

光干渉断層計を用いた最適組織選択による効果的な 卵巣組織移植法の開発

研究代表者 聖マリアンナ医科大学 准教授 高江 正道

緒言

近年、化学療法や放射線治療の発達に伴い、化学療法や放射線治療成績が改善している。そのため、がん経験者が増加し、それらのQuality of life(以下、QOL)に注目が集まっている。なかでも妊孕性はQOLを構成するうえで極めて重要な要素とされており、がん経験者の多くが治療後の妊孕性に関して不安を抱いているという現状がある。最近では、このような将来の妊孕性に関する不安を解消する方法として、妊孕性温存療法が普及しつつある。妊孕性温存療法とは、化学療法や放射線治療後の妊娠を目的として、原則的には化学療法や放射線治療前に卵子や精子などの配偶子を凍結保存する治療を指す。女性の場合、最も一般的な妊孕性温存療法は胚(受精卵)凍結であり、原則的には既婚の成人女性に用いられる。この方法は、一般的な不妊治療で行われている胚(受精卵)凍結とほぼ同様であるため、最も一般的かつ確立された医療技術として位置づけられている。また、未婚の成人女性の場合は卵子凍結が適応であり、本法も確立された医療として位置づけられている。一方、小児ならびに治療までに期間的猶予のない成人女性の場合、卵巣組織凍結が実施される。本法は、2004年にDonnez博士らによって初めて妊娠例が報告された比較的新しい医療技術であり[1]、2019年の米国生殖医学会のステートメントにおいて『ほぼ確立された医療技術』とされているものの、対となる卵巣組織移植は『challengingな技術』とされており[2]、わが国を含む多くの国においては『研究段階の医療技術』として位置づけられている。本法がいまだそのような位置づけになっている理由として、まだ生産例が比較的少数しかないと挙げられ、2020年の時点で200人程度と推定されている。さらに、本法の有効性と安全性が限定的であることも、その要因と考えられる。卵巣組織移植の成績は諸家によって異なり、妊娠率は29-50%、生産率は23-41%とされているが[3-7]、当然のことながら保有する卵胞数の多い若年者の成績が良好であ

ると報告されているものの、年齢ごと、卵巣予備能ごとの詳細な成績は報告されていない。一般的に卵巣組織移植を行う場合、凍結保存した卵巣組織の15-50%の移植が適切とするという報告があるが、基本的には卵胞内に存在する卵胞の分布は不均一であることから、このようなかたちで行われている卵巣組織移植では体内に戻されている卵胞数に大きなばらつきが生じることは自明であり、それが本法の成績に一定の見解が得られていない要因になっているものと推察される。その問題を解消するには、卵巣内に存在する最も未熟な卵胞である原始卵胞を可視化する必要があると考えられるが、ホルマリンに浸漬してパラフィンで包埋するような組織学的検索を行う方法では卵胞が死滅してしまうため、本問題の解決方法に成り得ない。あくまで非侵襲的に原始卵胞を可視化する方法が求められている。これまで我々は、近赤外線による撮像機器である光干渉断層計(Optical Coherence Tomography: 以下OCT)を用いた原始卵胞の非侵襲的可視化の卵巣組織移植への応用について、実臨床への応用可能性に関する報告を行ってきた[8, 9]。しかしながらその検証はいまだ不十分であり、実臨床に向けてさらなる検証が必要と考えられている。

今回我々は、OCTの安全性と有効性を実証するため、齧歯類を用いた基礎研究を行ったので報告する。なお、本研究申請時は、高い解像度をもつ最新のOCT機器(LL Tech社, フランス: Light-CT scanner)を用いた実験を予定していたが、借用先の都合によって 予定されていた実験を遂行することが不可能であり、一部計画を変更して本研究を遂行した。

