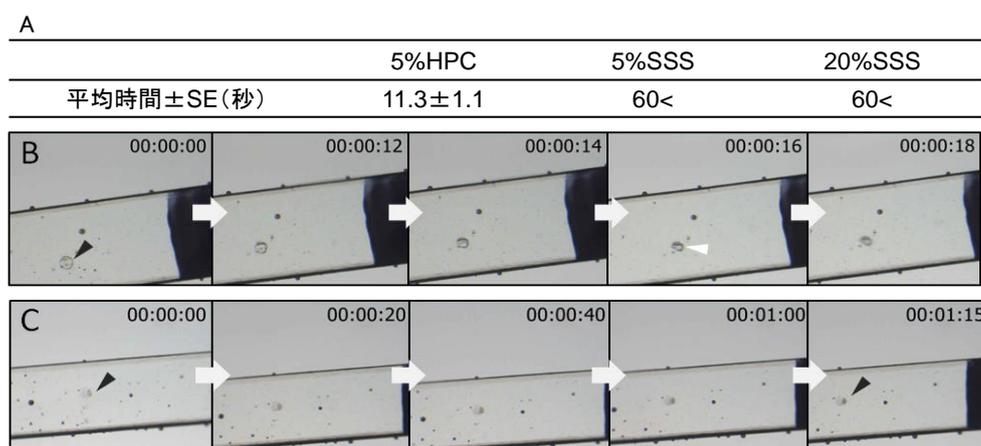


図 3-1. 加温時に胚が Cryotop 表面から離れるまでの時間と様子

(A)各保存液における加温時に胚が Cryotop 表面から離れるまでの所要時間の平均値±標準誤差。(B) HPC 区における加温時の胚の様子。(C)SSS 区における加温時の胚の様子。黒矢頭は胚が Cryotop 表面に接着している状態、B の白矢頭は胚が Cryotop 表面から離れて胚の向きが変わっている状態を指す。

(2) マウス胚盤胞超低温保存後の生存率

交雑系マウス (B6CBA) から得られた胚盤胞の超低温保存後生存率は、すべての試験区において 100%であり、区間に差が認められなかった。一方、近交系マウス (C57BL/6J) 胚盤胞の超低温保存後生存率は、1% HPC では 83.4%、5% HPC では 81.2%、20% SSS では 88.2%であり、いずれも 5% SSS 区の 60.6%よりも有意に高値であった ($P < 0.05$)。さらに、透明帯除去マウス胚盤胞では、5% HPC 区は 94.9%とその他の超低温保存区 (1% HPC 区 67.9%、5% SSS 区 72.7%、20% SSS 区 75.0%) よりも有意に生存率が高い値を示した ($P < 0.05$ 、図 3-2. A)。一方で、5%よりも高濃度の HPC を保存液に添加したところ、特に VS では HPC が溶解するための自由水が不足して HPC が互いに結合し凝集するため、溶液は白濁し、可視性が悪くなるため使用に適さなかった。

近交系マウスの透明帯無処置または透明帯除去胚盤胞における、超低温保存後生存胚の生細胞率を各区で比較した結果、透明帯無処置生存胚における生細胞率は新鮮区 97.3%、1% HPC 区 76.2%、5% HPC 区 91.9%、5% SSS 区 88.3%、20% SSS 区 90.0%であり、新鮮区と 1% HPC 区間にのみ有意差が認められた ($P < 0.05$)。同様に、透明帯除去胚盤胞における生細胞率を比較すると 1% HPC 区が新鮮区と比較して有意に低値であったが、その他の区間では同等の生細胞率であった (新鮮区 96.0%、1% HPC 区 77.1%、5% HPC 区 90.6%、5% SSS 区 87.8%、20% SSS 区 88.8%、図 3-2.B)。

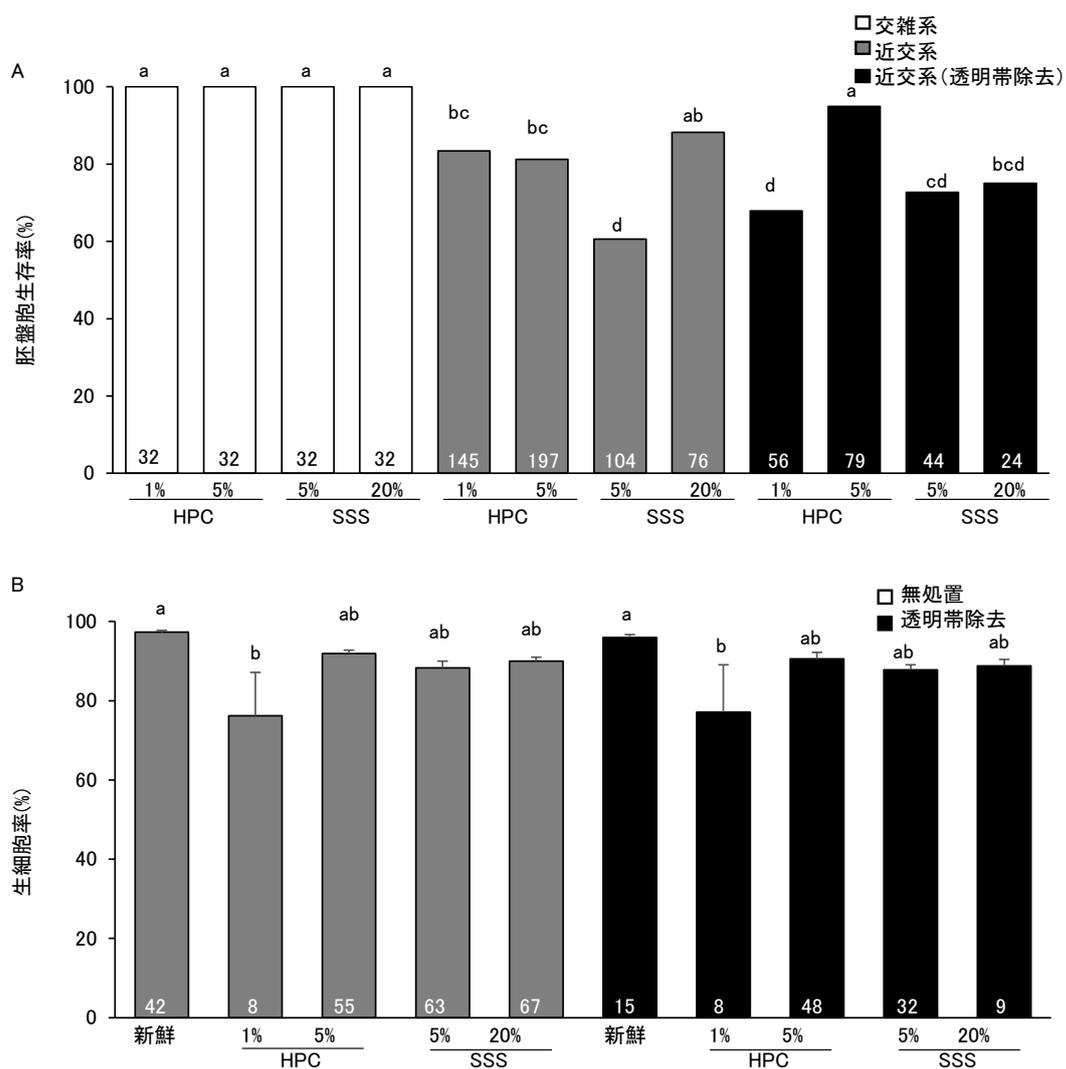


図 3-2. 超低温保存後マウス胚盤胞生存率および生細胞率
 (A)交雑系または近交系マウス胚盤胞を、各保存液を用いて冷却加温し、加温後に再拡張したものを生存と判定して生存率を示した。(B)超低温保存後に生存していた近交系マウス胚盤胞の細胞核を染色し生細胞率を測定した。グラフは各試験区における平均値と標準誤差を示し、棒グラフ下部の数値は n 数を示す。a,b,c,d:異なる文字間に有意差がある(P < 0.05)

(3) ヒト胚盤胞超低温保存後の生存率

本試験に提供された 123 個のヒト超低温保存胚盤胞はすべて加温 2 時間後に再拡張し、生存と判定された。生存胚は無作為に透明帯無処置区と透明帯除去区に振り分け、5% HPC 区、5 または 20% SSS 添加の 3 種の凍結保存液を用いて冷却加温し、加温後生存率を比較した。

透明帯無処置胚における超低温保存後生存率はいずれの保存液区においても 100%であった。一方、透明帯除去胚においては 5% HPC 区 (94.4%) が、5% SSS 区 (35.0%)、20% SSS 区 (50.0%) よりも有意に超低温保存後生存率が高値であった ($P < 0.05$ 、図 3-3. A)。透明帯無処置胚における超低温保存後生存胚の生細胞率は非再保存区 (89.6%) および各保存区間 (5% HPC 区 93.1%、5% SSS 区 91.7%、20% SSS 区 91.3%) に有意差は認められず同等であった (図 3-3. B)。また、透明帯除去胚においても非再保存区 (92.7%) および各保存液区間 (5% HPC 区 87.8%、5% SSS 区 88.8%、20% SSS 区 92.0%、図 3-3. B) に有意差は無かった。

