

「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」

山梨大学大学院
医工農学総合教育部
博士課程学位論文

2021年3月

鎌田 久美子

目次

表紙	1
目次	2
論文内容の要旨	4
SUMMARY OF DISSERTATION	8
緒論	11
1) はじめに	
2) 我が国の ART における顕微授精の増加	
3) ICSI の成功例と問題点	
4) 極少数の精子の凍結保存	
5) 精巣組織の凍結保存	
第一章 極少数ヒト精子凍結コンテナ「MAYU」の開発	15
第一節 序	15
第二節 材料および方法	16
第三節 結果	17
第四節 考察および結論	18
第二章 MAYU を用いたヒト精子の凍結保存および安全性の確認実験	19
第一節 序	19
第二節 材料および方法	20
1) 対象患者	
2) ヒト精子懸濁液の準備	
3) ヒト精子の凍結融解方法	
4) Cryotop®と MAYU の凍結融解速度の比較	
5) マウス	
6) マウスの採卵方法	
7) マウス精子の凍結融解方法	
8) Hoechst33342 および Propidiumiodide の 2 重蛍光染色による精子細胞膜の	
評価方法	
9) ChromomycinA3 染色による精子 DNA の評価方法	
10) マウス卵子への顕微授精方法	
11) マウス胚の胚移植方法	

12) 統計解析	
第三節 結果	27
第四節 考察および結論	38
第三章 MAYU によるヒト精巣がん患者の精巣凍結融解のプロトコルの開発	41
第一節 序	41
第二節 材料および方法	43
1) 実験動物と倫理審査	
2) MAYU®とクライオチューブの凍結および融解速度の検討	
3) マウスの精巣組織の緩慢および急速凍結と融解方法	
4) マウスの採卵方法	
5) マウス卵子への顕微授精方法	
6) マウス胚の胚移植方法	
7) 対象患者	
8) 精巣がん患者の精巣組織の準備	
9) 精巣がん患者の精巣組織の緩慢凍結と融解方法	
10) マウスおよびヒト精巣がん患者の凍結融解後の精巣内精子の Hoechst33342 および Propidiumiodide の 2 重蛍光染色による精子細胞膜の評価方法	
11) 凍結融解した精巣組織の Caspase-3 染色による評価方法	
12) 統計解析	
第三節 結果	54
第四節 考察および結論	69
総括	74
参考文献	77
関連論文	89
謝辞	90
論文目録	92

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。このような現状の中、1992 年に Carlsen らは 1930 年から 1991 年までに発表された 22 カ国、61 件の論文を収集し、その論文に含まれる 14947 人の男性 (特に選別していない健康な男性または妊孕性があることが確認されている男性) について、平均精子濃度、精液量を調査し報告した。1940 年の $113 \times 10^6/\text{ml}$ から、1990 年の $66 \times 10^6/\text{ml}$ へと 42%有意に減少し、また、精液量は 3.4ml から 2.75ml へと有意に減少していることが示された[1][2]。さらに、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。

現在、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 μL ~1mL の精子凍結液に精子を混和させ、液体窒素蒸気で 5 分静置した後、液体窒素中で凍結する。融解は、恒温槽で 5 分間、クライオチューブを加温し、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、沈殿した精子を回収する。しかしなが

ら、この過程で精子が約 20～30%失われる。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」は液体窒素で保存可能な高伸縮性の素材で作成され、底面の透明度は高く、通常の培養 Dish のように精子を確認でき、1.8mL のクライオチューブに収納できる形状をしている。「MAYU」での精子凍結は、底面に 1～5 μ L の精子凍結液のドロップを作成し、ミネラルオイルで覆う。その後、ヒト精子を、顕微授精用のガラスキャピラリーで移し、液体窒素の蒸気に 5 分間静置し、液体窒素内でクライオチューブに収納し凍結する。融解は 37°C のホットプレート上に 2 分間静置するため、恒温槽を使用しない。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全な産仔が得られ、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。さらに、「Preclinical evaluations of a new cryopreservation container for a limited number of human spermatozoa. K Nakata et al. JRD 2019」も掲載された [3]。

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」をコンテナー同士の比較、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。凍結8区をそ

れぞれ、MAYU-FERTIUP®-Slow (MFS)、MAYU-FERTIUP®-Rapid (MFR)、MAYU-Cellbanker1-Slow (MCS)、MAYU-Cellbanker1-Rapid (MCR)、Cryotube-FERTIUP®-Slow (CFS)、Cryotube-FERTIUP®-Rapid (CFR)、Cryotube-Cellbanker1-Slow (CCS)、Cryotube-Cellbanker1-Rapid (CCR) および新鮮区(Control)とした。Control 区および凍結 8 区の精巣組織凍結融解後の精子運動率、精子生存率を比較した。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。

SUMMARY OF DISSERTATION

TITLE: DEVELOPMENT AND CLINICAL APPLICATION OF A NEW CRYOCONTAINER AND PROTOCOL TO ENABLE CRYOPRESERVATION OF TESTICULAR TISSUE FROM PATIENTS WITH LIMITED NUMBER OF HUMAN SPERM AND HUMAN TESTICULAR CANCER.

According to WHO, male factors are associated with infertility in 50% of all cases. However, in ART (assisted reproductive technology), advances in treatment technology for women and improvements in techniques such as oocyte and embryo culture methods have been remarkable, but the handling of sperm on the technology for male side has not changed for the past 30 years.

Therefore, in 1992 Carlsen et al. were collected 61 papers from 22 countries published between 1930 and 1991, and 14947 men (unselected health) included in the papers. The average sperm concentration and semen volume were investigated and reported (males confirmed to be fertile). It was shown that there was a significant 42% decrease from $113 \times 10^6 / \text{mL}$ in 1940 to $66 \times 10^6 / \text{mL}$ in 1990, and a significant decrease in semen volume from 3.4 mL to 2.75 mL.

Furthermore, in ART in Japan, the rate of ICSI (Intra cytoplasmic sperm injection) is increasing year by year due to the small number of sperms. Therefore, we thought that it was necessary to develop a container that could reliably freeze-thaw a very small number of sperms and a method for freezing and thawing. For patients with a very small number of sperms, the same freeze-thaw method as for healthy male sperms was used, and in the process of washing the frozen solution after thawing, most of the sperms of a very small number of patients are lost. However, about 20-30% sperm was lost during this process.

Patients with a large amount of sperm can be used for ICSI and in vitro fertilization even if the sperm count decreases during the freeze-thaw process, but for patients with a very small number of sperms, treatment is not possible if sperm was lost it will be possible. The developed "MAYU" was made of a highly elastic material that can be stored in liquid nitrogen, has a high transparency on the bottom surface, can confirm sperm like a normal culture dish, and has a shape that can be stored in a 1.8 mL cryotube. For sperm freezing in "MAYU", created a drop of 1-5 μL sperm freezing medium on the bottom and cover with mineral oil. Then, the human sperm were transferred in a glass capillary for ICSI, allowed to place in the vapor of liquid nitrogen for 5 minutes, stored in a cryotube in liquid nitrogen, and frozen. The thawing of "MAYU" was allowed to place on a 37°C hot plate for 2 minutes. Since sperm were aspirated with a glass capillary under an inverted microscope and washed with a drop of culture medium.

Aiming at clinical application of "MAYU" to humans, we conducted basic experiments on mice. The mouse experiment was approved by the Experimental Animal Committee of Toin University of Yokohama.

The in vitro development ability and offspring development ability of mouse sperms frozen with "MAYU" were confirmed, and human sperms were also frozen and thawed with "MAYU".

In conclusion, 1) A comparison of freezing and thawing of 11 sperms of a very small number of human sperms using an egg or embryo freezing device called "MAYU" and "Cryotop[®]" revealed that 96.7% of sperms were found in "MAYU". While it was able to be recovered, it was 21.2% for "Cryotop[®]", and the recovery rate after thawing of "MAYU" was significantly higher ($P < 0.05$). 2) The motility rate after freezing and thawing was also 19.2% for "Cryotop[®]" and 35.0% for "MAYU". 3) In mice, in vitro culture experiments and comparison of sperm birth rate were performed using "MAYU", "Straw" which is a conventional method of freezing mouse sperm, and fresh sperm. The fertilization rate of fresh sperm was 100%, while that of "MAYU" was 90.3% and that of "Straw" was 86.6%. The blastocyst development rate was 91.9% for fresh sperm, 77.2% for "MAYU", and 80.3% for "straw".

When blastocysts were transferred into pseudopregnancy-induced recipient mice, the birth rate was 29.8%, while that of "MAYU" was 16.9% and that of "straw" was 17.1%. Compared with fresh sperm, "MAYU" and "straw" had significantly lower fertilization rate, blastocyst development rate, and offspring rate. The result was equivalent to that. 4) By using "MAYU", a very small number of sperms freezing methods showed higher results than the "Cryotop[®]" method, and healthy offspring were obtained in mice, and the development was also with offspring derived from fresh sperm.

Registered the trademark "MAYU" in 2018 and obtained a patent in 2019. In addition, "Preclinical evaluations of a new cryopreservation container for a limited number of human spermatozoa. K. Nakata et al. JRD 2019" was also published.

Next, we aimed to establish a testicular tissue freezing and thawing method by utilizing the simple freezing method and the high transparency of the bottom surface, which are the characteristics of "MAYU". In addition, it is currently recommended that testicular cancer patients freeze the ejaculated semen both in Japan and around the world. The reason is that testicular tissue freezing is in the research stage. Therefore, we examined on the development of a method for freezing testicular tissue in mouse and human testicular cancer patients.

In patients with testicular cancer, surgery to remove the testicles is performed immediately if the cancer progresses quickly and is highly urgent. Therefore, it is often the case that the cryopreservation of the injected semen is not in time. Furthermore, in the case of testicular cancer patients, it has been reported that the number of sperms in the ejaculated semen was also reduced and the number of abnormal sperms was high. It has been reported that patients with testicular cancer receive chemotherapy and radiation therapy after surgery, resulting in extremely low sperm production ability and many sperm DNA abnormalities.

Since cancer develops at the same time as the reproductive age, the situation where sperm cannot be secured has to give up the desire for the couple's children. The number of testicular cancer patients is particularly high not only in Japan but also overseas, and the establishment of a method for freezing and thawing testicular tissue is a significant study.

Therefore, "MAYU" was used to freeze the testis tissue of mice. This mouse experiment was

approved by the Laboratory Animal Committee of the University of Yamanashi.

For comparison with "MAYU", "Cryotube", which is widely used for freezing testis tissue, is used for comparison between containers, and "Cellbanker 1", which is used for freezing cells and tissues as a freezing solution, and for freezing mouse sperm. Two types of "FERTIUP®" were compared, and as freezing rates, "Rapid" and "Slow" were compared, and fresh testicular tissue was compared, for a total of 9 groups. MAYU-FERTIUP®-Slow (MFS), MAYU-FERTIUP®-Rapid (MFR), MAYU-Cellbanker1-Slow (MCS), MAYU-Cellbanker1-Rapid (MCR), Cryotube-FERTIUP®-Slow (CFS), Cryotube-FERTIUP®-Rapid (CFR), Cryotube-Cellbanker1-Slow (CCS), Cryotube-Cellbanker1-Rapid (CCR) and Fresh (Control). The sperm motility and sperm survival rate after freezing and thawing of testicular tissues in the Control group and the frozen 8 groups were compared. As a result, MAYU-Cellbanker1-Slow had higher sperm motility and survival rate than the other 7 groups. "MAYU", "Cryotube", "Cellbanker 1" and "FERTIUP®" were frozen and thawed with "Slow".

Using sperms from the 4 groups and the fresh group, ICSI were performed on mouse oocytes, and the fertilization rate, the development rate after in vitro culture, and the offspring rate after embryo transfer were compared. Oocytes survival rates after ICSI were significantly lower in the Cryotube-FERTIUP®-Slow group than in the other groups ($P < 0.01$). The development rate of blastocyst was significantly higher with "MAYU" than with cryotubes, regardless of freezing medium types ($P < 0.01$). Two-cell stage embryos from each group were transferred into recipient mice, the control group was significantly higher than all frozen groups in terms of offspring rate ($P < 0.01$). However, the rate of offspring from testicular tissue frozen with "MAYU" was significantly higher than that of the cryotube group ($P < 0.01$). It turned out that using "MAYU" gave birth to healthy offsprings.

Furthermore, with the approval of the Ethics Committee of Kanazawa University, testicular tissue was frozen in 5 testicular cancer patients, and motile sperm could be obtained after thawing from all 5 patients. Testicular tissue freezing by "MAYU" is thought to contribute to fertility preservation in testicular cancer patients.

With "MAYU", even a very small number of human sperms could be cryopreserved without reducing the sperm count during the freeze-thaw process. In addition, in a basic experiment using mice, we were able to confirm the safety from the fact that we obtained offspring and grew up healthy. Furthermore, "MAYU" was used to freeze and thaw the testicular tissue of testicular cancer patients, and motile sperm could be obtained. The safety of freezing and thawing of mouse testis tissue was also confirmed by the fact that the offspring were obtained and developed normally. "MAYU" was considered to be effective not only for cryopreservation of very small number sperms but also for testicular tissue cryopreservation.

緒論

1) はじめに

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。このような現状の中、1992年に Carlsen らは1930年から1991年までに発表された22カ国、61件の論文を収集し、その論文に含まれる14947人の男性 (特に選別していない健康な男性または妊孕性があることが確認されている男性) について、平均精子濃度、精液量を調査し報告した。1940年の $113 \times 10^6/\text{ml}$ から、1990年の $66 \times 10^6/\text{ml}$ へと42%有意に減少し、また、精液量は3.4 ml から2.75 ml へと有意に減少していることが示された [1, 2]。

一般的に、ARTにおいて精子数を増加させるために行われることは、ホルモンの補充による方法とサプリメントの投与が挙げられる。まず、ホルモン補充療法は、精子をつくるために必要な下垂体ホルモンの分泌が少ない「ホルモン分泌異常 (低ゴナドトロピン性精巣機能低下症)」の患者に適用され、効果も認められている [3-7]。また、サプリメントは、造精機能を維持するために抗酸化剤や亜鉛、ビタミン類が処方されるが、ヒトの場合、精子の形成におよそ76日かかるといわれているため、その期間、服用し続ける必要がある [8-10]。

2) 我が国の生殖補助医療 (ART: Assisted Reproduction Technology) における顕微授精の増加

2018年の日本産科婦人科学会の報告 [11] によると、体外受精 (IVF: In Vitro Fertilization) および顕微授精 (ICSI: Intra Cytoplasmic Sperm Injection) の治療総数は、251411 であり、そのうち IVF は 92522 (36.8%)、ICSI は 158859 (63.2%) であり、ICSI の数が IVF よりも上回っている。精子数が少ない患者に行われる ICSI の数は年々、増加している。2018年の ICSI の総数 15133 の内訳を調べてみると、射出精子による ICSI は 12794 (84.5%)、射出精液に精子がみられない場合に行われる精巣内精子による ICSI は 2339 (15.5%) であった。射出精子を使用した ICSI の移植数は 12794、妊娠数と妊娠率は 4487 (18.7%) であり、精巣内精子の場合は、移植数 530、妊娠数と妊娠率は 89 (16.8%) であった。射出精子の出産数と出産率は 3045 (12.7%)、精巣内精子の出産数と出産率は 60 (11.3%) であった [18]。年々増加する ICSI の治療数とその中でも精巣内精子の治療数は、[1, 2] に示したような論文のように、精子数の減少が原因の一つであるかもしれない。国内だけでなく、海外における生殖補助医療 (Assisted reproduction technology: ART) に占める ICSI の治療周期の増加は顕著である [12]。

3) ICSI の成功例と問題点

一般的に精子数が少ない患者に行われている ICSI は、極少数の精子の患者に対して、卵子を受精させるために必須の技術である。この ICSI の技術開発は、動物から始まった。1976年に Uehara らによるハムスターでの成功が最初であり、ウサギ、ウシ、ラットと報告されている [13-16]。ヒトにおいては 1988年に Lanzendorf S により始まり [17]、1992年には Palermo GD らによる ICSI で、初めての挙児が報告された [18]。その後、精巣内精子を用いた ICSI 挙児の報告、凍結精子を用いた顕微授精では初めての挙児の報告がされた [19-23]。精巣内精子の場合、正常形態であり、運動性

も見られる場合は、ICSI 後の受精率は高い [24]。しかし、成熟していない未熟な精子、伸長精子や円形精子の場合には、卵子を活性化させる能力が低いいため、受精率が低くなり、受精したとしても受精卵の発育不全が起こる [25-28]。

4) 極少数の精子の凍結保存

射出精液中に極少数しか精子が得られない患者、あるいは精巣内精子を手術により精巣組織の一部を摘出して得られた患者の場合、その得られた精子はとても貴重な精子である。そのため、いくつかに分けて凍結保存する必要がある。しかしながら、現在は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では精子の約 20~30 %が遠沈管への接着や洗浄で失われてしまう。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受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。

そこで、極少数の精子の凍結方法はいくつか報告されてきた。一つ目は、中身が空になった、卵子の透明帯の中に精子を入れる方法である [29]。アガロースゲルカプセルで凍結保存する方法も報告されている。カプセルに精子を移す際には、培養士がガラスキャピラリーを使って、精子の懸濁液から精子を吸引し、アガロースゲルカプセルの中に精子を入れる。そのゲルカプセルを Cryotop[®]の上に載せ、凍結しなければならない [30]。この方法は特別な技術と 2 つの凍結デバイスを必要とするため、時間と費用がかかる。また、Cryotop[®] は卵子や胚の凍結に使われている[31]が、精子の凍結にも使用されている [32]。そこで、本研究では、ヒト精子専用の極少数精子の凍結保存コンテナ「MAYU」を開発し、Cryotop[®]との比較を行い、マウスにおいては、マウス精子の凍結保存に使用さ

れるストローとヒト精子専用の極少数精子の凍結コンテナーを比較し、有効性と安全性を調べた。

5) 精巣組織凍結保存

「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。精巣がんが早期に発見された場合には、国内、海外でも射出精液の凍結保存が進められている [33]。しかしながら、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。さらに、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 [34-42]。がんを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、海外では特に多いが、精巣組織凍結は確立された技術でなく、研究段階であるため患者には勧められていないのが現状である[43]。このような中、精巣組織凍結融解方法の確立は、意義のある研究である。

第一章 極少数ヒト精子凍結コンテナ「MAYU」の開発

第一節 序

動物の精子の凍結の歴史は古く、1952年に Polge & Rowson が、ドライアイスを使用し凍結保存した牛の凍結保存精子による産仔生産を報告している [44]。凍結保存されたヒト精子からの初めての出産報告は1年遅れて、Bunge and Sherman により1950年に報告された [45]。しかしながら、これらの報告は、多数の精子の凍結保存の方法での成功であり、極少数の精子の凍結保存によるものではない。

近年、極少数の精子の凍結方法はいくつか報告されてきた。一つ目は、中身が空になった、卵子の透明帯の中に精子を入れる方法である [29]。

また、他の方法としてはアガロースゲルカプセルで凍結保存する方法が挙げられる。培養士がガラスキャピラリーを使って、精子の懸濁液から精子を吸引し、アガロースゲルカプセルの中に精子を入れる。そのゲルカプセルを Cryotop[®]の上に載せ、凍結しなければならない [30]。この方法は特別な技術と2つの凍結デバイスを必要とする。新規凍結コンテナの開発のヒントになったのは、顕微授精用の dish の凍結液の drop の中にそのまま精子を入れて、凍結保存と融解することができないだろうか、ということであった。それが、可能となれば、顕微授精もそのままその凍結融解を行ったコンテナ上でできるのではないかと考えた。

