

目次

ご挨拶	2
会場案内図	4
プログラム	5
招請講演1	6
教育講演1	7
特別講演1	8
ランチオンセミナー	9
特別講演2	10
会長講演	11
教育講演2	12
招請講演2	13
招請講演3	14
招請講演4	15
優秀発表賞演題	16
ポスター演題	21
共催・協賛企業一覧	33

ご挨拶

この度、第19回日本生殖工学会学術講演会を開催させて頂くことを大変名誉に思います。本学会は、我が国の生殖工学の草分けであります故尾川昭三教授と、卵子の研究のレジェンドとして世界的に知られる鈴木秋悦先生が創設されました。その後を柏崎直巳理事長が継がれて、基礎系と臨床系の各々の弟子が一同に介して、この分野の研究の促進と研究成果の情報交換のために貢献して参りました。現在までは関東圏での開催でしたが、この度初めて関東を離れ、大阪の地で開催させて頂くことを大変嬉しく思います。

さて、体外受精技術が生殖医療に導入されて以来、生殖工学は大きな発展を遂げ、不妊治療には必須の分野となっております。故尾川名誉教授が率いて基礎を作られた顕微授精技術は、今ではどのような小規模な施設でも不可欠の技術として応用されており、多くの人々がこの技術の恩恵にあずかっております。生殖工学というと、あまりなじみが無いと感じられる方も多いと思いますが、実は大変身近にあって、なくてはならない技術として存在しているのです。それだけに、それらの技術を開発あるいは改良し、有効性と安全性を検証して使用していくことが人類の幸福につながると思われまます。

今後、生殖工学の発展の可能性は無限です。再生医療が生殖医療と融合すると、配偶子は幹細胞から作成されることとなります。即ち、現在のように卵巣刺激や採卵をして、卵子を獲得することは近い将来無くなるでしょう。また、ミトコンドリアなどの細胞内小器官のみならず、分子までを標的にして生殖医療を行う技術も開発されるでしょう。そして、これらの夢のような技術が臨床に応用される日はそう遠くないと考えています。

今回、生殖工学の元祖と言って良い柳町隆造先生をお招きしました。先生は、世界中の学者から敬愛される我が国の誇るべき先達です。さらに、再生医学やミトコンドリアなどの未来の夢の技術の開発につながる各分野のエキスパートをお招きしております。

本学術集会に集われる皆様が、多くの知識を得られ、触発され、我が国のみならず世界の未来の夢の生殖医療に貢献されることを願ってやみません。

2019年2月

第19回日本生殖工学会学術講演会 会長 森本 義晴



ご挨拶

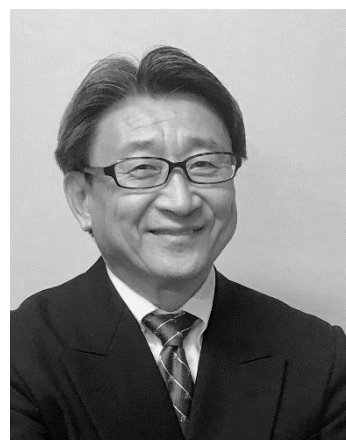
日頃より、日本生殖工学会の活動にご理解とご協力を賜り、誠にありがとうございます。この度、本学会学術講演会を第19回学術講演会大会長 森本 義晴 先生(HORAC グランフロント大阪クリニック)のご尽力により、大阪で開催させていただくこととなりました。大会長、学術講演会の事務局および関係者各位に心より深謝申し上げます。

日本生殖工学会は1988年に故 尾川昭三 先生(明治大学 名誉教授)が「動物における個体発生を人為的に修飾して正常発達や有用個体の発生ならびに、種の保全と生まれてくる生命の保全の促進を目的として、生殖細胞、生殖系列細胞、生殖幹細胞、生殖器官、組織のみならず一般組織に加えらるるのに必要な人為操作の理論や開発ならびにその適用について考究する学問領域であると考えられる。」との理念のもとに設立され、動物を研究対象とする生殖工学の研究者・技術者(猪 貴義 先生・岡山大学 名誉教授)等および生殖工学を不妊治療等へ適用する臨床関係の医師・研究者・生殖補助医療胚培養士(鈴木 秋悦 先生・東京生殖バイオロジー東京シンポジウム代表)等の皆様が集い、学術集会、Journal of Reproduction Engineering (JRE)の発刊等の学術活動を重ねて参りました。そして、生殖工学の発展のために貴重な研究の成果発表、情報交換の場として、特に、基礎となる研究と利活用を目的とした臨床や医療等を目的とした研究とが活発に交流して反応し、これらの分野での先端的で独自性の高い研究の成果を発出し、新たな展望がなされる場として、本学会は高く評価されているものと自負しております。

これまでの日本生殖工学会の活動に暖かいご支援、ご協力を賜り、深く御礼申し上げます。これからも本学会の活動を介し、社会に貢献できるよう、生殖工学の発展、さらには新たな生殖工学の利活用法および関連領域が創出されていくように、微力ながら尽力していく所存です。これまで以上に、皆様の益々のご指導、ご鞭撻を賜りますようお願い申し上げます。

2019年2月

日本生殖工学会 理事長 柏崎 直巳



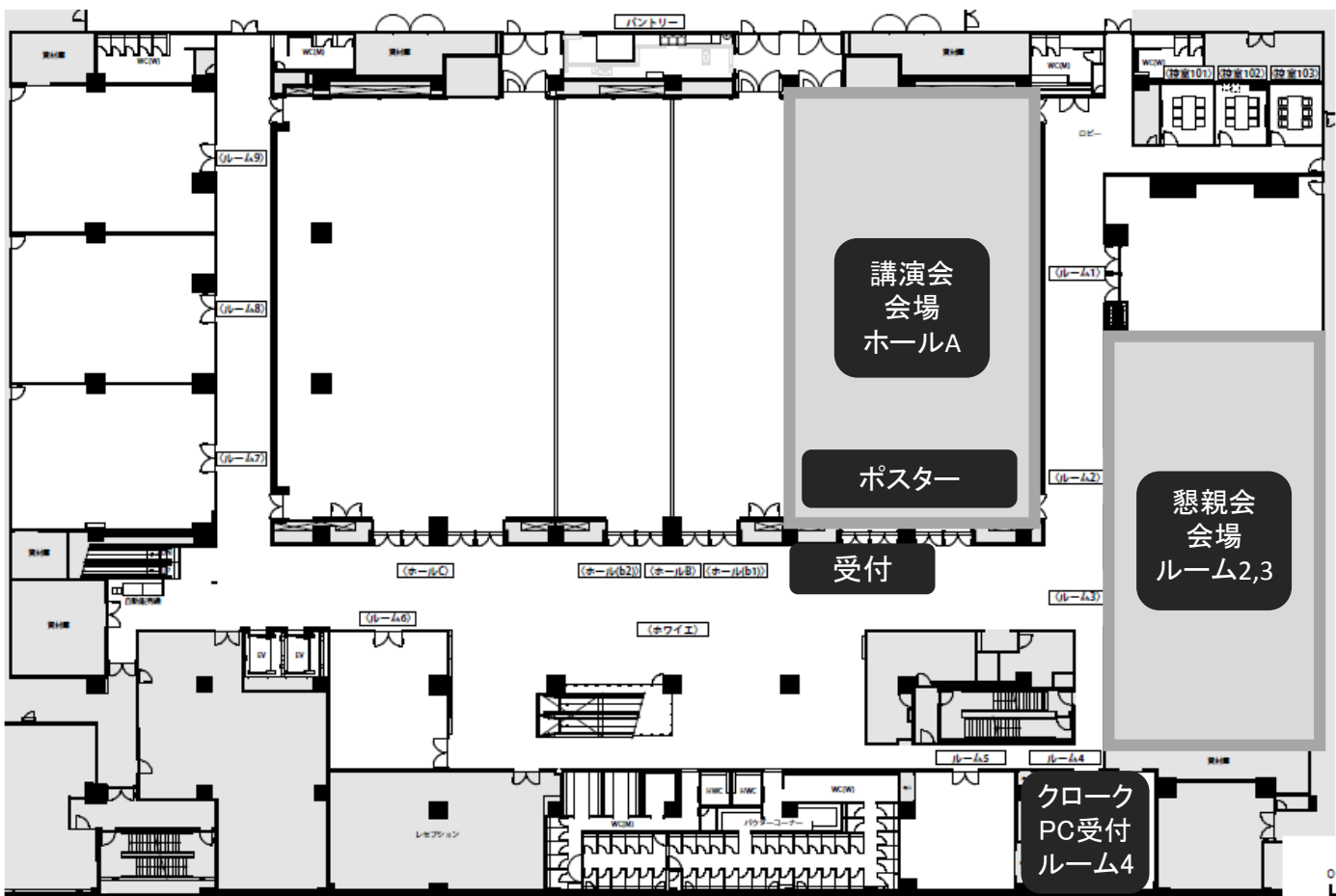
会場案内

グランフロント大阪北館B2F
コングレコンベンションセンター

講演会会場、ポスター会場：ホールA

懇親会会場：ルーム2,3

クローク、PC受付：ルーム4



第19回日本生殖工学会学術講演会プログラム

時間	講演タイトル	演者	座長	共催
9:00-	開場			
9:15-9:20	開会の辞	柏崎直巳 (麻布大学)		
9:20-9:25	大会長挨拶	森本義晴 (HORACグランフロント 大阪クリニック)		
9:25-10:35	優秀発表賞演題 AW-1: 卵母細胞-顆粒層細胞間の細胞膜融合による 新規結合構造の解析 AW-2: 200 μ mステンレスメッシュを用いたマウス卵巣組織 培養と卵胞発育の評価 AW-3: カニクイザルで安定的に高発現するユビキタス プロモーターの検討 AW-4: 卵特異的な垂鉛トランスポーターZip10遺伝子欠損 マウスは受精率の低下による低妊孕性を示す AW-5: ヒト人工多能性幹細胞からミュー管細胞 への誘導 AW-6: ヒト子宮内膜における甲状腺ホルモンの役割と その分子機構の解明 AW-7: ヒト射出精液培養検査: タイムラプス胚培養でのART 反復不成功例で疑う細菌の関与	小松紘司 (愛知医科大学) 亀井秀剛 (兵庫医科大学) 清田弥寿成 (滋賀医科大学) 影山敦子 (麻布大学) 武内大輝 (三重大学) 小林真以子 (関西医科大学) 安藤寿夫 (豊橋市民病院)	杉山カ- (杉山産婦人科) 堀内俊孝 (県立広島大学) 中岡義晴 (IVFなんばクリニック)	
10:35-11:05	招請講演1 ウシG2期卵母細胞のcAMP値の上昇により ミトコンドリア機能が亢進する	橋本周 (大阪市立大学)	牛島仁 (日本獣医生命科学大学)	
11:05-11:20	休憩 ポスター閲覧			
11:20-11:50	教育講演1 変異型ミトコンドリアゲノムの逆遺伝学: 多様な病型形成機構の理解に向けて	中田和人 (筑波大学)	菊池和弘 (農研機構)	
11:50-12:35	特別講演1 ヒト生殖細胞試験管内誘導研究の現状と展望 Mechanism and Reconstitution In Vitro of Human Germ Cell Development	斎藤通紀 (京都大学)	林克彦 (九州大学)	神和メディカル 株式会社
12:45-13:45	ランチョンセミナー 腸内マイクロビオームを どのように生殖医療に応用するか?	内藤裕二 (京都府立医科大学)	岡田英孝 (関西医科大学)	富士製薬工業 株式会社
13:45-14:05	休憩 ポスター閲覧			
14:05-14:30	特別講演2 Looking back to the past and looking ahead to the future: If I were 20-30 years old today.	柳町隆造 (ハワイ大学)	柏崎直己 (麻布大学)	神和メディカル 株式会社
14:30-14:55	会長講演 胚質不良患者へのミトコンドリア移植の応用	森本義晴 (HORACグランフロント 大阪クリニック)	古山将康 (大阪市立大学)	
14:55-15:25	教育講演2 ゲノム編集動物作製法の開発と 雄性不妊モデルマウスの機能解析	藤原祥高 (大阪大学)	古井憲司 (クリニックママ)	
15:25-15:45	休憩 ポスター閲覧			
15:45-16:15	招請講演2 卵子の発育を支えるマイクロRNA	岩田尚孝 (東京農業大学)	吉田仁秋 (仙台ARTクリニック)	
16:15-16:45	招請講演3 発生工学研究から派生する生殖補助医療 研究と新規治療開発の可能性	立花真仁 (東北大学病院)	塩谷雅英 (英ウィメンズクリニック)	
16:45-17:15	招請講演4 カニクイザルをモデルとした霊長類における 始原生殖細胞発生機構の解明	佐々木恒太郎 (ペンシルバニア大学)	福田愛作 (IVF大阪クリニック)	
17:15-17:45	閉会式・表彰			
18:00-20:00	懇親会			

招請講演1

ウシG2期卵母細胞のcAMP値の上昇により ミトコンドリア機能が亢進する



橋本 周
大阪市立大学医学研究科
リプロダクティブサイエンス研究所

(略歴)

- 2001年 京都大学大学院より博士(農学)取得
- 1989年 雪印乳業(株) 受精卵移植研究所、生物科学研究所研究員
- 2002年 (株)ワイエスニューテクノロジー研究所、(株)ワイエス研究所主任研究員
- 2004年 医療法人三慧会IVFなんばクリニック部長
- 2008年 日本繁殖生物学会賞受賞
- 2009年 日本哺乳動物卵子学会学術奨励賞受賞
- 2014年 日本卵子学会学術奨励賞受賞
- 2015年 世界体外受精会議記念賞受賞
- 2017年 大阪市立大学大学院医学研究科リプロダクティブサイエンス研究所 特任准教授