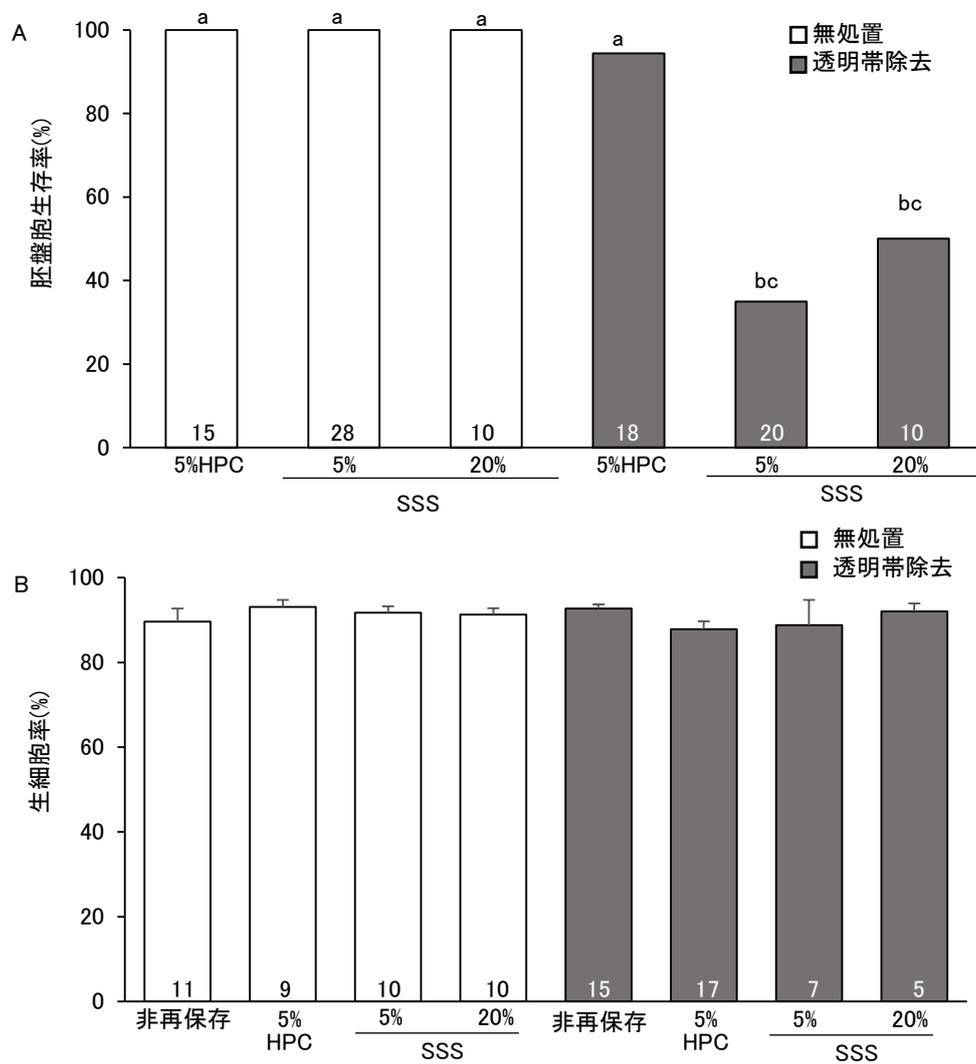


図 3-3. ヒト胚盤胞生存率および生細胞率
 (A)ヒト廃棄保存胚盤胞を加温し、加温後に再拡張したものを生存と判定して生存率を示した。(B)生存胚の細胞核を染色し生細胞率を測定した。グラフは各試験区における平均値と標準誤差を示し、棒グラフ下部の数値は n 数を示す。a,b,c：異なる文字間に有意差がある(P < 0.05)

(4) HPC 添加の有無と生存率

各試験区の保存液 (ES、VS、DS、WS) への HPC 添加の有無の組み合わせを図 3-4. B に示した。TS は HPC を添加しないため、組み合わせ表には表示していない。超低温保存後生存率は HPC を ES、VS、DS、WS 全ての保存液に添加したグループ 1 (95.2%) が HPC を全ての保存液に添加していないグループ 6 (7.1%) よりも有意に高値を示し

($P < 0.05$)、冷却前処置の ES と VS に HPC を添加したグループ 2 (92.9%) と VS のみに添加したグループ 4 (92.9%) では、保存後生存率は全ての液に添加したグループ 1 と同等であった。一方、ES にのみ HPC が添加されているグループ 3 の保存後生存率

(34.1%) はグループ 1、2、4 と比較すると有意に低値であった ($P < 0.05$)。HPC を加温段階である DS と WS にのみ添加したグループ 5 (28.6%) においては、保存後生存率はその他のグループと比較して有意に低値であった ($P < 0.05$) (図 3-4. A)。

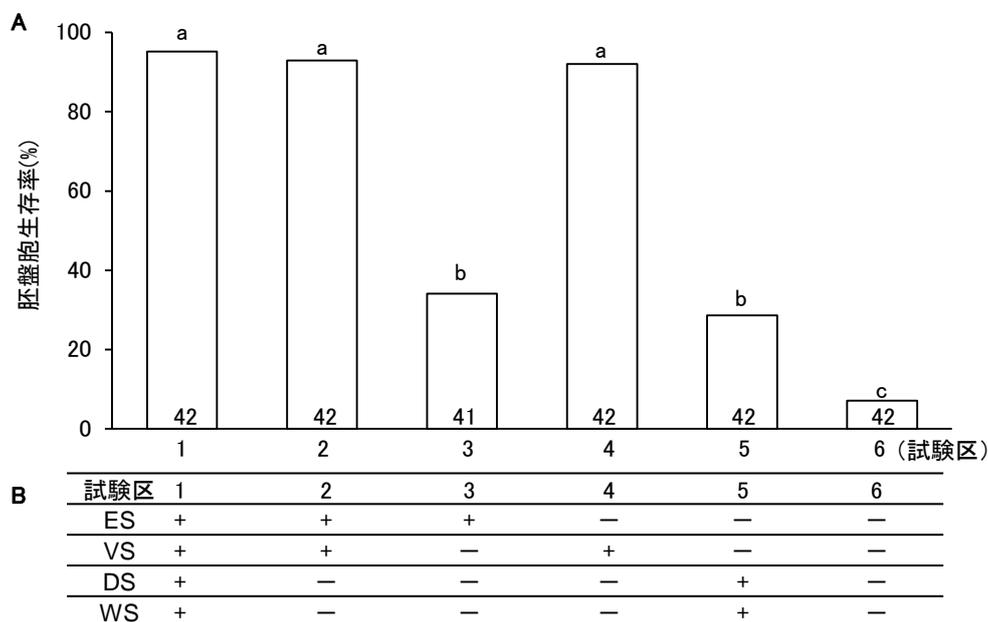


図 3-4. HPC 添加の異なる保存液を用いたマウス胚盤胞超低温保存後の生存率 (A)異なる HPC 添加の保存液を用いてマウス胚盤胞を冷却加温し生存率を算出した。グラフは各グループの平均生存率を示し、棒グラフ下部の数値は n 数を示す。a,b,c : 異なる文字間に有意差がある ($P < 0.05$)。 (B)各試験区の保存液への HPC 添加の有無を示す。表中の(+)は 5% HPC 添加あり、(-)は添加なしを示す。

(5) ヒトおよびマウス拡張胚盤胞の酸素消費量測定

5% HPC 添加保存液を用いて冷却加温したマウス拡張胚盤胞 (5%HPC 区) と超低温保存を行っていないマウス拡張胚盤胞 (新鮮区) の酸素消費量を測定し、比較した。5% HPC 区の酸素消費量は新鮮区と同等であった (新鮮区 3.06×10^{-15} mol/s、5% HPC 区 3.26×10^{-15} mol/s、図 3-5)。同様にヒト拡張胚盤胞においても、5% HPC 区と非再保存区の酸素消費量に差は認められなかった (非再保存区 5.21×10^{-15} mol/s、5% HPC 区 5.34×10^{-15} mol/s、図 3-5)。

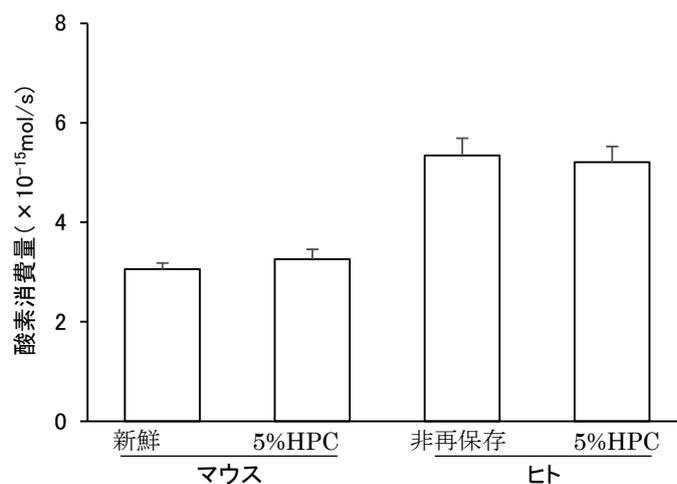


図 3-5. マウスおよびヒト超低温保存胚盤胞の加温 2 時間後の酸素消費量
マウスおよびヒト胚盤胞を 5% HPC 添加の保存液で冷却加温した後、走査型電気化学顕微鏡で酸素消費量を測定した。
グラフは各試験区における平均値と標準誤差を示した(各区 n=10)。

(6) マウス超低温保存胚移植成績

5% HPC 添加保存液を用いて冷却加温した胚の移植後の成績は新鮮胚と同等であった (表 3-1)。新鮮胚 (新鮮区) と 5% HPC 添加保存液で冷却加温処理した胚 (5% HPC 区) を偽妊娠雌マウス 5 頭に胚移植した結果、新鮮区では 3 頭、5% HPC 区では 5 頭が妊娠した。妊娠しなかった新鮮区のマウス 2 頭の子宮を観察したところ、着床痕や流産した形跡が見られなかったことから偽妊娠が成立しなかったため着床しなかったと考えられた。新鮮区の出生率は 55.6% (20/36)、5% HPC 区の出生率は 68.3% (41/60) であり、実験区間で出生率に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。5% HPC 区では、新鮮胚区よりも胎仔重量、胎盤重量がともに低値 ($p < 0.05$) であったが、産仔に形態的な異常は認められなかった (胎仔重量 : 5% HPC 区 1.63 ± 0.06 g、新鮮胚区 1.92 ± 0.02 g、胎盤重量 : 5% HPC 区 0.13 ± 0.003 g、新鮮胚区 0.14 ± 0.006 g、平均 \pm 標準誤差)。移植によって得られた産仔は性成熟後に自然交配し、妊娠することが確認され、得られた産仔数に差は認められなかった (新鮮胚区 12.4 ± 0.9 、5% HPC 区 13.4 ± 1.1)。

表 3-1. 超低温保存および新鮮マウス胚盤胞移植結果

実験区	胚移植 マウス数	妊娠 マウス数(%)	移植 胚盤胞数	産仔数 (%)	産仔体重 (g)	胎盤重量 (g)	F2産仔数
新鮮区	5	3(60)	36	20(55.6)	1.92 ± 0.02^a	0.14 ± 0.006^a	12.4 ± 0.9
5% HPC	5	5(100)	60	41(68.3)	1.63 ± 0.06^d	0.13 ± 0.003^b	13.4 ± 1.1