そこで、アガロースゲルや Cryotop[®]を使わない、よりシンプルで誰もが簡単に行うことができ、確実に極少数の精子を凍結保存し、融解時にかかる時間や機器類、最小限の培養液のみで行える新規の極少数精子の凍結コンテナの開発を試みた。

第二節 材料および方法

1) 実験 1

以下に実験 1 の内容を示した。まず、図 1-1 の①のように、顕微授精用の dish に凍結液のドロップを作成し、ミネラルオイルで覆い、 -20°C の冷蔵庫に入れた。その後、液体窒素の蒸気に 5 分間静置した後に、液体窒素に浸漬した。融解は、 37°C の温水を入れた dish に浮かべることで行った。

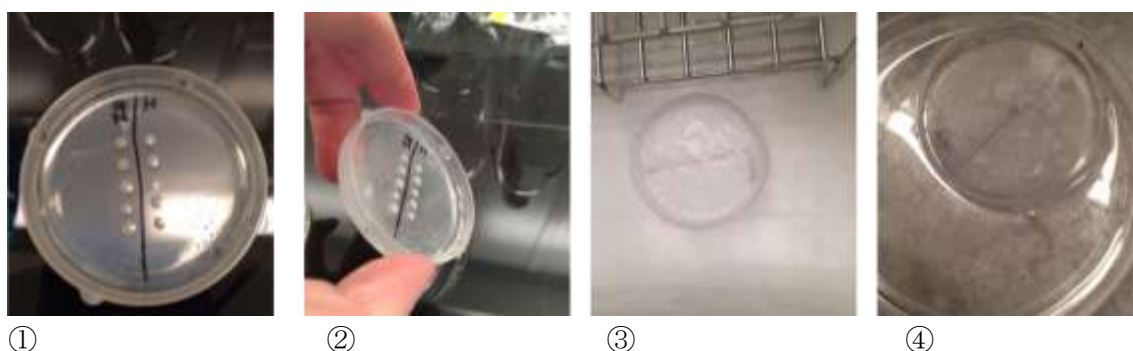


図 1-1. 顕微授精用の dish を用いた凍結融解の予備実験

- ① は 1006 dish (Falcon) に $10\ \mu\text{l}$ の精子凍結液のドロップを作成し、ミネラルオイル (KITAZATO. Co.) で覆い、 -20°C の冷蔵庫に 2 時間静置させた状態
- ② ミネラルオイル凍結され、横にしてもこぼれない様子。
- ③ 液体窒素に浸漬させた状態。
- ④ 温水に凍結した dish を浮かべた状態。

2) 実験 2

実験 2 では図 1-2 に示した新規極少数精子用の凍結コンテナ「MAYU」を使用した。研究用に提供された凍結前の運動性が 50 %以上の 3 名の精子を用いた。MAYU のシート状の部分に凍結液 drop の Volume として 0.1 、 0.3 、 0.5 、 $1\ \mu\text{l}$ を作成し、ミネラルオイルで覆った。その後、各ドロップ 2 個に ICSI 用のガラスキャピラリーで吸引した運動精子を 1 匹ずつ入れた。

第三節 結果

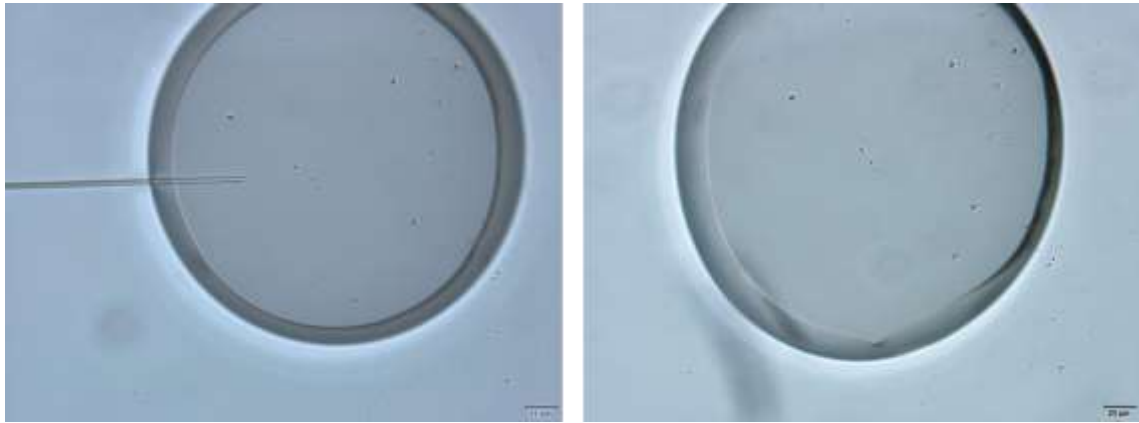
実験 1 の図 1-1 の④を倒立顕微鏡で観察すると、dish に亀裂が入り、ミネラルオイルが染み出すことが分かった。そこで、凍結融解に耐えられる素材であり、なおかつ、精子を凍結するクライオチューブに入る形を検討した。その結果、Polydimethylsioxan (PDMS) という素材が凍結融解に耐えられることがわかり、試作品を株式会社 STREX に作製していただいた。その試作品が以下のものである。MAYU は最終的には図 1-2 のように決まったが、試作品は、底面の厚みを 200 μm 、250 μm 、300 μm 、400 μm として、凍結融解に耐えられ、かつ、精子がクリアに見える厚みを探し、250 μm が最も良いことが分かった。



図 1-2. 新規極少数精子用の凍結コンテナ「MAYU」

(A) MAYU (STREX, Co.) のサイズは縦 30 × 横 10 × 高さ mm である。我々がこのサイズに決めた理由は、1.8 ml のクライオチューブに挿入しやすいからである。

(B) MAYU は PDMS という素材で作られている。高温低温に強く伸縮性に富んだ素材である。また、MAYU の底面は透明であり、顕微鏡下で精子の形態を評価しやすい。



①

②

図 1-3. MAYU で精子を凍結融解した際のヒト精子の様子

① はMAYU 上に作成した精子凍結液に顕微受精用のガラスキャピラリーで移動させたヒト精子の様子

② はMAYU で融解した後のヒト精子の様子

実験 2 では、結果は、すべての凍結ドロップで融解後、精子を回収できた (24/ 24, 100 %)。

第四節 考察および結論

新規の極少数精子の凍結コンテナを作るヒントを得てから、素材は通常の顕微受精のようなポリスチレン系の dish では、ひび割れが起こり、液体窒素に耐えられないということが分かった。PDMS は、伸縮性に富む素材であった上に、凍結にも、オートクレーブにも耐えられる素材であった。しかし、精子を載せる部分のシートの厚さが 250 μm よりも薄い場合には、凍結融解時に破れることがあるため、限界の薄さとして 250 μm とした。シート状の加工も、水をはじかないような表面加工を行っていた。また、400 μm の厚さでは精子が見えにくくなることがわかった。

他施設でこの新規コンテナを紹介に行った際には、ミネラルオイルが凍ることに驚かれたが、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ でも、ミネラルオイルは凍ったため、図 1-1 の②のような状態になった。融解はホットプレート上で行ったが、ミネラルオイルが凍結液よりも早い段階で温まり、液化し始めた。実際に、予備実験を行ったことで、極少数のヒト精子の凍結融解を簡易的かつ短時間であり、培養液の使用量も少なくすることができるメリットを考え、有効性と安全性を調べる実験を第二章から行った。

第二章 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

第一節 序

ヒト精子の初めての凍結保存は Polge らにより 1949 年に報告され [44]、凍結保存されたヒト精子からの初めての出産報告は 1 年遅れて、Bunge and Sherman により 1950 年に報告された [45]。それ以来、ヒト精子の凍結保存を含む生殖補助医療 (Assisted reproduction technology: ART) は発展し続け、現在、精子の凍結保存は ART で一般的に使われている方法である。

さらに、一つの精子を一つの卵子に直接注入する、卵子細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic sperm injection :ICSI) の開発により [18]、重篤な乏無精子症 (severe oligozoospermia) の患者たちからの出産が報告された [46]。最近では、非閉塞性無精子症 (non-obstructive azoospermia) 患者に精巣内精子採取法 (simple-testicular sperm extraction (TESE) and micro-TESE techniques) を行い、32–62 % の患者で精子が得られ、子供を持つことが可能になった [47]。

精子は卵子の採卵が完了し、選別されるまで保存される必要があるが、精子が限られた数しか得られなかった場合には、凍結保存の技術はとても重要である。

通常の精子の凍結方法では、精子は約 0.1-1 ml の凍結液と混和され、その混和液は凍結用のバイアルやストローに移され、液体窒素にて凍結される。保存された精子を回収する際には、液体窒素から取り出し、37°C の温水中にバイアルやストローを入れて融解する。その精子懸濁液は、別の容器に移され、洗浄用の培養液と混和され、遠心分離を行い、運動精子を得る。もし、患者が多数の精子を有していたならば、融解後の最終段階の洗浄を行って、いくらか精子を失っても、十分な数の精子を回収することができる。最終的に、その数の精子があれば顕微授精を行うには十分である。しかしながら、もしこのアプローチがとても数が少ない精子にも使用されるとしたら有効であるとは考えにくい。その理由に、融解後の精子懸濁液を大量の培養液に移し、洗浄後に別のチューブに精子懸濁液を移すことにより、5–10 % の精子が失われる。その結果、ICSI に必要な精子数が十分に得られないこともあ

るからである。

MAYU による精子の凍結融解方法は、凍結融解後の限られた数の精子を別のチューブに移す必要はない。本実験では、ヒトおよびマウスの精子を用いて、新しい凍結コンテナ「MAYU」の有効性と安全性を評価することを目的とした。

第二節 材料および方法

1) 対象患者

山下湘南夢クリニックで体外受精 (In vitro fertilization: IVF) を行った患者から、精子を提供いただいた。10 人は、精子の所見が健常である患者であり、一人は、OAT と診断された患者であった。実験に使用したサンプルの全ての患者の同意を得た。本研究は山下湘南夢クリニックの倫理委員会で承認された。

2) ヒト精子懸濁液の準備

精液のサンプルは3-5日間の禁欲期間を経たのち、患者からマスターベーションにより集められた。精子の所見は世界保健機関 (World Health Organization criteria: WHOの基準) に準じて評価された (2010) [48]。精子懸濁液は、以前報告された内容に沿って準備した [49]。概略して説明すると、精液に、10% Plasma Protein Fraction (PPF; Baxter Healthcare, IL, USA) を添加したCleavage medium (SAGE cleavage medium; Cooper Surgical, CT, USA) を加えて、よく混和させた。その後、そのサンプルを75% と 50% の2層にしたパーコールの上に乗せ、600 gで5分間遠心分離を行った。遠心管に沈殿した精子を回収し、上記と同じ6 mlの培養液によく混和させ、400 gで5分間遠心分離を行った。最終的に、上清を除去し、適度な精子濃度になるように上記の培養液を添加して調整を行った。

3) ヒト精子の凍結融解方法

精子懸濁液を等量の Sperm Freeze Solution (Sperm Freeze solution; Vitrolife k.k., Sweden) に滴下するように添加し、よく混和させた混合液を 10 分間、室温で静置した。52 の精子をガラスピペット (PIN07-20FT, Prime Tech, Ibaraki, Japan) で吸引し、倒立顕微鏡 (IX73, OLYMPUS, Tokyo, Japan) 下で、1 μ l の精子凍結液を Cryotop[®] の先端に滴下し、その中に精子を挿入した (n=10)。Cryotop[®] を液体窒素から 4 cm の位置に 2 分間静置させた。そして、Cryotop[®] を液体窒素内に素早く浸漬させた。

融解の際、凍結した Cryotop[®] を液体窒素から取り出し、2 μ l の 10 % plasma protein fraction (PPF; Baxter Healthcare, IL, USA) を添加した、37°C の Quinn's Advantage[™] cleavage medium (Cooper Surgical, CT, USA) に移した。Cryotop[®] の表面を 2 μ l の同じ培養液で 2 回洗浄し、注意深く確認した [32]。

精子に問題のない患者 10 名からの 44 精子と OAT 患者 1 名からの 16 精子をガラスキャピラリーで吸引し、倒立顕微鏡下で MAYU (STREX, Osaka, Japan) の底面の凍結液のドロップに精子を移した (n=11) (表 2-1)。MAYU を -80 °C のフリーザーに 5 分間静置した。引き続いて、MAYU を液体窒素内でクライオチューブに入れて凍結保存を行った。融解の際は、MAYU を液体窒素から取り出し、2 分間、37 °C のホットプレートに載せた。その後、MAYU を倒立顕微鏡のステージに置き、精子をガラスマイクロピペットで吸引し、10 % の PPF を添加した Quinn's Advantage[™] Medium with HEPES (Cooper Surgical, CT, USA) に精子を移し、よく洗浄した。ヒト精子の融解の際には、Cryotop[®] を使用した際はガラスマイクロピペットを使用しなかったが、MAYU では使用した。

4) Cryotop[®] と MAYU の凍結融解速度の比較

我々は、Cryotop[®] の先端および MAYU の内部に温度測定の電極 (KT-0177C4436; CHINO,

Tokyo, Japan) を固定し、1分間隔で測定を行った (Digital thermometer MC series ;CHINO) (図 2-1)。Cryotop® は、液体窒素の液面から 4cm の位置に 2 分間静置した。次に、Cryotop® を液体窒素の中に浸漬させた [32]。融解は、Cryotop® を液体窒素から取り出し、37 °C の cleavage medium に移し、37 °C に達するまでの時間を測定した。

対照的に、MAYU はまず -80 °C に設定したフリーザー (Program Deep Freezer, STREX, Osaka, Japan) に 5 分静置し、その後、液体窒素に浸漬させる。-80 °C から -196 °C に達するまでの時間を測定した。MAYU の融解は、液体窒素から取り出し、37 °C のホットプレートの上に置いた。-196 °C から 37 °C に達するまでの時間を測定した。

5) マウス

BDF1 と ICR マウス (8-12 週令) は日本クレア (Tokyo, Japan) から購入した。すべてのマウスは、SPF 室 (Specific Pathogen-Free: SPF) で飼育された。マウスには自由給水と自由給餌で水と餌を与え、明期が 8 時から 20 時になるように設定した室内で飼育した。すべてのマウス実験は、桐蔭横浜大学の実験動物委員会で承認 (承認番号 029 - 22) され、実施した。

6) マウスの採卵方法

BDF1 の雌マウスに 7.5 IU の Equine Chorionic Gonadotropin (ECG; Aska Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) を腹腔内に投与後、48 から 50 時間後に、7.5 IU の human chorionic gonadotropin (hCG; Aska Pharmaceuticals) を投与した。採卵前にあらかじめ 35 mm dish (3000-035, IWAKI Science product debt.) に 25 μ l の M16 medium (M7292, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) のドロップを作成し、ミネラルオイル (93621, Mineral Oil Heavy, Kitazato Corp) で覆い、24 時間、37.5 °C、5 % CO₂ に設定したインキュベーターでガス平衡を行った。hCG 投与後、14 から 15 時間

目に、マウスの卵管を摘出した。卵丘細胞卵子複合体を M16 medium 中に回収した。卵丘細胞卵子複合体の入った M16 medium にヒアルロニダーゼ (ART-4007-A; Cooper Surgical) を添加し、インキュベーターで 3 分間、培養した。その後、インキュベーターから 35 mm dish を取り出し、ピペッティングにより、卵丘細胞を除去した。卵子は、顕微授精まで M16 medium に移し、37.5°C、5% CO₂ の条件下のインキュベーターで培養を行った。

7) マウス精子の凍結融解方法

8 週令の BDF1 雄マウスから精子を採取し、MAYU (n=10) とストロー (n=10) で凍結を行った。凍結精子の比較として、非凍結の新鮮精子を別の BDF1 マウスから採取した (n=10)。新鮮精子は使用前まで、37.5°C、5% CO₂ でガス平衡した M16 medium で培養した。精子は 120 µl の sperm-freezing medium (FERTIUP®, KYUDO, Saga, Japan) [50, 51] に拡散させ、37.5°C で 3 分間、室温で静置した。

その精子懸濁液の半分を 10 µl の数本の straw (MY SCIENCES, Tokyo, Japan) に移した。これらのストローを 5 分間、液体窒素蒸気の上に静置し、液体窒素に浸漬して凍結保存を行った[52]。

一方、10 µl の精子懸濁液のドロップを MAYU の底面に作り、200 µl のミネラルオイルで覆った。

- 80 °C に維持したプログラムディープフリーザー (STREX, Osaka, Japan) を使用し、MAYU を 5 分間、フリーザーに置いた。MAYU を液体窒素に浸漬し、液体窒素中でクライオチューブ (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) に入れ、使用まで液体窒素で保存した。

凍結したストローを 37 °C の温水に 10 分間入れて加温し、ストロー内の精子懸濁液を 35 mm dish に滴下したのち、100 µl の M16 medium を添加した。凍結した MAYU は、液体窒素から取り出してすぐに、37 °C のホットプレート上に 2 分間置いた。MAYU の 10 µl の精子懸濁液をピペットで吸

引し、50 μ l の M16 medium に混和させた。融解から10分後に、精子の運動率をストロー区(n=10)とMAYU区 (n= 10) 及び新鮮区 (n = 10) をマクラーチャンバーにて測定した。マクラーチャンバーに10 μ l のそれぞれの精子懸濁液を滴下し、カバーガラスを載せた。

精子数は各5視野以上を計測し、その視野の平均を算出した。その平均精子数は、新鮮区で $47.8 \pm 5.3 \times 10^6$ / ml, ストロー区で $44.1 \pm 12.3 \times 10^6$ / ml, MAYU区では $28.8 \pm 4.6 \times 10^6$ / ml であった。前進運動精子を運動精子とし、非前進運動精子は運動精子から除外した。マウス精子を融解する際は、ストローでは直接 M16 medium に入れた。しかし、MAYUでは、ピペッターにより精子懸濁液をピックアップした。

8) Hoechst33342 および Propidiumiodide の2重蛍光染色による精子細胞膜の評価方法

凍結融解後のストロー区、MAYU区および新鮮区は各区5匹から得られた精子を染色した。精子の染色は Diercks A-K *et al* らの方法に従って、Hoechst 33342 (H1399, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) と propidium iodide (PI) (P3566, Life Technologies) 行った [53]。200 μ l の M16 medium に 0.001mg/ mL of Hoechst 33342 と 0.0001mg/ mL の PI を添加した。各区の精子懸濁液を2種類の染色液が添加された1.5mlのマイクロチューブの M16 medium に混和し、37.5 $^{\circ}$ C で10分間静置した。そののち、それぞれの懸濁液をスライドガラス (S9441, Matsunami Glass, Osaka, Japan) に滴下し、カバーガラスで覆った。各区のスライドガラスを5枚ずつ準備して、オリンパスの蛍光フィルターFUWとFGWを搭載した蛍光顕微鏡 (IX73, OLYMPUS, Tokyo, Japan) で観察をおこなった。各スライドの測定最小数は、100精子とした。

9) ChromomycinA3による精子DNAの評価方法

Chromomycin A3 (CMA3) (C2659, Sigma Aldrich) は、精子DNAのプロタミンに接着する。CMA3は精子のクロマチンのパッケージングの状態を評価し、プロタミンの損傷を間接的に可視化

できるシンプルで有効的な染色方法である。顕微授精後に残った精子を Carnoy's solution (methanol: glacial acetic acid 3:1) に入れ、4 °C で 5 分間の固定を行った。その後、その懸濁液をガラススライド (S9441, Matsunami Glass, Osaka, Japan) に滴下して、カバーガラスで引き延ばし、そのスミアに 200 μ L の CMA3 solution (0.25 mg/ ml CMA3 in McIlvaline buffer, 040-33731, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) を滴下して 20 分間、遮光しながら処置した。そのスライドを PBS で洗った。顕微鏡での解析に、FVW のフィルターを搭載した Olympus Fluorescent microscope (IX73, OLYMPUS, Tokyo, Japan) を使用した。

各スライドで最小数 100 spermatozoa を評価し、精子の染色された色の違いに基づいて測定を行った [54].

