

氏名(本籍)	遠山 智絵美(新潟県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	乙第6号
学位授与年月日	令和元年6月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 滝 沢 達 也 (副査) 柏 崎 直 巳 田 中 和 明

論文内容の要旨

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)から年々増加している。

ヒト生殖補助医療において卵と胚の体外培養および胚の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。また超低温保存により、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おり、近年では超低温保存は卵や胚のみならず、卵巣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3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 $1.8 \pm 0.3 \text{ mOsm/L}$ (n=9) および $0 \pm 0 \text{ mOsm/L}$ (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許容範囲である 10 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は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が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ており、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 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)、不妊治療終了後に胚の廃棄処分が決定され、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 1 M 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の測定を受精卵呼吸量測定装置 (HV-406、北斗電工株式会社、東京) で行った。さらに、HPC の凍害保護作用機序を解明するため、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ことから、HPC の粘度を測定し SSS と比較した。

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、「卵巣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、保存後の卵巣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効率は向上し、治療後の生活の質が問われるようになり、医原性不妊の対策として卵巣組織の超低温保存が臨床で普及し始めた。

卵巣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、超低温保存後の卵巣組織評価には、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。

検討では、卵巣組織の超低温保存法にガラス化法を選択した。従来の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、40分間保存液へ浸漬している。そこで、組織への凍害保護物質の浸透性を、物理的条件を変更することで改善し、平衡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。検討の結果、カドヘリンタンパク質発現量は従来法を用いた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。また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、新鮮区と陰圧区には差がなかった。

以上の結果から、卵巢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巢組織の損傷は、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。また、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。

主論文を構成する参考論文

- 1) 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
- 2) 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.
- 3) 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.

論文審査の結果の要旨

1. 論文の内容

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高い出生率を得るには、適切な胚の体外培養法と凍結保存技術は必須である。培養技術の向上により体外受精後の胚は 6～7 日間培養することが可能となり、良好胚の選別が容易となった。また、超低温保存技術により、多胎妊娠を防ぐために移植されない余剰胚は、次の移植周期で利用できるようになり、1 回の採卵により複数回移植できることから採卵あたりの妊娠率も向上した。さらに、保存技術は、がん治療分野の妊孕性温存において多大な貢献をしており、近年では卵や胚の保存のみならず、卵巣組織保存の臨床応用が開始されている。

本研究はヒト生殖補助医療に関する 3 つの技術の改良を目的とした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液の改良、第三章では卵巣組織保存法の効率化と保存後の組織の評価方法について検討した。

【第一章】培養器の気相の湿度に着目し、インキュベーターの改良を行った。一般的にヒト胚培養では、インキュベーターの下部に加湿用水分バットを設置する加湿インキュベーターが用いられる。加湿によりインキュベーター内の湿度は飽和状態であるため、培地の水分蒸発が防がれるが、真菌等の微生物が繁殖しやすい環境となっている。また水分バットは微生物の発生源となり、培地の微生物汚染の原因となる。一方、この問題を解決する、水分バットを設置しない無加湿インキュベーターにおける培地からの水分蒸発や、培養成績への影響は不明である。そこで、本章では無加湿インキュベーターの EZ-culture（株式会社アステック、福岡）を開発し、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、培地の水分蒸発率、浸透圧変化、マウス 2 細胞期胚を用いた発生培養成績を比較し、無加湿インキュベーターの有用性を検討した。

無加湿インキュベーターにおける培地水分蒸発率、浸透圧変化は加湿インキュベーターよりも高値であったが、市販培地のロット間浸透圧差よりも低値で、マウス 2 細胞期胚の胚培養成績は無加湿、加湿インキュベーター間で差がなかった。以上の結果から、水分バットを設置しない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、胚発生に影響しない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培養においても有用である事が示唆された。

【第二章】近年、ヒト生殖補助医療では安全性の観点から動物由来成分を含まない溶液の使用が望まれている。そこで、動物由来物質を含まない卵および胚の超低温保存液を開発するため、食品添加物や医薬品添加物として各国で利用され、安全性が確認されている植物由来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 Serum Substitute Solution（SSS）の代替となりうるか検討した。

HPC 添加保存液は、耐凍性が低いとされる近交系マウスや透明帯除去胚盤胞の保存後生存率を従来の SSS 添加保存液よりも改善し、胚盤胞の酸素消費量は新鮮胚盤胞と差がなく、マウス胚の移植試験から発生能も新鮮胚と同等である可能性が示された。さらに、HPC 添加保存液は SSS 添加保存液よりも粘度が高く、表面吸着が早いこと、冷却工程の前段階でもっとも凍害保護効果を示すという凍害保護物質としての新たな知見が得られた。