5% HPC 添加保存液を用いて冷却加温したマウス胚を偽妊娠マウスに移植し、胚移植後 16 日目に帝王切開によって出産させ各項目の測定を行った。また得られた産仔を性成熟後に交配させ、産仔数を観察した。重量と産仔数は平均 \pm 標準誤差で示した。a,b : 項目ごとに異なる文字間に有意差がある ($P < 0.05$)。

(7) Vitrification solution の物性測定

HPC 添加 VS の物性を SSS 添加 VS と比較するために、ガラス化能と相関がある粘度、および物質の界面吸着の特性を示す動的表面張力について検討を行った。5% HPC 添加 VS における粘度は $4.33 \pm 0.001 \text{ mm}^2/\text{s}$ と 1% HPC の $3.60 \pm 0.004 \text{ mm}^2/\text{s}$ よりも有意に高値であった ($P < 0.05$)。また、5% SSS 添加 VS における粘度は $3.49 \pm 0.004 \text{ mm}^2/\text{s}$ と、同濃度である 5% HPC 添加 VS の粘度よりも有意に低値であった ($P < 0.05$) (図 3-6. A)。

各添加物質を含む VS の静的表面張力 (mN/m) は、1% HPC 添加 VS が 39.3 ± 0.000 、5% HPC 添加 VS が 41.13 ± 0.208 、5% SSS 添加 VS が 60.23 ± 0.153 、20% SSS 添加 VS が 53.77 ± 0.153 と SSS 添加 VS よりも HPC 添加 VS の値が有意に低値だった ($P < 0.05$ 、図 3-6. A)。また、経時的に表面張力を測定した結果、HPC は SSS よりも速く表面張力が減少することが明らかとなった (図 3-6. B)。表面張力と界面吸着の関係性から (図 3-6. C) HPC は SSS よりも界面への吸着が速いことが示唆された。

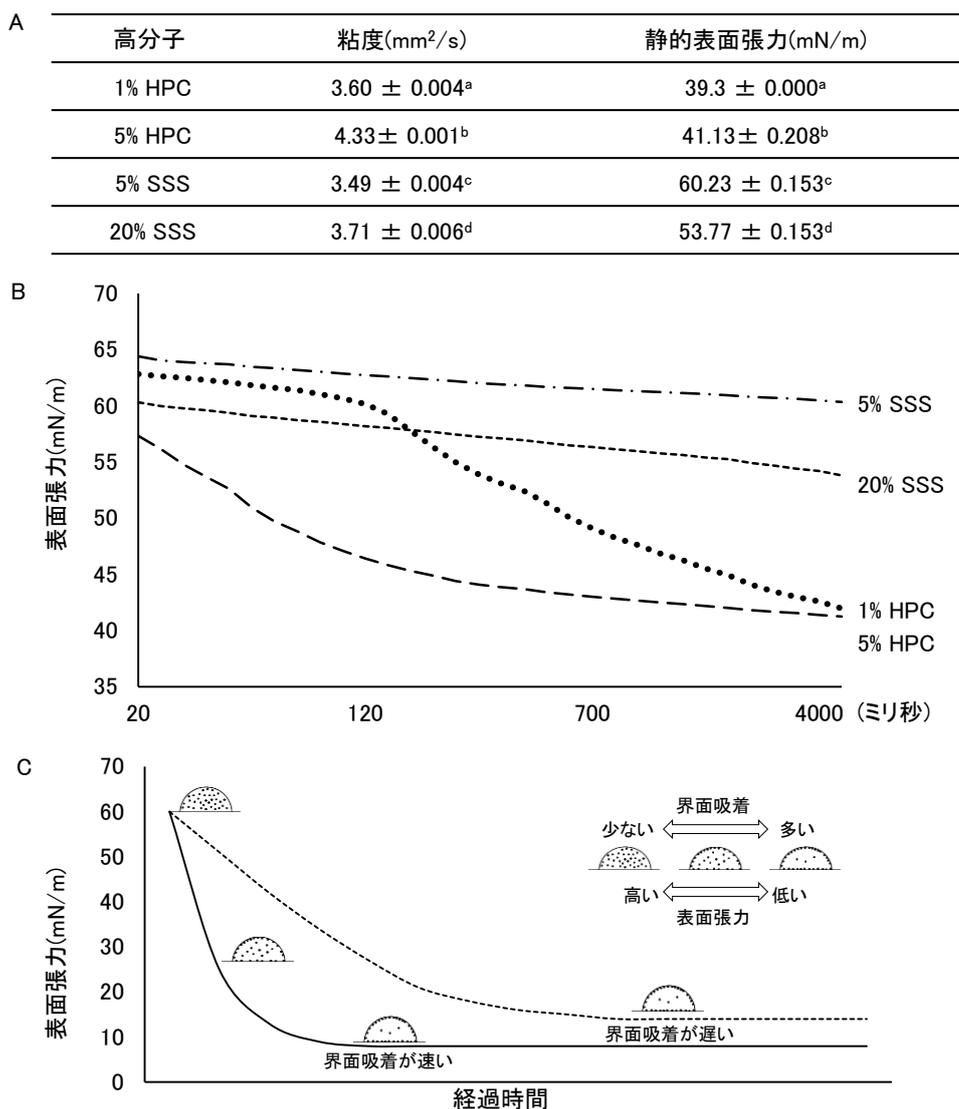


図 3-6. 各保存液の物性測定結果

(A)異なる高分子が添加された VS の粘度 (各区 $n=4$) と静的表面張力 ($n=3$) の測定結果。値は平均値 \pm 標準誤差で示した。a,b,c,d : 異なる文字間に有意差がある ($P < 0.05$)。 (B)各サンプルの表面張力を経時的に測定し、平均値をグラフに示した ($n=3$)。 (C)表面張力と界面吸着の関係性。時間経過と共に界面に吸着する物質が増えるほど表面張力は低下することを示した。

3.4. 考察

生殖補助医療施設におけるヒト卵および胚の超低温保存では、ヒト血清由来の SSS や蛋白成分を添加した超低温保存液が広く利用されている。しかしながら、近年は感染症のリスク等、安全性の観点から動物由来物質の利用が避けられているため SSS の代替となる非動物由来の添加物が必要とされている。

本章の実験結果から超低温保存液における SSS の代替として HPC を添加することで、胚盤胞で超冷却保存後に良好な生存率が得られることが明らかとなった。特に耐凍性が低いと考えられている孵化胚盤胞、近交系マウスの胚盤胞において、5% HPC 添加保存液では 20% SSS 添加保存液よりも有意に高い生存率が得られた。このことから 5% HPC は 20% SSS の代替となりうることが示唆された。さらに、HPC は冷却前処置において胚を脱水しガラス化する VS にのみ添加されていることで加温後の生存率が向上したことから、HPC は特に VS において凍害保護効果を発揮していると考えられた。

HPC の粘度は SSS よりも高く、また粘度が高いほど氷晶形成が抑えられガラス化しやすくなる[2]ことが報告されていることから、HPC では細胞を冷却した際に氷晶形成が起りにくく細胞が破壊されにくいと考えられた。さらに 1% HPC 添加よりも 5% HPC 添加保存液のほうが、保存後の生存率が高いことから、その効果は濃度依存的であると考えられた。一方、HPC を 5% より高濃度で溶解した場合、HPC が互いに結合・凝集するため溶液は白濁し、可視性が悪くなるため使用に適さなくなる。そのため保存液に添加可能な HPC の最高濃度は 5% であると判断された。

従来の 20% SSS 添加保存液では、融解時に胚が保存容器である Cryotop 表面に強く接着したまま離れず、回収が困難になることがあった。一方 5% HPC 添加保存液では Cryotop 表面から加温開始後約 10 秒で胚が自然に離れるため回収が容易であるという利点が挙げられた。従来、孵化胚盤胞は拡張期胚盤胞と比較して保存後の後生存率が低い

[43][44][45]と報告されているが、本章の実験結果から、生存率低下は HPC 添加保存液を使用することで防げることが明らかとなり、孵化胚盤胞の加温後生存率の低下は Cryotop 表面に胚が強固に接着し、回収時に物理的損傷が与えられることが要因のひとつとして考えられた。これら HPC 添加保存液において Cryotop 表面への胚の接着を防ぐ効果が観察されるのは、動的表面張力の測定結果から HPC の表面張力の低下が SSS よりも早く、Cryotop 表面など界面への吸着が早いことが明らかとなった。このことから HPC は胚が Cryotop 表面に接着する前に、Cryotop 表面に吸着することで被膜を形成し、胚と Cryotop 表面との直接的接着を抑制すると考えられた。

超低温保存後の生存胚の酸素消費量は、使用した保存液の種類や凍結の有無に関わらず同等であることが明らかとなった。さらに、マウス胚を移植した結果も実験区間で差が認められなかった。産仔重量と胎盤重量については、5% HPC 区は新鮮区よりも低値であったが、それらは 5% HPC 区が新鮮区よりも産仔数が多い（平均産仔数、5% HPC : 8.2/腹、新鮮区 : 6.6/腹）ことに起因すると考えられた。また、得られた産仔は成長後に実験区内で交配を行い妊娠させ、得られた産仔には異常がないことを確認した。以上の結果から、HPC 添加保存液を用いて保存した生存胚は新鮮区と同等の発生能を有していると考えられた。

HPC 添加保存液を用いることでヒト孵化胚盤胞の超低温保存後の生存率を改善するという報告はこれまでになく、本研究は初めての報告となる。また、HPC は多くの国においてすでに医薬品や食品添加物として使用されていることから、安全性についても多数の知見が積み重ねられており、ヒト生殖補助医療における新規凍害保護物質として有用であると考えられた。

3.5. 小括

本章により、胚の保存液において凍害保護物質として添加されているヒト血清由来成分 SSS の代替として HPC を用いたところ、耐凍性が低いと報告されている孵化胚盤胞や近交系マウス胚において超低温保存後の生存率を改善できることが初めて明らかとなった。また、HPC 添加保存液を用いて保存したマウス胚を移植した結果得られた産仔に異常は認められなかった。

4. 第三章 卵巣組織超低温保存法の改良と冷却加温後組織の評価方法の確立

4.1 はじめに

アルキル化剤などの抗がん剤は卵巣への影響が大きく早発閉経を引き起こすことが知られており[46][47]、特に骨髄移植による治療では治療後の92~100%の患者が早発閉経(POF; premature ovarian failure)を引き起こすと予想されている[48][49]。これらのことから、近年では多くの医師、患者はがん治療の前に治療後のQOL (Quality of life)に配慮して、疾病治療の副作用で不妊となる医原性不妊を防ぐため妊孕性温存を検討している。卵巣組織の超低温保存は当初より妊孕性温存法として研究され、がん患者等の早発閉経が予想される患者の一部で利用されている。