10) マウス卵子への顕微授精方法

既に報告があるように、凍結融解後の精子をピエゾマイクロマニピュレーター (Prime Tech, Ibaraki, Japan) に接続したガラスマイクロピペットで卵子に注入した [55]. 6 穴 dish のフタ (Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) を顕微授精の dish として使用した。卵子操作の 5 μ l の M2 medium と Human Serum Albumin (HSA) (5 mg/ ml) (90123, Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) を添加した 10 % polyvinylpyrrolidone (PVP) solution のドロップをいくつか 6 穴 dish の上に滴下し、ミネラルオイルで覆った。

凍結融解した精子を PVP の中に入れた。運動している精子を一つ注入用のピペット (PINU06-20FT, Prime Tech) で捕まえ、数回のピエゾパルスを与えることで、精子の頭部と尾部を切断した。それぞれのマウス精子の頭部を倒立顕微鏡下 (TE2000, NIKON, Tokyo, Japan) で、M2 medium に入れたマウス卵子に注入を行った。精子を注入されたマウス卵子は M2 medium 中に 10 分間静置し、その後、M16 medium に移し、5% CO₂、37.5 °C で 120 時間体外発生培養を行った。

11) マウス胚の胚移植方法

M16 medium で顕微授精させた胚を 120 時間培養し、精管結紮した雄マウスにより偽妊娠誘起させてから 3.5 日目のレシピエントの ICR マウスの子宮に、胚盤胞に到達した胚を移植した。1匹のレシピエントマウスには 5-10 の胚盤胞を移植した。

一般的には、72 時間培養した胚を偽妊娠誘起後 2.5 日目のマウス子宮に移植する。しかしながら、この研究では、体外発生培養した胚が胚盤胞に到達するデータを得なかったため、胚を 120 時間培養して、偽妊娠誘起後 3.5 日目に胚移植を行った。偽妊娠誘起後 19.5 日目に、レシピエントマウスを頸椎脱臼により、屠殺し、レシピエントマウスの子宮内を確認し、生きた胎児がいることを確認した。育て親のマウスを用意し、産仔を育てさせた。産仔の発育を注意深く観察した。

12) 統計解析

それぞれの実験は少なくとも 3 回以上繰り返し行った。得られたデータは、t-test および Chi-squared test により解析を行った。平均値のデータは解析前に arcsine transformation を行った。

第三節 結果

Cryotop[®] と MAYU での凍結融解の温度変化の比較

Cryotop[®] と MAYU の凍結融解温度変化を図 2-1 に示した。Cryotop[®] を液体窒素蒸気に 2 分間暴露し、冷却速度を調べた。冷却速度は、毎秒ごとに $-25.1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低下し、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで急速に温度が低下した。そして、Cryotop[®] を液体窒素に浸漬した。その際の冷却速度は、毎秒ごとに $-100.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低下し、 $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで急速に温度が低下した。

一方、MAYU はまず、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに 5 分間静置した。その冷却速度は、毎秒ごとに $-9.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低下し、 $-83.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで温度が低下した。その後、液体窒素に MAYU を浸漬させた。その冷却速度は、毎秒 $-49.3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低下し、 $-180\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで温度が低下した。融解については、Cryotop[®] は、15 秒で $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ から室温に温度上昇したが、MAYU は 200 秒で $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ に温度上昇した。

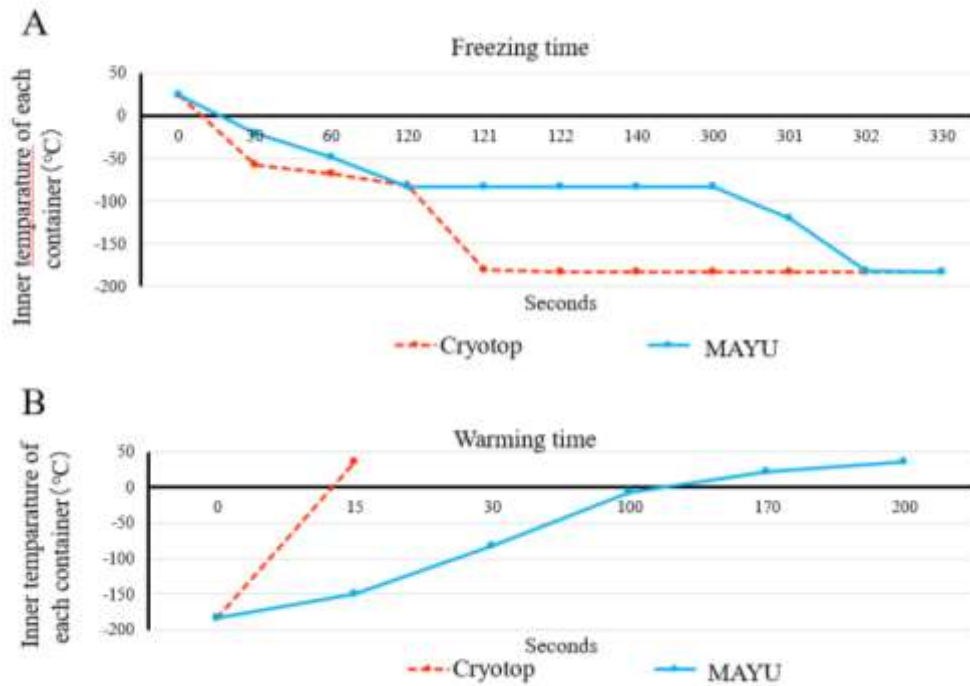


図 2-1. Cryotop[®] と MAYU の凍結および融解速度の比較

(A) に Cryotop[®] と MAYU の冷却速度を示した。Cryotop[®] は、液体窒素の液面から 4 cm のところに 2 分間静置した。その後、液体窒素に浸漬した。MAYU はまず -80 °C のフリーザーに 5 分間静置して、その後、液体窒素に浸漬した。

(B) に Cryotop[®] と MAYU の融解速度を示した。Cryotop[®] は、液体窒素から取り出すとすぐに 37 °C に加温した cleavage medium に入れた。MAYU は、液体窒素から取り出すと 37 °C のホットプレートの上に 2 分間、静置させた。

Cryotop® と MAYU で凍結融解を行ったヒト精子の回収率と運動率の比較

Cryotop® と MAYU で凍結融解を行った 10 名の患者と 1 名の OAT 患者の精子回収率と運動率を表 2-1 に示した。10 名の患者の凍結前の運動率の平均は 79.5 ± 12.1 %であった。Cryotop® での精子の回収率は 21.2 % (11/52) であったのに対して、MAYU では 96.7 % (58/60)であった($P < 0.05$)。さらに、Cryotop® での精子の運動率は 19.2 % (10/52)であったのに対して、MAYU では 35.0 % (21/60)であった($P < 0.05$)。OAT 患者の精子回収率と運動率も調べた。MAYU で 16 の精子を凍結保存した。融解後、14 の精子が回収され 87.5 % (14/16)、運動率は、28.6 % (4/16)であった (表 2-1)。

表 2-1. 健常男性と OAT 患者精子を Cryotop® と MAYU により凍結融解した後の回収率と運動率の比較

No. of patient	Sperm density *	Motility rate of fresh spermatozoa **	Cryotop®			MAYU		
			No. of frozen spermatozoa	No. of found spermatozoa (%)	No. of motility spermatozoa (%)	No. of Frozen spermatozoa	No. of found spermatozoa (%)	No. of motility spermatozoa (%)
Cont1	167	130 (78)	5	3 (60)	2 (66.7)	5	5 (100)	2 (20)
Cont2	73	56 (77)	5	1 (20)	1 (100)	4	4 (100)	2 (20)
Cont3	118	89 (75)	5	0 (0)	0 (0)	4	4 (100)	2 (50)
Cont4	80	71 (89)	5	0 (0)	0 (0)	5	5 (100)	2 (20)
Cont5	251	203 (81)	5	0 (0)	0 (0)	4	4 (100)	1 (25)
Cont6	171	151 (88)	5	2 (20)	2 (100)	3	3 (100)	2 (66.7)
Cont7	25.4	12.0 (47)	5	0 (0)	0 (0)	5	5 (100)	1 (20)
Cont8	19.6	17.9 (91)	5	1 (20)	1 (100)	5	5 (100)	1 (20)
Cont9	173	150 (87)	5	3 (60)	3 (100)	4	4 (100)	2 (50)
Cont10	520	390 (75)	7	1 (14.3)	1 (100)	5	5 (100)	2 (20)
OAT	-	-	-	-	-	16	14 (87.5)	4 (28.6)
	***	****	52	11 (21.2) ^a	10 (19.2)	60	58 (96.7) ^b	21 (35.0)

^{a,b} $P < 0.05$: between values with different superscript letter

*Sperm density $\times 10^6/\text{ml}$

** Motility rate of fresh spermatozoa $\times 10^6/\text{ml}$ (%)

***Average of sperm density \pm SE (No.1-10): 159.8 \pm 138.5

**** Average of motility rate of fresh spermatozoa \pm SE (No.1-10): 126 \pm 105.3 / 79.5 \pm 12.1

表 2-1 に健常男性 10 名と OAT 患者 1 名の Cryotop® と MAYU により凍結融解した後の回収率と運動率の比較を示した。OAT 患者は精子数が限られていたため、MAYU のみでの結果を示した。

凍結融解後のマウス精子の運動性

表 2-2 に示したように、ストローと MAYU で凍結融解したマウスの精子の運動率は、新鮮精子と比較して、有意に低かった (both $P < 0.001$)。さらに、MAYU で凍結融解したマウス精子の運動率は、ストローで凍結したマウス精子よりも有意に運動率が低かった ($P < 0.001$)。

表 2-2. 新鮮および凍結融解したマウス精子の運動率

Conditions of spermatozoa	N	Forward motility after thawing \pm SE (%)
Fresh	3	74.9 \pm 7.2 ^a
Straw	3	20.4 \pm 2.7 ^b
MAYU	3	6.8 \pm 2 ^c

^{a,b,c} $P < 0.001$: between values with different superscript letter

表 2-2 にストローと MAYU で凍結融解を行ったマウス精子の運動率を示した。MAYU での運動率が有意に低い結果を示した。

新鮮精子および凍結融解後の精子細胞膜の正常性

図 2-3A に代表的な Hoechs33342 と PI で染色したマウスの精子の画像を示した。明視野での新鮮区は 935、ストローでは 1073、MAYU では 960、の精子数であった。図 3B に示したように、PI 染色の精子の陽性率は、新鮮区は 23.2 \pm 20.7%、ストローでは 62.6 \pm 26.4%、MAYU では 52.8 \pm 31.0% であった。PI 陽性率は新鮮区と比べて、凍結区の 2 区が有意に低かった (both $P < 0.001$)。しかしながら、PI 陽性率は、ストロー区と MAYU 区の違いは見られなかった ($P = 0.76$)。

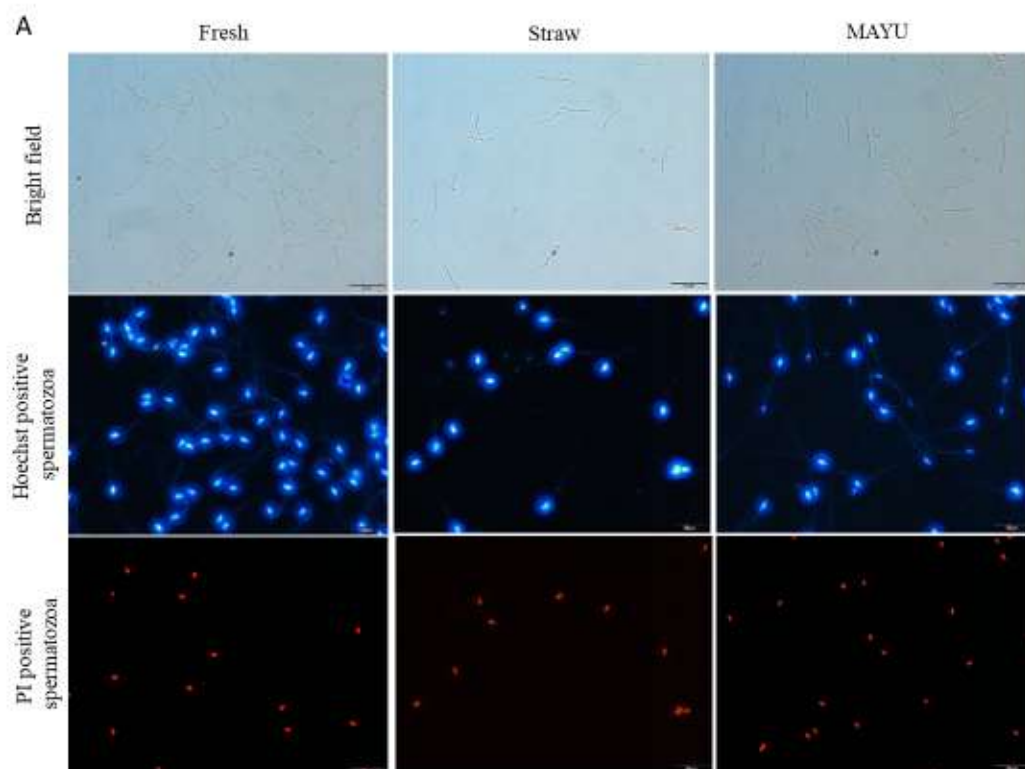


図 2-3A. Hoechst33342 と PI で染色した新鮮および凍結融解したマウス精子

図 2-3A に示したように Hoechst33342 陽性のマウス精子は鮮やかな青色、PI 陽性のマウス精子は鮮やかな赤色に染色された。Bar の長さは 20 μm である。画像は、ストローおよび MAYU で凍結融解したマウス精子、新鮮精子を示した。染色はそれぞれの区で 5 回行った。青色は精子の DNA を示し、赤色は死滅した精子を示した。精子の頭部が青色にだけ染色された精子を生存精子とした。

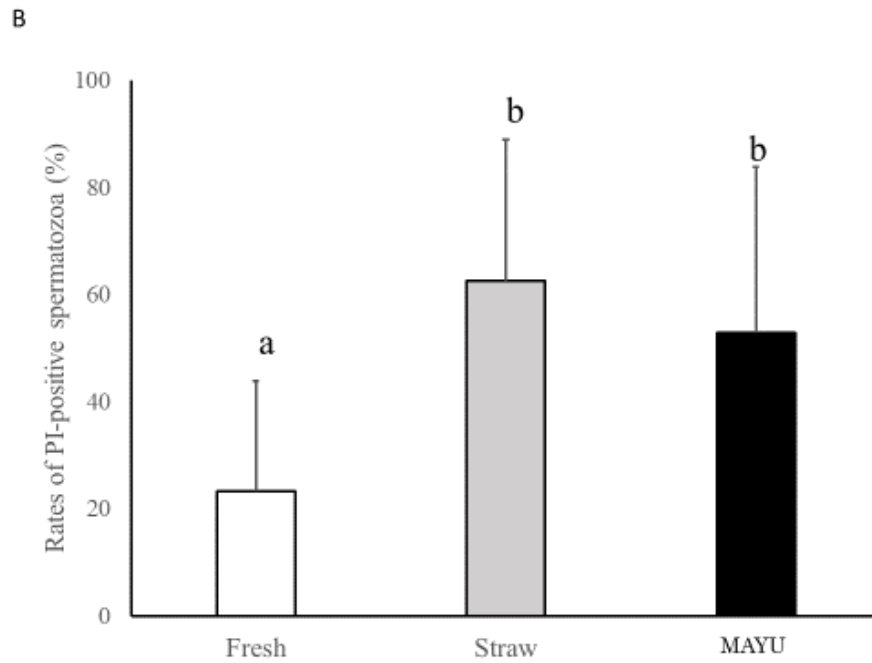


図 2-3B. Hoechst33342 と PI で染色した新鮮および凍結融解したマウス精子

図 2-3B に、ストローおよび MAYU 区の凍結融解後の PI 陽性率と新鮮区の PI 陽性率を示した。凍結融解したストローおよび MAYU の PI 陽性率は新鮮区よりも有意に高いことが示された (both $P < 0.001$)。

凍結融解した精子の DNA の正常性

図 2-4 に、マウス精子を CMA3 で染色した代表的な画像を示した。これらの写真が示すように、新鮮区、ストロー区、MAYU 区に違いは見られなかった。CMA3 染色の結果によると、新鮮精子の CMA3 陽性率は $2.4 \pm 2.1\%$ であった。ストロー区の CMA3 陽性率は $3.3 \pm 5.6\%$ であり、この率は新鮮区と有意な違いは見られなかった ($P = 0.951$)。MAYU 区の CMA3 陽性率は $2.4 \pm 6.4\%$ であり、この率はストロー区とも有意な差は見られず ($P = 0.33$)、新鮮区とも差は見られなかった ($P = 0.461$)。

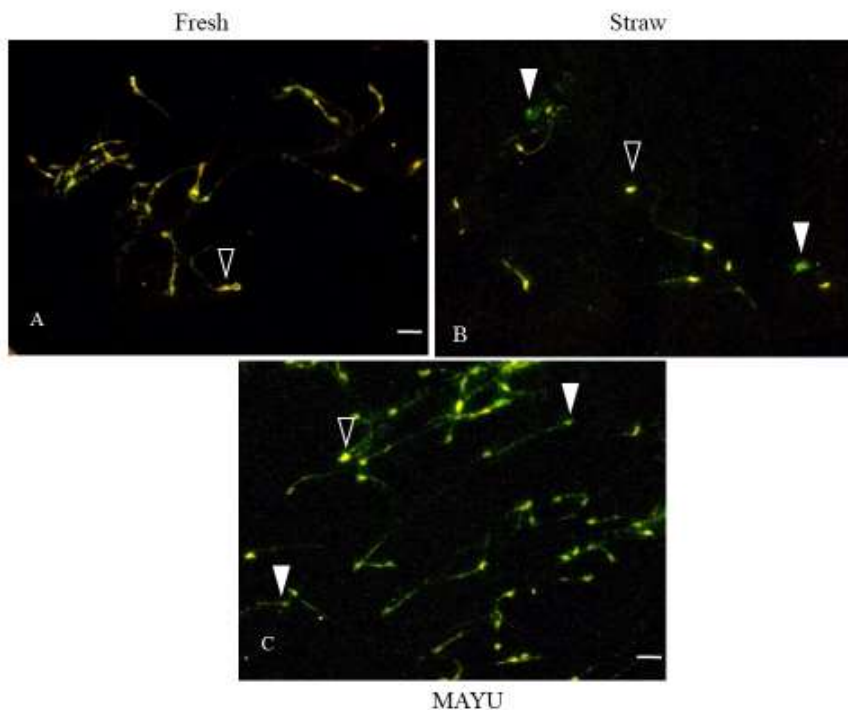


図 2-4. CMA3 で染色した新鮮および凍結融解したマウス精子

CMA3 陽性のマウス精子は緑色に染色されるが、CMA3 陰性の精子は黄色に染色される。Bar の長さは $20 \mu\text{m}$ である。A は新鮮精子、B はストローで凍結融解後の精子、C は MAYU で凍結融解後の精子の画像を示した。3 区の染色はそれぞれ 3 回繰り返した。黄色に染色された精子は核にダメージを受けていないことを示し、緑色に染色された精子は核にダメージを受けていることを示す。緑色に染色された精子の頭部を CMA3 陽性 (Δ)、黄色に染色された精子の頭部を CMA3 陰性 (\blacktriangle) として画像に示した。