小卵胞の卵母細胞を培養して成熟卵子を得る方法(IVM)は性腺刺激ホルモンを投与しないこと、より多くの卵母細胞を得られることから、生殖医療や家畜生産の次世代技術として注目を浴びている。しかし、IVMの臨床成績は従来の刺激法に比べ低いことがその普及の妨げとなっている。卵胞発育を促す卵胞刺激ホルモン(FSH)を投与後回収された卵母細胞の発育能力は未投与のものに比べ、高いことが知られている。卵母細胞にはFSHの受容体が無いことから、卵母細胞を取り巻く卵丘細胞を介してFSHの刺激を得ている。FSH刺激により、卵丘細胞内のcGMP量が上昇し、その結果、卵母細胞内のcAMP値が上昇する。ヒトと同じ単胎動物であるウシでFSH刺激の結果生じる卵母細胞内のcAMP値の上昇を人為的に促すことにより、その発育能が向上することが示されたが(Albuz 2010)、その機序は不明である。我々は、このcAMP上昇が誘起する遺伝子発現変化を次世代シーケンス法(NGS)により網羅的に解析し、卵母細胞における機能変化を明らかにした。

網羅的な遺伝子発現解析の結果、ミトコンドリア(mt)機能を司るタンパクをコードする遺伝子90個中60個の発現が有意に上昇し、そのうち13個は発現量が2倍以上に上昇していた。また、解糖系ならびに脂肪酸代謝に関わる酵素の遺伝子発現も上昇した。さらに、cAMP区で卵母細胞のmtチトクロームcオキシダーゼ活性の上昇が確認され、酸素消費量が有意に増加し、卵母細胞内のATP値も有意に上昇した。一方で、cAMP区ではforskolinとIBMX処理2時間の間、細胞周期が進行せず、卵核胞崩壊ならびに極体放出に要する時間は対照区と同等であった。

卵母細胞内のcAMPが上昇した2時間では細胞周期は進行せず、電子伝達系を司るタンパクの発現が上昇し、卵母細胞の酸素消費が増加し、細胞内ATP値が上昇し、mt機能が亢進した。FSH刺激による卵母細胞の発育能向上の機構の一端が明らかにされた。

教育講演1

変異型ミトコンドリアゲノムの逆遺伝学： 多様な病型形成機構の理解に向けて



中田 和人
筑波大学
生命環境系

(略歴)

1994年3月 筑波大学第二学群生物学類 卒業
1999年3月 筑波大学大学院博士課程生物科学研究科 修了 博士(理学)
1998年4月～2000年3月 日本学術振興会特別研究員
2000年4月 筑波大学生物科学系 講師
2001年12月～2005年3月 さきがけ研究員(兼任)
2004年5月 筑波大学大学院生命環境科学研究科 助教授(准教授)
2005年4月 科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞 受賞
2007年3月 日本学術振興会賞 受賞
2011年5月 筑波大学生命環境系 教授(現職)
2014年4月 筑波大学大学院生命環境科学研究科生物科学専攻 専攻長(現職)
2016年10月 科研費助成事業 審査委員表彰

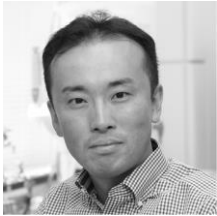
真核細胞のミトコンドリアには独自のゲノムであるミトコンドリアDNA (mtDNA) が存在し(哺乳類細胞では細胞あたり数百から数千コピーのmtDNAが内在されている)、ミトコンドリア独自のセントラルドグマを形成している。哺乳類のmtDNAにはミトコンドリアでのエネルギー産生に寄与する13種の構造遺伝子と、これらを翻訳するために必要な22種のtRNAと2種のrRNAがコードされている。近年、mtDNAにおける特定の突然変異が、ミトコンドリアでのエネルギー産生を低下させ、全身性のミトコンドリア機能異常をとまなうミトコンドリア病の原因になることが明らかにされた。さらに、同様の突然変異型mtDNA分子種が、糖尿病、神経変性疾患、がんなどの多様な疾患群にとどまらず、老化個体からも散見されることを発端に、突然変異型mtDNA分子種による多様な病型形成機構が広く注目を集めている。

本発表では、突然変異型mtDNA分子種を導入したモデル細胞やモデルマウスの作製とその活用によって明らかになりつつある突然変異型mtDNA分子種による多様な病型形成について紹介したい。特に、変異型mtDNA分子種による多様な病型形成機構が、1) 変異型mtDNA分子種間の差異による制御(変異分子種の階層)、2) 組織特異的な変異型mtDNA分子種の蓄積動態の差異による制御(組織・細胞種の階層)、3) 核ゲノム背景やストレス環境下での高次病原性制御(核-ミトコンドリアの協調階層)という多階層基盤によって形成されている可能性について紹介したい。

特別講演1

ヒト生殖細胞試験管内誘導研究の現状と展望

Mechanism and Reconstitution In Vitro of Human Germ Cell Development



齋藤 通紀

京都大学・ヒト生物学高等研究拠点
京都大学・医学研究科・機能微細形態学
京都大学・iPS細胞研究所

(略歴)

1995年 京都大学医学部 卒業

1999年 京都大学大学院医学研究科 修了 [博士(医学)(月田承一郎教授)]

1999年～2003年 Gordon Institute, Travelling Research Fellow/Senior Research Associate (Azim Surani教授)

2003年～2009年 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター チームリーダー

2009年～ 京都大学大学院医学研究科 教授

2011年～2018年 科学技術振興機構 戦略的創造研究推進事業 ERATO 研究総括

2018年～ 京都大学 ヒト生物学高等研究拠点 拠点長

生殖細胞は、精子・卵子に分化し、その融合により新しい個体を形成、我々の遺伝情報やエピゲノム情報を次世代に継承する細胞である。生殖細胞の発生機構の解明は、遺伝情報継承機構・エピゲノム制御機構の解明や幹細胞の増殖・分化制御技術の開発、不妊や遺伝病発症機序の解明につながる。

我々は、培養ディッシュ上で、マウスES細胞/iPS細胞から、精子・卵子・さらには健常な産仔に貢献する能力を有する始原生殖細胞様細胞を誘導する技術を開発した。また本培養系を用いて、始原生殖細胞を誘導する転写・シグナル機構の解明、エピゲノムリプログラミングの本態の解明、始原生殖細胞の増殖法の開発、始原生殖細胞から精子幹細胞の試験管内誘導、卵母細胞分化・減数分裂誘導機構の解明などに成功した。また、これら成果を基盤に、ヒトiPS細胞からヒト始原生殖細胞様細胞を誘導する技術を開発した。また、ヒト生殖細胞の試験管内誘導技術を発展させるため、実験動物として使用しうる霊長類の中でヒトに最も近縁のカニクイザルを用いた研究を推進し、マウス・サル・ヒトにおける多能性スペクトラムの発生座標を解明、霊長類生殖細胞系譜が初期羊膜を起源とすることを見出した。さらに、最近、ヒト始原生殖細胞様細胞を卵原細胞に成熟させ、エピゲノムリプログラミングを誘導することに成功した。本講演では、ヒト生殖細胞試験管内誘導研究に関する我々の最新の研究成果と今後の展望を議論したい。

ランチオンセミナー

腸内マイクロビオームをどのように生殖医療に応用するか？



内藤 裕二
京都府立医科大学大学院
医学研究科消化器内科学

(略歴)

1983年 京都府立医科大学医学部卒業
1993年 医学博士(京都府立医科大学)
1998年 京都府立医科大学助手、第一内科学教室勤務
2000年 京都府立医科大学助手、京都府知事公室職員課参事
2001年 米国ルイジアナ州立大学医学部分子細胞生理学教室客員教授
2005年 京都府立医科大学生体機能分析医学講座助教授
2008年 京都府立医科大学大学院医学研究科消化器内科学准教授
2015年 京都府立医科大学附属病院内視鏡・超音波診療部部长

日本人の腸内微生物叢、とくに細菌叢は極めて特徴的であることが明らかとなりつつある。最近、日本人300名弱の健常人に対して16D rRNA V3-V4メタゲノム解析を実施し、便性状の指標であるブリストル便性状スコア(BSS)との比較検討を報告した¹⁾。その結果、日本人の腸内細菌叢には性差があり、Bifidobacterium、Akkermansiaは女性に有意な優勢菌であることを明らかにした。BSSから日本人の便性状を評価した結果、女性では年齢を問わずBSS1、2の便秘症が20%程度あるのに対し、男性では39歳以下の若年群でBSS1、2が6%程度と少なく、BSS5、6の軟便群が30%を占めるのが特徴であった。男女別にBSSと相関する腸内細菌叢を日本人で明らかにすることができた。今後、日本人を対象にした臨床試験において基盤的データベースを提供できたと考える。

腸内環境を標的にした生殖医療の研究においては、腸内細菌叢だけでなくその菌叢による代謝物分析も極めて重要であり、代謝物の高感度定量的測定も可能となりつつある。日本人腸内マイクロビオーム研究の結果、典型的な日本人腸内細菌叢の機能システムは、食物繊維を利用した発酵反応により、水素分子、短鎖脂肪酸を産生し、さらには水素を利用した酢酸産生遺伝子を持った細菌叢が豊富であることが明らかとなった。食物繊維は水溶性食物繊維と不溶性食物繊維に分類されるが、戦後これらの食物繊維はともに摂取不足となってきており、目標値の25 g/日に対して14 g/日まで低下している。本セミナーでは、最近実施した水溶性食物繊維摂取によるヒト臨床試験の結果を照会し、その腸内細菌叢の変化からみたアウトカムとの関連を考察した。対象とした試験は、1) 軟便傾向の健常人を対象にした二重盲検比較試験、2) 不妊症に対する生殖医療実施中の非盲検単独介入試験、3) 自閉症関連疾患小児に対する盲検単独介入試験である。

以上のようなマイクロビオーム研究成果の進歩に伴い、ヒトを対象にした臨床研究において腸内細菌叢や代謝物のビッグデータを解析する必要性が生じてきている。本セミナーでは、できるだけ具体的な解析により、その具体例を紹介したい。

1) Takagi T, Naito Y. et al. J Gastroenterol 2018, in press.

特別講演2

Looking back to the past and looking ahead to the future: If I were 20–30 years old today.



柳町 隆造
ハワイ大学

(略歴)

1955–1960. Research & Teaching Associate, Hokkaido University.

1959–1960. Lecturer of General Biology, Fuji Women's College.

1960–1964. Research Scientist, Worcester Foundation for Experimental Biology.

1964–1966. Research Associate, Faculty of Science, Hokkaido University.

1966–1974. Assistant Professor & Associate Professor of Anatomy & Reproductive Biology, University of Hawaii Medical School.

1974–2004. Professor of Anatomy & Reproductive Biology, University of Hawaii Medical School.

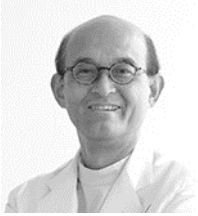
2000–2004. Director, The Institute for Biogenesis Research, Dept. of Anatomy & Reproductive Biology, University of Hawaii Medical School.

2005–現在. Professor Emeritus, University of Hawaii Medical School.

I was 23 years old when I began scientific work as a student majoring zoology in Japan. Compared to today, very little was known about anything. For example, it was a subject of intense debate if the Golgi apparatus in cells has some functions or is an artifact (vacuole). While the process and mechanism of fertilization in invertebrate species (such as the sea urchins) were well known by that time, very little was known about mammalian fertilization due to technical problems in obtaining large numbers of gametes (eggs in particular) and handling them in vitro. This was a subject smart researchers dared to touch, except for a few who were studying reproduction in farm (useful) animals. Perhaps, most medical students, even Ob/Gyn-major students, did not learn of human eggs, sperm and fertilization. During the past 60 years, I witnessed the birth and development of various research subjects and technology which I could not even imagine when I was my 20–30s. I thought the study of mammalian fertilization would become important some day because fertilization is a critical moment in the life cycle of all animals including humans. I admit and tell you that I missed or overlooked many good opportunities. Remember what will bloom when you (in 20–30s) reach my age is very likely unnoticed, underestimated, and even ignored today by most researchers. Some are comfortable being a part of popular subjects. Safety and no failure is their first and only concern. As far as failure (in experiments) is concerned, perhaps I have had more failures than any other persons. Most ideas that came up in my mind proved to be wrong or “stupid”, but one of ten was “not bad” or even “very good.” I will tell you there are few subjects which I want to pursue if I were 20–30s in my age today. I am sure that you have better ideas in your mind.