方法

今回、上記の事情によって研究計画を変更し、以下の1, 2について検証を行った。

1, OCTが生殖細胞に対する安全性の検証

a. 3日齢 ICR雌マウスから卵巣を摘出し、研究者ら

が作成した近赤外線照射機器にて0-240mW/cm²までの出力の間で照射を行った。また、照射時間をLight-CT scannerの標準的な撮像時間である3分間を軸に1分、3分、6分の三群を準備した。さらに照射された卵巣を、8-10週齢のICRレシピエントマウスの腎臓被膜下に異所性移植した。その2週間後にPMSG10IUならびにhCG10IU投与を行い、体外受精に供した。本実験における評価項目を、採取された卵子の成熟率、受精率ならびに胚盤胞到達率と設定して評価を行った。

b. 3日齢・10日齢・14日齢 ICR雌マウスから卵巣を摘出し、我々が開発中のOCT機器を用いて撮像を行った。撮像された卵巣の遺伝子発現を検証するため、GDF9(卵子マーカー)、CYP19a(顆粒膜細胞マーカー)のプライマーを用いてreal time qPCRに供した。

2. OCT機器による撮像が卵巣組織移植に与える影響の検証

a. 上記1 b.と同様の処理を10日齢 ICR雌マウスの卵巣に行った後に8-10週齢のICR レシピエントマウ

スの卵巣嚢へ同所性移植を行った。移植から2週間後に卵巣摘出し、HE染色ならびに免疫組織学的染色を行った後に組織学的評価を行った。

なお、本研究は聖マリアンナ医科大学実験動物飼育管理研究施設実験動物委員会による認可のもと行われた(1904002-C, 1904003-C)。また、統計処理はJMP Pro Ver 11-0にて行われ、主にWelch t検定が用いられ、p<0.05の場合に統計的有意差ありと判定した。

結果

1-a. 卵巣に対して近赤外線照射を行い、非接触検温器にて温度変化を確認したが、特に卵巣組織表面の温度上昇を認めなかった。また、今回行った実験系において、1分照射、3分照射、6分照射を行ったものの、体外受精成績に変化を認めなかった。図1に、近赤外線照射実験の結果を示す。本実験結果から、近赤外線の照射は明らかな熱の発生を伴うことはなく、また体外受精成績にも悪影響を及ぼさず、安全な装置であることが示された。