凍結融解した精子に由来する胚の体外発生および体内発生

表 2-3 に凍結 2 区 (ストロー区と MAYU 区) および新鮮区のマウス精子をマウス卵子に顕微授精を行った後の受精および胚発生率を示した。ピエゾマイクロマニピュレーターによる ICSI 後、3 つの区で 90%以上の卵子が生存した。分割率は新鮮区で 100% (99/99)、ストロー区で 86.6% (110/127)、MAYU 区で 90.3% (131/145)であった。MAYU 区の分割率はストロー区との間には有意な差は見られなかったが ($P=0.06$)、新鮮区との間に有意な差が見られた ($P<0.05$)。そして、胚盤胞発生率は新鮮区では 91.9% (91/99)、ストロー区では 80.3% (102/127)、MAYU 区では 77.2% (112/145) であった。MAYU 区の胚盤胞発生率はストロー区との間には有意な差は見られなかったが ($P=0.22$)、新鮮区との間に有意な差が見られた ($P<0.05$)。

表 2-3 に、レシピエントマウスの子宮に胚移植を行った結果を示した。胚移植を行った後の産仔率は、新鮮区では 57.4% (27/56)、ストロー区では 23.7% (18/91)、MAYU 区では 29.2% (19/78)であった。凍結 2 区の産仔率は、新鮮区と比較して有意な差がみられた (both $P<0.01$)。しかしながら、ストロー区と MAYU 区の産仔率においては、有意な差はみられなかった ($P=0.28$)。MAYU で凍結融解を行った精子に由来する胚から生まれた産仔は、他の区と同様に正常な形態を示した。

表 2-3 に 3 つの区の産仔および胎盤重量を示した。ストロー区、MAYU 区および新鮮区の産仔の体重はそれぞれ、 1.56 ± 0.17 g ($n=8$)、 1.39 ± 0.28 g ($n=6$)、 1.28 ± 0.25 g ($n=6$)であった。ストロー区の産仔の体重が、他の 2 区と比較して有意な差が見られた (both $P<0.05$)。ストロー区、MAYU 区および新鮮区の胎盤重量はそれぞれ、 0.19 ± 0.02 g ($n=8$)、 0.15 ± 0.02 g ($n=6$)、 0.15 ± 0.03 g ($n=6$)であった。ストロー区の胎盤重量が、他の 2 区と比較して有意な差が見られた (both $P<0.05$)。MAYU で凍結融解を行った精子に由来する産仔は、全て離乳し、全て健常に成長した。図 2-5 に MAYU 由来の産仔の画像を示した。

	Conditions of preservation		
	Fresh	Straw	MAYU
No. of oocytes	110	137	150
No. of (%) oocytes surviving after ICSI	99 (90.0)	127 (92.7)	145 (96.7)
No. (%) of two-cell embryos	99 (100) ^a	110 (86.6) ^b	131 (90.3) ^b
No. (%) of blastocysts	91(91.9) ^c	102 (80.3) ^d	112(77.2) ^d
No. of transferred blastocysts	56	91	78
No. of recipients	5	8	7
No. of implanted (per transferred, %)	27 (57.4) ^e	18 (23.7) ^f	19 (29.2) ^f
No. of offsprings (per transferred, %)	14 (29.8)	13 (17.1)	11 (16.9)
No. of offsprings measured for body and placenta weight *	6	8	6
Average of offspring weight (g)	1.28 ± 0.25 ^g	1.56 ± 0.17 ^h	1.39 ± 0.28 ^g
Average of placenta weight (g)	0.15 ± 0.03 ⁱ	0.19 ± 0.02 ^j	0.15 ± 0.02 ⁱ

表 2-3. 新鮮および凍結融解後の 2 区のマウス精子をマウス卵子に顕微授精を行った後の体外発生および産仔発生状況

^{a-b, c-d} $P < 0.05$: between values with different superscript letter

^{e-f, g-h, i-j} $P < 0.01$: between values with different superscript letter

*一部のレシピエントマウスは自然分娩したが、それらの産仔はレシピエントマウスに食殺されていた。われわれは、帝王切開で生まれた産仔の体重と胎盤重量を測定することができた。そのため、産仔の体重と胎盤重量を測定できた産仔の数が産仔の総数よりも少なくなっている。



図 2-5. MAYU で凍結融解した精子由来の産仔

図 2-5 に MAYU で凍結融解を行った精子に由来する産仔の画像を示した。帝王切開により里親に育てられた産仔は全て離乳し、全て健常に成長した。

第四節 考察および結論

本研究で、我々は MAYU を使用し、その安全性を調べた。すでに報告されているデバイスと違った MAYU の主な利点は、次のことである。1) MAYU のシート状の底面はプラスチックと同様に透明であり、明瞭に観察することが可能であること。2) MAYU の素材は伸縮性に富み、液体窒素に浸漬しても破損しないこと。3) MAYU の形状はクライオチューブに合わせたサイズにしたため、液体窒素内での長期保存が可能であり、特別な凍結保存用のケーンなどを準備する必要がないこと。4) MAYU の素材やシート状の薄さは熱伝導率が高いため、融解を 2 分で行えること。5) MAYU で凍結融解した精子は、ガラスキャピラリーにより顕微鏡下で吸引して確保することが可能であり、別の培養 dish に準備した少量の培養液で直ちに精子を移動させることが可能であること。既存の方法のように大量の培養液を使用せず、遠心処理により、凍結液の成分を洗浄しなくても良いこと、が挙げられる。このような、凍結融解後の洗浄や遠心処理の過程で精子の数は減少し、顕微授精に使用できる精子数がさらに限定されてしまう。MAYU は、特別な技術を必要とせず、極少数の精子を凍結することが可能である。

ヒトの研究での我々の目的は、この MAYU の利便性を評価することであった。我々は、Cryotop[®]と MAYU を使用して、融解後の精子の回収率と運動率を比較した。我々は、Endo らが行ったような Cryotop[®]での凍結融解方法で良好な結果を出すことができなかった [32]。

精子を凍結する前に、まず、Cryotop[®] の先端に精子凍結液のドロップを作成した。ガラスマイクロピペットで吸引した精子 5 つを倒立顕微鏡下で、精子凍結液のドロップに精子を入れた。しかしながら、この際に、精子凍結液の陰影ができ、精子を確認することができなかった。

融解後、とても少ない容量の培養液に Cryotop[®] を入れた。我々は、その中に精子を確認したが、精子を回収することができなかった。卵子や胚の凍結の際には、Cryotop[®] はとても機能的である。なぜならば、卵子や胚は精子よりも大きく、Cryotop[®] の上にあることを確認することも容易いため、卵子や

胚をすばやく融解液の中に入れることができる。しかしながら、精子のような小さなサイズの細胞は、融解する液の中に離すことが難しかった。そして、Cryotop® 上の精子が Cryotop® に張り付くこともあり、回収することが難しかったこともあるかもしれない。

マウス精子の実験では、ストローと MAYU で凍結融解を行った場合に新鮮精子よりも運動率がともに低い結果となった。さらに、MAYU を使ってマウス精子を凍結融解した場合、精子の回収率はストローの半分の率になった。

この理由は、融解後に MAYU からマウス精子をピペットで吸引して回収したことが挙げられる。我々が、極少数のヒト精子を MAYU で凍結する際、ガラスキャピラリーを使って精子を確保し、MAYU のシート状の精子凍結液のドロップに精子を移した。しかしながら、ピペットを使って多数のマウス精子を MAYU で凍結した。多数のマウス精子が MAYU の底面に張り付いて、融解後にピペットで吸引することがとても困難であった。多数のマウス精子の回収率を上げるためには、MAYU でのマウス精子の融解方法を改善する必要がある。

凍結方法の追加の評価としては、MAYU でマウスの精子の運動率および回収率を維持させる必要がある。ストローと MAYU で凍結融解した精子は、精子膜に同様のダメージを受けていた。しかしながら、新鮮精子と凍結融解した精子は、CMA3 染色では核へのダメージに違いは見られなかった。

ICSI 後にすべての卵子が分割し、3 つの区の間で胚の発育スピードや胚の形態に違いは見られなかった。したがって、MAYU で凍結保存した精子は、胚の発育に悪影響を及ぼさなかったと考えられる。

本研究では、胚移植後に 11 匹の産仔が得られた。しかし、MAYU の区で 5 匹の産仔が自然分娩したレシピエントマウスに食殺された。6 匹の産仔は、帝王切開により出産されて生存し、仮親のマウスによって育ち、離乳した。6 匹のマウスは健常に発育した。我々は、5 匹の産仔がレシピエントマウスに食殺された理由は、1 匹のレシピエントから生まれた産仔が少なかったこと、妊娠期間中のケージの床

敷替えがストレスを与えたのではないかと考える。そのため、6匹の産仔は健常に発育したことから、MAYUによる精子の凍結保存は安全だと考える。

結論として、この研究でMAYUの利便性と安全性が確認できた。MAYUは、極少数の精子の取り扱いやすく、凍結融解過程の精子数の減少を最小限にできる。我々の発見は、医療現場での新規の凍結コンテナーとして使用され、極少数の精子の凍結を行う際に役立つだろうと考える。

第三章 MAYU によるヒト精巣がん患者の精巣凍結融解のプロトコルの開発

第一節 序

ヨーロッパ、特に北欧では、精巣がんの発症率は全てのがんの発症率の 1%を占めている。精巣がんの発症率が高いのは 15 から 40 歳である。イギリスでは、その年代の精巣がんの発症率は 90 %だと報告されている [56]。そのため、医師たちは 1996 年から成人の精巣がん患者には、射出された精子の凍結保存を勧めてきた [57, 58]。しかし、精巣がん患者の 6-24 %は無精子症であり、50 %は乏精子症であると報告されている [59, 60]。その理由には、尿道下裂か停留辜丸による精巣がん患者は精子形成が異常であるという報告がある [61]。また、がんのサイズが大きいほど、同側の精巣で精子形成のレベルが減少することに関与するという報告もある [62, 63]。

精巣がん患者はがんを手術で摘出した後、化学療法や放射線治療などのように様々な治療を受けるが、彼らがん患者の妊孕性はいくつかの例で残される状況である。しかしながら、がん患者の生存者は治療から 2 年を経過しても、精子の異数性、DNA のダメージ、異常なクロマチン構造、エピジェネティックな異常などのリスクを抱えることになる [64]。そして、妊孕性の回復には 2 年から 10 年か、それ以上の年数がかかる場合がある。放射線治療で使われる放射線量が無精子症を誘導し、さらに線量が多い場合には回復がさらに遅くなるという報告もある [65, 66]。

さらに、患者が回復したとしても、無精子症や乏精子症になる可能性が高く、パートナーの出産年齢のピークを過ぎてしまうかもしれないという問題もある [67]。

しかしながら、乏精子症の患者では、精巣上体精子や精巣内精子の方が、妊娠率が高いという報告がある [68, 69]。これらの理由から、精巣組織の凍結保存はとても重要であると考えられる。

しかしながら、日本では、限られた数の施設でしか、精巣がんの緊急手術の際に、胚培養士がその場所に存在し、精子を確保することができない。そのような場合では、大概、泌尿器科医師は精巣が

んの精巣から精子を確保するため、精巣がんを摘出して、正常な精巣組織を取り出す oncologic testicular sperm extraction (onco-TESE) を行う。正常な精巣組織をハサミやナイフで細かく刻み、精巣組織の懸濁液と精子の凍結液を混和させて凍結保存を行う [70, 71]。緊急手術の中、このような精子確保の処置を行うことはとても難しい。さらに、その時に精子凍結液は TYB (Tris-yolk-buffer, Kitazato corporation, Japan) が使用されているが、融解後に得られたのは不動精子であったと報告されている。これは、精子の凍結保存方法により精子の質が低下したことが示唆される。そのため、精巣がん患者から正常な精巣組織があったとしたら、その組織を注意深く凍結するか、組織から精子を見つけ出して、極少数の精子を凍結するかになるが、その凍結方法は難しい。

我々は、“MAYU®” (STREX, JAPAN) (図 1C) を開発し、報告した [72]。MAYU®は極少数の精子の凍結融解を可能にした。MAYU® は Polydimethylsiloxane (PDMS) で作製されているため、その底面の厚さは 160 μm でありとても透明度が高く、薄い。MAYU® は、精巣がん患者から得られた極少数の精子の凍結保存も可能である。さらに、MAYU® の底面に精巣の精細管を置き、倒立顕微鏡下で精細管の内部を観察することも可能である。

現在まで、ヒトの精巣組織の凍結保存法はたくさんの報告がある。しかし、それらの大多数が融解後の組織の状態の報告であり、精子の状態ではない [73-79]。さらに、精巣内の精子の凍結方法の効率をあげるために、凍結保護剤の種類、凍結速度が精子の質に影響を与えるかが報告されているが多く報告では凍結するコンテナの比較は行っていない [80]。

本研究では、我々は、精巣組織の凍結保存のために、凍結速度、凍結液、凍結コンテナの比較を行った。さらに、精巣がん患者の精巣組織およびマウス精巣組織を MAYU®で凍結融解を行い、マウス精巣組織から得られた精子で、MAYU® の有効性と安全性を評価することを目的とした。

第二節 材料および方法

1) 実験動物と倫理審査

8-12 週令の BDF1 マウスと ICR mice は、日本クレアから購入した (CLEA, Japan)。すべてのマウスは specific pathogen-free condition (SPF) の条件下で飼育を行った。マウスは自由給水と自由給餌、午前8時から午後8時までが明期になるようにコントロールされた室内で飼育した。実験当日あるいは全ての実験が終了した後は、CO₂ の吸引もしくは頸椎脱臼により、安楽死させた。全ての動物実験は、実験動物の管理と使用に関する指針に従い、山梨大学の実験動物委員会で承認されて行った (承認番号:A29-24)。

2) MAYU®とクライオチューブの凍結および融解速度の検討

我々は、MAYU®およびクライオチューブ(SUMITOMO BAKELITE, Japan) の内部に温度測定用の電極 (KT-0177C4436; CHINO, Tokyo, Japan) を固定した。緩慢凍結の温度を測定するために、測定装置には、Digital thermometer MC series (CHINO)を使用した。MAYU®およびクライオチューブを Bicell (Nihon Freezer, Japan) に入れ、-20 °C のフリーザーに入れた。凍結温度の測定は5分まで1分間隔、その後120分目に行った。その後、MAYU® とクライオチューブを液体窒素の液面から4 cm の場所に5分間静置した。そして、それらを直ちに液体窒素内に浸漬した。

対照として、我々は急速凍結の温度も測定した。MAYU® とクライオチューブを液体窒素の液面から4 cm の場所に5分間静置した。その温度を5分まで1分間隔で測定し、その後直ちに液体窒素内に浸漬した。

MAYU® を液体窒素から取り出し、37 °C のホットプレートの上に置き、10秒間隔で120秒まで測定を行った。クライオチューブは液体窒素から取り出すと37 °C の恒温槽に入れ、その温度をMAYU®と同様に測定した。

3) マウスの精巣組織の緩慢および急速凍結と融解方法

35 匹の 8 週令の BDF1 の雄マウスから精巣組織を取り出し、MAYU[®] とクライオチューブにより凍結を行った。凍結した精巣組織との比較のために、新鮮な精巣を 25 匹の BDF1 の雄マウスから取り出した。

マウスの精巣を生理食塩水に移し、血液を洗浄し、精巣白膜をピンセットではがした。そして、精巣を M2 medium (M7167, Sigma Aldrich, USA) に移し、ハサミで 2-3 mm のサイズになるように切断した。これらの小さな精巣組織を 300 μ l の Cellbanker1 あるいは sperm-freezing medium (FERTIUP[®], KYUDO, Japan) に移し、15 分間室温に静置した。

我々は、100 μ l の Cellbanker1 および FERTIUP[®] を MAYU[®] および cryotube に前もって作成した。細かくした精巣組織を 9 つのグループに分けた: MAYU[®]-FERTIUP[®]-Slow freezing (MFS)、MAYU[®]-FERTIUP[®]-Rapid freezing (MFR)、MAYU[®]-Cellbanker1-Slow freezing (MCS)、MAYU[®]-Cellbanker1-Rapid freezing (MCR)、Cryotube-FERTIUP[®]-Slow freezing (CFS)、Cryotube-FERTIUP[®]-Rapid freezing (CFR)、Cryotube-Cellbanker1-Slow freezing (SCC)、Cryotube-Cellbanker1-Rapid freezing (CCR)、Fresh (Control) (図 3-1. A)。

Slow freezing の group では、マウスの精巣組織を MAYU[®] あるいはクライオチューブを Bicell に入れて、 -20°C で 2 時間静置した。その後、MAYU[®] とクライオチューブを液体窒素の蒸気に 5 分間暴露し、液体窒素に浸漬後、液体窒素内に保管した。

一方で、Rapid freezing の group では、マウスの精巣組織を MAYU[®] あるいはクライオチューブに入れ、液体窒素の蒸気に 5 分間暴露した後、液体窒素内に保管した。

精巣組織を融解する時には、液体窒素から取り出したクライオチューブを直ちに、 37°C の恒温槽に 5 分間入れて加温し、クライオチューブ内に 200 μ l の M2 medium を添加した。液体窒素から取り出した MAYU[®] を 37°C に温めたホットプレート上に 2 分間静置し、200 μ l の M2 medium を添加した。次に精巣組織の細片を 100 μ l の M2 medium を入れた 35 mm dish に移し、5 分間静置した。

精巣組織の一部は10%ホルマリン溶液に入れた。そのほかの精巣組織は23Gの注射針 (NIPRO, Japan) を使って細切し、精子懸濁液は、45 μ m の Cell strainer (Corning, USA)でろ過した。

融解から10分後、マクラーチャンバーを使って、9つのグループの運動率を測定した。精子の運動率の評価方法は、10 μ l の融解した精子懸濁液をマクラーチャンバーに滴下し、カバーガラスを載せた。