会長講演

胚質不良患者へのミトコンドリア移植の応用



森本 義晴

HORAC グランフロント大阪クリニック

(略歴)

1977年 関西医科大学卒業

2014年 HORACグランフロント大阪クリニック設立、院長

・日本IVF学会 一名誉理事長、監事

・日本生殖心理学会 一理事長

・PSRM(環太平洋生殖医学会) 一President

・ISIVF(世界体外受精会議) 一Secretary

・ASPIRE(アジア太平洋生殖医学会) 一Past President、Official Journal "Fertility and Reproduction" 一Editorial Board

・客員教授: 聖マリアンナ医科大学、近畿大学先端技術研究所、岡山大学、三重大学、Pochon Cha University

・臨床教授: 関西医科大学

本邦では41万件を越える体外受精が行われているが、近年体外受精を繰り返し実施しても妊娠しない反復不成功の難治性不妊患者が多い。この難治性不妊症の原因は様々であるが、主に卵子の獲得が難しい、卵子の質が悪い、着床に問題がある、男性側に問題があるなどがその主たるものである。今回は中でも、卵子の質の問題について考えてみたい。

質の悪い卵子とはどのような卵子であろうか。これらは、①卵子が成熟能力を持たない②卵子が受精能力を持たない③卵子からできた胚が発育能力を持たないなどと考えられる。そして、その原因として最初に考えられるのは卵細胞の司令塔である核の遺伝情報の異常である。細胞の設計図としての核が異常を起こしていれば、当然、各生殖現象に必要な情報が正確に伝達されず卵子の質は低下することになる。

さらに、卵子には核以外に細胞質があって、この中では多くの細胞内小器官が機能している。その中でも、最も重要と考えられるのはミトコンドリアである。ミトコンドリアはパワーハウスと呼ばれ、エネルギー産生の機能を担っているが、そのほかにもカルシウムの貯蔵やステロイド産生の機能もある。

卵細胞内のミトコンドリアはおおよそ20万コピーのミトコンドリアDNA(mDNA)を有していると言われている。ミトコンドリアの機能は、多くの部分が核の遺伝子に制御されていることが分かっている。卵子のミトコンドリアは、卵成熟過程で変化する。GV期の卵子では円形もしくは楕円形で、クリステの少ないミトコンドリアが多いがMII期へと成熟するにつれて、長形のものが出現する。分布も成熟に応じて変化する。ミトコンドリアの機能は、胚発育の過程でも変化する。膜電位やATP産生能、酸素消費能などでミトコンドリアの機能を推測するが、胚盤胞期には著しく増大する。

さて、先に述べた胚質不良の患者に対して、私たちは自家ミトコンドリア移植法を臨床応用している。対象は、前の体外受精の治療過程で、胚質が極めて悪かった患者である。即ち、胚の分割が停止したり、胚にフラグメントが多く発生して、妊娠に至らなかった症例を選択した。まず、患者の卵巣表面から皮質組織片(6×6×1mm)3個を腹腔鏡により採取し、さらにそれらよりDDX4抗体を用いて卵子幹細胞を抽出し、さらにその細胞からミトコンドリアを採取した。卵子幹細胞のミトコンドリアは遺伝子異常が少なくATP産生量が多いことが知られている。このミトコンドリアを顕微授精時に精子と共に卵細胞質に注入する。現在51名の患者において卵巣生検を行い60回の移植中19名の妊娠(31.7%)を得ている。本法は、他に有効な手段の無い胚質不良患者において極めて有効な治療法であり、今後その適応範囲を卵子成熟障害や受精障害に拡げて行きたいと考えている。

教育講演2

ゲノム編集動物作製法の開発と雄性不妊モデルマウスの機能解析



藤原 祥高
大阪大学
微生物病研究所附属遺伝情報実験センター

(略歴)

2004年 神戸大学農学部応用動物学科 卒業
2006年 大阪大学大学院医学系研究科修士課程 修了
2007年～2010年 日本学術振興会特別研究員(DC1)
2010年 大阪大学大学院医学系研究科博士課程 修了
2010年～2013年 大阪大学微生物病研究所附属生体応答遺伝子解析センター特任研究員
2013年～現在 大阪大学微生物病研究所附属遺伝情報実験センター助教
2018年～現在 Visiting Assistant Professor, Baylor College of Medicine, USA

生命科学研究において、個体レベルでの遺伝子機能解析や遺伝子改変技術が果たしてきた役割は非常に大きい。なかでも、特定の遺伝子を欠損させたノックアウト(KO)マウスは、現在まで四半世紀を越えて作製されてきた。しかし、作製には年単位の期間を要することが多く、作製効率・コスト・技術、そして設備などの問題で、KOマウスの恩恵を受けられる研究者は限られていた。

このような状況を一変させたのが、2013年に登場したゲノム編集ツールCRISPR/Cas9である。このシステムの特徴は、遺伝子改変効率の高さに加えて、改変デザインの簡便さとゲノム編集のバリエーションにある。現在では、わずか1カ月でのKOマウス作製も可能になった。本会では、爆発的な広がりを見せているCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集動物作製の現状について、われわれが開発した方法を交えながら紹介する。そして、応用例として、ゲノム編集を駆使した雄性不妊モデルマウスの開発と機能解析についても報告したい。

- 1) Mashiko D et al. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep.* 3:3355. 2013
- 2) Fujihara Y et al. CRISPR/Cas9-based genome editing in mice by single plasmid injection. *Methods Enzymol.* 546:319–36. 2014
- 3) Miyata H et al. Genome engineering uncovers 54 evolutionarily conserved and testis-enriched genes that are not required for male fertility in mice. *PNAS.* 113(28):7704–10. 2016
- 4) Oji A et al. CRISPR/Cas9 mediated genome editing in ES cells and its application for chimeric analysis in mice. *Sci Rep.* 6:31666. 2016
- 5) Fujihara Y et al. Human globozoospermia-related gene Spata16 is required for sperm formation revealed by CRISPR/Cas9-mediated mouse models. *Int J Mol Sci.* 18(10):E2208. 2017
- 6) Fujihara Y et al. Co-expression of sperm membrane proteins CMTM2A and CMTM2B is essential for ADAM3 localization and male fertility in mice. *J Cell Sci.* 131(19):jcs221481. 2018

招請講演2

卵子の発育を支えるマイクロRNA



岩田 尚孝
東京農業大学
農学部

(略歴)

1990年 京都大学 農学部
1992年 京都大学 農学研究科 博士前期課程
1992年-2003年 神戸市役所
1999年 京都大学 農学博士
2003年 東京農業大学 農学部 畜産学科 講師
2012年 東京農業大学 農学部 畜産学科 教授
2019年 東京農業大学 農学部 動物科学科 教授

体内では卵子発育に伴い卵胞が形成され、卵子発育は卵胞液中で行われる。卵胞液中には非常に多くの生理活性物質が含まれている。卵子の成熟培地に卵胞液を添加すると卵子の能力を向上させることは古くから知られており、さらに卵胞液の性状は卵胞の状態や個体の状態によっても変わる。

ウシをモデルに若齢や加齢個体の卵巣から卵胞液を回収し、これを初期胞状卵胞卵子の体外発育培地や胞状卵胞卵子の成熟培地に添加すると、加齢由来の卵胞液は、体外発育卵子や成熟卵子の質を低下させる。ブタでは、卵胞中の顆粒層細胞数が個体によって大きく異なりこれは内包される卵子の発生能力と高い相関がある。そこで顆粒層細胞の多い個体の卵胞液と少ない個体の卵胞液をそれぞれ初期胞状卵胞卵子の体外発育培地や卵胞卵子の体外成熟培地に添加すると、顆粒層細胞が多い卵胞液が卵子の質を改善した。この効果の分子背景を調べるため、顆粒層細胞が多い卵胞と少ない卵胞から回収した顆粒層細胞を用いてRNAseqを行い発現が異なる遺伝子を検出し、これらを用いてIPA解析による上流因子の推測を行うとE2、EGF、VEGFなど卵胞発育に必要な因子とmiRNAが見つかった。

卵胞液はエキソソームの形でmiRNAを含んでいる。エキソソーム除去卵胞液と非除去卵胞液を作成し、ブタの初期胞状卵胞卵子の体外培養や胞状卵胞卵子の成熟培養に用いると非除去卵胞液は卵子発育や発生能力を改善し、除去卵胞液はこれを低下させた。そこで卵子発育を支えるmiRNAを同定するために、大-小卵胞や、顆粒層細胞が多いまたは少ない卵胞の顆粒層細胞で発現に差がある遺伝子群をRNAseqによって同定しさらに上流因子としてのmiRNAを推測した。さらに卵胞液中のエキソソーム内miRNAのsmallRNAseqを行い高濃度で含まれるmiRNAを見つけ、前述のmiRNAと照合することで卵胞の質や発育に必要な候補miRNAを推定した。これらのmiRNAは、エキソソーム除去と非除去の卵胞液で培養した顆粒層細胞のRNAseqとIPA解析から推測した上流因子とも重複していた。

候補miRNAのmimicを卵子の体外発育や成熟培地に添加する実験を行うと、卵子の体外発育や卵子の体外成熟後の発生能力を有意に改善するmiRNAが見つかった。これらのmiRNAが作用する分子背景は明らかではない。しかし、先のRNAseqの結果から卵胞発育には顆粒層細胞のHIF1-VEGFや解糖系の活性化が必要であることを我々は見つけている。そこで、今回、卵胞発育効果が認められたmiRNAを検討すると、顆粒層細胞の解糖系の活性を有意に促進するものがあることが分かった。これまではホルモン等の効果を明らかにして培地に添加することにより、培養条件の改善を行ってきたが、miRNAも卵子の質に非常に大きなインパクトを持っていることが分かり、さらに高質な卵子を得る条件として、または高質な卵子のマーカーとして利用できるかと考えている。

招請講演3

発生工学研究から派生する生殖補助医療 研究と新規治療開発の可能性



立花 眞仁
東北大学病院
産科

(略歴)

1999年3月 日本大学医学部卒業(MD)、同年東北大学産婦人科学教室入局
2006年3月 東北大学大学院修了(PhD)、同年東北大学産婦人科助教
2008年6月 Oregon Health & Science University, Postdoctoral Research Fellow
2009年7月 同大 Senior Research Associate
2011年7月 同大 Staff Scientist 1
2013年9月 みやぎ県南中核病院 産婦人科 科長
2014年4月 同 産婦人科 部長
2015年7月 東北大学病院産科 助教
2016年4月 同 講師

近年、再生医療への期待が高まっている。再生医療に不可欠な多能性幹細胞の樹立、多能性の証明や安全性の検証において発生工学技術は重要な役割を果たしている。一方、発生工学によって得られた発生生物学の知見や技術は、近未来の生殖医療分野における遺伝子治療などへの応用の可能性が示されている。

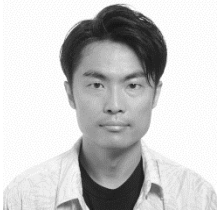
生物の初期発生は、全能性をもった受精卵から分化にともないその細胞の能力が限定/特定されていく nonstop の過程である。しかしながら、1981年にエバンス、カウフマンらによって胚盤胞期の内細胞塊より単離された 胚性幹細胞(以下ES細胞)は、生物の初期発生を多能性幹細胞の時点で停止したまま継代することが可能であることを示した画期的な発見であった。以後、ES細胞は再生医療の切り札として注目され、Tissue engineering研究の発展に寄与している。しかしながら、受精卵由来のES細胞は非自己の細胞であり、患者細胞に由来する組織適合性多能性幹細胞の樹立が次なる課題であった。この組織適合性幹細胞の樹立過程においては、ガードン博士が発見した、初期化(リプログラミング)と呼ばれる細胞の分化による能力の限定/特定という記憶の消去(または巻き戻し)を要する。そこで登場したのが体細胞核移植(以下SCNT)による核移植ES細胞(ntES細胞)と人工多能性幹細胞(iPS細胞)である。演者らは卵子の持つ自然なリプログラミングに着目し、霊長類やヒトにおける組織適合性ntES細胞樹立に取り組んできた。一方、通常の受精においても、精子も卵子もそのものに全能性も多能性もない分化した生殖細胞の雌雄核が卵細胞質への曝露と受精というプロセスを経て初期化され全能性を持った胚となる。つまり、受精卵の初期化の解明は、ART治療の発展に寄与する可能性がある。

一方、核移植技術は細胞質の置換、すなわちミトコンドリアの置換(MRT: Mitochondrial Replacement Therapy)とみなすことができる。そこで演者らは、MII期におけるSCNT技術の応用からMII期紡錘体置換法(MST法)を開発し、ミトコンドリア遺伝病に対する配偶子系列遺伝子治療の可能性を示してきた。MRT技術はミトコンドリア遺伝病の伝搬防止を目的として開発されたが、細胞質因子に起因する不妊の解明、救済する可能性を秘めている。

このシンポジウムでは配偶子/胚操作を中心とした発生工学研究から得られた知識や技術が寄与する今後の生殖医療研究や治療の可能性について、この分野において演者が得たこれまでの知見を交えて紹介する。

招請講演4

カニクイザルをモデルとした霊長類における始原生殖細胞発生機構の解明



佐々木 恒太郎
ペンシルバニア大学
獣医学部

(略歴)

2005年 北海道大学医学部医学科 卒業
2005年 国立国際医療センター 研修医
2006年 ピッツバーグ大学免疫学分野 ポスドク研究員
2008年 ピッツバーグ大学付属病院 病理診断部 研修医
2011年 ワシントン大学付属病院 腎臓病理部 後期研修医
2011年 米国病理専門医資格取得
2012年 京都大学医学研究科機能微細形態学分野 ポスドク研究員
2018年 ペンシルバニア大学獣医学部(医学部病理部門兼任) 助教・研究室主任

始原生殖細胞(primordial germ cell, PGC)は次世代に遺伝情報を継承する生殖細胞系譜の源であり、その発生機構は世代を越えた生命サイクルの永続性にかかわる本質的な問題である。マウスをモデル生物とした近年の研究により生殖細胞形成に関わるシグナル機構が明らかになり多能性幹細胞(ESCs/iPSCs)を起点とした生殖細胞形成過程の試験管内再構成も可能となってきた。しかし、マウス以外の哺乳類における生殖細胞形成機構の解明は非常に遅れており、特に霊長類においては技術的、倫理的困難さ故に全く分かっていなかった。今回、我々はカニクイザル着床胚の解析により、SOX17/TFAP2C/BLIMP1陽性のPGCは胎齢11日にて初期羊膜にて形成された後、17日目までに後部卵黄嚢へ移動することを発見した。羊膜はBMP4及び、その標的遺伝子を発現していることより自己分泌機構によりPGCを誘導している可能性が示唆された。また、単一細胞遺伝子発現解析法により生殖細胞の形成から生殖巣に移動するまでの網羅的遺伝子発現動態の解明に成功した。またこれらの知見をもとに試験管内で分化誘導したヒト始原生殖細胞様細胞は発生直後のサルPGCと類似する遺伝子発現パターンを有することが判明した。これらの研究により霊長類における生殖細胞発生メカニズム解明の基盤が形成され、これまで極めて困難であった霊長類の生殖細胞発生の分子機構が解明されつつある。また、本研究をベースに生殖細胞分化の最終産物であるヒト精子・卵子の試験管内誘導に向けた我々の最近の取り組みについても紹介したい。

