

氏 名 ・ (本籍)	白澤 弘光 (秋田県)
専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	医博甲第 884 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科 ・ 専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Retrieval and in vitro maturation of human oocytes from ovaries removed during surgery for endometrial carcinoma: a novel strategy for human oocyte research (子宮体癌手術時の摘出卵巣を用いたヒト卵子回収及び体外成熟培養: ヒト卵子研究における新たな手法)
論文審査委員	(主査) 教授 南谷 佳弘 (副査) 教授 大森 泰文 教授 妹尾 春樹

学 位 論 文 内 容 要 旨

論 文 題 目 Retrieval and in vitro maturation of human oocytes from ovaries removed during surgery for endometrial carcinoma: a novel strategy for human oocyte research

(論文題目の和訳) 子宮体癌手術時の摘出卵巣を用いたヒト卵子回収及び体外成熟培養: ヒト卵子研究における新たな手法

申請者氏名 白澤弘光

研 究 目 的

ヒト個体加齢により妊娠率が低下することは広く知られている。これには卵子の質の低下が想定されている。しかし、なぜ加齢により卵子の質が低下するかということにおいて、ヒトではその詳細が未だ明らかになっていない。研究目的にヒト卵子を得ることは各国の指針で異なるが、多くの場合において倫理的な面から研究目的に各年齢層のヒト卵子を十分に得ることは難しいのが実情である。そのため、卵子研究においてはマウスなど非ヒト卵子を用いたものが多い。しかし、ヒト卵子と非ヒト卵子では微小管、中心体などの細胞骨格に違いがあるため、非ヒト卵子の知見をそのままヒト卵子に置き換えることはできない。そのためヒト卵子を用いた研究が不可欠であり、ヒト卵子の確保が課題となっている。

2004年にRevelらは子宮体癌患者の摘出卵巣から未成熟卵子を回収し、体外成熟培養を行った症例報告を報告した。われわれは研究目的に各年齢層のヒト卵子を得る手法としてこの手法に着目した。今回の我々の報告は、ホルモン非刺激下に施行した子宮体癌手術時の摘出卵巣から、30代、40代の複数の患者において、子宮体癌手術時の摘出卵巣からヒト卵子の回収及び体外成熟培養を施行した、初めての報告である。

研 究 方 法

対象患者は35歳から44歳までの子宮体癌IA期の患者8人であり、文書による同意、大学病院における倫理委員会の承認を得て研究を施行した。ホルモン投与による卵巣刺激は行わず、月経周期を考慮せずに手術日程を決定している。

開腹後に速やかに両側卵巣を摘出し、研究室に卵巣を移送後、ランダムに片側卵巣あたり約15カ所穿刺して卵胞液を回収した。顕微鏡下に卵子を回収し、体外成熟培養を施行した。血清、卵胞刺激ホルモンを添加したM199メディウムを用いて24~48時間体外成熟培養を施行した。体外成熟培養を施行後に24時間、48時間の時点で極体の放出有無を観察した。極体放出時、もしくは48時間の体外成熟培養後に卵子の固定を施行した。

卵子固定後は微小管および染色体に対して蛍光免疫染色を施行し、卵子の成熟ステージの確認及び紡錘体の形態観察を行った。

回収卵子個数、紡錘体の形態に関して30代患者、40代患者における比較を行った。

研 究 成 績

8症例から計87個の未成熟卵子を回収した。1患者あたり平均10.9個の卵子を回収した。内訳としては30代患者3名から65個、40代患者5名から22個であった。患者あたりの平均卵子回収個数は30代患者21.7個、40代患者4.4個であり、30代患者で有意に回収個数が多い結果となった。

体外成熟培養の結果は、微小管、染色体に対して蛍光免疫染色を施行し確認した。87個に対し体外成熟培養を施行し、germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD)が23個、metaphase I (MI)が17個、metaphase II (MII)が11個、分類不能が31個であった。MIIの卵子は全て30代の2症例から回収した卵子であった。今回の体外成熟培養におけるMII到達率は12.6%であった。