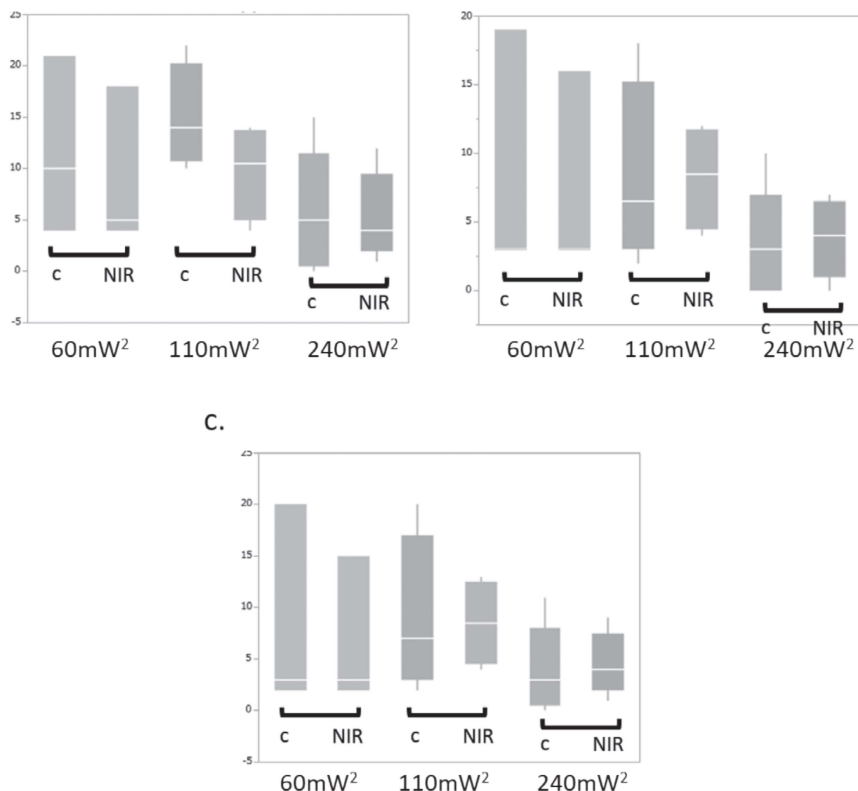


図1. 近赤外線照射による体外受精成績への影響

a 採卵個数、b 受精卵個数、c 胚盤胞期胚到達個数を示す。それぞれn=7で実施され、Welch t検定にてすべてp>0.05であった。(c: コントロール群, NIR: 近赤外線照射群)

1-b. Light-CT scannerの代替機であるOCT機器を用い、卵巣を撮像した。その後、real time qPCRにて検証した結果を図2に示す。卵子のマーカであるGDF9ならびに顆粒膜細胞のマーカであるCYP19aはそれぞれの日齢においてははっきりと発現しており、明らかな悪影響はないと考えられる。なお、今回はコントロール群で同様の条件を設定するのが困難であったのでコントロール群との比較は行われていない。

2-a. 卵巣組織移植後のドナー卵巣を摘出し、卵胞カウントにて評価を行ったところ、コントロール群では平均211個の卵胞(range 57-332)が、OCT群では131個の卵胞(range 15-271)が存在した(図3)。しかしながら、明らかな有意差は認められず、OCT撮像による卵巣組織移植への悪影響はないものと考えられた。

考 察

OCTは実臨床において、眼科領域、循環器科領域にて既に一般診療として用いられている機器である。本研究はこのOCTを生殖領域に応用するための重要な知見になると考えられる。これまで、我々はOCTの安全性について齧歯類を用いた検証を行い、撮像後の卵巣組織を腎被膜化に移植し、そこから得られた卵子が形態学的ならびに生殖機能の面から正常の産仔に成り得ることを実証してきた[8]。本研究では、その前段階である体外受精成績に対する安全性と有効性を実証したのみならず、近赤外線に曝露された卵巣組織の遺伝子発現が問題ないということを実証することができ、OCTの安全性について、有効な知見を積み重ねることができたと考えられる。しかしながら、安全性の最終的な検証をするまでには至っておらず、OCT撮像後の卵子ならびにそれから作出された胚の遺伝子検査、エピジェネ