卵巣組織の超低温保存では卵や胚とは異なり、卵巣刺激等の準備期間が不要なため、健康状態が良好であれば、卵巣摘出手術により卵巣組織を取り出し、短時間で保存出来るという利点がある。またその他に成熟卵子を採取することができない性成熟前の女兒においても適応が可能である。卵巣組織超低温保存の妊孕性温存法としての臨床応用は、いまだ検討段階ではあるが[50]、2016年時点での報告は80症例を超えており[51]、卵巣組織の保存はその有用性から今後、臨床において多くの患者に適応されることが予測される。

卵巣組織においても、超低温保存法はガラス化法と緩慢凍結法の2種が普及している[52][53]。どちらにおいても卵巣組織内に凍害保護物質を浸透させ、組織中の水分を脱水し、冷却および加温時に組織内に氷晶を形成させないことが保存による障害を避けるために重要であることから、最適な凍害保護物質や培地の比較検討が行われている[54][55]。しかし、凍害保護物質の浸透方法について検討している報告はない。

そこで第三章では、物理的条件を変更することで凍害保護物質の浸透性を高めることが可能か検討を行った。本章では物理的条件として、小規模の施設においても実施可能な方法として、陰圧、陽圧、振盪の3つを選択した。凍害保護物質の浸透性についてはガスク

ロマトグラフィーを用いて測定した。

また、冷却加温後の組織評価方法についても検討を行った。保存後の卵巣組織では、新鮮区と比較して細胞密度が低下することが報告されており[56][57]、卵巣組織の損傷は、主に保存液への浸漬による浸透圧差と、冷却加温時の氷晶形成に起因する。特に氷晶形成は細胞を破壊するため細胞密度の減少を直接引き起こす[58]。これらの報告から、本検討では細胞密度の変化は細胞接着タンパク質の変化を引き起こすと仮定し、細胞接着因子であるカドヘリンタンパク質の局在と発現量変化に着目した。カドヘリンは、カルシウム依存性の接着因子であり胚発生や細胞間接着の形成と維持に関わることが知られており、ウシおよびヒト卵巣において発現していることが報告されている[59]。カドヘリンタンパク質による細胞間接着は血管において浸透圧調整を行うなど、物質輸送にも関連しており、炎症反応では血管内皮の細胞間接着を変化させ、血管の透過性を増加させる役割を有している[60]。さらに、細胞培養においてカドヘリンタンパク質の発現を細胞の超低温保存後の組織評価に用いている報告もあることから[61]、卵巣組織の超低温保存においても加温後の組織評価にカドヘリンタンパク質の比較が有用であるか、ヒト卵巣と比べて全体的な大きさと組織分布が類似しているウシ卵巣をヒト卵巣モデルとして用いて、ウエスタンブロット、免疫組織化学染色で解析した。

4.2 材料および方法

(1) ウシ卵巢

食肉処理場にて試験前日に採取されたウシ卵巢計 31 個を用いた。ウシ卵巢は、生理食塩水 (12~15°C) 中に浸漬し、採取から 24 時間以内に輸送した。ウシ卵巢は Square measure (8121、株式会社北里コーポレーション)[62]を用いて 1 個の卵巢から 1×1 cm 四方 1 mm 厚の組織片を 3 または 5 片採取し、合計で 113 個の組織片を実験に供した (図 4-1)。

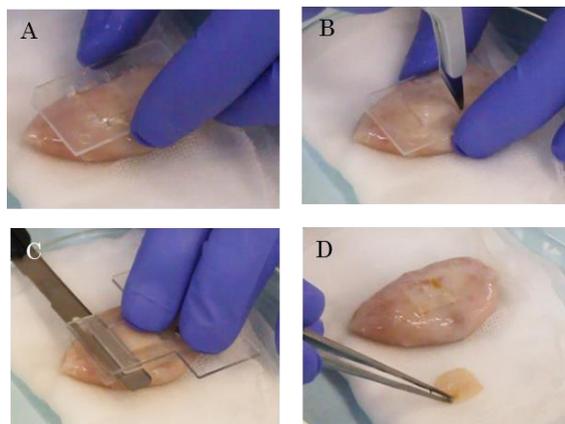


図 4-1. 卵巢から 1cm 四方 1mm 厚の組織を切り出す様子
(A)スクエアメジャーAを卵巢に置き、(B)枠に沿って1cm四方の切込みを入れる。(C)スクエアメジャーBをAの上に重ねてマイクロトームの刃を間から滑らせると、(D)1cm 四方 1mm 厚の組織が切り出される。

(2) 凍結液平衡時の物理的条件

物理的条件として陰圧、陽圧、振盪を比較した。振盪は振盪器 (Rotary Shaker R-20, 株式会社タイテック、埼玉) を用いて 60 mm ディッシュ (Falcon) に 10 mL の凍結液を入れ、組織を浸漬し 60 rpm で振盪させた。陽圧条件は 50 mL シリンジ (SS-50LZ, テルモ株式会社、東京) に保存液 10 mL と組織片を入れ、シリンジキャップ (H4900C, アズワン株式会社、大阪) で栓をし、シリンジ内の容量を 50 mL から 40 mL に圧縮して通常の気体圧力を 1 としたとき 1.25 倍の圧をかけた。また、陰圧条件は陽圧と同様の方法で、シリンジの容量を 30 mL から 45 mL に拡張し 0.57 倍の圧をかけた。

(3) ガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC/MS)

GC/MS は Agilent 7890A GC/5975MSD (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)、解析カラムは DB-WAXetr column (30mm×0.25mm×0.25 μm, Agilent Technologies Inc.) を用いた。カラムオープン温度は 60°C (1 min) →150°C (10°C/min) →160°C (2°C/min) →200°C (10°C/min) とした。キャリアガスにはヘリウム (1 μL/min, 57 kPa) を用いた。気化室温度、注入温度、インターフェイス温度、イオン源温度は 250, 220, 230, 150°C で行った。測定は selected ion monitoring (SIM) モードで行った。測定サンプルとして 0.3 g の卵巣組織を計量し、100 mL エタノール(056-03341、富士フィルム和光純薬株式会社)中で細切し、400 ×g で 10 分間遠心分離後の上清を用いた。得られた上清は 0.45 μm シリンジフィルター (5040-28541, ジーエルサイエンス株式会社、東京) を用いて粒子を除去し、エタノールで 20 倍希釈し GC/MS にて EG (324558, MERCK) と DMSO (D4540, MERCK) の測定を行った。内部標準には 2-Octanone (O0038、東京化成工業株式会社、東京) を用いた。各物質によって得られるピーク値は図 4-2 に示した。

(4) 卵巣組織の超低温保存法

1×1cm 四方 1 mm 厚に細切した卵巣組織は Cryotissue Kit (北里コーポレーション) を用いて超低温保存した。初めに 7.5% (v/v) EG と 7.5% (v/v) DMSO を含む equilibrium solution (ES) に 25 分間浸漬し、その後 20% (v/v) EG および 20% (v/v) DMSO, 0.5 M スクロース (S1888, Sigma-Aldrich) を含む vitrification solution (VS) に 15 分間浸漬した。保存液への平衡が終了した卵巣組織片は保管容器 (Cryotissue、株式会社北里コーポレーション) とともに液体窒素中に浸漬し、急速に冷却し液体窒素中で保管した。加温は卵巣組織片を 1.0 M スクロースを含む 37°C の thawing solution (TS) に 1 分間浸漬した後に、0.5 M スクロースを含む Diluent solution (DS) に 3 分間浸漬した。最

後に Washing Solution (WS)へ 20 分間浸漬し解析に用いた。

(5) ウェスタンブロッティング

卵巣組織からのタンパク質抽出には Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) buffer (182-02451、富士フィルム和光純薬株式会社) を用いた。抽出したタンパク質濃度の測定には Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を用いた。電気泳動時には各レーンのタンパク質総量が (6 $\mu\text{g}/\text{lane}$) になるようにサンプル濃度を調整し、10%ポリアクリルアミドゲルで泳動した後、PVDF メンブレン (IPVH00010、MERCK) に転写した。メンブレンは転写後に 5%スキムミルクを含む TBS で 1 時間 (室温) ブロッキングし、抗カドヘリン抗体 (1:3000、pan-cadherin、RB-9036-P0、Thermo Fisher Scientific) で 1 時間 (室温) 反応させた。内在性コントロールには抗 β -アクチン抗体 (1:4000、clone:G043、EnoGene、New York、NY、USA) を用いた。ペルオキシダーゼ標識の 2 次抗体 (1:3000、Peroxidase-conjugated aftinipure Goat Anti-Rabbit IgG、Jackson Immuno Research、PA、USA、1:4000、Anti Mouse IgG HRP、Novus Biological、Centennial、CO、USA) を 1 時間 (室温) 反応させ、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare、Chicago、IL、USA) を用いてバンドを可視化した。発現量の比較には ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare) を用いた。

(6) 免疫組織化学染色

卵巣組織は 10%中性緩衝ホルマリン (富士フィルム和光純薬株式会社) で固定し、パラフィン包埋後に 7 μm 厚で薄切した。抗カドヘリン抗体による免疫組織化学染色では組織切片を脱パラフィン処理した後に 10 mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) で 10 分間煮沸処理し、その後室温で 20 分間静置して冷却した。抗カドヘリン抗体はウェスタンブロッティ

ングと同様の抗体を用いた。一次抗体として抗カドヘリン抗体 (1:400) を室温で 30 分間反応させ、PBS で 15 分間洗浄した後に Cy3 標識された抗ウサギ IgG 抗体 (1:3200, 711-165-152, Jackson Immuno Resarch) を二次抗体として室温で 30 分間反応させ、蛍光顕微鏡 (BZ-X710, KEYANCE, 東京) を用いて観察した。染色強度の比較は、画像解析ソフトの Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MA, USA) を用いて解析した。カドヘリンの染色強度は、各実験区の卵巣白膜部を 5 箇所以上無作為に選択し、平均値を算出した。解析時には Threshold adjustments を実施し、閾値 (90 - 255) を定め、同一条件化で全ての画像の染色強度を数値化した。