優秀発表賞演題

AW-1 卵母細胞－顆粒層細胞間の細胞膜融合による新規結合構造の解析

小松 紘司、増淵 悟

愛知医科大学医学部生理学講座

【目的】哺乳類の卵胞では、卵母細胞と顆粒層細胞がtranszonal projections (TZPs)によって結合し、物質の輸送を行っている事が知られている。我々はタイムラプス撮影によって卵巣組織培養下における卵胞発育過程を観察する中で、卵母細胞－顆粒層細胞(卵丘細胞)間において細胞膜融合を介した結合構造(connections in cumulus-oocyte complex, 以下、CCOC)が存在する事を発見し、その構造や特性に関して解析を行った。

【方法】卵胞発育過程をライブイメージング解析するために、卵子特異的に発現する遺伝子Oogenesis1 (Oog1)のプロモーターに蛍光タンパク質AcGFP1を結合した組換え遺伝子を持つ遺伝子改変マウスを用いた卵巣組織培養を行った。AcGFP1にはGAP-43のN末端配列が付与されており、AcGFP1は細胞膜に局在するように制御されている。4週齢雌マウスの卵巣組織を培養し、2週間タイムラプス撮影を行い、解析を行った。また、CCOCの構造と特徴を解析するために、組織学的解析、電子顕微鏡による観察を行った。さらに、凍結切片を用いたDilのインジェクション、培養卵巣組織中の卵胞へのDextran conjugated with Alexa594のインジェクションを行い、CCOCを介した物質移動の可能性を検証した。

【結果】解析の結果、CCOCは一次卵胞から卵母細胞が排卵されるまで維持されており、TZPs末端にあるgap junctionを通過できないサイズの蛍光タンパク質やDextran conjugated with Alexa594がCCOCを通して、卵母細胞から顆粒層細胞へと移動する事が確認できた。この結果から、CCOCは卵胞発育過程において、卵母細胞－顆粒層細胞間における成長因子や母性因子などの輸送経路として重要な役割を果たしている可能性が考えられる。また、ライブイメージング解析の結果から、排卵の際、まずは卵丘細胞が排卵方向に移動し、CCOCによって卵母細胞が牽引されて排卵される様子が観察された。この結果から、CCOCが物質交換だけではなく、排卵時の卵母細胞の動態制御にも重要な役割を果たしている事がわかった。

AW-2 200 μ mステンレスメッシュを用いたマウス卵巣組織培養と卵胞発育の評価

亀井 秀剛¹、長谷川 昭子^{1,2}、塩谷 雅英²、柴原 浩章¹

¹兵庫医科大学産科婦人科、²英ウィメンズクリニック

【背景】近年、妊孕性温存を目的として卵巣自家移植および組織培養が検討されている。特に微小残存病変(MRD:minimal residual disease)を回避するために卵巣組織培養において新しいデバイスの開発が期待されている。卵巣組織培養において、酸素の供給および培養液中の有効成分の組織内への浸潤は培養成績に大きな影響をもたらす。従来の既製のメッシュは最大30 μ mの幅で容積1 \times 1 \times 1 mm程度の組織でも酸素濃度や有効成分の浸透は十分ではなく、原始卵胞や初期発育卵胞の発育に必要な長期間の培養は困難であった。今回我々は、マウスの卵巣組織を幅200 μ mのステンレスメッシュ上で培養し、経時的に卵胞発育を評価した。

【方法】7日齢マウスの卵巣を摘出し、培養皿にステンレスメッシュを設置し、その上でマウス卵巣組織を培養した。培養0日、4日、8日、12日に卵巣を回収してヘマトキシリン-エオジン染色を行い、経時的に卵胞発育を評価した。培養液は α -MEMを基本とし5% FCS、Vit.C、抗生剤、ITSを加えたものを使用し、培養液は2日に1回交換した。

【結果】培養0日(7日齢相当)の卵巣組織は、原始卵胞と1~2層程度の顆粒膜細胞を有する初期発育卵胞のみからなり、胞状卵胞を認めなかった。培養4日(11日齢相当)では卵胞の数と容積の増加を観察した。培養8日(15日齢相当)ではさらに発育卵胞の顆粒膜細胞数の増加を確認した。卵胞腔を有する成熟卵胞は認めなかった。

【考察】200 μ mステンレスメッシュを用いたマウス卵巣組織培養を行い、胞状卵胞に至る以前において、良好な卵胞発育を誘導することに成功した。メッシュ幅を大きくすることによって、気相の環境と培養液中の有効成分の組織への浸透が改善されたものと考えられる。これによって初期卵胞の培養効率が向上し、成熟卵子の十分な数の獲得が期待される。卵巣組織培養の安全性や効率が向上すれば、早発卵巣不全(POI:Premature Ovarian Insufficiency)や卵巣組織凍結を必要とするがん生殖分野に応用したい。

AW-3 カニクイザルで安定的に高発現するユビキタスプロモーターの検討

清田 弥寿成^{1,2,3}、築山 智之¹、浅見 拓哉¹、岩谷 千鶴¹、土屋 英明¹、中家 雅隆¹、中村 紳一郎¹、依馬 正次¹

¹滋賀医科大学動物生命科学研究センター、²葵鐘会研究開発部、³ペンシルバニア大学獣医学部

【目的】近年、非ヒト霊長類にも適用できる遺伝子組換え技術が開発されたことから、ヒト病態を対象として多様なモデルカニクイザル(Cyno)が作出され、病態解明に繋がることが期待される。本センターにおいてもレンチウイルス法で、GFP Tg-Cynoの作製に成功した。Tg-Cynoを作出するためには、プロモーターの選択が非常に重要である。そこで本実験では、プロモーター活性を評価する試験管内アッセイ系を構築後、プロモーターを評価し、外来遺伝子を全身性に高発現するTg-Cynoを作出することを目的とした。

【方法】プロモーター活性の評価系を構築するために、Cyno-ES細胞(ESCs)のAAVS1遺伝子座にCAG、EF1 α 、UbC、CMVプロモーターをノックインし、GFP発現レベルを未分化なESCs、胚葉体、神経細胞などの分化細胞間で比較した。Tg-Cynoはレンチウイルス法で作出した。

【結果】ESCsを用いた解析から、ESCs においてはEF1 α プロモーターの活性が強く、分化細胞ではCAGプロモーターの活性が強いことが分かった。そこで、CAG、EF1 α プロモーターでそれぞれ 3頭のGFP Tg-Cynoの作製し解析を行なった結果、CAGでは1コピーのTg挿入でも蛍光が皮膚で観察されたのに対し、EF1 α では4コピーの挿入でも蛍光が観察されない個体が見られた。以上の解析結果から、CAGプロモーターがTg-Cynoを作出するのに適している事が明らかになった。また、個体でのGFP発現パターンとESCs分化系は概ね一致しており、ESCs分化系で個体レベルの解析を代替できる可能性が示された。

AW-4 卵特異的な亜鉛トランスポーターZip10遺伝子欠損マウスは受精率の低下による低妊孕性を示す

影山 敦子¹、石井 緑²、鴨下 真紀¹、並木 貴文¹、伊藤 潤哉^{1,2}、柏崎 直巳^{1,2}

¹麻布大学大学院獣医学研究科、²麻布大学獣医学部

【目的】哺乳類の受精メカニズムに関して、近年マウスおよびヒト卵の受精時には亜鉛イオンの一過性の卵外放出、「亜鉛スパーク」が起こることが報告され、亜鉛シグナルが哺乳類の受精および発生に重要な役割をもつ可能性が示唆されている。一般的に亜鉛イオンの細胞内外への輸送は亜鉛トランスポーターによって制御されていることから、哺乳類卵でも重要な役割をもっていると考えられる。本研究では、亜鉛イオンの取り込みに関わる亜鉛トランスポーターであるZipファミリーに着目し、哺乳類(マウス)卵におけるZipの機能について検討した。

【方法・結果】C57BL6/J雌マウスから卵を回収し、RT-PCRを用いることでZipファミリー(Zip1~Zip14)の発現を調べた結果、Zip6およびZip10のmRNAの発現が確認された。また免疫蛍光染色を行った結果、マウス卵でZip10タンパク質の発現が確認された。さらにZip10に関してCre/loxPシステムを用いた卵特異的Zip10遺伝子欠損マウス($Zp3^{Cre/+}Zip10^{lox/lox}$: $Zip10^{d/d}$)を作製した。性成熟した $Zip10^{d/d}$ 雌マウスを雄マウスと交配させ、妊孕性の確認を行った。対照区マウスは $Zip10^{f/f}$ ($Zp3^{+/+}Zip10^{lox/lox}$)とした。その結果、平均産子数は $Zip10^{d/d}$ マウスで 3.0 ± 0.9 匹($Zip10^{f/f}$: 7.2 ± 1.8 匹)であり、妊孕性の著しい低下が認められた。その理由を明らかにするため、 $Zip10^{d/d}$ マウスから過剰排卵により卵を採取し、体外受精後の受精率を調べた。その結果、 $Zip10^{d/d}$ マウスの受精率は約35%であり、 $Zip10^{f/f}$ マウスの85%と比べて著しく低下していた。

【考察】以上のことから、Zip10を介した亜鉛シグナルはマウスの受精において重要な役割をもっていることが初めて明らかとなった。

AW-5 ヒト人工多能性幹細胞からミューラー管細胞への誘導

武内 大輝^{1,2}、真柄 栄梨²、立花 亮太¹、西岡 美喜子^{2,3}、前沢 忠志^{2,3}、北野 裕子^{2,3}、森下 みどり^{2,3}、池田 智明^{1,2,3}

¹三重大学大学院 医学系研究科産科婦人科、²三重大学 医学部附属病院 高度生殖医療センター、

³三重大学 医学部附属病院 産科婦人科

【緒言】近年の不妊患者の増加に伴い、体外受精件数は右肩上がりであり上昇している。不妊因子は様々あり、卵子の不妊因子は研究が進み臨床応用も進んでいるが、着床の不妊因子となる子宮内膜組織に起因する不妊要因の研究は、*in vitro*での研究ツールが少なくあまり進展していない。本研究では女性要因の中でも卵管・子宮・卵巣等雌性生殖器由来の不妊の新規治療法の創出を目指して、多能性幹細胞から雌性生殖器の初期発生に重要なミューラー管(Mullerian Duct: MD)細胞への誘導系の開発を試みた。

【目的】子宮内膜の発生は、途中の段階であるMDまでの機序についても詳細は不明である。本研究ではヒト人工多能性幹(iPS)細胞からMD上皮細胞を誘導するために、関与する各シグナル経路の活性化と抑制の重要性を検討した。

【方法】本研究ではヒトiPS細胞を使用し、2段階のstepwiseな方法でMD上皮細胞への誘導を試みた。MD発生に関わるシグナル経路の中でも、特に中間中胚葉からMD上皮細胞の誘導で関与が報告されているBone Morphogenetic Protein (BMP)経路に注目した。MD発生に関わる各シグナル経路を促進・抑制するために各種成長因子や低分子化合物を添加して培養し、解析は遺伝子とタンパク質の発現を解析した。誘導課程の中間産物である中間中胚葉のマーカーとしてOSR1、LHX1、PAX2を、前駆MD細胞のマーカーとしてHOXA10、HOXA13を、MDのマーカーとしてWT1、AMHR2を使用した。

【結果・考察】各種添加因子での刺激により、上述した各マーカー遺伝子の発現は顕著に上昇し、LHX1、PAX2、HOXA10の各タンパク質の局在が確認された。本研究においてMD細胞の誘導には初期の段階でBMP経路の活性化し、次段階ではBMP経路を抑制することが重要であることが示唆された。

AW-6 ヒト子宮内膜における甲状腺ホルモンの役割とその分子機構の解明

小林 真以子、坪倉 弘晃、木戸 健陽、木田 尚子、久松 洋司、村田 紘未、小野 淑子、岡田 園子、中尾 朋子、岡田 英孝

関西医科大学産科学婦人科学講座

【目的】甲状腺疾患は生殖可能年齢の女性に多くみられ、軽微な甲状腺機能異常でも妊娠に影響を及ぼすことが報告されている。脱落膜化の過程における甲状腺ホルモンの役割はまだまだ不明な点が多い。今回我々は子宮内膜の脱落膜化や着床機構における甲状腺ホルモンの役割について*in vitro*で検討した。

【方法】IRBの承認と患者の同意を得て分離したヒト子宮内膜間質細胞(hESCs)に、エストラジオールおよび酢酸メドロキシプロゲステロンを添加して脱落膜化を誘導した。(1)脱落膜化過程での各甲状腺ホルモン受容体の発現量の変化について、定量的・時間依存的に検討した。(2)甲状腺ホルモン添加が脱落膜化に及ぼす影響について、PRLおよびIGFBP-1のmRNA発現への関与を検証した。(3)脱落膜化における局所の甲状腺ホルモンの恒常性維持機構を解明するため、各脱ヨード酵素(DIO1、DIO2、DIO3)の発現量を定量的・時間依存的に解析した。(4)甲状腺ホルモン添加によるIL-15、HAND2、GLUT1などの各着床因子のmRNA発現量の変化を解析した。

