

主 論 文 要 旨

論文提出者氏名：

阿部 恭子

専攻分野：産婦人科学

コース：

指導教授：鈴木 直

主論文の題目：

透過型電子顕微鏡による評価を利用したカニクイザルを用いた卵巣組織凍結閉鎖型デバイスの開発

共著者：

杉下 陽堂、中嶋 真理子、今西 博治、西島 千絵、五十嵐 豪、鈴木 直

緒言

卵巣組織凍結の歴史は浅く、1997年ベルギーの Donnez らが悪性腫瘍患者の妊孕性温存のために初めて卵巣組織凍結を開始し、25歳のホジキンリンパ腫患者による融解卵巣組織の移植後の生児獲得が Donnez らによって2004年に初めて報告された。このホジキンリンパ腫患者は、抗がん治療を開始前に卵巣の切除および組織凍結を行い、治療開始から6年経過した完全寛解後、患者の閉経を確認したため、凍結保存していた卵巣が融解され卵巣周囲の腹膜に移植された。融解卵巣組織移植後、患者の月経周期が再開し自然妊娠および分娩に至ったため、Donnez らが世界で初めて本技術の成果を報告した。その報告を境に、ヒト卵巣組

織凍結の技術は急速な発展をとげることになった。この報告から約 20 年が経過した今、我々は現在新しい卵巢組織凍結技術を開発し、その凍結デバイスの安全性向上のため閉鎖型デバイス開発に取り組んでいる。これまで、卵巢組織凍結および融解移植に関わる検討において、多くの報告が光学顕微鏡を使用した卵巢の組織学的評価を用いている。しかし、その組織学的評価が卵巢の生理学的機能までも反映するのかどうかは不明である。生理学的機能の評価方法として月経周期の有無を血中ホルモン値で確認することが一般的であるが、我々は血中ホルモン値測定以外の評価として透過型電子顕微鏡を使用した評価方法に着目し本研究を実施した。

方法・対象

麻酔導入後のカニクイザルを開腹した後、両側の卵巢を切除し、閉鎖型卵巢組織凍結デバイスを用いて超急速冷凍法(vitrification法)によって液体窒素中に凍結保存した。この組織を融解後、大網や卵管間膜へ移植した。移植後の月経周期回復を確認した後、卵子獲得のため卵巢刺激を実施し、移植した卵巢組織より卵子を回収した。卵巢組織および獲得した卵子を透過型電子顕微鏡にて、細胞小器官の有無と形態を評価した。我々がこれまでに実施してきた卵巢組織凍結の研究の一環として、医療法人三慧会倫理委員会（受付番号5）ならびにイブバイオサイエンス研究所における動物実験ガイドラインに準じて実施している。

結果

我々は卵巢移植後にエストラジオール上昇とともに開腹手術を実施し、移植後卵巢の一部を採取した。採取した組織を透過型電子顕微鏡で評価し、凍結していない新鮮卵巢をコントロールとしている。移植後卵巢の顆粒膜細胞および核膜、細胞小器官の有無と形態を確認し、融解直後では卵巢組織の間質部分に間隙を確認した。なお、細胞小器官の形態

が良好な組織からは、卵子の獲得ができた。大網移植後の卵巢組織では透過型電子顕微鏡で顆粒膜細胞の維持、核膜の維持、細胞小器官の確認が可能であり、大網移植部位から卵子を獲得することができた。卵子を獲得することができなかつた卵管間膜移植部位に組織の線維化や空胞変性の増加、核膜および間質細胞の変性といった形態学的変化を認めた。また、融解直後と移植後 105 日経過した大網間質側の組織を比較すると、大網間質側の間質間隙の減少を認めた。

考察

我々が新たに開発した閉鎖型卵巢組織凍結デバイスを用いて、卵巢組織凍結および融解・移植後の卵巢の評価を行った。卵巢組織の評価方法として、これまでに組織学的検査や卵胞密度検査および免疫染色、卵巢移植後卵子獲得の評価、線維化の評価、ホルモン値の評価などが報告されている。本研究では、凍結卵巢、融解・移植を行ったカニクイザルのホルモン値測定により、月経周期の有無を確認している。

卵巢を大網移植後および卵管間膜移植後 105 日経過した卵巢組織を評価した結果、融解直後に認められた卵巢組織の間質部分の間隙は、移植後から時間が経過することで、その間隙が修復されるなどの卵巢組織の変化を確認することができた。光学顕微鏡における大網移植部位と卵管間膜移植部位の組織評価では、組織学的に大きな差を認めない所見であった。一方、透過型電子顕微鏡における組織評価では、大網移植部位は顆粒膜細胞の維持など細胞小器官の形態が保たれていたが、卵管間膜移植部位では空胞変性増加などの形態学的変化を認めた。大網移植部位から採卵することができたが、卵管間膜移植部位からは採卵することができなかつた。大網移植部位から採卵できた理由としては、大網移植部位の電子顕微鏡像がコントロール群と比較し、形態学的な差異が小さいことから生理機能が維持されたことが示唆された。本研究では透過型電子顕微鏡で細胞構造を詳細に分析することが、凍結融解された卵巢組織

より卵子獲得の有無を推測する指標として利用出来る可能性が示唆された。

現在、我々は卵巣組織の移植部位、移植方法の検討を行っており、より安定した卵巣組織凍結、融解・移植法の発展と確立を目指している。今後本研究の成果を若年がん患者の妊孕性温存療法の技術革新に役立てていきたい。