体外成熟培養後における、蛍光免疫染色による紡錘体の形態観察結果としては、正常な紡錘体形態を取る卵子のほか、様々な配列異常を認める紡錘体が認められた。

結 論

ヒト卵子研究において、研究マテリアルとしてヒト卵子を得る際のハードルは高い。その中で、ヒト卵子の加齢性変化において、減数分裂過程は重要な影響を与えるためGVからMIIまでの様々なステージの卵子を得ることが求められている。今回の我々の手法によって、30代から40代の各年齢層においてGVからMIIの卵子が回収可能であることが明らかになった。今後この手法を用いることで、卵子の加齢性変化、異数性発生機序に重要なコヒーシン蛋白などの蛋白に対し、各年齢層における発現量変化などの検討が可能になる。

また、ホルモン非刺激下に施行した、子宮体癌手術時における摘出卵巣からの卵子回収個数において、患者の年齢に依存して卵子回収個数が異なることを初めて明らかにした。今後の悪性腫瘍患者における妊孕性温存方法の選択を考慮する上で、重要な知見が得られた。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 南谷 佳弘

申請者： 白澤 弘光

論文題名：Retrieval and in vitro maturation of human oocytes from ovaries removed during surgery for endometrial carcinoma: a novel strategy for human oocyte research（子宮体癌手術時の摘出卵巣を用いたヒト卵子回収及び体外成熟培養：ヒト卵子研究における新たな手法）

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、ヒト卵子の研究を行う際のマテリアル確保を目的に、子宮体癌 IA 期患者の手術時の摘出卵巣から卵子を回収する手法を検討したものである。35 歳から 44 歳の患者 8 症例に対して、手術時に摘出した卵巣から速やかに 15～20 ヶ所穿刺を行い、卵胞液を採取後に未成熟卵子を回収している。回収した卵子は体外成熟培養を 24～48 時間施行し、その後に卵子の固定および微小管、染色体に対し蛍光免疫染色を行い、卵子の成熟ステージの確認と、紡錘体の形態評価を、患者の年齢層を考慮して検討している。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

卵子の老化など、卵子の質について評価する際には、研究目的にヒト卵子を得ることが不可欠である。しかし、ヒト卵子の確保は国内外を通して困難であり、ヒト卵子を用いた研究が進んでいないのが実情である。著者らは 2004 年

に 43 歳の子宮体癌患者の摘出卵巣から卵子を回収したという、海外の症例報告に着目した。本研究の斬新性は、35 歳から 44 歳までの各年齢層の複数の患者において、卵子回収個数、体外成熟培養結果、蛍光免疫染色結果の検討を行い、年齢層によってこれらの結果に差を認めることを初めて見出したことにある。

2) 重要性

近年の晩婚化に伴い、国内外を通して挙児希望の年齢が上昇している。今後「卵子老化」など、卵子の質に関わる研究をヒト卵子で進めていくことが重要である。著者らは各年齢層の子宮体癌患者の摘出卵巣から、1～26 個の卵子回収が可能であり、また第 2 減数分裂まで各ステージの卵子まで成熟させることが可能であることを示している。倫理的な問題をクリアした上で、安定した卵子確保につながる知見を示しており、今後のヒト卵子研究を行う上で、この意義は大きい。

3) 研究方法の正確性

ヒト卵子の回収および体外成熟培養の方法は、国外で過去に報告された方法を用いている。また、卵子の固定方法、微小管、染色体の蛍光免疫染色方法は、すでに著者らのグループが報告した方法を用いている。また、卵子の体外成熟培養の結果については、蛍光免疫染色を行い、紡錘体の形態からステージを決定しており、客観的な評価方法で、正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

これまでヒト卵子を研究目的に確保する際の問題点の解決法、つまり各年齢層から卵子を倫理的な問題をクリアした上で確保する手法として、研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。