(7) アポトーシス陽性細胞観察

アポトーシス陽性細胞の検出には、TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) 法を用いた。TUNEL 法は市販のキット (MK500、タカラバイオ株式会社、滋賀) を用いて行った。免疫染色と同様の方法で組織切片を作成し、脱パラフィンした組織をプロテインキナーゼ K (10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) で 15 分間 (室温) 処理し、PBS で 3 回洗浄した後に、50 μL の DNA Labeling Solution (FITC 標識 TdT Enzyme 5 μL + Labeling Safe Buffer 45 μL) を 37 °C で 60 分間反応させ、キシレンを用いて脱水透徹し、封入後、TUNEL 陽性細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。

(8) 超低温保存後卵巣組織片の細胞密度の計測

保存後の卵巣白膜部の細胞密度の比較を行った。免疫染色と同様に卵巣組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を行った。細胞密度は、Image J software (National Institutes of Health) で白膜部の面積を計測し、そこに含まれる核を数え、面積あたりの細胞数で示した。

(9) 統計解析

実験にて得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。統計処理には StatView statistical software package (Abacus Concepts)を用いた。多群間の比較には分散分析 (ANOVA) を行い、多重比較 (Scheffe) を用い、P 値が 0.05 未満の場合に有意差があると判定した。

4.3 結果

(1) 卵巣組織中の凍害保護物質濃度

保存液平衡の1段階目であるESに浸漬した後の卵巣組織内EGおよびDMSO (mg/mL)濃度は、陰圧区(10分間)でそれぞれ 53.6 ± 0.8 と 52.1 ± 0.8 (n=5)であり、コントロール区(25分間)(EG: 55.0 ± 1.3 , DMSO: 52.7 ± 1.0 , 各 n=5)と同等であった。また、振盪区(49.8 ± 0.6 , 48.4 ± 0.6 , n=5)と陽圧区(50.8 ± 1.0 , 49.5 ± 0.9 , n=5)においても10分間の平衡時間にもかかわらず、コントロール区と同等であった(図4-2. B)。

平衡時の物理的条件を比較すると、陰圧平衡は最も省力的で器具も安価であり、電源等も必要としないことから臨床現場において簡易に導入可能であり、最も有用性が高いと判断し、以降の実験は陰圧条件を従来法と比較し、その有効性を検討した。

次に、保存液平衡の2段階目であるVS平衡の時間もES平衡と同様に15分よりも短くできるか検討した結果、卵巣組織内のEGおよびDMSO濃度(mg/mL)は陰圧10分間平衡区でそれぞれ 169.3 ± 2.7 , 140.9 ± 2.7 (n=5)と、コントロール区(15分間平衡)の 173.1 ± 8.2 , 143.5 ± 6.8 (n=5)と同等であった。一方、陰圧5分間平衡では卵巣組織内のEGおよびDMSO濃度(mg/mL)は、それぞれ 104.2 ± 2.4 , 105.1 ± 1.9 (n=5)と陰圧10分間平衡およびコントロール区よりも有意に低値であった(P < 0.05, 図4-2. C)。

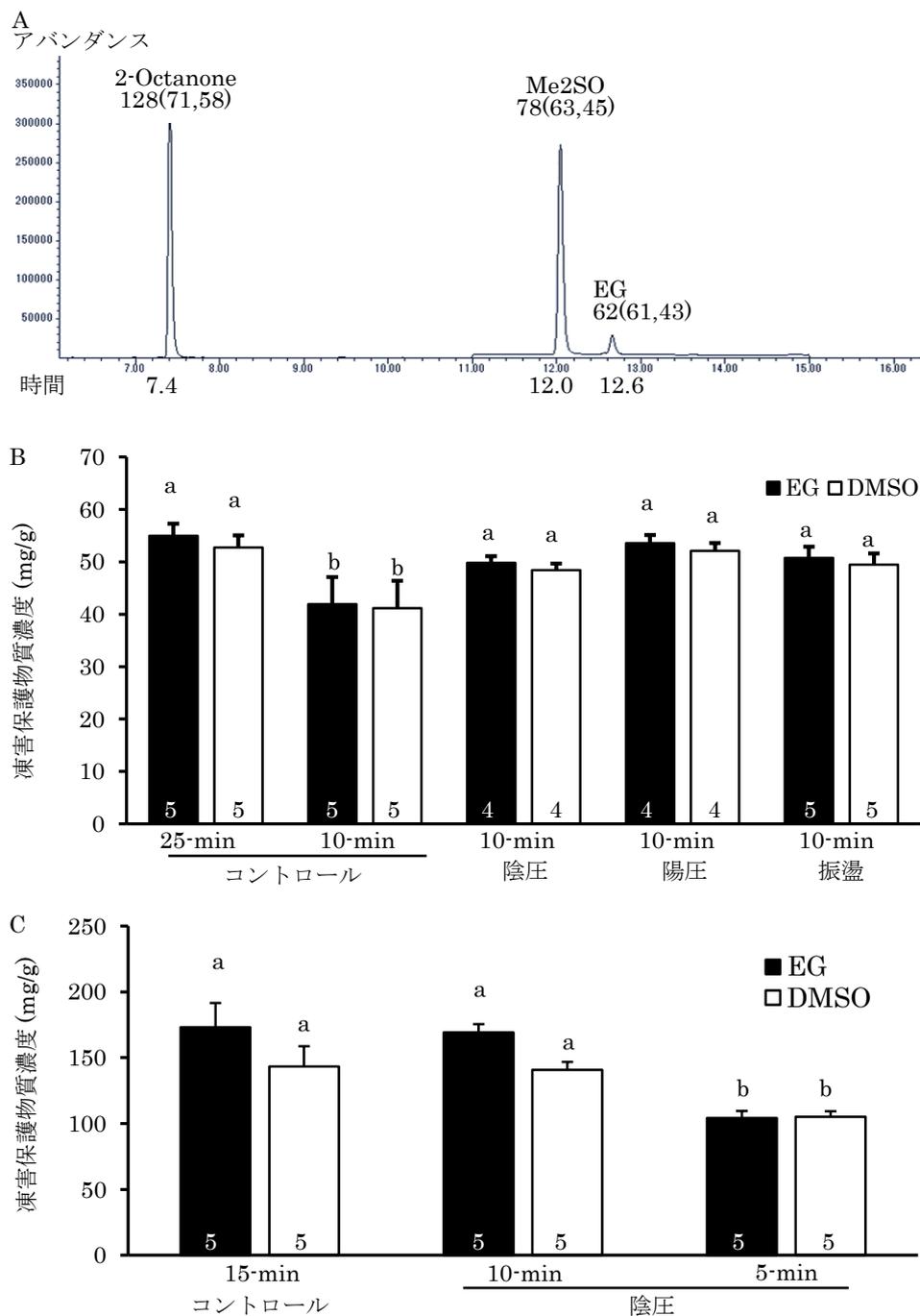


図 4-2. 各平衡条件における組織への凍害保護物質の浸透濃度

(A)ガスクロマトグラフ測定時の測定物質のスペクトル。(B)ES 平衡後の組織 1 mg 中エチレングリコール (EG)およびジメチルスルホキシド(DMSO)濃度。(C)VS 平衡後の組織 1 mg 中のEG および DMSO 濃度。グラフは各試験区における平均値と標準誤差を示し、グラフ下部の数値は n 数を示す。a,b : 異なる文字間に有意差がある(P < 0.05)

(2) 超低温保存後卵巣組織片における細胞密度

H.E.染色を用いて、平衡時の陰圧処理と従来法による超低温保存後の卵巣組織の細胞密度を比較した。解析の結果、平衡時に陰圧処理をした卵巣白膜部の細胞密度 (cells/mm²) は 5812.4 ± 258.1 (n=10) であり、新鮮区の 6934.4 ± 496.2 (n=10) と同等であった。一方で、コントロール区である従来法の細胞密度は 4809.2 ± 390.1 (n=10) であり新鮮区および陰圧区よりも有意に低値であった ($P < 0.05$ 、図 4-3.)。

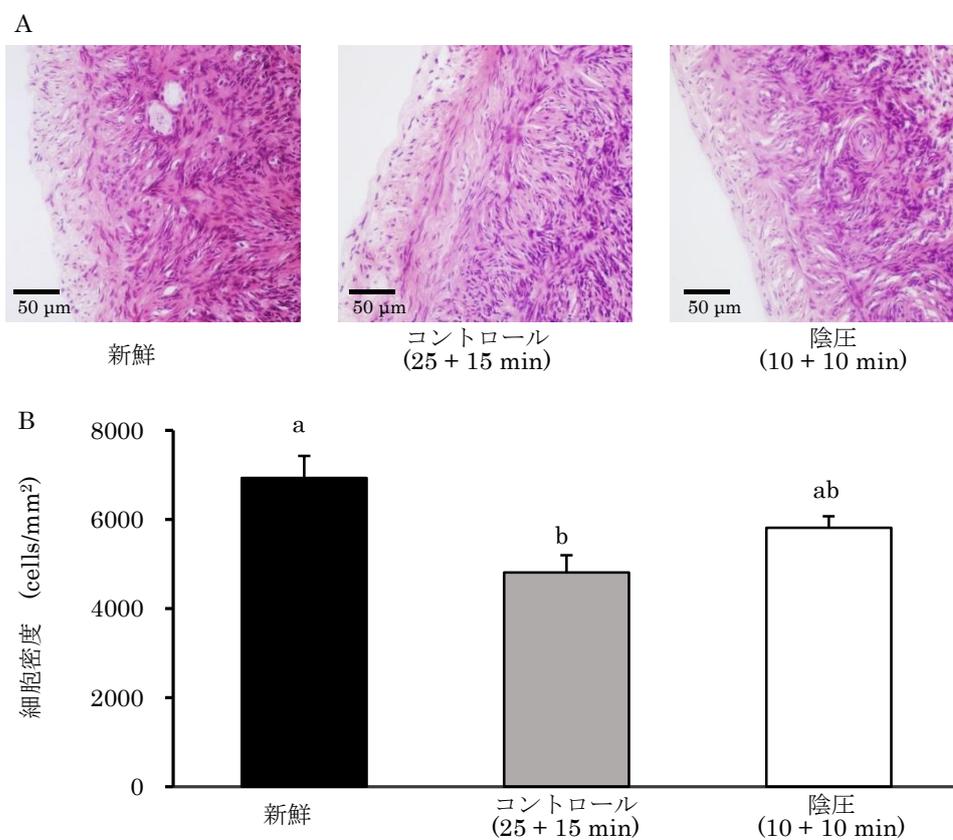


図 4-3. 超低温保存後卵巣組織における卵巣白膜部の細胞数

新鮮または超低温保存卵巣組織のパラフィン包埋切片を H.E.染色し、面積あたりの細胞核数を計測し、細胞数として示した。

(A)各試験区の代表的な H.E.染色像。(B)各試験区の面積あたりの細胞数(各区 n=10)。グラフは各試験区における平均値 ± 標準誤差で示した。a,b,c:異なる文字間に有意差がある ($P < 0.05$)