精子の数は5視野以上測定し、それぞれの視野の平均を計算した。

精巣の大多数の精子は運動性がないため、頭部と尾部が痙攣したような動きをしている精子を運動精子とした [81]。

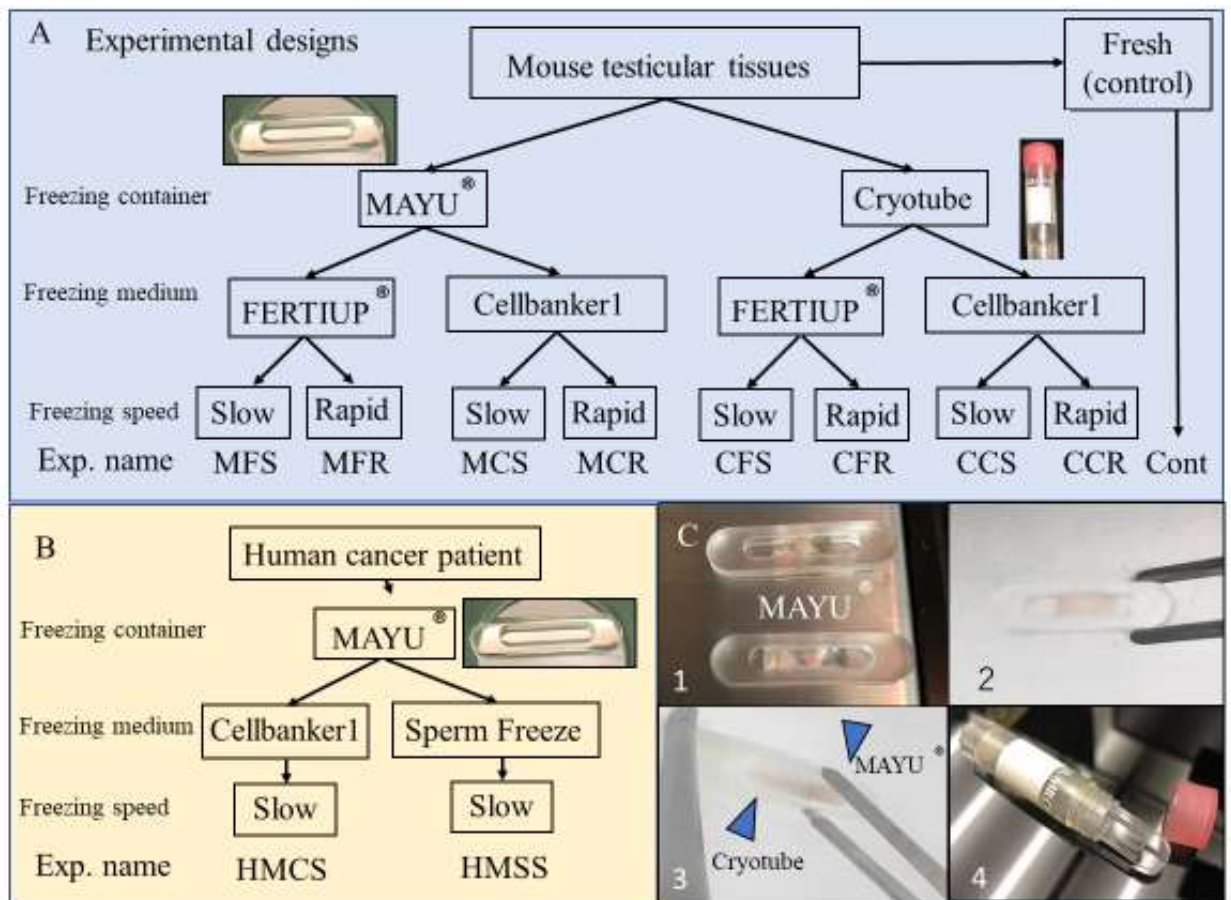


図 3-1. マウスおよびヒト精巣がん患者の精巣組織凍結融解の実験デザイン

図 3-1A にマウスの精巣組織凍結融解の実験デザイン、凍結コンテナ、凍結液、凍結スピード、新鮮区と比較した 9 区を示した。図 3-1B にヒト精巣がん患者の実験デザインを示した。図 3-1C には、実際の MAYU での精巣組織凍結融解の画像を示した。

4) マウスの採卵方法

BDF1 の雌マウスに 7.5 IU の Equine Chorionic Gonadotropin (ECG; Aska Pharmaceuticals, Tokyo, Japan) を腹腔内に投与後、48 から 50 時間後に、7.5 IU の human chorionic gonadotropin (hCG; Aska Pharmaceuticals) を投与した。採卵前にあらかじめ 35mm dish (3000-035, IWAKI Science product debt.) に 25 μ l の M16 medium (M7292, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) のドロップを作成し、ミネラルオイル(93621, Mineral Oil Heavy, Kitazato Corp) で覆い、24 時間、37.5 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ に設定したインキュベーターでガス平衡を行った。hCG 投与後、14 から 15 時間目に、マウスの卵管を摘出した。卵丘細胞卵子複合体を M16 medium 中に回収した。卵丘細胞卵子複合体の入った M16 medium にヒアルロニダーゼ(ART-4007-A; Cooper Surgical) を添加し、インキュベーターで 3 分間、培養した。その後、インキュベーターから 35 mm dish を取り出し、ピペッティングにより、卵丘細胞を除去した。卵子は、顕微授精まで M16 medium に移し、37.5 $^{\circ}$ C、5 % CO₂ の条件下のインキュベーターで培養を行った。

5) マウス卵子への顕微授精方法

既に報告があるように、凍結融解後の精子をピエゾマイクロマニピュレーター (Prime Tech, Ibaraki, Japan) に接続したガラスマイクロピペットで卵子に注入した [55] [82]。6 穴 dish のフタ (Research Institute for the Functional Peptides, Yamagata, Japan) を顕微授精の dish として使用した。

凍結融解した精子を PVP の中に入れた。運動している精子を一つ注入用のピペット (PINU06-20FT, Prime Tech) で捕まえ、数回のピエゾパルスを与えることで、精子の頭部と尾部を切断した。それぞれのマウス精子の頭部を倒立顕微鏡下 (TE2000, NIKON, Tokyo, Japan) で、M2 medium に入れたマウス卵子に注入を行った。精子を注入されたマウス卵子は M2 medium 中に 10 分間静

置し、その後、M16 medium に移し、5 % CO₂、37.5 °C で 120 時間体外発生培養を行った。

6) マウス胚の胚移植方法

M16 medium で顕微授精した胚を 24 時間培養し、精管結紮した雄マウスにより偽妊娠誘起させてから 0.5 日目のレシピエントの ICR マウスの卵管に、2 細胞に到達した胚を移植した。1 匹のレシピエントマウスには 5-10 の 2 細胞を移植した。偽妊娠誘起後 19.5 日目に、レシピエントマウスを頸椎脱臼により、屠殺し、レシピエントマウスの子宮内を確認し、生きた胎児がいることを確認した。育て親のマウスを用意し、産仔を育てさせた。産仔の発育を注意深く観察した。

7) 対象患者

精巣組織のサンプルは、精巣がんの摘出手術をした後の 5 名の患者から得た。我々が 5 名の患者を選択した理由は、ヒトの精巣組織の凍結方法が確立していないからであり、そのためにその精巣組織の凍結方法の安全性と有効性を本研究で調べるためである。そのため、我々は精子を凍結する必要のない対象患者を選んだ。対象患者はすでに子供がいる患者、これ以上子供を望まない患者、すでに精子を凍結保存した患者である。全ての患者から本研究についてのインフォームドコンセントを得て、さらに金沢大学の倫理委員会で承認を受け (Test number: 2018-120)、医療法人社団煌の会 山下湘南夢クリニックの施設内倫理委員会においても承認を得た (Test : YSYC-05)。

8) 精巣がん患者の精巣組織の準備

5 名の患者の精巣サンプルは、患者から精巣がんを摘出した後に入手した (図 3-2A)。泌尿器科医師が実体顕微鏡下で、精子が存在すると考えられる部分の精巣組織を選別した (図 3-2B)。その後、精巣組織を生理食塩水に移し、ハサミで 2-3 mm に切断した (図 3-2 C)。その精巣組織の細片の平

均重量は 4.02 ± 1.6 mg であった (図 3-2D)。

9) 精巣がん患者の精巣組織の緩慢凍結と融解方法

精巣がん患者の精巣組織の細片を 500 μ l の Sperm Freeze (Sperm Freeze solution; Kitazato corporation, Japan, Tokyo) あるいは、同量の Cellbanker1 に移した (図 3-2E)。その精巣組織を 15 分間、室温に静置した。それぞれの 100 μ l の凍結液を MAYU[®] に入れ、精巣組織の細片をその中に移した (図 3-2F)。精巣組織の細片を入れた MAYU[®] を前もって 2 時間前に -30 $^{\circ}$ C のフリーザーに静置していた Bicell に入れ、 -30 $^{\circ}$ C のフリーザーに 2 時間静置し、凍結させた (図 3-2G)。その後、MAYU[®] を Bicell から取り出し、 -80 $^{\circ}$ C になる位置の液体窒素の蒸気に MAYU[®] を 5 分間置き (図 3-2H)、液体窒素に浸漬させた (図 3-2I)。MAYU[®] を液体窒素内でクライオチューブに入れ、液体窒素内に保管した (図 3-2J)。

MAYU[®] を融解するときには、液体窒素から取り出し、 37 $^{\circ}$ C に加温したホットプレートの上に 2 分間静置させた (図 3-2K)。 37 $^{\circ}$ C に加温した 200 μ l の modified-HTF を MAYU[®] に添加し、精巣組織の細片の入った MAYU[®] を 3 分間静置した (図 3-2L)。その後、精巣組織の細片を 100 μ l の modified-HTF を入れた 35 mm dish (AGC TECHNO GLASS, Japan) に移した (図 3-2M)。

23G の注射針で精巣組織の細片をよく切り刻み、組織の懸濁液を 45 μ m の cell strainer でろ過した (図 3-2N, 図 3-2O, 図 3-2P)。2 ml の m-HTF をろ過後の懸濁液に添加し、遠心処理を行った (500 g, 5 minutes)。遠心後、上清を廃棄し、20 μ l の沈殿した懸濁液を 35 ml dish の上に滴下し、ミネラルオイルで覆った。Dish を倒立顕微鏡で観察し、精子数を測定した (図 3-2Q)。倒立顕微鏡のステージに、融解直後の 5 名の精巣がん患者の精巣組織の細片が入った MAYU[®] を置き、精細管の状態を確認した (図 3-3)。

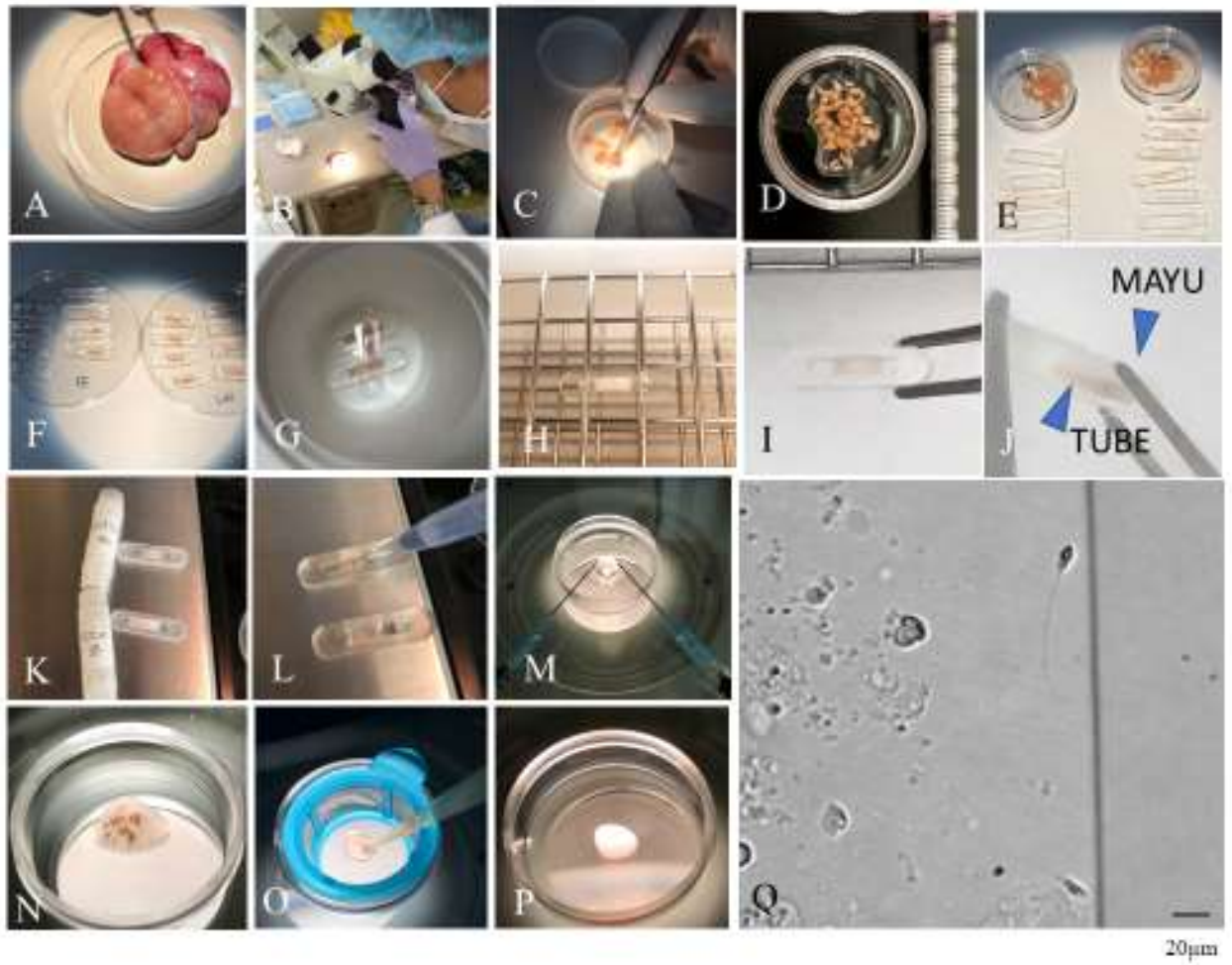


図 3-2. 精巣がん患者の精巣組織の準備と緩慢凍結と融解方法

図 3-2 に摘出された精巣がん患者の精巣(A)から精巣組織の確認と細切(B-D)、凍結(E-J)、融解過程(K-P)、運動精子の確認(Q)を示した。Bar は 20 μm を示している。

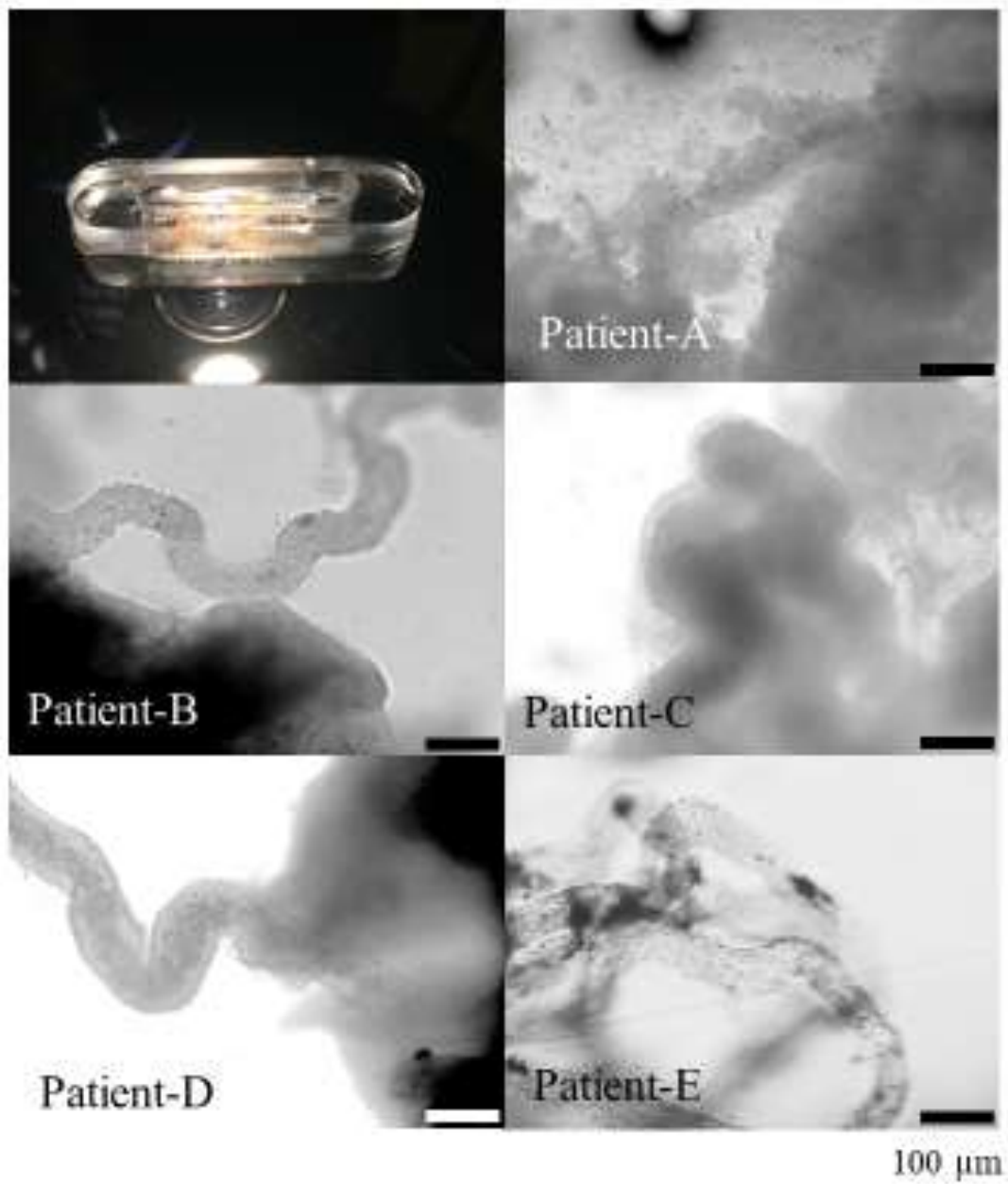


図 3-3. 精巣がん患者の精巣組織の融解後の画像

図 3-3 に融解後の 5 名の患者の精巣組織を MAYU に入れたまま、倒立顕微鏡下で確認した画像を示した。Bar は 100 μm を示している。

10) マウスおよびヒト精巣がん患者の凍結融解後の精巣内精子の Hoechst33342 および Propidium

Iodide の 2 重蛍光染色による精子細胞膜の評価方法

15 匹のマウスから得た精巣を、凍結融解区と新鮮区に分け、精巣内精子の染色を行った。

マウスとヒト精子の染色は Diercks A-K *et al* らの方法に従って、Hoechst 33342 (H1399, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) と propidium iodide (PI) (P3566, Life Technologies) で行った [53]。200 μ l の M16 medium に 0.001mg / mL of Hoechst 33342 と 0.0001mg / mL の PI を添加した。各区の精子懸濁液を 2 種類の染色液が添加された 1.5 ml のマイクロチューブの M16 medium に混和し、37.5 $^{\circ}$ C で 10 分間静置した。そののち、それぞれの懸濁液をスライドグラス (S9441, Matsunami Glass, Osaka, Japan) に滴下し、カバーガラスで覆った。各区のスライドグラスを 5 枚ずつ準備して、オリンパスの蛍光フィルターFUW と FGW を搭載した蛍光顕微鏡(IX73, OLYMPUS, Tokyo, Japan) で観察をおこなった。各スライドの測定最小数は、100 精子とした。

3 名の患者の場合、20 μ l の精子懸濁液に 20 μ l の Hoechst 33342 と PI の混合液を添加し、スライドグラスに 5 μ l を滴下し、カバーガラスで覆った。Cellbanker1 と Sperm Freeze のグループに 2 枚ずつのスライドグラスを準備し、マウスの精子と同じく蛍光顕微鏡で観察を行った。それぞれのスライド上の全ての精子を蛍光観察して評価した。

11) 凍結融解した精巣組織の Caspase-3 染色による評価方法

精巣組織のサンプルを 10% ホルマリン溶液に浸漬し、そのまま脱水過程を経てパラフィン包埋し、Formalin fixed-Paraffin embedding (FFPE) ブロックとした。
マイクロームで厚さ約 4 μ m の切片を作製し、日本工業規格 (JISR 3703) 標準形スライドガラスに貼付・乾燥させて染色用標本とした。

免疫染色は、1 次抗体として Anti-Caspase3 rabbit polyclonal antibody (GTX110543; GeneTex

Inc. Irvine, USA) を 1: 500 に希釈し、4 °C で overnight 反応させた後、二次抗体として Horse radish peroxidase (HRP) を標識した anti-rabbit IgG (H/L) goat polyclonal antibody (HISTOFINE # 424144; Nichirei Corporation, Japan) を室温 30 分間反応させて行った。発色基質には 3,3'-diaminobenzidine, tetra-hydrochloride (DAB) を用い、反応陽性部位を茶褐色に発色させて可視化後、Hematoxylin で対比染色を行った。

評価は、拡大倍率 400 倍にて顕微鏡下に 1,000 個の細胞を 2 回ランダムに観察し、Caspase3 の発現を以下の 4 区分に分類して各々に該当する細胞数 (個) の平均を計測した。ただし、計測対象は精細管由来の細胞とし、明らかな血管の細胞や間質細胞は対象より除外した。Caspase-3 の染色と測定は外注した (Mediridge, Japan)。