【結果】(1)hESCsにおける甲状腺ホルモン受容体の存在を確認した。いずれも脱落膜化過程で発現量の変化はなかった。(2)甲状腺ホルモン添加によって、脱落膜化はより強く誘導された。(3)脱落膜化により、DIO2のmRNAの発現量は低下し、DIO3の発現量は増加した。その効果は甲状腺ホルモン添加によってより顕著となった。(4)脱落膜化で誘導されるIL-15、HAND2、GLUT1のmRNA発現は、甲状腺ホルモン添加によってさらに増加した。

【結論】hESCsにおいて、甲状腺ホルモンが脱落膜化に促進的に作用し、さらに各着床因子の発現の調整にも重要な役割を担っていることが示唆された。本研究により脱落膜化における甲状腺ホルモンの重要性が初めて*in vitro*で示された。

AW-7 ヒト射出精液培養検査:タイムラプス胚培養でのART反復不成功例で疑う細菌の関与

安藤 寿夫、窪川 芽衣、皆元 裕子、鈴木 範子

豊橋市民病院総合生殖医療センター

【目的】ヒトARTは主に不妊症治療として行われるために、ARTにより新たに明らかになる問題点もある。タイムラプス胚培養により個別の胚発生を詳細に観察できるようになり、男性側の細菌感染の関与を疑う症例が飛躍的に増加した。今回、ART反復不成功例を中心に臨床的に疑わしいとして行った精液一般細菌培養結果をまとめたので報告する。

【方法】当院のART症例で、タイムラプス観察での胚発生異常や着床不全などへの関連を調べるためにインフォームドコンセントを経て精液細菌培養検査を実施した106例について検討した。検出菌に対しては薬剤感受性データに基づき、原則的に菌が検出されなくなるまで抗菌薬治療を行った。さらに治療症例についての精液所見の変化や妊娠転帰についても調べた。

【結果】精液一般細菌培養陽性は、38例(35.8%)だった。内訳としては、*Enterococcus faecalis* 14例、 α *Streptococcus* 11例、*Streptococcus agalactiae* 9例をはじめ、*Escherichia coli*、*Citrobacter koseri*等、多様な菌種が検出された。抗菌薬治療後に運動率等の精液一般所見は特に変化を認めなかったが、当院で不妊治療を継続しICSIに変更した夫婦31組のうち21組で挙児を得た。

【考察】細菌性精液症例に対して、抗菌薬治療を経てICSIを積極的に適用した結果、良好な妊娠転帰につながった可能性が示唆される。文献的には菌種ごとに精子への様々な影響が指摘されているが、動物種を超えた基礎研究が重要であることを実際の臨床で裏付ける結果ともなった。細菌性精液症例における男性に対する抗菌剤治療法は当院でも試験的に行われているに過ぎず、今後多くの研究成果が蓄積統合されて正しい解釈が確立されていくことが求められる。

ポスター演題

P-1

フリーラジカル解析装置を用いた生殖医療における酸化ストレスの検討

鍋田 基生、大内 茉湖、松本 綾香、長谷川 麻理、坂井 和貴、須賀 真美、鶴久森 夏世、兵頭 慎治、伊木 朱有美

つばきウイメンズクリニック

【目的】酸化ストレスは生活習慣病など多くの疾患形成や老化促進と関連しているが、不妊症との関連は明確ではない。近年、血清中の酸化ストレス値(d-ROMs)および抗酸化力値(BAP)が簡便に測定できるようになり、当院でも不妊症患者に対し酸化ストレスの評価を行っている。今回、血清中の酸化ストレスと受精および胚発育との関連について検討した。

【対象と方法】2016年1月21日から2017年12月18日までに当院で採卵を実施した125症例、201周期を対象とした。回収した卵はConventional-IVF(c-IVF)またはICSIを行った。d-ROMs / BAP x 100の値を酸化ストレス度(Oxidation Stress Index : OSI)とし、13.0以下を正常・軽度、13.1~18.0を中等度、18.1以上を強度の酸化ストレス状態と仮定し、それぞれの受精率・初期胚形成率・胚盤胞到達率を比較した。

【結果】OSIが「正常・軽度」、「中等度」、「強度」におけるc-IVFでの正常受精率は各63.6%、59.9%、56.7%、ICSIでは各77.8%、78.4%、78.7%、初期胚形成率は各98.3%、94.7%、95.0%であり、いずれも有意差は認めなかった。胚盤胞到達率は各58.5%、46.9%、45.8%であり、「正常・軽度」に比べ「強度」において有意に低下した。良好胚盤胞到達率は各25.5%、20.7%、15.0%であり、有意差はないもののOSIが高くなるにつれて低下する傾向にあった。

【考察】血清中のOSIが高い2群において、胚盤胞および良好胚盤胞到達率が低下したことから、酸化ストレスと胚発育には関連がある可能性が示唆された。

P-2

ウシ卵子の体外成熟(IVM)におけるIGF-1とアンフィレグリン(AREG)添加がICSI後の胚発生に及ぼす影響

坂本 紘史¹、柴田 夏奈¹、森下 奈美^{1,2}、越知 正憲²、堀内 俊孝¹

¹県立広島大学大学院総合学術研究科、²おち夢クリニック名古屋

【目的】ウシIVM卵子のICSI後の胚盤胞率は、体内成熟卵子と比べ低く、IVMの改善が必要である。これまでに、卵胞発育に関わる成長因子であるIGF-1とEGFの併用は、卵丘細胞・卵子複合体(COCs)の膨潤を促進し、膨潤関連遺伝子とグルコース代謝遺伝子を亢進させ、ICSI後の胚盤胞率を高めることを明らかにした。本研究は、IGF-1とEGF様ペプチド、AREGとの併用添加がICSI後の胚発生に及ぼす影響を調べた。

【方法】[実験1] IGF-1(100 ng/ml)添加IVM培地へのAREG 0、100、200、400 ng/ml添加がCOCsの膨潤スコア、核成熟率、ICSI後の胚発生率に及ぼす影響を調べた。[実験2] IGF-1とAREG(200 ng/ml)の添加がCOCsの膨潤関連遺伝子(*HAS2*、*PTX3*、*TNFAIP6*)とグルコース代謝遺伝子(*PFKP*、*ALDOA*、*ENOL*)の発現に及ぼす影響を調べた。[実験3] IGF-1とAREGの添加がCOCsの受容体遺伝子*IGF1-R*と*EGF-R*の遺伝子発現に及ぼす影響を調べた。

【結果】[実験1] 膨潤スコアは、無添加区と比べ、AREG添加区で有意に高く、200 ng/ml濃度で最も高くなった。核成熟率に有意な差はなく、AREG区の胚盤胞率は有意に高く、200 ng/ml濃度で最も高くなった(19.6 vs. 35.1%)。[実験2] AREG区の膨潤関連遺伝子と*ALDOA*、*ENOL*の遺伝子発現が亢進された。[実験3] IGF-1単独区と比べIGF-1とAREG併用区の*IGF-1R*と*EGFR*の遺伝子発現は高くなった。

【考察】ウシIVMでのIGF-1とAREGの併用添加は、COCsの膨潤、ICSI後の胚発生を促進した。この結果は、AREGとIGF-1はIVM卵子の発生能向上に重要な要因であることを示している。

P-3 妊孕性温存療法における連続的ランダムスタート法

北野 裕子、前沢 忠志、西岡 美喜子、池田 智明

三重大学産科婦人科学教室

【目的】近年がんサバイバーは増加し、若年患者に対する妊孕性温存療法の需要が高まっている。卵子・胚凍結は、がん治療に影響を及ぼさない期間内ですできるだけ貯卵・貯胚が求められる。そこで月経周期に関わらず卵巣刺激を開始できるランダムスタート法に対する期待は高い。当院で連続的にランダムスタート法を行った症例について報告する。

【方法】2017年4月から11月に5例の乳がん患者に対し術後から化学療法までの期間にランダムスタート法により卵子・胚凍結を行った。うち、3症例に連続した2回の調節卵巣刺激を施行した。患者の年齢は平均34.6(32-36)歳、AMHIは平均4.87(3.57-6.44) ng/mlであった。

【結果】刺激開始から採卵までに要した時間は初回で平均10.3(9-12)日で2回目は平均15.6(15-17)日であった。調節卵巣刺激に要した総FSH量は初回が平均900(900-1050)単位、2回目が平均925(900-975)単位であり、総hMG量は初回が平均950(600-1650)単位、2回目が平均2325(1875-2550)単位であった。採卵数や成熟卵子数に差は認めなかった。2回目刺激は、1例は初回採卵後4日目、2例は同10日目で開始した。前者は開始から15日目に採卵決定となったが、後者2例は13日目であった。

【考察】ランダムスタート法を連続した場合、採卵数に影響がないものの2回目は刺激期間の延長や投薬量の増加を認めた。これは卵胞発育までの期間が長くなることが一因と考えられた。2回目の刺激開始時期を遅らせると、投薬期間が短縮する傾向にあった。初回で多数採卵できると黄体嚢胞の影響等で2回目の周期で卵胞発育が遅延する可能性がある。卵巣刺激開始を遅らせることで採卵数を確保しつつ投薬量を減量できる可能性が示唆された。今後の症例の集積で2回目刺激開始の至適時期を模索していきたい。

P-4 ヒト子宮内膜間質細胞における低酸素環境下での代謝経路の網羅的解析

木戸 健陽、坪倉 弘晃、木田 尚子、小林 真以子、村田 紘未、中尾 朋子、岡田 英孝

関西医科大学産科学婦人科学講座

【目的】子宮内膜は、月経のような子宮内膜再生時に低酸素環境となる。このような環境下で子宮内膜細胞が生き抜くメカニズムを解明するには、正常子宮内膜組織を用いたエネルギー産生の代謝経路を網羅的に調べる必要がある。

【方法】ヒト子宮内膜間質細胞(hESC)は、患者の同意のもとに良性疾患に対して行われる子宮摘出術で得られた組織から採取された(N=3)。この研究は、当院での臨床研究倫理委員会で承認済みである。hESCは2%の低酸素下で24時間培養しメタノール固定を行った。その抽出液を使用し、メタボローム解析を行った。

【結果】メタボローム解析により、116の代謝物質を解析した。低酸素環境下において、解糖系内のグルコース6リン酸とフルクトース6リン酸、フルクトース1,6ビスリン酸が有意に上昇していた($p < 0.05$)。またクエン酸回路内のシスアコニット酸やイソクエン酸、クエン酸が低下傾向であった。

【考察】低酸素環境下において、hESCは解糖系を亢進しクエン酸回路を抑制した。子宮内膜間質細胞は、代謝経路の変化により月経期のような環境に適応していると示唆された。また、hESCにおける低酸素環境への適合性の理解は、子宮内膜由来腫瘍の発症メカニズムの解明に寄与すると考えられる。

P-5 PCOSの病態とCNPの関連

バヤソラ¹、中村 智子²、後藤 真紀²、吉川 史隆²、山下 守¹

¹医療法人葵鐘会ベルリサーチセンター、²名古屋大学産婦人科

【目的】卵液中の卵子成熟抑制因子として同定されたCNP(C-typenatriuretic peptide)は、壁在顆粒膜細胞から産生され、卵丘顆粒膜細胞に発現するNPR2受容体に結合し、グアニルシクロアゼ作用によりcGMPを産生することで、減数分裂の停止を維持することが報告されている。生体内では、LHサージ後に急激にCNPが減少し、卵子成熟抑制因子としての機能が果たせなくなることで減数分裂再開が起こると考えられている。さらにマウスを用いた研究では、CNPの初期卵胞の発育促進および顆粒膜細胞の増殖を促進する作用が報告されている。今回我々は、不死化ヒト顆粒膜細胞株HGrC1を用いてCNP発現を誘導する因子の探索と、PCOS病態に及ぼす影響を検討した。

【方法】HGrC1細胞におけるCNPの発現を定量的PCRにより測定した。CNP添加によるHGrC1細胞増殖への影響をBrdUアッセイにて検討した。さらに上記刺激時の細胞増殖能をMTSアッセイで検討し、CNPの関与を検証するため、siRNAによるノックダウンを行った。

【結果】HGrC1細胞におけるCNPの発現は、IGF-1、テストステロン、アンドロゲン、インスリンなどの刺激により有意に増加した。CNPの添加培養によりHGrC1細胞の増殖促進が確認された。PCOS患者卵胞中のインスリン値とCNPの発現が有意相関を示し、PCOS患者卵巣免疫組織染色ではCNPの高発現が認められた。

【考察】卵成熟や卵胞発育に関与するCNPが、ヒト顆粒膜細胞株でのインスリンの誘導、細胞増殖の作用及びPCOS卵巣組織での発現がCNPのPCOSの病態への関与を示唆する可能性が考えられた。

P-6 回復培養後の胚盤胞Gradeによる妊娠率の比較

小熊 惇平、加藤 泰宏、奥原 彩也香、佐藤 渚、小川 奈津、野尻 由香、松浦 大創、野村 昌男、古井 憲司

クリニックママ

【目的】凍結胚を融解後、3時間の回復培養を行った後に胚盤胞が完全に回復または拡張しGrade評価ができる胚と、回復が遅延し収縮してGrade評価できない胚がある。そこで、本検討は融解胚移植時に胚盤胞の回復状態が妊娠に影響するのか比較検討した。