(3) 超低温保存卵巣組織におけるカドヘリンタンパク質発現量と染色強度

超低温保存後の卵巣組織片から抽出した総タンパク質に含まれるカドヘリンタンパク質量を、ウエスタンブロットを用いて検討した。新鮮区、コントロール区、陰圧区のカドヘリンタンパク質は内部標準である β -actin を 1 としたとき、それぞれ 9.5 ± 1.4 (n=6)、 9.7 ± 2.4 (n=6)、 7.2 ± 1.4 (n=6) であり、各区間で有意差は認められなかった (図 4-4. A、 $P > 0.05$)。

次に卵巣組織切片を、抗カドヘリン抗体を用いて免疫染色した結果、いずれの区においても卵巣白膜部が強く染色された (図 4-4. C)。染色強度を計測した結果、新鮮区、コントロール区、陰圧区でそれぞれ、 243.7 ± 30.4 、 27.1 ± 7.6 、 186.3 ± 23.0 (各区 n=15) であった。陰圧区と新鮮区は同等であったが、コントロール区は新鮮区、陰圧区と比較して有意に低値であった ($P < 0.05$ 、図 4-4. D)。

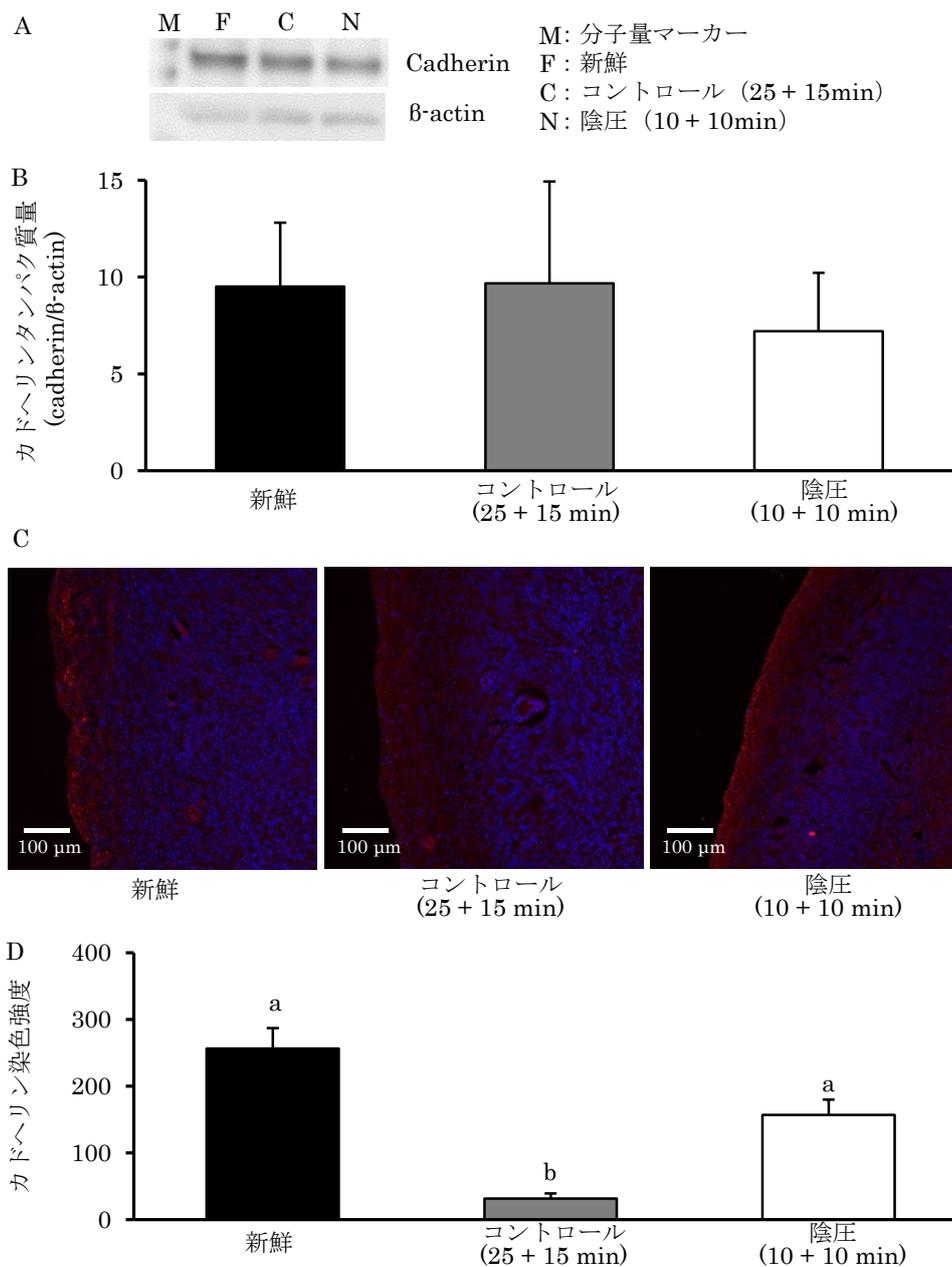


図 4-4. 超低温保存後卵巣組織におけるカドヘリンタンパク質量および染色強度
 (A)新鮮および超低温保存卵巣組織片からタンパク質を抽出しウエスタンブロットを行った典型的な泳動像を示した。(B)各試験区のカドヘリンタンパク質量は内在性コントロールである β -actin で補正を行い、数値化してグラフで示した(各区 n=6)。(C) カドヘリンタンパク質の免疫組織化学染色像。(D) 卵巣白膜部におけるカドヘリン染色強度を数値化し、グラフで示した(各区 n=15)。グラフは各試験区における平均値と標準誤差を示した。a,b: 異なる文字間に有意差がある(P < 0.05)

(4) 超低温保存卵巣組織におけるアポトーシス陽性細胞

TUNEL 法を用いて、陰圧区と従来のコントロール区でアポトーシス陽性細胞に差が認められるか検討した。TUNEL 法の陽性コントロールスライドとして用いたラット胸腺組織 (MK504、タカラバイオ株式会社) では、多くの TUNEL 陽性細胞が確認されたが、新鮮および超低温保存卵巣組織では、TUNEL 陽性細胞はほとんど観察されず、平均値の算出に至らなかった (図 4-5)。

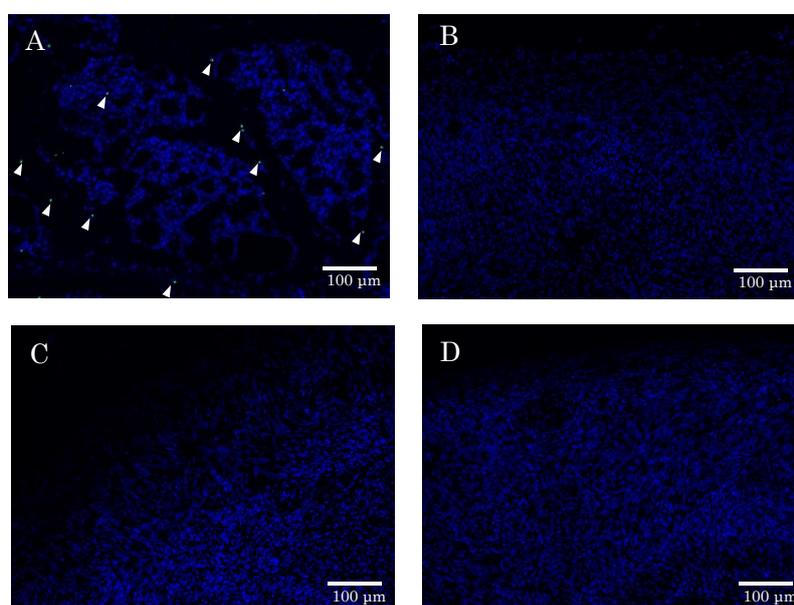


図 4-5 各試験区の TUNEL 染色像

(A)陽性コントロールとしてラット胸腺組織を染色した。白矢頭は TUNEL 陽性細胞を示す。(B)無処置の新鮮卵巣組織。(C)従来法で超低温保存した卵巣組織。(D)陰圧条件化で保存液に平衡した超低温保存した卵巣組織。

4.4 考察

卵巣組織片の超低温保存において凍害保護物質の卵巣組織への浸透性が物理的条件の変化によって促進されるか振盪、陽圧、陰圧条件で比較した。ガスクロマトグラフィーの結果から、いずれの物理的条件によっても凍害保護物質の卵巣組織への浸透速度は従来法である静置と比較して約2倍の速さとなることが明らかとなった。

これまでに静磁場及び交流電磁場の両者を作用させた環境下で哺乳動物の胚または卵子を保存する発明が報告されており[63]、ウシ胚を用いた検討の結果、従来の緩慢凍結法よりも生存率が改善させることが明らかとなっている。また、卵巣保存においても保存液への浸漬を磁場下で行う有用性を検討した報告があり[64]、ブタ卵巣を磁場下で凍結保存液に浸漬した後に過冷却すると、卵胞が受ける障害が従来法と比較して小さくなると報告している。しかし、報告では組織を -80°C で保存しているため通常用いられる液体窒素中での長期保存においても有用であるかは明らかではなく、また磁場を発生させる特別な機器を必要とするため、臨床施設への導入は容易ではないと考えられた。施設への導入という点において、本検討で用いた陰圧条件に必要とされるのは50 mL シリンジのみであり、特別な機器や電源を必要とすることなく容易に実施できることから、最も臨床において有用性が高いと考えられた。

次に卵巣組織の評価法を検討した。はじめに従来から用いられている細胞密度を卵巣白膜部で解析したところ、新鮮区の細胞密度は従来法のコントロール区よりも有意に高く、コントロール区と陰圧条件区では差が認められなかった。次に新たな評価法としてカドヘリンタンパク質発現量を検討した。超低温保存によって卵巣組織中のカドヘリンタンパク質発現量に変化するかウエスタンブロットで解析したところ、卵巣組織片全体から抽出したタンパク質では、新鮮組織と超低温保存組織で差は認められなかった。一方、卵巣白膜部におけるカドヘリンタンパク質染色強度を免疫組織化学染色で比較した結果、陰圧区は新