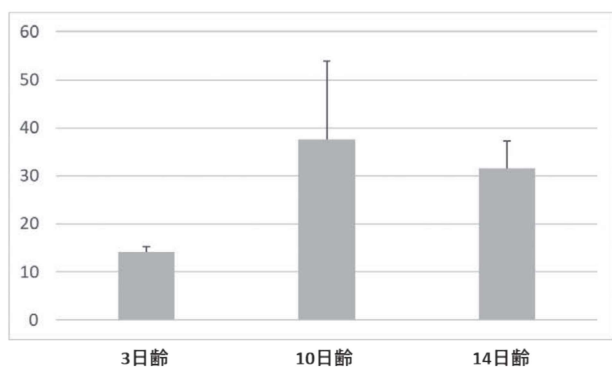


図2a. OCT撮像後の遺伝子発現の比較

a GDF9, b CYP19a

それぞれn=5で実施され、各日齢においてGDF9およびCYP19aが発現していた。

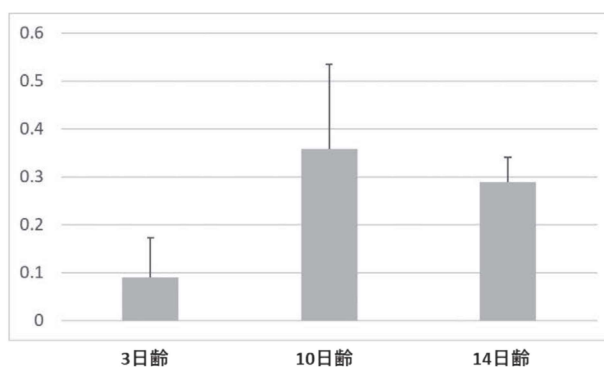


図2b. OCT撮像後の遺伝子発現の比較

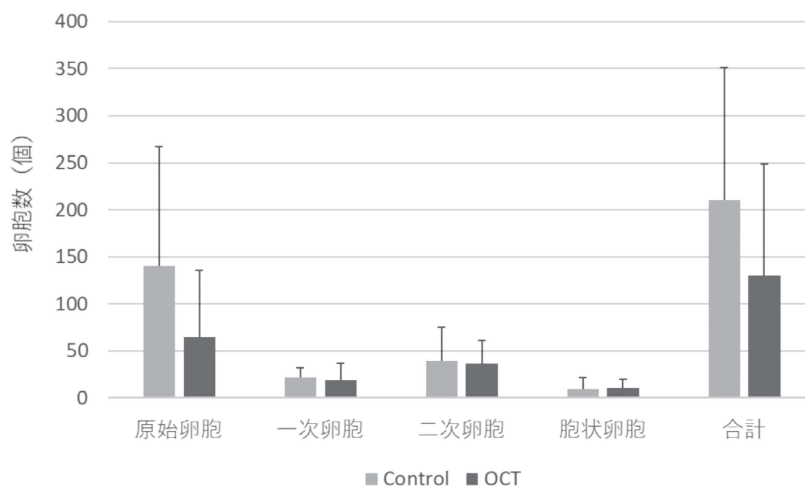


図3. OCT撮像後の卵胞数カウントの比較

それぞれn=5で実施され、各発達段階での卵胞数に有意差を認めなかった。

ティックな変化をみてゆくことにより、安全性の検証は完全なものに近づくものと推察される。

さらに、本研究では、現在主流となっている卵巣組織の同所性移植を実施し、OCTによる卵胞数への影響を検証した。本研究は、体外受精成績や卵子への影響と同様に、卵巣組織移植成績に対する影響を

検証したという点でもオリジナリティは高く、今後は移植された卵巣から得られた卵子に対して上記と同様の検証をおこなうことによって、より実臨床に近い状態での安全性と有効性の検証が可能になると考えられる。

参考文献

1. Donnez, J., et al., Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 2004. 364(9443): p. 1405-10.
2. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Electronic address, a.a.o., Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *Fertil Steril*, 2019. 112(6): p. 1022-1033.
3. Beckmann, M.W., et al., Concept Paper on the Technique of Cryopreservation, Removal and Transplantation of Ovarian Tissue for Fertility Preservation. *Geburtshilfe Frauenheilkd*, 2019. 79(1): p. 53-62.
4. Donnez, J. and M.M. Dolmans, Fertility Preservation in Women. *N Engl J Med*, 2017. 377(17): p. 1657-1665.
5. Pacheco, F. and K. Oktay, Current Success and Efficiency of Autologous Ovarian Transplantation: A Meta-Analysis. *Reprod Sci*, 2017. 24(8): p. 1111-1120.
6. Gellert, S.E., et al., Transplantation of frozen-thawed ovarian tissue: an update on worldwide activity published in peer-reviewed papers and on the Danish cohort. *J Assist Reprod Genet*, 2018.
7. Shapira, M., et al., Evaluation of ovarian tissue transplantation: results from three clinical centers. *Fertil Steril*, 2020. 114(2): p. 388-397.
8. Takae, S., et al., Accuracy and safety verification of ovarian reserve assessment technique for ovarian tissue transplantation using optical coherence tomography in mice ovary. *Sci Rep*, 2017. 7: p. 43550.
9. Takae, S., et al., Preliminary human application of optical coherence tomography for quantification and localization of primordial follicles aimed at effective ovarian tissue transplantation. *J Assist Reprod Genet*, 2018. 35(4): p. 627-636.