【方法】2015年1月から2017年12月まで、移植時年齢が39歳以下でHRT周期にて単一融解胚移植を行った612周期を対象とした。凍結胚の回復培養は融解後3時間とし、移植直前にGradeの評価を行った。胚の評価が出来た群(以下回復群)と収縮してGradeが判断出来なかった群(収縮中群)のそれぞれG1G2、G3、G4、G5における妊娠率について比較検討を行った。胚の評価はGardner分類で行い、収縮中群のGradeは凍結時のGradeで分類した。

【結果】妊娠率は、回復群でG1G2 38.3% (18/47)、G3 61.5% (59/96)、G4 66.7% (198/297)、G5 72.5% (29/40)、収縮中群でG1G2 27.3% (3/11)、G3 45.0% (9/20)、G4 50.5% (51/101)であった。回復群のG3、G4、G5とG1G2で有意差があった($p < 0.05$)。回復群のG4と収縮中群のG4で有意差があった($p < 0.05$)。

【結論】本検討より、凍結時、融解後にかかわらず胚盤胞のGradeが高くなるにつれて妊娠率が上昇することが示唆された。さらに、Grade 4で完全に回復した胚盤胞と回復が遅延していた胚盤胞の妊娠率に有意差があった。このことから、凍結をする際はGrade3以上の胚盤胞で行い、それに加えて、融解胚移植の際はGrade3以上の完全に回復した胚盤胞を移植することが望ましいと考えられる。今後は凍結時に胚盤胞がGrade3以上になるまで待つ凍結することまた、融解胚移植時に収縮中の胚盤胞は、回復培養時間を延長して胚盤胞がGrade3以上に回復するのを見極めた後に胚移植をすることによって妊娠率が改善するか検討をしていきたい。

P-7 採卵時卵胞径の違いによる胚発生能について

奥原 彩也香、小熊 惇平、加藤 泰宏、佐藤 渚、小川 奈津、野尻 由香、松浦 大創、野村 昌男、古井 憲司

クリニックママ

【目的】小卵胞から採取した卵子の多くは未成熟卵子であるが、その中の一部は成熟した卵子も含まれることが知られている。そこで、採卵時卵胞径別に、大卵胞、中卵胞、小卵胞に分類し、採取できた卵子の採取率、成熟率、未熟率、変性率、受精率、胚盤胞発生率、良好胚盤胞発生率を比較し、今後の採卵時における小卵胞採取の意義を検討した。

【方法】2018年3月～10月に採卵を行った290周期226症例を対象とした。採卵施行時、卵胞径が18 mm以上を大卵胞、12 mm～18 mm未満を中卵胞、12 mm未満を小卵胞とした。各卵胞から得られた卵子に体外受精または顕微授精を施行し、個別に培養し、各群における採取率、成熟率、未熟率、変性率、受精率、胚盤胞発生率、良好胚盤胞発生率を比較した。

【結果】大卵胞・中卵胞・小卵胞各々の採取率は78.4%、69.5%、43.9%、成熟率は75.4%、63.2%、37.1%、未熟率は5.1%、21.7%、51.9%、変性率は19.5%、15.1%、11.0%であった。大卵胞・中卵胞・小卵胞各々の受精率は83.4%、82.7%、75.8%、胚盤胞発生率は50.0%、37.0%、25.6%、良好胚盤胞発生率は40.5%、27.5%、20.9%であった。

【考察】大卵胞から75.4%、中卵胞から63.2%の成熟卵が採取され、小卵胞から採取された卵子も、37.1%が成熟卵であった。小卵胞由来卵子の、正常受精数あたりの胚盤胞発生率、良好胚盤胞発生率は、大卵胞由来卵子に比べ、有意に低い結果となるが、胚盤胞となる卵子も存在していた。よって、小卵胞からも卵子を採取し、培養する意義はあると示唆された。

P-8 反復過剰排卵刺激による卵巣、卵子への影響の検討

森本 篤^{1,2,3}、矢持 隆之²、橋本 周²、福田 愛作³、森本 義晴⁴、柴原 浩章¹

¹兵庫医科大学産科婦人科学講座、²大阪市立大学院医学研究科リプロダクティブサイエンス研究所、

³IVF大阪クリニック、⁴HORACグランフロント大阪クリニック

【目的】体外受精において、多くの場合、挙児までに複数回の卵巣過剰排卵刺激を必要とする。過剰排卵刺激は安全とされているが、OHSSや血栓症を引き起こす可能性がある。また、マウスやヒトにおいて、反復過剰排卵は卵巣組織の酸化ストレスの増大、卵子紡錘体の形態異常、排卵数や卵質の低下、AMHの低下などを導くことが知られている。しかし、反復過剰排卵が卵巣や卵子の機能低下を導く機構は不明である。反復過剰排卵による悪影響を低下させ、刺激への応答性や卵質の低下の軽減が可能となれば、より少ない刺激周期数で多くの良質な卵子を得られると考えられ、早期の妊娠、出産が期待できる。本研究では、複数回の過剰排卵による卵巣や卵子への悪影響を軽減する方法の開発を目的として、マウスに反復過剰排卵刺激を施し、卵巣、卵子への影響を観察した。

【方法】8-9週齢のICRマウスに5IUのPMSGを投与し、48時間後にhCGを投与した。hCG投与後19時間後に25 mgのプロスタグランジンF2 α (PGF2 α)を投与した。PGF2 α 投与12時間後に2回目の刺激を開始し、同投与スケジュールで5回の過剰排卵を行った。対象区は反復過剰排卵区のマウスと同じ週齢の個体に1回のみ過剰排卵刺激を行った。5回目のhCG投与後14-15時間に卵子卵丘細胞複合体を採取した。得られた卵子を体外受精による受精能、発育能の検討、ミトコンドリアの蛍光染色及び画像解析による膜電位の測定に供試した。

【結果】得られた卵子数を計測した結果、平均排卵数は反復過剰排卵により有意に低下した($p < 0.05$)。体外受精を行った結果、受精率、胚発育に差は見られなかった。ミトコンドリア蛍光染色および画像解析を行った結果、反復過剰排卵により卵子ミトコンドリアの膜電位が低下した。

【考察】これらの結果から、反復過剰排卵は卵巣のホルモンへの反応性、及び卵子ミトコンドリア機能を低下させると示唆された。

P-9 採卵あたりの生児獲得率

佐藤 渚、奥原 彩也香、小熊 惇平、加藤 泰宏、小川 奈津、野尻 由香、松浦 大創、野村 昌男、古井 憲司

クリニックママ

【目的】近年、女性の社会進出等により不妊治療患者は高齢化している。女性の高齢化により、卵子の数や質、そして女性の体の問題で妊娠しにくくなることはよく知られている。今回、治療している患者が、どれくらいの採卵回数で生児獲得まで至ることができるのか、患者に治療成績を開示するため調査した。

【対象および方法】2012年1月～2012年12月の間に、当院でCG-rFSH法にて1回目の採卵を施行した186症例を対象に、2018年11月までに生児獲得した症例を調査した。1回目の採卵にて生児獲得に至らなかった症例で、2回目以降の採卵を施行した場合の刺激方法は限定せず、また胚移植の方法も新鮮胚移植・融解胚移植問わなかった。1) 1回目の採卵時の年齢が、A. 30歳未満(n=29)、B. 30-34歳(n=62)、C. 35-39歳(n=61)、D. 40歳以上(n=34)に分けて調査した。2) 年齢は問わず、採卵回数別の生児獲得率を調査した。

【結果】1) 186症例中生児獲得した方は125症例で、A. 93.1%(27/29)、B. 77.4%(48/62)、C. 65.6%(40/61)、D. 29.4%(10/34)であった。2) 生児獲得した125症例の採卵回数別は、採卵1回目が44.6%(83/186)、2回目まででは62.4%(116/186)、3回目まででは65.6%(122/186)、4回目まででは66.7%(124/186)、6回目まででは67.2%(125/186)が生児獲得した。採卵6回目以降で生児獲得した症例は、今回の検討ではなかった。

【結論】今回の調査により、1回目の採卵時の年齢が若いほど生児獲得の可能性が高い事が示された。また、生児獲得した125症例中122例が採卵3回目までであった。今回の調査結果を患者に公開し、納得のいくかたちで治療を進めていけるよう努めたい。

P-10 胎児発育不全による新生児の神経学的障害に対するタダラフィル療法の有効性についての検討

立花 亮太、梅川 孝、田中 博明、田中 佳世、武内 大輝、池田 智明

三重大学大学院医学系研究科産科婦人科学講座

【目的】胎児発育不全(Fetal growth restriction:FGR)は学童期以降の学習障害や精神発達遅延など神経学的障害リスクの増加が指摘されているが、現在有効な治療方法は確立していない。近年FGR治療に、血管拡張により血流を増加させるホスホジエステラーゼ5阻害剤が有効な可能性が示唆された。我々はNOS合成阻害薬であるL-NAMEを用いてFGRモデルマウスを作成し、ホスホジエステラーゼ5阻害剤であるタダラフィルが胎児発育を促進することを確認した(Yoshikawa K et.al.)。しかし、FGRとなった児の学童期以降の神経学的障害リスクが是正されるかは判明していない。本研究ではFGRモデルマウス由来の産仔を用い、タダラフィルがFGR産仔の発達中の脳に与える影響を検討した。

【方法】本研究ではC57BL/6マウスを使用した。妊娠11日に溶媒単独投与群と1 mg/ml L-NAME溶液投与群に分けた。妊娠14日にL-NAME溶液投与群をL-NAME溶液の投与を継続する群と0.08 mg/mlタダラフィル溶液単独投与群に分け、妊娠17日に各群半分を犠牲剖検し、胎盤を採取した。残りは自然分娩させ、仔を生後15日と生後30日に犠牲剖検し、脳を採取した。胎盤は低酸素マーカーであるHIF2 α の免疫組織化学染色を行った。脳はHIF2 α に加え、GFAP、MBP、シナプトフィジンの蛍光免疫染色を行った。

【結果】FGRに対するタダラフィル治療は、胎盤とFGR仔の脳におけるHIF2 α の発現を減少させた。さらに生後15日、生後30日におけるFGR仔のシナプス形成ならびに髄鞘形成を改善した。これらの結果はFGRに対するタダラフィル治療は、胎児成長を促進するだけでなく、出生前の低酸素状態を改善し、FGR仔の発達中の脳への神経保護作用があることを示した。

P-11 精液中の酸化還元電位を測定することで受精率を予測できるか。

高門 千絵¹、田中 晶子¹、佐藤 学¹、中岡 義晴¹、森本 義晴²

¹医療法人三慧会IVFなんばクリニック、²医療法人三慧会HORACグランフロント大阪クリニック

【目的】精子の酸化ストレスは男性不妊症の要因の1つと考えられる。MiOXSYS™ systemは精液中の酸化ストレスを酸化還元電位 (static oxidation reduction potential; sORP)として数値化し、精液中の酸化力と抗酸化力を共に評価できる。これまでに精液中の酸化ストレスと精液所見との関係が調べられており、この機材で簡便に測定ができる。そこで本検討では、MiOXSYS™ systemで測定したsORPのIVF成績との関連を調べ、有用性があるか調べた。

【方法】2017年4月～11月に精液検査およびIVFを行った107症例(132周期)を対象とした。MiOXSYS™ systemにより測定したsORPを総精子濃度/10⁶で割り標準化した値(以下、ORP値)が1.38以上を異常値であると定義した。検討1: 精液検査でORP値の正常群(87症例)と異常群(20症例)に分け、精液所見を比較した。検討2: 両群におけるIVF時の精液所見ならびに正常受精率およびDay3移植可能胚率を後方視的に比較した。

【結果】<検討1>精液検査の結果は禁欲期間が正常群3.4日と比べ、異常群6.7日で長かった。総精子濃度、運動精子濃度は正常群74.0 × 10⁶ cell/mL、43.2 × 10⁶ cell/mLに比べ、異常群43.2 × 10⁶ cell/mL、19.0 × 10⁶ cell/mLで低かった。なお、採精から検査までの時間、精液量、SMIは両群に差がなかった。<検討2>IVF時の精液所見は両群に差がなかった。正常受精率はICSIで低く(79.1% vs. 67.0%)、cIVFで差がなかった。また、両群のDay3移植可能胚率に差はなかった。

【考察】ORP値異常症例では精子濃度が低く、禁欲日数が長いことが明らかとなった。MiOXSYS検査はとくにICSI受精率の予測に有用であることが示唆された。ORP値異常の場合、酸化ダメージを受けた精子の割合が増え、その精子が人為的選択によってICSIに使用される頻度がcIVFよりも高いのかもしれない。

P-12 PGTにおける栄養外胚葉生検の出生児への影響

樽井 千香子¹、宮崎 友佳¹、小林 亮太¹、水野 里志¹、福田 愛作¹、森本 義晴²

¹IVF大阪クリニック、²HORACグランフロント大阪クリニック

【目的】着床前診断(PGT; preimplantation genetic test)は、重篤な遺伝性疾患(PGT-M)または染色体相互転座に起因する習慣性流産(PGT-SR)の患者に日本産科婦人科学会(日産婦)承認のもと実施されている。胚細胞生検はPGTに不可欠な操作であるが、胚細胞の一部を採取するため児への影響が懸念される。しかしながら、その出生児について調査した報告は少ない。そこで本研究は、PGTを実施した児と同期間のART出生児を比較することで、胚細胞生検が出生や出生児に与える影響について検討した。

【方法】2014年1月～2017年12月の間に日産婦承認後に全ゲノム増幅を用いたaCGH法およびNGS法にてPGT-SRを実施し、出生に至った21児(PGT出生児群)を対象とした。出生時体重、身長、在胎日数および先天異常を調査、同一期間に単胎出産に至った1241児(ART出生児群)と比較した。