鮮組織と同等のカドヘリン染色強度を示し、従来法のコントロール区では新鮮区および陰圧平衡区と比較して有意に染色強度が弱いことが明らかとなった。以上のことから、カドヘリン染色強度は細胞密度よりも実験区間の差が顕著であり、超低温保存後の卵巣組織評価に用いることができると考えられた。

超低温保存卵巣組織のヒトにおける移植報告例の多くは緩慢凍結法によるものであり[3]、これは初期の臨床における保存法の主流が緩慢凍結法であったためと考えられる。近年では緩慢凍結法とガラス化法の比較が複数報告され[52][53][65][66]、ガラス化法は緩慢凍結法よりも優れていることが通常の組織学的評価、あるいは電子顕微鏡による観察によって示されている。これまでに超低温保存後の組織評価にはアポトーシス解析が用いられることがあったが、近年の報告ではガラス化法を用いた卵巣組織保存ではアポトーシス陽性細胞は新鮮組織と比較して増加しないことが報告されている[67]。本章の研究においても保存後の組織のアポトーシス陽性細胞は、物理的条件に関わらず新鮮区と同等であった。また、卵巣組織を培養後にアポトーシス解析を行うと、冷却加温による影響よりも培養による虚血の影響が大きいことが報告されている[68]。このようなことから、保存法の比較のようにわずかな差異を比較する場合にはアポトーシス解析は不向きである可能性が考えられた。一方、本章で検討したカドヘリンタンパク質の染色強度は、これまで比較が出来ないと考えられていたわずかな保存後の組織学的差異の評価を可能としたことから、より有用であると考えられた。

また本検討により、冷却直前の卵巣組織中の凍害保護物質濃度は凍結液中の濃度よりも低いことから、ガラス化法における保存液の凍害保護物質濃度は、従来法よりも低濃度にすることが可能性であると考えられ、より安全性の高い卵巣組織のガラス化法の確立のための有益な情報が得られた。

以上のことから、本検討によって得られた凍害保護物質の濃度の測定結果および、カドヘリンを用いた組織学的評価法はより安全な超低温保存法を確立させる際に役立つと考え

られ、さらに平衡時の陰圧条件は効率的な平衡法として有用であることが示唆された。

4.5 小括

本章の結果から、卵巣組織超低温保存において保存液中の凍害保護物質を陰圧条件下で平衡処理することにより卵巣組織への浸透効率が向上することが明らかになった。さらに、超低温保存後の卵巣組織において、TUNEL法や通常の組織学的観察では評価が難しかった保存法の比較が卵巣白膜部のカドヘリンタンパク質の染色強度を比較することで可能となることを示した。

5. 総括

第一章の結果から、無加湿インキュベーターにおける培地の水分蒸発量および浸透圧変化は、加湿インキュベーターと比較して有意に高値であったが、その変化は市販培地の製品間の差異よりも小さく、マウス胚を用いた胚培養成績に影響を与えないことが明らかとなった。また第二章では、動物由来物質を含まない完全合成の卵および胚超低温保存液の開発を目的として保存液に含まれるヒト血清由来成分の SSS の代替として HPC を用いた結果、耐凍性が低いとされる孵化胚盤胞や近交系マウス胚において保存後の生存率が改善され、得られた産仔に異常がないことを初めて明らかとした。第三章では、卵巣組織超低温保存において保存液中の凍害保護物質を陰圧条件下で平衡処理することにより卵巣組織への浸透効率が向上することが明らかとなり、さらに TUNEL 法や通常の組織学的観察では評価が難しい冷却加温後の卵巣組織において、卵巣白膜部のカドヘリンタンパク質の染色強度は有用な指標となる可能性を示した。

本論文の一部は以下に公表した。

・ C. Toyama-Mori, K. Suzuki, Y. Miyazaki, T. Suzuki, M. Katsumata, K. Tanaka, M.

Usami, T. Takizawa, Negative air pressure treatment accelerates the penetration of permeable cryoprotectants into bovine ovarian tissue in vitrification protocol and improves cell density after vitrification., *Cryobiology*, 88 (2019) 92–97, DOI:

10.1016/j.cryobiol.2019.03.001

・ C. Mori, A. Yabuuchi, K. Ezoe, N. Murata, Y. Takayama, T. Okimura, K. Uchiyama, K.

Takakura, H. Abe, K. Wada, T. Okuno, T. Kobayashi, K. Kato, Hydroxypropyl cellulose as an option for supplementation of cryoprotectant solutions for embryo vitrification in human assisted reproductive technologies., *Reproductive BioMedicine Online*, 30 (2015)

613–21., DOI: 10.1016/j.rbmo.2015.02.004

・森智絵美, 沖村匡史, 藪内晶子, 青野文仁, 竹原祐志, 加藤修, 生殖補助医療施設における無加湿インキュベーターの有用性の検討, 日本臨床エンブリオロジスト学会雑誌. (2011) 39–43.

6. 謝辞

本研究の実施ならびに本論文の作成にあたり、多大なる御指導および御助言を賜りました滝沢達也先生に深甚なる謝意を表します。また、本論分の予備審査や発表資料について御指導、御校閲を賜りました動物繁殖学研究室教授 柏崎直巳先生ならびに動物工学研究室准教授 田中和明先生に深く感謝し、心から御礼申し上げます。論文作成において英文作成の御指導等、御助力を賜りました国立医薬品食品衛生研究所第四室長 宇佐見誠博士に深く感謝いたします。

ガスクロマトグラフィーの測定に御協力、御助力いただきました栄養学研究室教授 勝俣昌也先生、准教授 鈴木武人先生、鈴木久留美先生に深謝いたします。また、免疫組織化学的解析にあたり機器の貸与等、御支援いただいた実験動物学研究室名誉教授 猪股智夫先生、准教授 塚本篤士先生、同研究室内の学生の皆様に心より感謝申し上げます。

また、日頃から実験の御助言をいただきました動物工学研究室 宮崎陽子先生には、多くの御支援を賜り、誠にありがとうございました。最後に動物工学研究室の学生の皆様には、多くのお気遣いを頂き有難うございました。

7. 引用文献

- [1] H. Kurosawa, H. Utsunomiya, N. Shiga, A. Takahashi, M. Ihara, M. Ishibashi, M. Nishimoto, Z. Watanabe, H. Abe, J. Kumagai, Y. Terada, H. Igarashi, T. Takahashi, A. Fukui, R. Suganuma, M. Tachibana, N. Yaegashi, Development of a new clinically applicable device for embryo evaluation which measures embryo oxygen consumption, *Hum. Reprod.* 31 (2016) 2321–2330.
- [2] J. Saragusty, A. Arav, Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction.* 141 (2011) 1–19.
- [3] S. Silber, Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications, *J. Assist. Reprod. Genet.* 33 (2016) 1595–1603.
- [4] M.C. Chang, Fertilization of rabbit ova in vitro, *Nature.* 184(Suppl) (1959) 466–7.
- [5] R. Yanagimachi, M.C. Chang, Fertilization of hamster eggs in vitro, *Nature.* 200 (1963) 281–2.
- [6] T. Uehara, R. Yanagimachi, Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei, *Biol. Reprod.* 15 (1976) 467–70.
- [7] P.C. Steptoe, R.G. Edwards, Birth after the reimplantation of a human embryo, *Lancet (London, England).* 2 (1978) 366.
- [8] G. Palermo, H. Joris, P. Devroey, A.C. Van Steirteghem, Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte., *Lancet (London, England).* 340 (1992) 17–8.
- [9] 厚生労働省, 平成 29 年 (2017) 人口動態統計, 2017
- [10] 日本産科婦人科学会, 平成 21 年度倫理委員会登録・調査小委員会報告, 2010

- [11] J.E. Swain, Decisions for the IVF laboratory: comparative analysis of embryo culture incubators, *Reprod. Biomed. Online.* 28 (2014) 535–547.
- [12] A. Trounson, L. Mohr, Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo, *Nature.* 305 (1983) 707–9.
- [13] D.G. Whittingham, S.P. Leibo, P. Mazur, Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C., *Science.* 178 (1972) 411–4.
- [14] D.G. Whittingham, Survival of mouse embryos after freezing and thawing, *Nature.* 233 (1971) 125–6.
- [15] W.F. Rall, G.M. Fahy, Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification, *Nature.* 313 (1985) 573–5.
- [16] M. Kasai, T. Mukaida, Cryopreservation of animal and human embryos by vitrification, *Reprod. Biomed. Online.* 9 (2004) 164–70.
- [17] First baby born of frozen embryo, *N. Y. Times Web.* (1984) A16.
- [18] K. Ozgur, M. Berkkanoglu, H. Bulut, P. Humaidan, K. Coetzee, Perinatal outcomes after fresh versus vitrified-warmed blastocyst transfer: retrospective analysis, *Fertil. Steril.* 104 (2015) 899–907.
- [19] G. Griesinger, L. Schultz, T. Bauer, A. Broessner, T. Frambach, S. Kissler, Ovarian hyperstimulation syndrome prevention by gonadotropin-releasing hormone agonist triggering of final oocyte maturation in a gonadotropin-releasing hormone antagonist protocol in combination with a freeze-all strategy: a prospective multi, *Fertil. Steril.* 95 (2011) 2029–2033.
- [20] M.W. Healy, G. Patounakis, M.T. Connell, K. Devine, A.H. DeCherney, M.J. Levy, M.J. Hill, Does a frozen embryo transfer ameliorate the effect of elevated progesterone seen in fresh transfer cycles?, *Fertil. Steril.* 105 (2016) 93–99