マウス胚盤胞移植試験により産仔率を比較した結果、HPC 添加保存液を用いた保存胚と、新鮮胚との間に差はなく、得られた産仔にも異常は認められず、凍害保護物質として安全に使用できることが示唆された。

以上の結果から、HPC は凍害保護物質として SSS を代替でき、HPC 添加保存液はヒト胚の超低温保存においても有用であると考えられた。

【第三章】 卵巣組織の超低温保存において、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保存後の新規の卵巣組織評価法の確立を試みた。これまでに卵巣組織の液体窒素下での保存において、組織への凍害保護物質の浸透率の改善を検討した報告はない。また、保存後の卵巣組織の評価方法については、アポトーシス解析と形態評価が主に用いられているが、アポトーシス解析は経路が完了するまで時間を要するため加温直後の組織では比較が難しく、また形態評価は局所的な評価であるため、臨床現場への普及にむけて組織評価法を新規に検討する必要があると考えられた。

本章ではウシ卵巣をモデルとして用いて、卵巣組織の超低温保存法としてガラス化法を用い、既法で用いられている 40 分間の保存液への浸漬時間を、物理的条件（静置、振盪、陰圧、陽圧）を変更することで短縮し効率化できるか検討した。卵巣組織中の凍害保護物質の濃度はガスクロマトグラフィで測定した。検討の結果、陰圧条件下では凍害保護物質の浸透効率が向上することから、平衡時間を静置の 40 分から 20 分に短縮することができた。また新規組織評価の指標として細胞間接着因子であるカドヘリンタンパク質の染色強度を検討した結果、陰圧平衡を用いて超低温保存した卵巣組織のカドヘリンタンパク質の染色強度は従来法よりも高く、新鮮組織と同等であることが示唆された。

本研究の結果、インキュベーターの改良、完全合成の超低温保存液の開発、卵巣組織の効率的な保存方法と組織評価方法が開発され、これらの手法はヒト生殖補助医療技術の向上に貢献すると考えられた。

2. 論文審査

1) テーマの立て方

ヒト生殖補助医療において、胚培養、および胚の超低温保存は欠かせない技術であり、また卵巣の超低温保存技術も、近年需要が高まっている妊孕性温存において重要な技術となっている。各章で着目した上記技術の社会的貢献度は高く、得られた改善案は臨床現場において実施可能な実用性の高いものである。

2) 研究の背景

先行研究で得られている知見を十分に理解し、解決すべき課題や問題点を見出し、検討を行っている。また、ヒト生殖補助医療技術の向上という明確な目的を達成するために適切な実験方法を選択し、計画的に検討している。

3) 研究の結果

各章における課題を解決するための結果が得られている。水分バットを設置しない無加湿インキュベーターの有用性を証明することで従来の加湿インキュベーターの問題点を克服できた。また、完全合成の胚保存液、卵巣組織保存プロトコルの効率化、卵巣組織の評価法を開発および提案できている。新規凍害保護物質としてヒドロキシプロピルセルロースの有用性を見出したことや、凍害保護物質の物性解析から得られた結果や、卵巣組織の新規評価法としてカドヘリンタンパク質を用いた解析結果は、今後の研究に貢献できる知見と言える。各章の実験結果は数値や図表を用いて明確に示されており、適切な統計処理がなされている。

4) 考察と結論

無加湿インキュベーターにおいて、これまで得られていなかった無加湿の影響を臨床に沿った方法で検討し、従来の条件と適切に比較し考察および結論が得られており、臨床における有用性を明確に示している。完全合成の卵および胚の超低温保存液の開発においては従来の知見を参考にしつつ、新規候補物質を検討し安全性や効果について十分に考察されて結論が出されている。卵巣組織の超低温保存においても先行研究による知見と比較検討され、得られた結果から考察を展開し、今後の卵巣保存法の改良に示唆を与えるものとなっている。

5) 参考文献

本研究において必要と思われる文献は、緒言および考察で十分かつ適切に引用されている。

6) 審査結果

本研究で得られた結果により、ヒト生殖補助医療における胚培養環境が改良され、完全合成かつ保存効率の高い超低温保存液、および効率的な卵巣保存法が開発された。これらの成果により、ヒト生殖補助医療技術の改善が見込まれ、臨床成績の向上に少なからず貢献するものと考えられ、博士（学術）の学位にふさわしい業績と評価した。