【結果】出生時の体重、身長、在胎日数および先天異常率は、PGT出生児群で3062.9 ± 472.25 g、48.8 ± 2.55 cm、274.2 ± 12.60日および9.5%(2/21)であり、ART出生児群の3040.5 ± 469.52 g、48.7 ± 2.58 cm、275.1 ± 13.67日および2.4%(30/1241)と比べ、在胎日数は短く、先天異常率は高かった(p < 0.05)。PGT出生児の先天異常は先天型筋強直性ジストロフィーとジュベール症候群であった。

【考察】PGT出生児群の在胎日数が短い要因として、胚細胞生検は胎盤を形成する栄養外胚葉の一部を採取するため、生検による細胞数の減少が胎盤形成に何らかの影響を与え、在胎日数の短縮をきたす可能性が示唆された。一方、確認された先天異常は単一遺伝子疾患であり、胚細胞生検はその原因となり得ない。今後、生検の採取細胞数との関係など継続的な調査を行いたい。

P-13 ARTの安全性の向上を目指した新たな治療システムの研究開発と臨床応用: Microfluidic dishと複数GF添加培養液によるIVC並びに安全性の高いCryoroom vitrification system

水野 仁二¹、乾 裕昭¹、菊地 瑛子¹、野口 香里¹、丹治 百合¹、小堤 千歩¹、込山 真貴子¹、武藤 和也¹、野口 幸子²、北村 直也²、丸本 孝太郎³、田村 みどり⁴

¹乾マタニティクリニック、乾フロンティア生殖医療不妊研究所、²東京慈恵会医科大学、³株式会社ナガヨシ、⁴聖マリアンナ医科大学

【目的】既存の培養法並びにガラス化法は、EpigeneticやDOHA-Dへの影響が懸念される。体内環境に近い培養法と、より安全なガラス化法の開発が急務である。本発表は安全性の向上を目指した革新的ART治療システムの研究開発の経緯と得られた知見の一部を報告する。

【方法及び結果】1. Microfluidic dishと複数GF添加In vivo mimic培養液による培養システム。2004年より東大生産技術研究所と共同でMicrofluidicシステム開発に着手したが、構造が複雑で臨床利用には至らなかった。昨年35 mm dish内にMicrofluidic機能All in ONEのシンプルなMicrofluidic dishを開発し、オリジナル開発複数GF添加培養液(2007年より臨床利用中)を用いたMEAにより良好な胚発育率と産仔生産率、更に4世代繁殖試験にて安全性を確認した。また、次世代シーケンサー解析によりMicrofluidic dish 培養胚はMicrodrop 培養胚よりも遺伝子発現がIn vivo胚に近いことが示唆された。

2. CryoroomとRoomplateによるSafer vitrification system。既存のガラス化デバイスの多くは空気中で受精卵を操作し、VS体積を勘だよりで減量するため乾燥リスクと技量差が懸念される。そこで2009年より自動で極小体積を作製・部屋収容式デバイスの開発を進め、2016年にCryoroomとRoomplateを完成した。遺伝的背景が同一なマウス胚を作成、マイクロアレイ解析にてCryoroomと従来品の遺伝子発現への影響を調べた結果、Cryoroomは従来品に比しDNAのメチル化、複製、修復、組み換えにかかわる遺伝子の発現に影響せず安全性が高いことが判明した(Cryoletters accepted,2019掲載)。2017年1月より臨床利用を開始、552個の胚を保存し、28名の健児が誕生し良好な治療成績が得られている。

【考察】革新的な2つの治療システムの臨床利用により、更なるARTの安全性の向上に寄与するものと推察される。

P-14 生殖補助医療において血栓塞栓症を起こした3症例

西岡 美喜子、前沢 忠志、武内 大輝、北野 裕子、池田 智明

三重大学産科婦人科

【緒言】卵胞ホルモン剤の血栓塞栓症(Thromboembolism: 以下TE)のリスクは広く知られている。しかし生殖補助医療(Assisted reproductive technology: 以下ART)においては卵胞ホルモン剤を日常的に使用しており、特に40歳以上の高齢患者が増加している中でTEのリスクは潜在していると考えられる。今回当院でARTのための卵胞ホルモン剤使用中、使用後にTEを発症した3例を経験したので報告する。

【症例1】45歳。採卵翌日から卵胞ホルモン黄体ホルモン混合剤(ソフィアA配合錠)を内服、内服終了翌日に右片麻痺で脳梗塞を発症し、他院でのMRA検査で左中大脳動脈閉塞を認め、tPA療法を施行された。血管は再開通し、幸い後遺障害なく経過した。経口FXa阻害剤による抗凝固療法中である。精査で卵円孔開存を認め、奇異性脳塞栓症を疑われた。

【症例2】40歳。凍結融解胚移植を予定して卵胞ホルモン剤(ジュリナ)を内服していたが、胚融解後に胚変性したため胚移植は中止となった。消退出血を起こすため卵胞ホルモン黄体ホルモン混合剤(ソフィアA配合錠)を内服した。内服終了3週間後に右下腿腫脹と疼痛が出現し、他院での下肢静脈エコー検査で右膝窩静脈に血栓塞栓を認めた。経口FXa阻害剤による抗凝固療法中である。

【症例3】34歳。31歳時に排卵誘発タイミング療法中に深部静脈血栓塞栓症、肺動脈血栓塞栓症を起こした既往がある。明らかな血栓素因を認めず、TEの再発リスクを説明、了承を得たうえで、ARTを開始した。凍結融解胚移植を予定して卵胞ホルモン剤(エストラーナテープ)を貼付していたところ、肺炎となり入院し、すぐにエストラーナテープを中止した。その10日後、画像検査で深部静脈血栓塞栓症、肺動脈血栓塞栓症を認めた。血栓素因を再度検索したが明らかな異常はなかった。経口FXa阻害剤による抗凝固療法中である。

【結語】3症例いずれも卵胞ホルモン剤が血栓塞栓症の原因と断定できないものの、卵胞ホルモン剤の血栓塞栓症リスクをもう一度検討することが必要と考えられた。

P-15 子宮内膜菲薄症例において子宮動脈抵抗値は上昇する

河邊 麗美、井上 朋子、寺脇 奈緒子、小宮 慎之介、杉山 伸子、浅井 淑子、姫野 隆雄、森本 義晴

HORACグランフロント大阪クリニック

【目的】凍結融解胚移植(FET)治療における子宮内膜厚(EMT)と子宮動脈(Uterine Artery: UA)および放射状動脈(Radial Artery: RA)の血管抵抗値(Resistance Index: RI)が相関するか検討を行った。

【方法】ホルモン補充周期FET予定の患者43名の移植本番周期月経14日目に経腔超音波断層法およびパルスドプラ法にて子宮内膜厚・UA-RIおよびRA-RIを測定した。EMT<8 mm群(n=7)とEMT≥8 mm群(n=36)におけるUA-RIおよびRA-RIの相関について検討した。統計学的解析にはT検定を用いた。

【結果】EMT<8 mm群のUA-RIは 0.86 ± 0.03 、EMT≥8 mm群のUA-RIは 0.81 ± 0.07 であり、EMT<8 mm群のUA-RIは有意に高かった($p < 0.04$)。EMT<8 mm群のRA-RIは 0.67 ± 0.08 、EMT≥8 mm群のRA-RIは 0.69 ± 0.07 であり、EMTとRA-RIは相関しなかった。

【結論】UA-RIを測定する事で骨盤循環不全に伴う子宮内膜菲薄化の指標となりえる事が示唆された。RA-RIは測定箇所によってばらつきがあり、測定方法を再考する必要があると考えられる。今後は月経周期や薬物投与による変化があるかどうか、症例を重ね検討していきたい。

P-16 卵胞液中の抗酸化物質やビタミンの欠乏は体外受精成績に影響を及ぼす

西原 卓志、森本 義晴

HORACグランフロント大阪クリニック

【目的】卵胞液は卵子を取り巻く環境に存在し、卵子の質や胚発生に影響を及ぼす因子を解析するうえで、貴重な情報をもたらすマーカーとして用いられる。近年、活性酸素やビタミンD(VD)がARTの成功率に大きな影響を及ぼす因子の一つであることが明らかとなり、女性生殖との関連についても多くの知見が得られている。そこで本研究では、それら因子の卵胞液中濃度とIVF-ETの成績との相関を調査した。

【方法】検討1では、117症例117周期を対象に、成熟卵胞から得られた卵胞液中の総抗酸化能、総グルタチオン(GSH)、ビタミンC、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)を測定、検討2では、100症例100周期を対象としVDを測定した。それぞれの検討において、年齢、卵成熟率、受精率、良好胚率、胚盤胞到達率、良好胚盤胞率、妊娠との相関を検討した。測定は患者の同意のもとで行われ、当グループの倫理委員会において審査され承認された。

【結果】〈検討1〉受精率は、低率群(75%未満)で高率群と比較し、GSHが有意に低値を示し(0.204 vs. 0.403 μM , $p < 0.05$)、8-OHdGは有意に高値を示した(1.10 vs. 0.88 ng/mL , $p < 0.05$)。良好胚盤胞率は、低率群(40%未満)で高率群と比較し、8-OHdGが有意に高値を示した(0.97 vs. 0.74 ng/mL , $p < 0.05$)。〈検討2〉卵成熟率は、低率群(75%未満)で高率群と比較し、VDが有意に低値を示した(16.6 vs. 20.3 ng/mL , $p < 0.05$)。

【考察】卵胞液中のGSH、8-OHdG、VDの濃度と、卵成熟、受精率や胚発育との相関が確認された。卵胞液中の活性酸素増加やVD欠乏を原因とした不妊発症のプロセスへの関与が示唆されたことから、抗酸化やVDのサプリメントの服用が不妊症の治療戦略の一つとなることが示された。

P-17 Is loss of fertility due to changes in the extracellular environment?

Pilar Ferré Pujol¹、Junko Otsuki^{1,2,3}、Hiroaki Funahashi^{1,2}、Mikiya Nakatsuka^{1,3,4}

¹Assisted Reproductive Technology Center, Okayama University、²Graduate School of Environment and Life Science, Okayama University、³Reproduction Center, Okayama University Hospital、⁴Graduate School of Health Sciences, Okayama University

【目的】 Loss of fertility in women due to old age is a great concern, especially in developed countries. A recent hypothesis suggests that the loss of fertility may be due to changes in the extracellular environment, which could negatively affect oocyte quality. To demonstrate this hypothesis, a preliminary study with ovaries from 18 individuals diagnosed with gender identity disorder, ranging from 21 to 46 years old (mean age \pm SD; 30.1 \pm 7.5 years) was performed.

【方法】 Slices of these ovaries, 5 μ m thick, were prepared for histological analysis by picrosirius red staining (a specific dye for collagen I and III fibers). Then, the mean thickness and density of the outermost part of the ovary, the tunica albuginea (TA) were calculated by computer image analysis. Finally, to assess the effects of the patients' age and of androgenic treatment on the ovaries; the data underwent statistical analysis by Pearson's correlation.

【結果】 The results showed no correlation between the dosage or length of the androgenic treatment and the thickness and density of the TA ($p = 0.76$ and $p = 0.14$, respectively). However, when the age of the donor was analyzed against the aforementioned parameters, a significant positive correlation ($r = 0.52$, $p < 0.05$) was detected between the thickness of the TA and the age of the patient. Furthermore, when its density was assessed, the results indicated the presence of another significant positive correlation ($r = 0.55$, $p < 0.05$) between the age and the TA density. These results indicate that the thickness and density of the TA increase with the age of the patient. More exhaustive histological analysis revealed that the increase in the thickness of the TA seems to be due to fibrotic growth beneath it, causing an increase in the total thickness of the dense connective tissue, whereas in normal ovaries, the thick connective tissue capsule of the TA is generally easily distinguished from the cortical tissue area.

【考察】 In conclusion, we have demonstrated that an increased thickness in the dense connective tissue of the ovarian cortical area is directly correlative with increasing age, but unaffected by the dosage or length of the androgenic treatment received by patients. How the findings in this study might vary in terms of the presence of pre-existing pathologies, such as polycystic ovarian syndrome (PCOS) requires further study in the future.