12) 統計解析

それぞれの実験は少なくとも 3 回以上繰り返し行った。得られたデータは、t-test および Chi-squared test により解析を行った。平均値のデータは解析前に arcsine transformation を行った。

第三節 結果

MAYU® とクライオチューブの Slow and Rapid freezing と Warming rate の比較

MAYU® とクライオチューブの凍結および融解速度を図 3-4 に示した。

Slow freezing の場合、MAYU® は $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに入れた Bicell の中に 120 分間静置させると、5 分間で $24.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $-13.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ に低下した。しかし、クライオチューブは図 3-4A に示したように、 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ のフリーザーに入れた Bicell の中に 120 分間静置させると、5 分間で $24.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $2.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ に低下した。クライオチューブの冷却速度は MAYU® よりも遅かった。

Rapid freezing の場合、MAYU® とクライオチューブを液体窒素の蒸気上に 5 分間、静置させた。5 分間で $24.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $-134\text{ }^{\circ}\text{C}$ に低下した。図 3-4B に示したように、1 分の時点で注目すると、MAYU® は $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ であったが、クライオチューブは $-4.4\text{ }^{\circ}\text{C}$ であった。クライオチューブの冷却速度は MAYU® よりも遅かった。

融解については、図 3-4C に示したように、MAYU® は 110 秒で $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ から室温に上昇したが、クライオチューブは 120 秒で $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ から $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ に上昇した。それぞれの凍結および融解の温度測定実験は 3 回繰り返し行った。

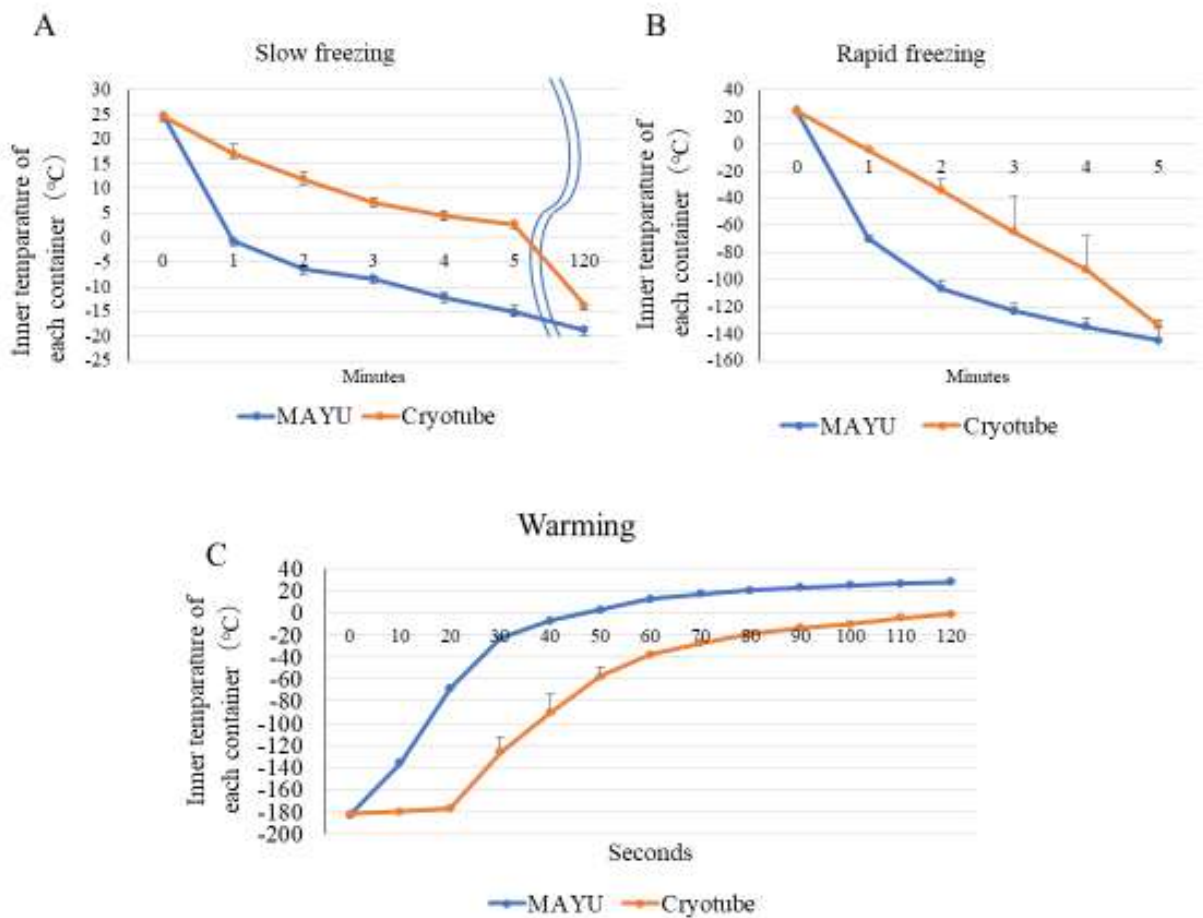


図 3-4. MAYU® とクライオチューブの Slow and Rapid freezing と

Warming rate の比較

図 3-4A に Slow freezing での MAYU® とクライオチューブの温度低下を示した。クライオチューブの冷却速度は MAYU®よりも遅かった。図 3-4B に Rapid freezing での MAYU® とクライオチューブの温度低下を示した。クライオチューブの冷却速度は MAYU®よりも遅かった。図 3-4C に、MAYU®とクライオチューブの融解速度を示した。クライオチューブの融解速度は MAYU®よりも遅かった。

MAYU® とクライオチューブで凍結融解した精巢内精子の運動率の比較

図 3-5 に示したように、凍結融解したマウスの精巢内精子の運動率を凍結液、凍結スピード、MAYU® とクライオチューブでの比較を行った。

図 3-5A に全ての処置の精子の運動率の詳細、それぞれの処置の結果を図 3-5B、3-5C、3-5D に示した。凍結液では、FERTIUP® のグループの精子の運動率は 2.2 ± 5.1 % であり、Cellbanker1 のグループは 18.6 ± 13.4 % であった。図 3-5B に示したように、FERTIUP® のグループは Cellbanker1 のグループよりも有意に低かった ($P < 0.001$)。凍結スピードでは、Rapid のグループは精子の生存率は 10.1 ± 12.1 % であり、Slow のグループは 11.9 ± 14.2 % であった。図 3-5C に示したように、これら 2 つのグループの間に有意な差は見られなかった。そして、凍結コンテナーでは、図 3-5D に示したように、MAYU® のグループの精子の生存率が 13.6 ± 14.7 % であり、クライオチューブのグループの 9.8 ± 11.1 % よりも高い結果だったが、有意な差は見られなかった。図 3-5E に運動精子と非運動精子の画像を示した。

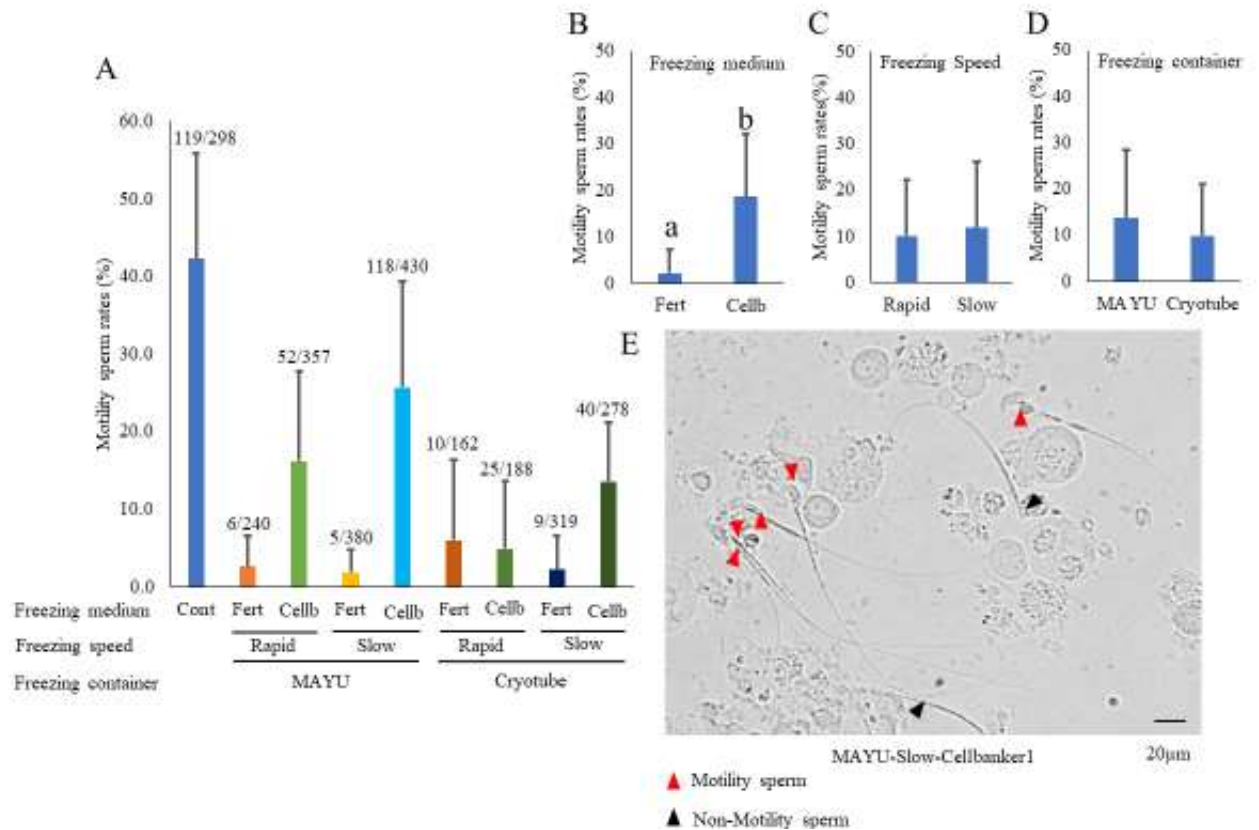


図 3-5. MAYU® とクライオチューブで凍結融解した精巢内精子の運動率の比較

図 3-5 に凍結融解したマウスの精巢内精子の運動率を凍結液、凍結スピード、MAYU® とクライオチューブの比較を示した。精子の運動率では、Cellbanker1 のグループは FERTIUP®のグループよりも有意に高かった。凍結スピードでは、Rapidのグループでの精子の生存率は凍結液間に違いはなかった。凍結コンテナでは、MAYU®のグループの精子の生存率がクライオチューブのグループよりも高い結果だったが、有意な差は見られなかった。図 3-5E に運動精子と非運動精子の画像を示した。Bar は 20 µm を示し、赤が運動精子、黒が不動精子を示している。

MAYU®とクライオチューブで凍結融解を行ったマウス精子の細胞膜の正常性

図 3-6 に、凍結融解を行ったマウスの精巣内精子の生存精子率および PI 陰性率を凍結液、凍結スピード、MAYU® およびクライオチューブで比較を行った結果を示した。図 3-6A に全ての処置での正常な細胞膜の詳細を示した。そして、図 3-6B、3-6C、3-6D にそれぞれの処置の総合結果を示した。Hoechst 33342 と PI で染色された特徴的なマウスの精子の画像を図 3-6E、3-6F に示した。

凍結液では、FERTIUP® のグループの精子の生存率は 2.2 ± 5.1 %であったのに対して、Cellbanker1 のグループは 18.6 ± 13.4 %であった。図 3-6B に示したように、FERTIUP®のグループは Cellbanker1 のグループよりも有意に低かった ($P < 0.001$)。凍結スピードでは、Rapid のグループの精子の生存率が 10.1 ± 12.1 %であったのに対して、Slow のグループは 11.9 ± 14.2 %であった。図 3-6C に示したように、両グループの間に有意な差は見られなかった。

そして、凍結コンテナーでは、MAYU® のグループの精子の生存率が 13.6 ± 14.7 %であったのに対して、クライオチューブのグループは 9.8 ± 11.1 %であった。図 3-6D に示したように、クライオチューブのグループは MAYU® のグループよりも有意に低かった ($P < 0.05$)。図 3-6E に MCS (MAYU®-Cellbanker1-Slow) の画像を示し、図 3-6F に CCS (Cryotube-Cellbanker1-Slow) の画像を示した。

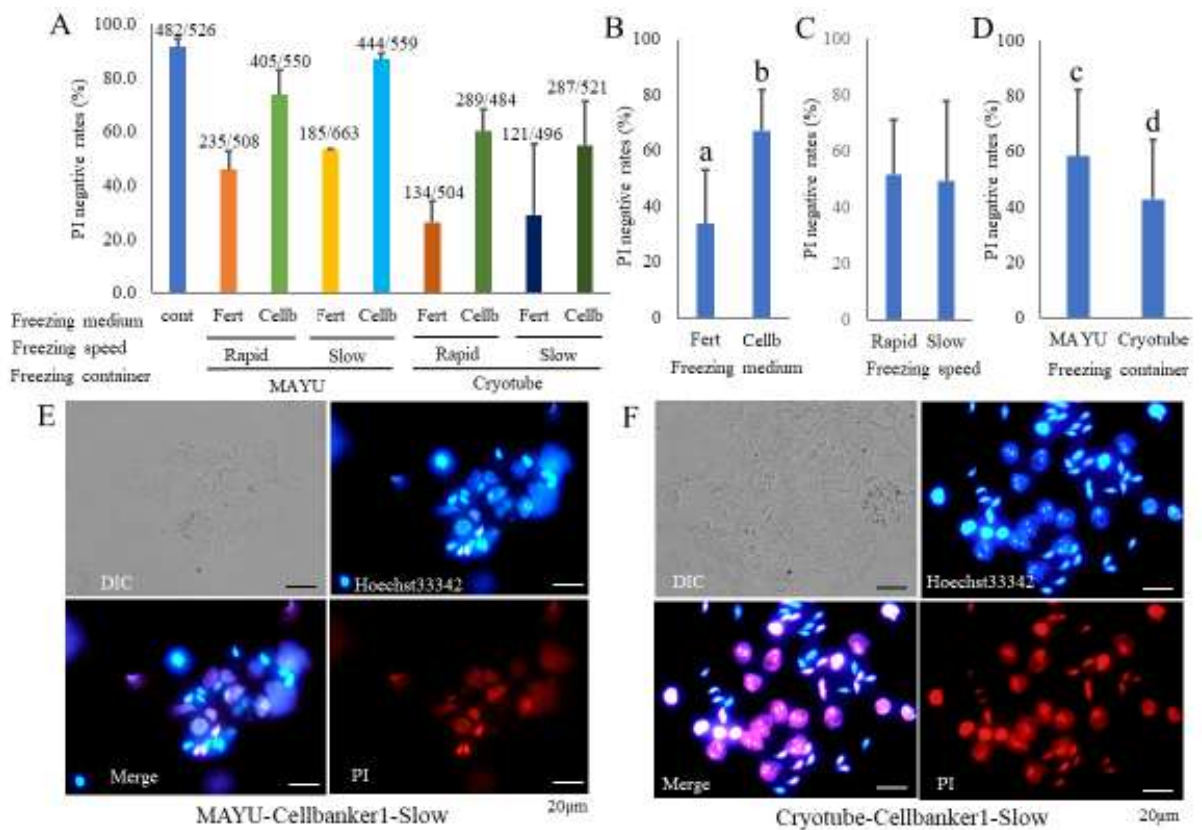


図 3-6. 凍結融解を行ったマウスの精巣内精子の生存精子率および

PI 陰性率を凍結液、凍結スピード、MAYU® およびクライオチューブの比較

図 3-6 に、凍結融解を行ったマウスの精巣内精子の生存精子率および PI 陰性率を凍結液、凍結スピード、MAYU® およびクライオチューブで比較を行った結果を示した。Bar は 20 μm。青が精子の核、赤が死滅した精子の核を示している。

凍結液では FERTIUP®のグループは Cellbanker1 のグループよりも有意に低かった。凍結スピードでは、Rapid と Slow のグループの間に有意な差は見られなかった。凍結コンテナでは、クライオチューブのグループは MAYU® のグループよりも有意に低かった。

凍結融解したマウス精子に由来する胚の体外発生および産仔発生

表 3-1 と図 3-7 に、それぞれのグループで凍結融解したマウス精子をマウス卵子に ICSI を行った後の体外発生培養の結果を胚盤胞の画像を示した。

ICSI 後の卵子の生存率は、CFS グループが他のグループよりも有意に低い結果だった ($P < 0.01$)。

表 3-1 および図 3-7A と 3-7C に示したように胚盤胞の発生率は、凍結液の種類に関係なく、MAYU[®] がクライオチューブよりも有意に高い結果であった ($P < 0.01$)。ICSI 後にそれぞれのグループの 2 細胞期胚を移植した後の結果を図 1 に示した。産仔率の点では、コントロールグループが全ての凍結グループよりも有意に高い結果であった ($P < 0.01$)。しかしながら、表 3-1、図 3-7B、3-7C に示したように、MAYU[®] で凍結された精巣組織からの産仔率は、クライオチューブのグループよりも有意に高い結果であった ($P < 0.01$)。

表 3-1. 新鮮および凍結融解したマウス精巣組織の精子をマウス卵子に
顕微授精を行った後の体外発生および産仔発生状況

	Conditions of preservation				
	MFS	MCS	CFS	CCS	Control
No. of oocytes	259	216	171	183	165
No. (%) of oocytes surviving after ICSI	229 (88.4) ^a	198 (91.7) ^a	138 (80.7) ^b	160 (87.4) ^a	155 (93.9) ^a
No. (%) of two-cell embryos	225 (98.3)	192 (97.0)	128 (92.8)	144 (90.0)	149 (96.1)
No. (%) of blastocysts/two-cell embryos	38/58 (65.5) ^c	44/85 (51.8) ^c	9/49 (18.4) ^d	17/67 (25.4) ^d	50/80 (62.5) ^c
No. of transferred 2cell embryos	167	107	79	77	69
No. of recipients	10	8	6	6	5
No. of offsprings (per transferred, %)	38 (22.8) ^e	24 (22.4) ^e	5 (6.3) ^f	10 (13.0) ^f	29 (42.0) ^g

^{a-b, e-f} $P < 0.05$: between values with different superscript letter

^{c-d, e-g} $P < 0.01$: between values with different superscript letter

表 3-1 に、それぞれのグループで凍結融解したマウス精子をマウス卵子に ICSI を行った後の体外発生培養の結果を示した。ICSI 後の卵子の生存率は、CFS グループが他のグループよりも有意に低い結果だった。胚盤胞の発生率は、凍結液の種類に関係なく、MAYU[®] がクライオチューブよりも有意に高い結果であった。MAYU[®] で凍結された精巣組織からの産仔率は、クライオチューブのグループよりも有意に高い結果であった。