- [21] K. Oktay, E. Buyuk, O. Davis, I. Yermakova, L. Veeck, Z. Rosenwaks, Fertility preservation in breast cancer patients: IVF and embryo cryopreservation after ovarian stimulation with tamoxifen., *Hum. Reprod.* 18 (2003) 90–5.
- [22] C. Ladanyi, A. Mor, M.S. Christianson, N. Dhillon, J.H. Segars, Recent advances in the field of ovarian tissue cryopreservation and opportunities for research, *J. Assist. Reprod. Genet.* 34 (2017) 709–722.
- [23] P. Quinn, J.F. Kerin, G.M. Warnes, Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid., *Fertil. Steril.* 44 (1985) 493–8.
- [24] R.L. Brinster, A method for in vitro cultivation of mouse ova from two-cell to blastocyst., *Exp. Cell Res.* 32 (1963) 205–8.
- [25] 日本学術会議, 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン, (2006).
- [26] J.E. Swain, Optimizing the culture environment in the IVF laboratory: impact of pH and buffer capacity on gamete and embryo quality, *Reprod. Biomed. Online.* 21 (2010) 6–16.
- [27] B. Dale, Y. Menezes, J. Cohen, L. DiMatteo, M. Wilding, Intracellular pH regulation in the human oocyte., *Hum. Reprod.* 13 (1998) 964–70.
- [28] 田巻智慧, 平岡謙一郎, 松村康子, 桐明千晶, 宇都博文, 吉田宏之, 北村誠司, インキュベーターの開閉回数を減らすための培養方法の改善が受精率と胚発育におよぼす影響, *日本臨床エンブリオロジスト学会雑誌.* 13 (2011) 35-38.
- [29] P. Boyer, D. Montjean, P. Tourame, M. Gervoise-Boyer, Oocyte vitrification in an ART laboratory, *Gynecol. Obstet. Fertil.* 41 (2013) 551–3.
- [30] M. Roque, K. Lattes, S. Serra, I. Solà, S. Geber, R. Carreras, M.A. Checa, Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a

- systematic review and meta-analysis., *Fertil. Steril.* 99 (2013) 156–62.
- [31] R. Gosden, Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation, *Fertil. Steril.* 96 (2011) 264–8.
- [32] C.M. Checura, G.E. Seidel, Effect of macromolecules in solutions for vitrification of mature bovine oocytes, *Theriogenology.* 67 (2007) 919–930.
- [33] L.L. Kuleshova, J.M. Shaw, A.O. Trounson, Studies on replacing most of the penetrating cryoprotectant by polymers for embryo cryopreservation, *Cryobiology.* 43 (2001) 21–31.
- [34] O. Kato, N. Kawasaki, D. Bodri, T. Kuroda, S. Kawachiya, K. Kato, Y. Takehara, Neonatal outcome and birth defects in 6623 singletons born following minimal ovarian stimulation and vitrified versus fresh single embryo transfer, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 161 (2012) 46–50.
- [35] A. Cobo, M. Meseguer, J. Remohí, A. Pellicer, Use of cryo-banked oocytes in an ovum donation programme: a prospective, randomized, controlled, clinical trial, *Hum. Reprod.* 25 (2010) 2239–46.
- [36] C. Mori, M. Kuwayama, P-67 Role of cryoprotective effect of SSS on bovine oocytes during vitrification, in: *Cryo2009, Sapporo, 2009.*
- [37] J.M. Shaw, L.L. Kuleshova, D.R. Macfarlane, A.O. Trounson, Vitrification Properties of Solutions of Ethylene Glycol in Saline Containing PVP, Ficoll, or Dextran, *Cryobiology.* 35 (1997) 219–229.
- [38] Y. Kato, Y. Nagao, Effect of polyvinylpyrrolidone on sperm function and early embryonic development following intracytoplasmic sperm injection in human assisted reproduction., *Reprod Med Biol.* 4 (2012) 165–176.
- [39] H. Shiku, T. Shiraishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi, M. Kobayashi,

- Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy., *Anal. Chem.* 73 (2001) 3751–8.
- [40] R. Ota, T. Kato, N. Soga, Kinetic study on glass formation and crystallization behavior in a continuously cooling melt, *Yogyo-Kyokai-Shi*, 91(2) (1983)73-81
- [41] N.R. Council, *Guide for the care and use of laboratory animals*, Eighth, 2011.
- [42] H. Abe, H. Hoshi, Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media, *J Reprod Dev.* 49 (2003) 193-202.
- [43] J. Saragusty, A. Arav, Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction.* 141 (2011) 1–19.
- [44] R. Morató, R. Romaguera, D. Izquierdo, M.T. Paramio, T. Mogas, Vitrification of in vitro produced goat blastocysts: Effects of oocyte donor age and development stage, *Cryobiology.* 63 (2011) 240–244.
- [45] A. Cobo, M.J. de los Santos, D. Castellò, P. Gámiz, P. Campos, J. Remohí, Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles, *Fertil. Steril.* 98 (2012) 1138–46.
- [46] M.-J. Escribá, N. Grau, L. Escrich, A. Pellicer, Vitrification of isolated human blastomeres., *Fertil. Steril.* 93 (2010) 669–71.
- [47] S.J. Lee, L.R. Schover, A.H. Partridge, P. Patrizio, W.H. Wallace, K. Hagerty, L.N. Beck, L. V. Brennan, K. Oktay, American Society of Clinical Oncology, American Society of Clinical Oncology Recommendations on Fertility Preservation in Cancer Patients, *J. Clin. Oncol.* 24 (2006) 2917–2931.
- [48] J. Donnez, M.-M. Dolmans, Ovarian tissue freezing: current Status, *Curr Opin Obstet Gynecol.* 27 (2015) 222-30.
- [49] D. Meirou, D. Nugent, The effects of radiotherapy and chemotherapy on female

- reproduction, *Hum. Reprod. Update.* 7 (2001) 535–43.
- [50] C. Teinturier, O. Hartmann, D. Valteau-Couanet, E. Benhamou, P.F. Bougneres, Ovarian function after autologous bone marrow transplantation in childhood: high-dose busulfan is a major cause of ovarian failure, *Bone Marrow Transplant.* 22 (1998) 989–94.
- [51] K. Oktay, B.E. Harvey, A.H. Partridge, G.P. Quinn, J. Reinecke, H.S. Taylor, W.H. Wallace, E.T. Wang, A.W. Loren, Fertility preservation in patients with cancer: ASCO Clinical Practice Guideline update., *J. Clin. Oncol.* 36 (2018) 1994–2001.
- [52] A.K. Jensen, K.T. Macklon, J. Fedder, E. Ernst, P. Humaidan, C.Y. Andersen, 86 successful births and 9 ongoing pregnancies worldwide in women transplanted with frozen-thawed ovarian tissue: focus on birth and perinatal outcome in 40 of these children, *J. Assist. Reprod. Genet.* (2016) 1–12.
- [53] Q. Shi, Y. Xie, Y. Wang, S. Li, Vitrification versus slow freezing for human ovarian tissue cryopreservation: a systematic review and meta-analysis, *Sci Rep.* 7 (2017) 8538.
- [54] V. Keros, S. Xella, K. Hulthenby, K. Pettersson, M. Sheikhi, A. Volpe, J. Hreinsson, O. Hovatta, Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue, *Hum. Reprod.* 24 (2009) 1670–1683.
- [55] D. Nikiforov, V. Russo, D. Nardinocchi, N. Bernabò, M. Mattioli, B. Barboni, Innovative multi-protectoral approach increases survival rate after vitrification of ovarian tissue and isolated follicles with improved results in comparison with conventional method., *J. Ovarian Res.* 11 (2018) 65.
- [56] H.W. Youm, J.R. Lee, J. Lee, B.C. Jee, C.S. Suh, S.H. Kim, Optimal vitrification protocol for mouse ovarian tissue cryopreservation: effect of cryoprotective agents

- and in vitro culture on vitrified-warmed ovarian tissue survival, *Hum. Reprod.* 29 (2014) 720–730.
- [57] T. Du, L. Chao, S. Zhao, L. Chi, D. Li, Y. Shen, Successful cryopreservation of whole sheep ovary by using DMSO-free cryoprotectant, (2015) 1267–1275.
- [58] J.R. Westphal, R. Gerritse, D.D.M. Braat, C.C.M. Beerendonk, R. Peek, Complete protection against cryodamage of cryopreserved whole bovine and human ovaries using DMSO as a cryoprotectant, *J. Assist. Reprod. Genet.* 34 (2017) 1217–1229.
- [59] M. Ghavami, D. Mohammadnejad, R. Beheshti, J. Solmani-rad, A. Abedelahi, Ultrastructural and morphological changes of mouse ovarian tissues following direct cover vitrification with different cryoprotectants, *J. Reprod. Infertil.* 16 (2015) 138–147.
- [60] E. Lengyel, Ovarian cancer development and metastasis, *Am. J. Pathol.* 177 (2010) 1053–1064.
- [61] S.-S. Rho, K. Ando, S. Fukuhara, Dynamic regulation of vascular permeability by vascular endothelial cadherin-mediated endothelial cell-cell junctions, *J. Nippon Med. Sch.* 84 (2017) 148–159.
- [62] H. Ohkawara, S. Miyagawa, S. Fukushima, S. Yajima, A. Saito, H. Nagashima, Y. Sawa, Development of a vitrification method for preserving human myoblast cell sheets for myocardial regeneration therapy, *BMC Biotechnol.* 56 (2018) 10-18
- [63] 森 智絵美, 第一章卵巢組織凍結 08, 卵巢組織凍結・移植 第一版, 医師薬出版株式会社, (2013) 60-67.
- [64] M. Mihara, T. Nakagawa, S. Noguchi, K Fujii, T. Ohwada, T. Kawai, MRI, Magnetic resonance influenced, organ freezing method under magnetic field, *Academic Collaborations for Sick Children*, 1 (2009) 34-37

- [65] S. Silber, Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: scientific implications, *J. Assist. Reprod. Genet.* 33 (2016) 1595–1603.
- [66] S. Sanfilippo, M. Canis, J. Smitz, B. Sion, C. Darcha, L. Janny, F. Brugnon, Vitrification of human ovarian tissue: a practical and relevant alternative to slow freezing, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13 (2015) 67.
- [67] F.J. Mathias, F. D'Souza, S. Uppangala, S.R. Salian, G. Kalthur, S.K. Adiga, Ovarian tissue vitrification is more efficient than slow freezing in protecting oocyte and granulosa cell DNA integrity, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 60 (2014) 317–322.
- [68] M. Jafarabadi, M. Abdollahi, M. Salehnia, Assessment of vitrification outcome by xenotransplantation of ovarian cortex pieces in γ -irradiated mice: morphological and molecular analyses of apoptosis, *J. Assist. Reprod. Genet.* 32 (2015) 195–205.
- [69] J. Lee, H.S. Kong, E.J. Kim, H.W. Youm, J.R. Lee, C.S. Suh, S.H. Kim, Ovarian injury during cryopreservation and transplantation in mice : a comparative study between cryoinjury and ischemic injury, 31 (2016) 1827–1837.