P-18 マウス子宮上皮におけるGp130は胚着床および脱落膜反応に必須である

並木 貴文¹、寺川 純平³、大黒 多希子³、伊藤 潤哉^{1,2}、柏崎 直巳^{1,2}

¹麻布大学大学院獣医学研究科、²麻布大学獣医学部、³金沢大学学際センター

【目的】 これまでの研究報告から白血病阻止因子(Leukemia inhibitory factor, LIF)遺伝子をノックアウト(*Lif*^{-/-})した雌マウスでは、胚着床不全による不妊の表現型を示した(Stewart *et al.*, 1992)が、その下流シグナルは未だ不明である。さらなる胚着床分子メカニズムを明らかにするために、LIFの受容体であるGp130に着目し、子宮上皮特異的Gp130ノックアウトマウス(*Ltf*^{Cre/+}*Gp130*^{flox/flox}; Gp130 conditional KO: cKO)を作製・解析することで、子宮上皮細胞でのGp130の機能を検討した。

【方法】 子宮上皮特異的にCreリコンビナーゼを発現する*Ltf*^{Cre/+}マウスと*Gp130*^{flox/flox}マウスを交配させGp130 cKOマウスを作製し、妊孕性、免疫染色および人工脱落膜化処置を行った。

【結果】 平均産子数は、対照区マウス(*Gp130*^{flox/flox})の7.2 \pm 0.6匹に対して、Gp130 cKOマウスでは産子は得られなかった。そこで膣栓確認日をD1とし、D5のマウスにChicago Blue Dyeを尾静脈投与することで胚着床の有無を確認したところ、Gp130 cKOマウスでは着床部位が確認されず、子宮灌流を行ったところ脱出胚盤胞が回収された。これらのことからGp130 cKOマウスは、胚着床不全を伴う不妊であることが明らかになった。さらに免疫染色の結果から、子宮内膜上皮細胞でのリン酸化Stat3および間質細胞でのプロゲステロン受容体(PR)の発現が対照区と比較して著しく減少していた。人工脱落膜化処置したところGp130 cKOマウスは、対照区と比較して脱落膜反応は著しく抑制されていた。

【考察】 以上のことから子宮上皮細胞においてGp130は、上皮のStat3リン酸化および間質細胞のPR発現を制御することで、胚着床に関与していることが明らかとなった。

P-19 精子に対する自己抗体が認識する抗原について

長谷川 昭子^{1,2}、北川 集²、柴原 浩章²、塩谷 雅英¹

¹英ウィメンズクリニック、²兵庫医科大学産科婦人科学講座

【目的】哺乳類の精子は、体細胞には存在しない特異抗原を含んでいるが、blood-testis-barrier (BTB) により免疫系から隔離されているため、通常、精子に対する自己抗体が産生されることはない。しかし組織の損傷や加齢のためBTBが破たんすると、自己の精子抗原に対する抗体が産生され、精子の運動を障害して不妊症の原因になることが知られている。一方、精子は半数体の遺伝物質を卵子に運ぶだけではなく、卵子の活性化に必要なPLC ζ や、第一卵割に必要な中心体を持ち込むことが報告されている。これらの分子に自己抗体が付着していた場合、不妊症を発症することが想定される。すなわち抗精子抗体は、原因不明の難治性受精障害や胚発育障害に関与する可能性がある。本研究では生殖に係わる精子抗原を探索する目的で、自己精子に反応するモノクローナル抗体Ts3を樹立し対応抗原の分析を行った。

【方法】Ts3を産生するハイブリドーマは2004年、我々の研究室で加齢雄マウスから樹立し、凍結保存していたものを用いた。本研究ではまずこれを融解して培養し、抗体のisotypeを決定したのち、蛍光抗体法、免疫組織染色、ウェスタンブロット-ECL法、受精阻害試験を用いて解析を行った。

【結果】Ts3抗体のisotypeはIgAであった。マウス精巣上体精子における局在を調べたところ、中片部から尾部にかけて反応した。ヒト射出精子でも同様の反応を示した。マウス雄性生殖組織を用いた免疫組織染色では、精巣上体精子と管腔内上皮に特異的な反応が見られた。ウェスタンブロットでは250kDaに反応を認め、質量分析の結果ミオシン11であることが判明した。また、マウス受精阻害実験では、Ts3を前処理した精子において受精率と胚発育率の低下を認めた。

【考察】本研究では、精子に対する自然発生自己抗体が認識する抗原として、ミオシン11を初めて証明した。この分子は平滑筋と細胞内骨格運動、及びギャップジャンクションの形成に関与するとされるが、いまだ研究例は少ない。受精および胚発育における役割と自己抗体の影響についてさらに研究を進めたい。

P-20 雌雄前核形成動態評価 一出産に至る胚の非侵襲的選別方法一

大月 純子^{1,2}、岩崎 利郎¹、片田 雄也¹、古橋 孝祐¹、塩谷 雅英¹

¹英ウィメンズクリニック、²岡山大学生殖補助医療技術教育研究センター

【目的】着床前染色体異数性診断(PGT-A)にて正常2倍体胚と診断された胚を移植しても妊娠率は60-70%、出産率は50%程度であり、胎盤となる細胞の一部を採取することによって胚が受けるダメージや胎盤形成不全による着床失敗および流産が起こる可能性が否めなない。染色体異数性の異常は減数分裂時に起こることから、受精後から雌雄前核消失(PNMBD)までの事象に着目した動態解析を行い、有益な結果を得たので報告する。

【方法】2013年6月から2016年12月までの期間に英ウィメンズクリニックにてEmbryoScopeを用いたタイムラプス観察を行い、かつ凍結融解単一胚盤胞移植を行った213個(ICSI:112個、IVF:101個)の移植胚の後方視的解析を行った。PNMBD直前の雌雄2前核面積差より、出産有無のcut-off値をROC曲線から算出し、PNMBD直前、4時間前、8時間前の雌雄前核形成過程の動態解析から正常胚の定義を設定した。

【結果】PNMBD直前の雌雄2前核面積差による出産有無のcut-off値はIVF:39.3 (AUC:0.631, CI:0.518-0.745)、ICSI:40.0 (AUC:0.670, CI:0.568-0.771)であった(定義①: PNMBD直前の雌雄2前核面積差:cut-off値↓)。PNMBD 8時間前の段階で雌性前核>雄性前核であった胚(n=15)はすべて出産に至らなかった(定義②: PNMBD8時間前の雌性前核面積<雄性前核面積)。出産に至った接合子の雌雄前核差はPNMBD8時間前から直前まで徐々に狭まっていくのに対し、出産に至らなかった接合子の雌雄前核差はこの8時間の間に狭まらないことが判明した(定義③: PNMBD8時間前の雌雄前核面積差>PNMBD直前の雌雄前核面積差)。これらの結果から、正常胚の定義をICSI: ①②、IVF: ①③②とした場合の出産率は、IVF: 68.1% (47/69)、ICSI: 56.6% (30/53)であった。また、それ以外を異常胚と定義した場合の出産率(偽陰性率)はIVF: 9.3% (3/32)、ICSI: 6.8% (4/59)であった。

【考察】ICSI、IVFともにPGT-Aを勝る可能性のある非侵襲的胚評価法を生み出すことができた(特許申請済)。胚盤胞形成までのアルゴリズム、グレードと組み合わせ、更に精度を上げていきたい。

P-21 ヒト卵胞内容物中白血球の胚発生マーカーとしての応用

石川 孝之^{1,2}、中條 友紀子¹、服部 裕充¹、種村 健太郎²、佐藤 英明²、京野 廣一¹

¹京野アーククリニック、²東北大学大学院農学研究所応用生命科学専攻動物機能科学講座動物生殖科学

【緒論】単排卵哺乳動物の正常排卵では、卵成熟の完了と排卵が同期する。本研究では、排卵が炎症様反応であり、免疫担当細胞が関与する点に着目し、自然周期採卵におけるヒト卵胞内容物中の白血球を解析して、cIVF後の胚発生能力との相関を調べた。

【方法】2008年11月期～2013年6月期に自然周期採卵を行った患者のうち、文書による研究同意を得た35人39周期(平均年齢: 33.5 ± 3.2歳)を対象とした。OPU後、末梢血混入が極微量な周期の卵胞内容物から密度勾配遠心法で白血球を分離、Diff/Quik染色およびPAS染色を施して細胞種を同定・計測した。OPUは卵胞径が17.5 cm以上(2方向平均)に成長した後、GnRHアゴニストの点鼻36時間後に施行した。精子調整はWHOガイドライン(1999)に、cIVFおよび胚培養は、Fauqueらの方法(2008)に準じた。未熟卵および未受精卵を得た周期をA群、受精卵/初期分割胚をB群、胚盤胞をC群、未回収周期はD群に分けて群間の白血球数を比較した。

【結果】7周期がA群、10周期がB群(受精率: 75.0%)、11周期がC群(胚盤胞到達率39.3%)、11周期がD群に分けられた。次に各群の白血球数を比較した結果、C群の平均多核球数が他のいずれの群に比べて有意に高い数値を示し、その主体は好中球であった。(I群: $6.7 \pm 10.0 \times 10^2$ 細胞/卵胞、II群: $23.2 \pm 17.1 \times 10^2$ 、III群: $101.0 \pm 21.8 \times 10^2$ 、D群: $12.0 \pm 11.5 \times 10^2$, $P < 0.001$)。各群の平均卵胞径、患者年齢ならびに末梢エストロゲン濃度には、有意差を認めなかった。

【考察】本研究において、卵胞内容物中の好中球増加が胚盤胞発生能力と相関することが明らかになった。研究結果は好中球の増加がDay3胚移植における新たな胚選択マーカーになる得る事を示している。同時に、好中球の増加を認めぬ周期では、MII期卵母細胞が得られにくい傾向があり、空卵胞症候群など成熟卵が得られぬ周期に対する補完的なマーカーとしての利用法も示唆している。

P-22 卵巣組織移植術における融解卵巣組織内の凍結保護剤遺残に関する安全性の検討

杉下 陽堂^{1,2}、鈴木 由妃¹、柏木 恵¹、古山 紗也子¹、上川 篤志¹、戸澤 晃子^{1,2}、鈴木 直¹

¹聖マリアンナ医科大学産婦人科学、²聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター診断治療開発創薬部門CRS研究室

【目的】悪性腫瘍患者に対する妊孕性温存療法の1つである卵巣組織凍結保存は本邦においても徐々に施行件数が増加しつつある。現在卵巣組織凍結保存における標準的な方法は緩慢凍結法(SF法)であるが、近年どこでも何時でも施行可能となる簡便なガラス化凍結法(VF法)が導入され、VF法による生児獲得の報告があった。VF法では高濃度の凍結保護剤が用いられることから、融解卵巣組織内の凍結保護剤遺残に関する安全性の検証が必要とされていた。一方、卵巣組織移植時に際しては、融解後移植までに要する時間は約120分とされている。そこで本研究ではウシ卵巣を対象にガスクロマトグラフィーにて両法での融解後卵巣組織内における凍結保護剤の遺残に関する解析を行った。

【方法】ウシ卵巣皮質組織(10 × 10 × 1 mm)を作成し、SF法(DMSO 1.5 MおよびPrOH 1.5 M)、VF法(EG 35%)にて卵巣組織凍結を行った。1週間後に凍結卵巣を融解し、融解直後、融解後60分間また120分間の卵巣組織を培養し、ガスクロマトグラフィーにて卵巣組織内における凍結保護剤の遺残濃度を測定した。

【結果】SF法、VF法は融解前それぞれDMSOが $8.77 \pm 0.19\%$ 、PrOHが $7.77 \pm 0.75\%$ 、EGが $27.9 \pm 1.63\%$ であり、融解直後 $0.71 \pm 0.18\%$ 、 $0.66 \pm 0.08\%$ 、 $3.17 \pm 0.13\%$ であった。融解後60分の卵巣培養後 $0.0072 \pm 0.0027\%$ 、 $0.025 \pm 0.012\%$ 、 $0.038 \pm 0.011\%$ 、融解後120分の卵巣培養後 $0.00078 \pm 0.00046\%$ 、 $0.0038 \pm 0.0016\%$ 、 $0.0093 \pm 0.0069\%$ となり、その濃度はほぼゼロとなった。

【考察】凍結卵巣組織融解後卵巣培養ではSF法、VF法いずれの凍結方法においても、120分の卵巣培養を実施することで、凍結保護剤の融解卵巣組織内濃度は単純拡散によって低下することから、VF法による卵巣組織凍結保存の安全性が明らかになった。

学術集会 共催企業(50音順)

神和メディカル株式会社

神戸市灘区原田通3-8-7 TEL: 078-802-3460 FAX: 078-802-3461

富士製薬工業株式会社

東京都千代田区三番町-5-7 精糖会館 6F TEL: 03-3556-3344 FAX: 03-3556-4455

学術集会 協賛企業(50音順)

稲畑産業株式会社

大阪市中央区南船場1-15-14 TEL: 06-6267-6051 FAX: 06-6267-6040

オリジン・ジャパン株式会社

神奈川県横浜市中区日本大通11 横浜情報文化センター4F TEL: 045-319-6580 FAX: 045-319-6581

株式会社AAプロジェクト

石川県金沢市泉が丘2-6-52 TEL: 076-280-3108 FAX: 076-280-3108

株式会社エスアールエル

東京都新宿区西新宿2-1-1 TEL: 03-6279-0900

株式会社北里コーポレーション

静岡県富士市中島81番地 TEL: 0545-65-7122 FAX: 0545-65-7128

株式会社中部メディカル

三重県四日市市松原町33-5 TEL: 059-365-7248 FAX: 059-364-9294

株式会社成茂科学器械研究所

東京都世田谷区南烏山4-27-9 TEL: 03-3308-8233 FAX: 03-3308-2005

株式会社馬場酸素

大阪市福島区鷺洲4-6-26 TEL: 06-6451-5552 FAX: 06-6451-3115

ケン・メディカル株式会社

兵庫県尼崎市南武庫之荘1-22-18 TEL: 06-4962-5060 FAX: 06-4962-5070

システムロード株式会社

東京都中央区新川1-3-3 グリンオーク茅場町 TEL: 03-3553-9812 FAX: 03-3555-0887

GEヘルスケア・ジャパン株式会社

東京都日野市旭が丘4-7-127 TEL: 042-585-5111 FAX: 042-585-5360

ソニーネットワークコミュニケーションズ株式会社

東京都品川区東品川4-12-3 品川シーサイド TSタワー TEL: 03-6714-8700

バイエル薬品株式会社

大阪市北区梅田2-4-9 プリーゼタワー TEL: 06-6133-7000

フェリング・ファーマ株式会社

東京都港区虎ノ門2-3-17 虎ノ門2丁目タワー7F TEL: 03-3596-1105

メルクセローノ株式会社

東京都目黒区下目黒1-8-1 アルコタワー 4F TEL: 03-6756-0800 FAX: 03-6369-8707

持田製薬株式会社

東京都新宿区四谷1-7 TEL: 03-3358-7211

有限会社新生パートナーズ

大阪府高槻市東和町20-1 TEL: 072-628-4520 FAX: 072-675-4748