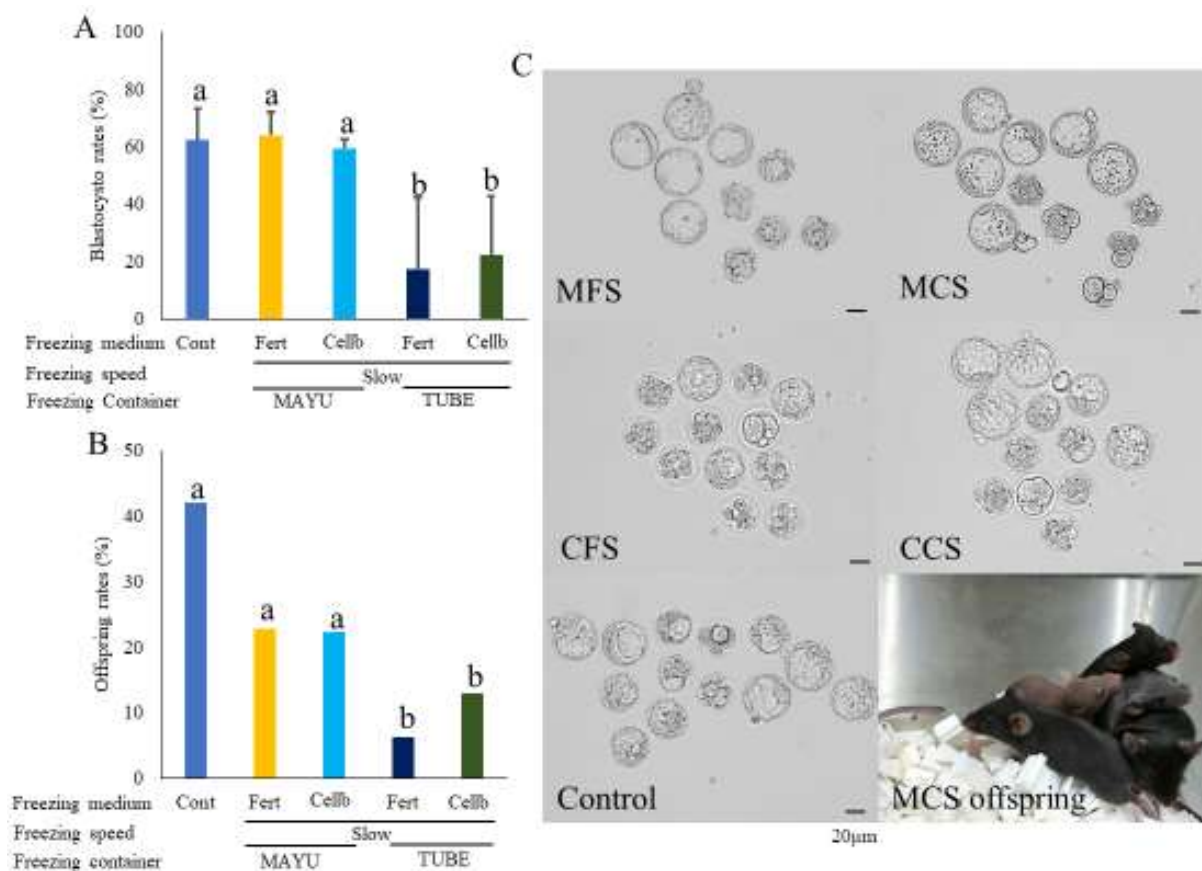


図3-7. 新鮮および凍結融解したマウス精巣組織の精子をマウス卵子に

顕微授精を行った後の体外発生および産仔発生状況

図3-7に、それぞれのグループで凍結融解したマウス精子をマウス卵子にICSIを行った後の体外発生培養の結果を胚盤胞の画像を示した。Barは20µm。図3-7Cに示したように胚盤胞は、MAYU®がクライオチューブよりも良好な発育を示した。

MAYU®を使用した精巣がん患者の精巣組織の凍結融解

MAYU®を使用することによって、精巣がん患者の精巣組織に凍結融解が簡便になった。

がん患者の精巣組織を摘出から直ちに実体顕微鏡下で観察することによって、精子が存在する可能性の高い組織を凍結することができた。図 3-3 に示したように、その組織の確認が難しかったのは、患者の精巣組織の状態が違うからである。しかしながら、MAYU®を使用することによって、5名の患者全てから精子を回収することができた。MAYU®の使用は、精巣がん患者の精巣組織の凍結融解で精子を確保することができない場合や ART が難しい場合の問題を解決できる。

MAYU®を使用して Cellbanker1 と Sperm Freeze で精巣組織の凍結融解を行った 5名の患者精子の運動率と PI 陰性率の比較

表 3-2 と図 3-8A に、患者 5名の精巣組織を融解した後の精子の運動率を示した。

5名の患者の精子の運動率は、Sperm Freeze では平均が 29.6% (0–54.5%) であり、Cellbanker1 では平均が 18.9% (0–50.2%) であり、Sperm Freeze が有意に高い結果であった ($P < 0.05$)。

表 3-2 と図 3-8A に示したように、3名の精巣がん患者の精巣組織を凍結融解して得られた精子を Hoechst33342 と PI 染色を行った。図 3-8C に示した左の画像が、MCS (MAYU®-Cellbanker-Slow) であり、図 3-8D に示した右の画像が MSS (MAYU®-Sperm Freeze-Slow) である。

PI 陰性率は、Sperm Freeze では平均が 73.3% (57.7–91.7%) であり、Cellbanker1 では平均が 42.6% (20.0–80.0%) であり、Sperm Freeze が有意に高い結果であった ($P < 0.001$)。

表 3-2. 精巣がん患者 5 名の病歴の詳細と精巣組織を凍結融解した後の精子運動性

	Patient-A	Patient-B	Patient-C	Patient-D	Patient-E	
Age	35	42	26	43	42	
Cancer Stage	I	I	I	IIA	IA	
Pathology	lt.seminoma	rt.seminoma	rt.seminoma/ lt.mixed type (embryonal carcinoma, seminoma, choriocarcinoma)	mixed germ cell tumor (yolk sac 80%, teratoma 20%)	seminoma	
Cellbanker1	Total number of spermatozoa	201	57	2365	38	20
	Total number of motile spermatozoa (%)	40 (19.9)	14 (24.6)	417 (17.6)	4 (10.5) ^a	2 (10.0)
Sperm Freeze	Total number of spermatozoa	272	1853	2590	67	50
	Total number of motile spermatozoa (%)	35 (12.9)	352 (19.0)	984 (38.0)	30 (44.8) ^b	14 (28.0)
Cellbanker1	Total number of Hoechst positive spermatozoa (%)	N. D	20	329	111	N. D
	Total number of PI negative spermatozoa (%)	N. D	13(65.0)	108 (32.8) ^c	46 (41.4) ^e	N. D
Sperm Freeze	Total number of Hoechst positive spermatozoa (%)	N. D	69	334	65	N. D
	Total number of PI negative spermatozoa (%)	N. D	54 (78.3)	200 (59.9) ^d	56 (84.8) ^f	N. D

^{a-b, c-d, e-f} $P < 0.01$: between values with different superscript letter

表 3-2 に示したように、5 名の患者全てから精子が回収できた。

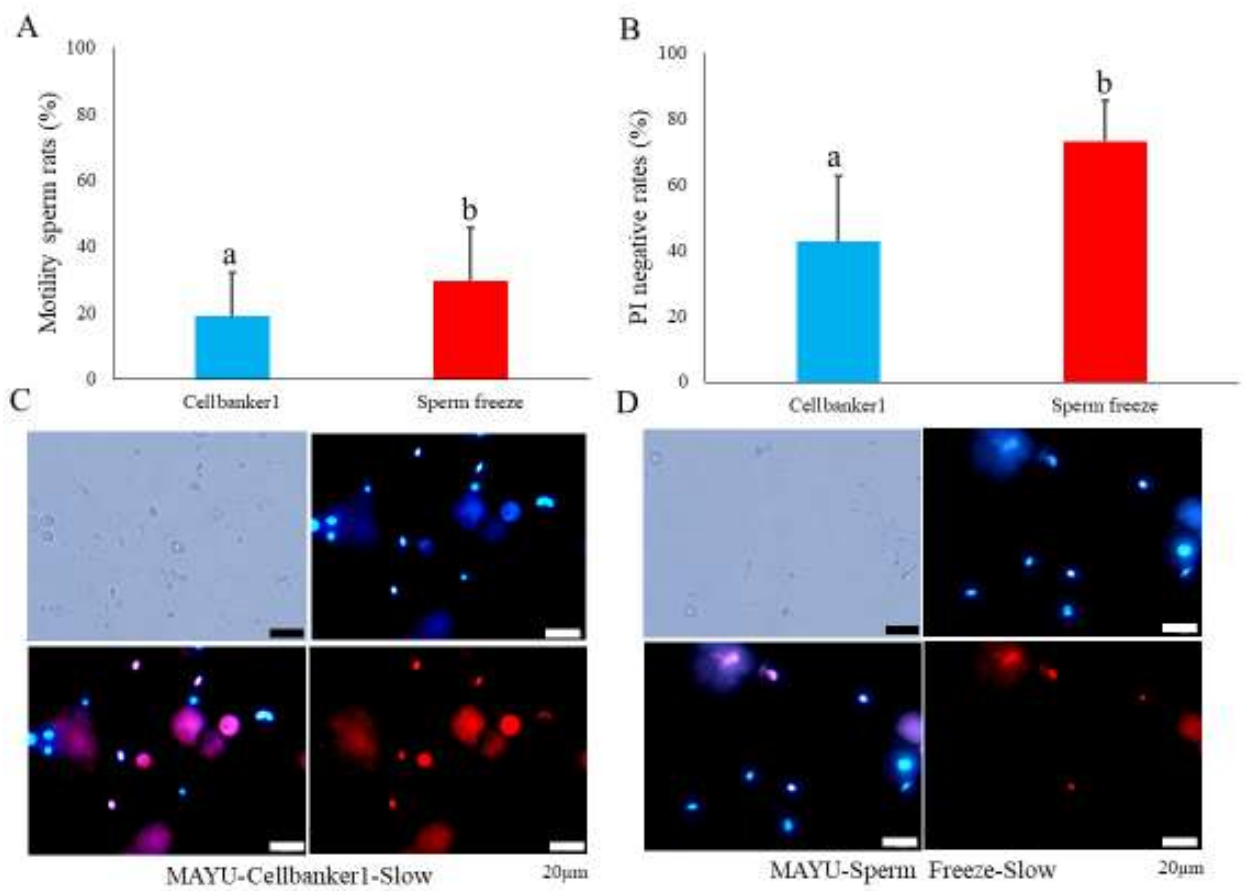


図 3-8. 精巣がん患者 5 名の精巣組織を凍結融解した後の精子運動性と

Hoechst と PI 染色後の画像

図 3-8A に、患者 5 名の精巣組織を融解した後の精子の運動率を示した。5 名の患者の精子の運動率は、Sperm Freeze が有意に高い結果であった。

図 3-8C と 3-8D に精巣がん患者の精巣組織を凍結融解して得られた精子を Hoechst33342 と PI 染色した。青が精子の核、赤が死滅した精子の核を示している。Bar は 20 µm。PI 陰性率は、Sperm Freeze が有意に高い結果であった。

MAYU®を使用して Cellbanker1 と Sperm Freeze で精巣組織の凍結融解を行った 5 名の患者の精巣組織の Caspase-3 染色による比較

表 3-3 と図 3-9A に、5 名の精巣がん患者の新鮮精巣組織と凍結融解した精巣組織を Caspase-3 で染色した結果を示した。病理学的検査の結果に基づいて、Caspase-3 陽性細胞が区別された。Cellbanker1 の Caspase-3 陰性細胞の平均は 34.8 ± 24.6 であり、Sperm Freeze の Caspase-3 陰性細胞の平均は 62.7 ± 59.9 であった。これらの間には、有意な差は見られなかった ($P = 0.36$)。新鮮区の Caspase-3 陰性細胞の平均は 215.8 ± 321.5 であった。新鮮区と凍結 2 区の間には有意な差は見られなかった。

図 3-9B に Patient C の Caspase-3 の染色結果を示したが、Patient C からは多数の精子が得られた。Patient C の凍結融解後の精巣組織では Caspase-3 陽性細胞も確認できたが、Cellbanker1 と Sperm Freeze で精巣組織を凍結して、精子も確保することができた。

表 3-3. 精巣がん患者 5 名の精巣組織の凍結融解後の Caspase-3 染色結果

	Cellbanker1				Sperm Freeze				Control			
	++	+	±	—	++	+	±	—	++	+	±	—
Patient-A		163	761	76		95	739	166		55	177	768
Patient-B		20	945	35		21	917	62		26	742	232
Patient-C	6.5	45	932	16	3.5	30	939	27.5	6	39.5	908	46.5
Patient-D	0.5	10.5	958	31	0.5	17.5	944.5	37.5	1.5	28.5	948.5	21.5
Patient-E	22	651	311	16	11.2	635.9	332.6	20.3	16	509	463	11
Total	29	889.5	3907	174	15.2	799.4	3872	313.3	23.5	658	3239	1079

++: A dark brown coloration reaction (Caspase-3 reaction) was observed throughout the cells that was too strong for the nuclear structure to be clearly discerned. +: Weakly positive (±) in the cytoplasm as a whole, but in a part of it a localized course dot-like or continuous Caspase-3 reaction is observed. ±: Caspase-3 reaction is observed around the nucleus or the entire cytoplasm, and the nuclear structure can be observed relatively clearly. —: Unclear Caspase-3 reaction in the cytoplasm

表 3-3 に、5 名の精巣がん患者の新鮮精巣組織と凍結融解した精巣組織を Caspase-3 で染色した結果を示した。Cellbanker1 と Sperm Freeze の Caspase-3 陰性細胞において、新鮮区と凍結 2 区の間には有意な差は見られなかった。

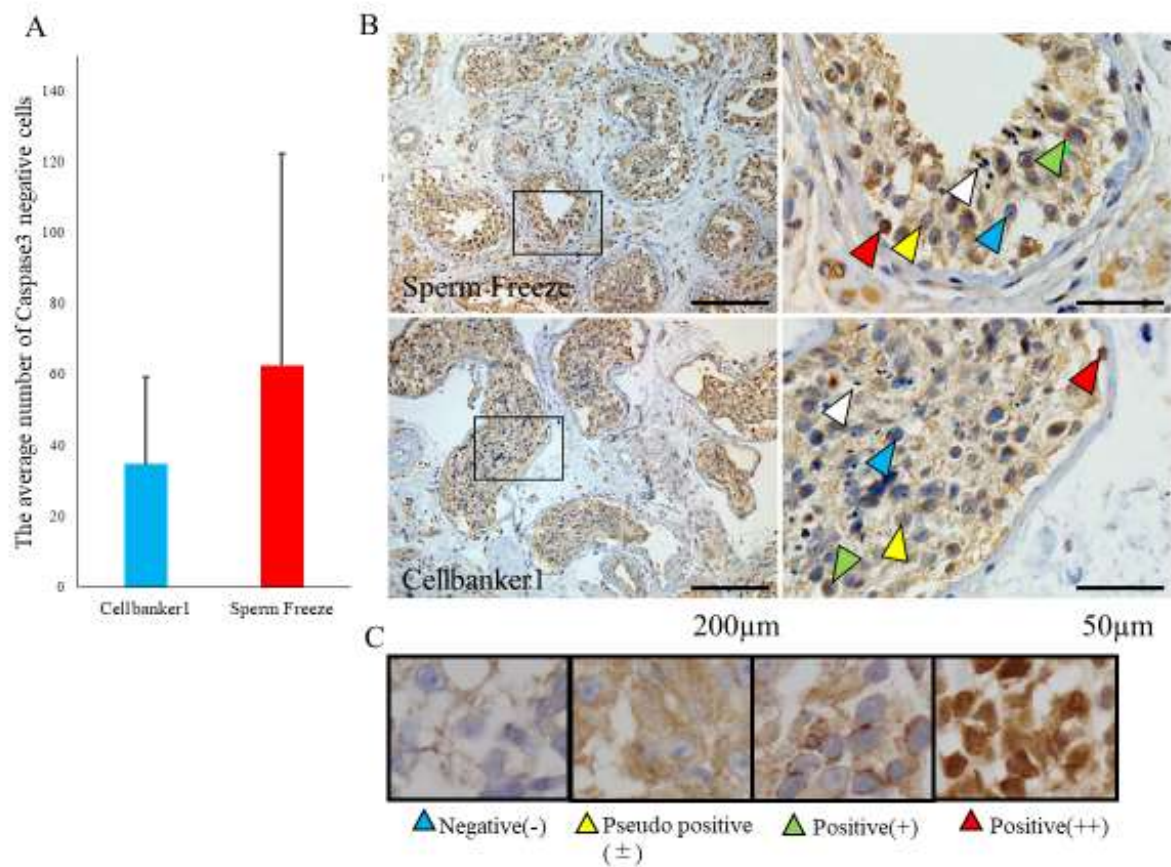


図 3-9. 精巣がん患者 5 名の精巣組織の凍結融解後の Caspase-3 染色結果

図 3-9A に精巣がん患者 5 名の Caspase-3 染色結果を示したが、有意な差は見られなかった。図 3-9B に Patient C の Caspase-3 の染色結果を示した。左上が Sperm Freeze、左下が Cellbanker1 で凍結融解を行った染色画像である。Bar は 200 µm。図 3-9B の右上が Sperm Freeze、左下が Cellbanker1 で凍結融解を行った染色画像である。Bar は 50 µm。白い△が精子を示しているが、Patient C からは多数の精子が得られた。

第四節 考察および結論

冒頭で述べたように、精巣腫瘍の発生率は日本では 10 万人に 1 人である。さらに、民族的であり、デンマーク、ノルウェー、スイス、ドイツ、ニュージーランドで最も一般的な腫瘍である。日本とアジアでは、これらの国よりも症例の頻度が低くなっている。しかし、どの国でも発症年齢は 15 歳から 40 歳の間であり、これは結婚と出産の最盛期と重なる。がん患者の妊孕性温存のガイドラインに記載されているように、射精された精子の保存が推奨されているが、精巣組織の凍結は研究中である。その理由は、精巣組織を凍結するための確立された方法がないからである。

そこで、本研究では、精巣組織の凍結を確立することを目的とし、新しい凍結コンテナ「MAYU®」と従来のクライオチューブ、凍結速度、および凍結培地を比較した。

MAYU®のシート部分の厚さは 160 μm であるが、クライオチューブを切断して厚さを測定したところ、900 μm だった。図 2 に示すように MAYU®の温度は、凍結が Slow か Rapid であるかに関係なく、クライオチューブの温度よりも速く低下した。凍結融解後の細胞生存率は、凍結中に $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 前後を急速に通過し、融解中にも急速に融解することにより、細胞生存率を高めることが報告されている [80, 83, 84]。

図 2 に示すように、MAYU®の精子は、クライオチューブよりも Rapid 区でも Slow 区でもより急速に凍結することができ、さらに MAYU®は融解時も、クライオチューブよりも、急速に温度上昇することができた。MAYU®の凍結融解の温度が、生存率や運動率に影響を与えたと考えられる。つまり、凍結容器の厚さの違いは、同じ量の凍結培地でも凍結融解の温度変化に影響を与えたと考えられる。

MAYU®などの開放系のコンテナは凍結速度が速く、チューブなどの閉鎖系のコンテナは凍結速度が遅いため、開放系のコンテナは精巣組織の凍結に優れた結果をもたらすと報告されている

[85]。これまで、精巣組織の凍結の場合、ストローが開放系の容器として使用されてきた [74, 78, 86]。しかし、精巣を凍結するためのストローの厚さは 300~400 μm で、MAYU[®]の 2 倍以上の厚さである。これらの点からも、MAYU[®]は開放系のコンテナであり、その薄さは凍結融解の工程に有効だと考えられる。

Cellbanker1 と FERTIUP[®]をマウス精巣組織の凍結液として使用した理由は、Cellbanker1 が組織凍結の実績がある凍結液であり[87]、FERTIUP[®]を使用した理由は、マウスの精子に使用されている凍結液であるためである [50, 51]。

