

様式4（公表用）

氏名	鎌田 久美子
博士の専攻分野の名称	博士（生命工学）
学位記番号	医工農甲 第68号
学位授与年月日	令和3年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	統合応用生命科学専攻
学位論文題目	極少数ヒト精子およびヒト精巣がん患者の精巣組織の凍結保存を可能にするための新規凍結コンテナーおよびプロトコルの開発と臨床応用
論文審査委員	主査 教授 若山 照彦
	教授 岸上 哲士
	教授 黒澤 尋
	教授 幸田 尚

学位論文内容の要旨

WHOによると不妊原因に男性因子が関係しているのは、全体の50%である。しかしながら、ヒト生殖補助医療（Assisted Reproduction Technology: ART）において、女性側への治療技術の進歩、卵子や胚培養方法などの技術の向上は目覚ましいが、男性側、精子の取り扱いについてはこの30年ほとんど技術が変わっていない現状が挙げられる。我が国のARTにおいては、精子数が少ないために顕微授精の割合が年々増加している。そこで、極少数の精子を確実に凍結融解できるコンテナーの開発と凍結融解の方法が必要であると考えた。また、精巣がん患者は日本においても世界的にも、射出精液の凍結が勧められているのが、現状である。その理由には、精巣組織凍結は研究段階であるからである。そこで、マウスおよびヒト精巣がん患者の精巣組織凍結方法の開発に取り組んだ。

第一章 極少数ヒト精子の凍結保存を可能にするための新規凍結コンテナーおよびプロトコルの開発

極少数の精子の患者に対しても、健常男性の精子と同様の凍結融解方法が用いられ、融解後に凍結液を洗浄する過程で、極少数の患者精子の多くが失われている。ヒト精子の凍結融解の従来法は、1.8mlのクライオチューブで200 μ L~1mLの精子凍結液に精子を混和させ凍結し、解凍は6mLの精子用の培養液に精子凍結液を混和させ、遠心処置を行い、沈殿

様式 4 (公表用)

した精子を回収する。この過程で精子が約 20～30%失われてしまう。大量の精子を有する患者であれば、凍結融解の過程で精子数が減少しても顕微授精や体外受精に使用可能だが、極少数の精子を有する患者の場合は、精子を失えば治療が不可能になる。開発した「MAYU」での精子凍結は、恒温槽を使用せず、倒立顕微鏡下で精子をガラスキャピラリーで吸引し、培養液のドロップで洗浄するため大量の洗浄液用の培養液も、遠心処置も必要がない。「MAYU」のヒトへの臨床応用を目指し、マウスで基礎実験を行った。「MAYU」で凍結したマウス精子の体外発生能力および産仔発生能力を確認し、ヒトの精子においても「MAYU」で凍結融解を行った。

結論として、1) 極少数のヒト精子 11 名の精子を「MAYU」と「クライオトップ」という卵子や胚の凍結デバイスで、凍結融解の比較を行ったところ、「MAYU」では 96.7%の精子が回収できたのに対して、「クライオトップ」では 21.2%であり、有意に「MAYU」の融解後の回収率が高かった($P<0.05$)。2) 凍結融解後の運動率においても、「クライオトップ」が 19.2%であったのに対して、「MAYU」では 35.0%であった。3) マウスにおいて、「MAYU」とマウス精子の凍結の従来法である「ストロー」と新鮮精子を用いて、体外培養実験と産仔率の比較を行った。新鮮精子の受精率は 100%であったのに対して、「MAYU」では 90.3%、「ストロー」では 86.6%であった。胚盤胞発生率では、新鮮精子では 91.9%であったのに対して、「MAYU」では 77.2%、「ストロー」では 80.3%であった。偽妊娠誘起させたレシピエントマウスに胚盤胞移植を行ったところ、新鮮精子の産仔率は 29.8%であったのに対して、「MAYU」では 16.9%、「ストロー」では 17.1%であった。新鮮精子と比較すると「MAYU」および「ストロー」は、受精率、胚盤胞発生率、産仔率ともに有意に低い結果であったが、凍結区である「MAYU」は、従来法の「ストロー」と同等の結果を示した。4) 「MAYU」を使用することにより、極少数の精子凍結方法が「クライオトップ」法よりも高い結果を示し、マウスにおいても健常な産仔が得られ、発育も新鮮精子由来の産仔と変わらなかったという成果を得た。2018 年に商標「MAYU」を登録し、2019 年特許を取得した。

第二章 「ヒト精巣がん患者の精巣組織の凍結保存を可能にするための新規凍結コンテナーおよびプロトコルの開発」

次に「MAYU」の特徴である簡便な凍結方法と底面の透明度の高さを利用して、精巣組織凍結融解方法の確立を目指した。精巣がん患者はがんの進行が早く緊急性が高い場合、すぐに精巣の摘出手術が行われる。そのため、射出精液の凍結保存が間に合わない場合も多い。さらに、精巣がん患者の場合、射出精液中の精子も数が減少し、異常精子が多いことも報告されている。精巣がん患者は、手術後に化学療法や放射線治療が行われるため、患者の精子の造精能力は極度に低下し、精子の DNA の異常が多いことが報告されている。がんを

様式4（公表用）

発症するのは生殖年齢期と重なるため、精子が確保できない状況は、夫婦の子供を望むことを諦めざるを得ない。精巣がん患者は日本のみではなく、海外では特に多く、精巣組織凍結融解方法の確立は、意義のある研究である。

そこで、「MAYU」を用いて、マウスの精巣組織凍結を行った。「MAYU」との比較のため、精巣組織の凍結で汎用されている「クライオチューブ」をコンテナ同士と比較、凍結液として、細胞や組織凍結で使用されている「Cellbanker1」とマウス精子凍結用の「FERTIUP®」の2種類の比較、凍結速度として、「Rapid」と「Slow」の比較、新鮮精巣組織との比較、合計9区の比較を行った。その結果、MAYU-Cellbanker1-Slowが他の7区よりも精子運動率、生存率が高かった。「MAYU」および「Cryotube」、「Cellbanker1」および「FERTIUP®」を「Slow」で凍結融解を行った。4区と新鮮区の精子を使用し、マウス卵子に顕微授精を行い、受精率、体外培養後の発生率、胚移植後の産仔率の比較を行った。「MAYU」を使用して、健全な産仔を得た。さらに、金沢大学の倫理委員会の承認を得て、5名の精巣がん患者の精巣組織凍結を行い、5名全ての患者から融解後に運動精子を得ることができた。「MAYU」による精巣組織凍結は、精巣がん患者の妊孕性温存に寄与するものになると考える。

総括

「MAYU」により、極少数のヒト精子であっても、凍結融解の過程で精子数を減少させることなく凍結保存ができた。また、マウスによる基礎実験で、産仔を得て、健全に発育したことから安全性を確認できた。さらに精巣がん患者の精巣組織の凍結融解にも、「MAYU」を使用し、運動精子を得ることができた。マウス精巣組織の凍結融解においても、産仔を得て、健全に発育したことから安全性を確認できた。「MAYU」は極少数精子の凍結保存だけでなく、精巣組織保存にも有効であると考えられる。

論文審査結果の要旨

本論文は、極少数ヒト精子およびヒト精巣がん患者の精巣組織の凍結保存を可能にするための新規凍結コンテナおよびプロトコルの開発と臨床応用を検討したものである。

第1章では、極少数精子の保存を可能にするための新規コンテナ（MAYU）の開発を試みた。マウスを用いた基礎研究において、MAYUおよび従来法であるストロー法で精子を凍結融解した所、MAYUを用いても精子の凍結保存に影響ないこと、得られた精子から産仔を作出できることを証明した。この結果は、本デバイスが安全であることを示している。続いてヒト精子を用いて極少数の精子を凍結保存し、その回収率を従来法と比較した。その結果、MAYUを用いればすべての個体からほぼすべての極少数精子を回収することが出来、本デバイスの有用性を証明することが出来た。新規開発した、全く新しい概念の精子凍結用コンテナ（MAYU）について、その有効性だけでなく

様式4（公表用）

安全性をマウスおよびヒト精子を使って詳細に調べた点は高く評価できる。また質疑応答で、すでに本コンテナで凍結保存した極少数精子患者から子を作ること的成功したと話しており、臨床応用も実現化されていることが示された。この結果は国際誌である Journal of Reproduction and Development にて第一著者として発表しており、論文作成能力も高いことが示された。

第2章では、精巣ガン患者の精巣組織の凍結保存に対しても本デバイスが利用可能であることを証明することを試みた。マウスを用いた基礎研究では、本デバイスの比較だけでなく、凍結保護剤、凍結速度についても合わせて検討した。その結果、MAYUで精巣組織を凍結した場合の方が、従来法より高い精子の回収率を示し、また産仔の作出成績も高く、本デバイスが精巣組織に対しても有効であることを示すことが出来た。そこで5名の精巣ガン患者から同意を得てヒト精巣組織をMAYUを用いて凍結保存してみた。また同時に凍結保護剤および凍結速度の検討も行った。その結果、5名全員からわずかだが精子を回収することに成功し、MAYUがヒト精巣ガン患者の精巣組織の凍結保存に対しても適していることを証明した。この結果は国際誌へ投稿し、現在再投稿中である。新規開発したコンテナ（MAYU）の新たな使い方を模索し、臨床の現場で役立つ可能性を明確に示した点は評価できる。また臨床応用のための手続き等も確実に行っており、研究者として信頼できることが示された。

最終審査では主査および副査の教員合わせて4名で行い、鎌田氏に対して厳しい質問を多数行った。副査から本研究の要となる「MAYU」の価値について、博士論文中で明確に表現できていない、という指摘を受けた。この点に関しては明確な回答をすることが出来なかったことから、全体的な構成を考える力がまだ不十分であると思われた。しかし、公聴会で受けたいずれの質問に対しても、鎌田氏は的確にこたえることが出来ており、個々の研究に対しては十分に理解していると思われた。

博士論文については、標記の不一致や専門用語の略字が説明なく頻出しており、専門外の読者への配慮が見られなかった。図表のタイトルの表記方法を間違えていた点、および行番号が図表にまで付けられていた点なども指摘された。いずれも重大なミスではないが、すべての指摘を最終稿で修正しておくように指示された。

鎌田氏は本研究には含まれないが、おなじ研究テーマで他にも論文を第一著者として発表しており、また共著論文も多数ある。学会発表も多い。これらのことを総合的に討論した結果、鎌田氏は博士として十分な知識と技術を有しており、今回の成果は鎌田氏へ博士号を授与するのに値するものであると全員が判断した。