マウス精巣組織を Slow freezing によりクライオチューブで凍結し、Cellbanker1 と FERTIUP[®]を凍結液として使用した場合、融解後の精子の粘着性は MAYU[®]よりも高かった。さらに、凍結融解後の精巣組織の懸濁液を 1 時間または 3 時間培養すると、精子以外の組織と精子が ICSI に使用するガラスキャピラリーに付着し、時間の経過とともに精子を吸引することが困難になった。これは、時間の経過とともに、精子以外の精巣組織の細胞の核やタンパク質が破壊され、精子表面に付着し、粘度が上昇したためと考えられる。そのため、ICSI を行う際、精子をガラスキャピラリーに吸引し、ピエゾマイクロマニピュレーターでマウスの精子頭部を切断するのに時間がかかった。ICSI 後の有意に低い生存率は、クライオチューブと FERTIUP[®]の組み合わせだった。この理由は、精子を吸引し ICSI に使用するキャピラリーの外側が変性した細胞質成分で汚染され、粘着性が増加したことにより、卵子細胞膜の破膜に影響を与え、生存率に悪影響を及ぼした可能性があると考えられる。

クライオチューブと Cellbanker1 の組み合わせも、MAYU[®]よりも精子の粘着性が高かった。しかし、FERTIUP[®]よりも生存率が高かったのは、おそらくガラスキャピラリーの外側の汚染が少なかったためだろうと考えられる。しかしながら、ICSI 後の 2 細胞への発生率に差はなかった。胚盤胞発生率と

産仔率は、MAYU®よりもクライオチューブで両方の凍結液を使用して凍結融解を行った結果で異なっていた。これらのことから、クライオチューブは精巣組織の凍結には適さないと考えた。マウスの実験結果に基づいて、精巣癌患者の精巣組織は、クライオチューブは使用せず、MAYU®を使用して凍結した。

一般的に、TYB あるいは Sperm Freeze はヒト精子の凍結液として使用されている。この研究の前の報告では、精巣癌患者に TESE が行われ、回収された精巣組織は直ちに細切され、精子懸濁液は TYB と Cryotube で凍結保存されている [70]。

我々は、実際に TESE により無精子症患者の精巣組織を回収し、TYB と Cryotube で精子懸濁液を凍結保存したことがあった。その際は、精子懸濁液の凍結保存に TYB と Cryotube を使用したが、融解後、洗浄操作と遠心分離機の使用が必要だった。融解および洗浄後、上澄みを除去して沈殿物を回収すると、卵黄成分と精子等の細胞が凝集し、精子の採取が困難になった。

しかしながら、MAYU®で精巣組織の凍結保存を行う場合は、洗浄および遠心分離は必要ない。前述のように、凍結融解後、精子の粘度は時間とともに増加するだけでなく、TYB の成分にはタンパク質に加えて脂質が大量に含まれているが、Sperm Freeze には含まれていない。Sperm Freeze を凍結に使用すると、洗浄後に凝集することなく精子を簡単に回収できると考えた。上記の理由から TYB は使用せず、Cellbanker1 と Sperm Freeze を比較した。Cellbanker1 は、マウスで良好な結果を示したため、精巣腫瘍患者の精巣組織の凍結液として使用した。マウスの場合、Cellbanker1 は精巣組織の凍結に使用される凍結液で良好な結果を示したが、ヒトの場合は、精子凍結のための Sperm Freeze が精巣組織凍結でも良好な結果を示した。結果から、考えられる理由の 1 つは、精細管の構造である。通常、マウスの精細管の直径は 200 μm であり、ヒトの精細管の直径は 200~250 μm であ

る [88]。

この研究では、5 人の精巣癌患者の精巣組織を凍結したが、図 7 の写真に示すように、それらは 200 μm より薄く、精細管内の細胞が少ないことがわかった。したがって、Sperm Freeze は Cellbanker1 よりも細胞の少ない精細管内にすばやく浸透したため、融解後の精子の運動性と生存率は Cellbanker1 よりも高かったと考えられる。

Cellbanker1 には凍結防止剤として DMSO が含まれているため、ヒト精子の凍結保護剤には使用されていないが、Sperm Freeze には凍結保護剤としてグリセロールとスクロースが含まれている。

MAYU[®]で精巣癌患者の精巣組織の凍結融解を行った後、23G 針で細切すると、Cellbanker1 で凍結した組織は固く細切するのが困難だったが、Sperm Freeze では組織が柔らかかった。

上述したように、精子の他の細胞との粘着、精巣組織の固さや柔らかさから、実際に不妊治療で凍結融解した精巣組織の精子を卵子に ICSI する場合は、精巣組織の凍結融解直後に精子のみをガラスキャピラリーで吸引して別の培養液に移す方がいいかと考える。凍結融解した精巣組織から得られた精子を ICSI に使用する場合は、融解した精巣組織を切り刻み、懸濁液にし、すぐに 1006 dish に薄く伸ばしたドロップを作った。ドロップが乾燥しないように、ただちにミネラルオイルでドロップを覆うことが重要である。さらに、精巣組織を細切する胚培養士と、別の培養士が dish の精子を検索し、見つかった精子は、ガラスキャピラリーをセッティングした倒立顕微鏡下で、別の培養液のドロップに滴に精子を移動させるなど、胚培養士の間で役割を分担することが重要で考える。そうすることで、運動性の精子を素早く集めることができると考える。

Caspase-3 の結果は、がん患者の精巣組織の状態を示していると考えられる。精子の運動率と PI 陰性の結果は、凍結保護剤の効果だけでなく、偶然に選択された精巣組織の質と、Caspase-3 の結

果と一致していた。

運動性および PI 染色実験は各患者で 3 回実施したが、凍結融解した精巣組織から得られた精子数も変動し、Caspase-3 も精巣組織で測定されたことを示唆している。結果は患者ごとに異なる場合がある。

ヒトの精巣がん患者の精巣組織凍結のこの研究では、MAYU®とクライオチューブでの比較はしていない。しかし、将来的には、精巣腫瘍患者の精巣組織だけでなく、非閉塞性無精子症患者の精巣組織における凍結融解の比較も検討している。

MAYU®は、凍結融解温度の結果とマウスの結果から、ヒト精巣組織の凍結にも有効であると考えている。この研究では、MAYU®を使用して、ヒトの精巣組織の凍結融解から、得られた精子の顕微授精後の胚発育や胚盤胞率、出生率は確認していない。しかし、マウスの結果から、MAYU®がヒトにおいても同様に有用であると考ええる。

総括

本研究の第一章、第二章は、日本だけでなく海外でも ART において、既存の技術あるいは、既製品を代用して行われてきた極少数の患者精子の凍結融解方法を変えるべく、開発した新規のヒトの極少数精子凍結コンテナ、MAYU を中心にして行った。ART においては、新規のコンテナやキットを開発し販売されるのは、企業が中心となって行われている。しかし、1 クリニックの 1 培養士であり、1 研究員である私が開発できたことは、培養士として患者精子を実際に取り扱うことができたことが大きい。患者と精子の結果について説明する機会、患者の悩みを聞く機会が持てたことで、培養士としてだけでなく患者の求めるものを作ることが、MAYU の開発の原動力となった。MAYU の主な利点は、1) MAYU のシート状の底面はプラスチックと同様に透明であり、明瞭に観察することが可能であること。2) MAYU の素材は伸縮性に富み、液体窒素に浸漬しても破損しないこと。3) MAYU の形状はクライオチューブに合わせたサイズにしたため、液体窒素内での長期保存が可能であり、特別な凍結保存用のケーンなどを準備する必要がないこと。4) MAYU の素材やシート状の薄さは熱伝導率が高いため、融解を 2 分で行えること。5) MAYU で凍結融解した精子は、ガラスキャピラリーにより顕微鏡下で吸引して確保することが可能であり、別の培養 dish に準備した少量の培養液で直ちに精子を移動させることが可能であること。既存の方法のように大量の培養液を使用せず、遠心処理により、凍結液の成分を洗浄しなくても良いこと、が挙げられる。

マウスの実験結果により、健常な産仔が得られ、また、極少数のヒト精子においても凍結融解の過程で紛失することなく、精子を確保できた。そのため、患者の同意を得て、現在までに山下湘南夢クリニックでは 5 名の患者が出産している。また、MAYU は販売されているため、ワークショップも開催し、使用方法を実際に指導する機会を持つこともできた。日本の培養士は、なかなか新規なコンテナを使用し、精子を紛失しなくなったという連絡をいただくこと、実際に MAYU を使用し、出産したという報告をいただくことも、研究を行った喜びを感じる。それとともに、極少数の精子の患者が子供を授か

ることを諦めず、子供と過ごす未来を創る、ことにわずかばかりではあるが貢献できたことが、この研究の価値ではないかと考える。

第三章のヒト精巣がん患者の精巣組織凍結保存では、5名の患者の精巣組織を凍結融解し、5名全ての患者から運動精子を確保することができた。5名の患者のうち1名は射出精子も凍結できていたが、残り4名はすでに子供を授かっていたため、精巣組織の凍結保存の研究に協力してくださった。しかし、Patient D と E は、泌尿器科の医師が超音波検査やほかの検査結果からも、とても精子を確保できるような状態でないほど精巣がんが進行している、と連絡を受けた。急な手術ではあったが、すぐに金沢大学に向かい、精巣組織の一部をいただくことができた。もともと精子が得られた Patient C に比べて、目視の状態でも Patient D と E は精細管が細く、精細管の中も透明に見え、ピンセットでつまむと粘り気が強かった。しかしながら、融解後に組織を細切すると、運動精子を得ることができた。これは、常に、射出精液から精子の得られない患者を手術し、精子の存在する精巣組織を選ぶことができる泌尿器科医師の技術があるからこそであり、日頃からヒトの精巣組織を見慣れていない培養士や研究者にとっては、その選別できる能力はない。がん患者の精巣組織凍結には、泌尿器科医師の高い技術が必要であると考えます。

本研究のマウスの精巣組織凍結の実験では、凍結コンテナ、凍結スピード、凍結液の比較を行うことができ、その中で、健全な産仔を得ることができた。しかしながら、実験に使用したマウスは8週令のマウスであり、性成熟が終了したマウスである。また、金沢大学で行った5名の患者もすべて成人男性である。射出精液の採取できない未成熟の男児でも、がんや白血病になるため、将来の妊孕性温存のためには、精巣組織凍結保存はとても価値のある研究である。しかしながら、未成熟な男児の精巣組織から、体外培養で精子を作ることは非常に難しい。現在は、その技術ができれば、ということで、海外などでは未成熟な男児の精巣組織の凍結保存は行われているが、その男児からの出産報告はない。今回、成熟マウス、成人男性の精巣組織凍結を MAYU により、簡便に行えたことは、今後の未

成熟男児の精巣組織凍結に役に立つ可能性が挙げられる。今後、MAYUを使った研究で、未成熟マウスの精巣組織凍結を保存し、体外培養で精子を得ることができれば、ヒトでの研究に大いに貢献できるのではないかと考える。

結論として、MAYUは、医療現場での新規の凍結コンテナーとして使用され、極少数の精子だけでなく精巣組織の凍結を行う際に役立つだろうと考える。

参考文献

1. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen past 50 years. *Br Med J* 1992; 305: 609-613, 1992
2. 平成9年度厚生省心身障害研究「不妊治療の在り方に関する研究」最近の精子数減少に関する国内外文献調査(分担研究:男性不妊の実態および治療に関する研究)分担研究報告書 研究協力者: 聖マリアンナ医科大学泌尿器科 岩本晃明、松下智彦
3. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 2536–2559.
4. Mulhall JP, Trost LW, Brannigan RE, Kurtz EG, Redmon JB, Chiles KA, et al. Evaluation and Management of Testosterone Deficiency: AUA Guideline. *J Urol.* 2018; 200: 423–432.
5. Heidebaugh JJ. Endocrinology update: testicular hypogonadism. *FP Essent.* 2016; 451: 31–41.
6. Tajar A, Forti G, O'Neill TW, Lee DM, Silman AJ, Finn JD, et al. Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010; 95: 1810–1818.
7. Ramasamy R, Scovell JM, Kovac JR, Lipshultz LI. Testosterone supplementation versus clomiphene citrate for hypogonadism: an age matched comparison of satisfaction and efficacy. *J Urol.* 2014; 192: 875–879.
8. Zhang K.S., Zhao M.J., An Q., Jia Y.F., Fu L.L., Xu J.F., Gu Y.Q. Effects of testosterone

supplementation therapy on lipid metabolism in hypogonadal men with T2DM: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Andrology*. 2018; 6: 37–46.

9. Pubertal arrest due to Zn deficiency: the effect of zinc supplementation.

Karaca Z, Tanriverdi F, Kurtoglu S, Tokalioglu S, Unluhizarci K, Kelestimur F. *Hormones (Athens)*. 2007; 6: 71-4.

10. Association of hypogonadism with vitamin D status: the European Male Ageing Study. Lee DM, Tajar A, Pye SR, Boonen S, Vanderschueren D, Bouillon R, O'Neill TW, Bartfai G, Casanueva FF, Finn JD, Forti G, Giwercman A, Han TS, Huhtaniemi IT, Kula K, Lean ME, Pendleton N, Punab M, Wu FC; EMAS study group. *Eur J Endocrinol*. 2012; 166: 77-85.

11. 令和元年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告（2018年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2020年7月における登録施設名）

12. Palermo GD, O'Neill CL, Chow S, Cheung S, Parrella A, Pereira N, Rosenwaks Z.

Intracytoplasmic sperm injection: state of the art in humans. *Reproduction*. 2017; 154: F93-F110.

13. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Uehara T, Yanagimachi R. *Biol Reprod*. 1976;15: 467-70.

14. Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, and Iritani A. 1988. Development of rabbit oocyte after microinjection of spermatozoa. (Abstr.331). In Proceedings of 11th International Congress on animal Reproduction and Artificial Insemination.

15. Goto K, Kinoshita A, Takuma Y and Ogawa K. Fertilization of bovine oocytes by the

injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet. Rec.* 1990; 127, 517-520.

16. Intracytoplasmic sperm injection in the rat. Dozortsev D, Wakaiama T, Ermilov A, Yanagimachi R. *Zygote*. 1998; 6: 143-7.

17. Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, Slusser J, Hodgen GD & Rosenwaks Z.

A preclinical evaluation of pronuclear formation by microinjection of human spermatozoa into human oocytes. *Fertility and Sterility*. 1988; 49: 835-842.

18. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17

19. Schoysman R, Vanderzwalmen P, Nijs M, Segal L, Segal-Bertin G, Geerts L, van

Roosendaal E & Schoysman D. Pregnancy after fertilization with human testicular spermatozoa. *Lancet*. 1993; 342: 1237.

20. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W & Van Steirteghem A. Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertility and Sterility* 1994; 61: 1045-1051.

21. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Goossens A, Tournaye H, Camus M, van Steirteghem A & Silber S. Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction* 1995; 10: 1457-1460.

22. Tournaye H, Devroey P, Liu J, Nagy Z, Lissens W & Van Steirteghem A.

Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new

effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertility and Sterility*. 1994; 61: 1045–1051.

23. Podsiadly BT, Woolcott RJ, Stanger JD & Stevenson K. Pregnancy resulting from intracytoplasmic injection of cryopreserved spermatozoa recovered from testicular biopsy. *Human Reproduction* 1996; 11: 1306–1308.

24. Testicular spermatozoon is superior to ejaculated spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection to achieve pregnancy in infertile males with high sperm DNA damage. Zhang J, Xue H, Qiu F, Zhong J, Su J. *Andrologia*. 2019 ;51: e13175.

25. Post-testicular sperm environment and fertility. Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, Thimon V, Dacheux JL. *Anim Reprod Sci*. 2004; 82-83: 321-39.

26. Comparison of oocyte activation and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities of round/elongated spermatids of mouse, hamster, rat, rabbit and human assessed by mouse oocyte activation assay. Yazawa H, Yanagida K, Katayose H, Hayashi S, Sato A. *Hum Reprod*. 2000; 15: 2582-90.

27. Fertilization and developmental initiation of oocytes by injection of spermatozoa and pre-spermatozoal cells. Yanagimachi R. *Ital J Anat Embryol*. 2005; 110: 145-50.

28. Paternal age as an independent factor does not affect embryo quality and pregnancy outcomes of testicular sperm extraction intracytoplasmic sperm injection in azoospermia. Park YS, Lee SH, Lim CK, Choi HW, An JH, Park CW, Lee HS, Lee JS, Seo JT. *Andrologia*. 2018; 50.

29. Tomita K, Sakai S, Khanmohammadi M, Yamochi T, Hashimoto S, Anzai M, Morimoto Y,

Taya M, Hosoi Y. Cryopreservation of a small number of human sperm using enzymatically fabricated, hollow hyaluronan microcapsules handled by conventional ICSI procedures. *J Assist Reprod Genet* 2016; 33: 501-511.

30. Araki Y, Yao T, Asayama Y, Matsuhisa A, Araki Y. Single human sperm cryopreservation method using hollow-core agarose capsules. *Fertil Steril* 2015; 104: 1004-1009.

31. Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, S.P. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 2005; 11, 300–308.

32. Endo Y, Fujii Y, Kurotsuchi S, Motoyama H, Funahashi H. Successful delivery derived from vitrified-warmed spermatozoa from a patient with nonobstructive azoospermia. *Fertil Steril* 2012; 98: 1423-1427.

33. Meirou D, Schenker JG. Cancer and male infertility. *Hum Reprod.* 1995; 10: 2017-22.

34. Jemma A Moody, Kamran Ahmed, Catherine Horsfield, Malene R V Pedersen, Tet Yap, Majid Shabbir. Fertility Preservation in Testicular Cancer - Predictors of Spermatogenesis. *BJU Int.* 2018; 122: 236-242.

35. Joensen UN, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome and Leydig cell function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 102: 155-161.

36. Delouya G, Baazeem A, Boman JM, Violette P, Saad F, Zini A. Identification of spermatozoa in archived testicular cancer specimens: implications for bench side sperm retrieval at orchidectomy. *Urology* 2010; 75: 1436-1440.

37. Choy JT, Wiser HJ, Bell SW, Cashy J, Brannigan RE, Köhler TS. Predictors of spermatogenesis in orchiectomy specimens. *Urology* 2013; 81: 288-292.
38. Beaud H, Tremblay AR, Chan PTK, Delbes G. Sperm DNA Damage in Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1166: 189-203.
39. Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, Paoli D, Culasso F, Toselli L, Tsamatropoulos P, Lenzi A. Effect of chemoradiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Hum Reprod* 2006; 21: 2882-2889.
40. Trottmann M, Becker AJ, Stadler T et al. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol.* 2007; 52: 355-367.
41. Jemma A Moody, Kamran Ahmed, Catherine Horsfield, Malene R V Pedersen, Tet Yap, Majid Shabbir. Fertility Preservation in Testicular Cancer - Predictors of Spermatogenesis. *BJU Int.* 2018; 122: 236-242.
42. Sandro C. Esteves, Matheus Rnque, Cara K. Bradley and Nicolas Garrido. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. *Fert Steril* 2017; 108: 456-467.
43. Baert Y, Van Saen D, Haentjens P, in't Velt P, Tournaye H, Goossens E. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum Reprod* 2013; 28: 1816-1826.

44. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 1949; 164: 666.
45. Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 1953; 172: 767-768.
46. Hashimoto H, Ishikawa T, Goto S, Koikeguchi S, Fujisawa M, Shiotani M. The effects of severity of oligozoospermia on Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycle outcome. *Syst Biol Reprod Med.* 2010; 56: 91-5.
47. Deruyver Y, Vanderschueren D, Van der Aa F. Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: a systematic review. *Andrology* 2014; 2: 20-24.
48. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
49. Liu J, Nagy Z, Joris H, Tournaye H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Intracytoplasmic sperm injection does not require special treatment of the spermatozoa. *Hum Repro* 1994; 9: 1127-1130.
50. Takeo T, Hoshii T, Kondo Y, Toyodome H, Arima H, Yamamura K, Irie T, Nakagata N. Methyl-beta-cyclodextrin improves fertilizing ability of C57BL/6 mouse sperm after freezing and thawing by facilitating cholesterol efflux from the cells. *Biol Reprod* 2008; 78: 546-551.
51. Takeo T, Nakagata N. Combination medium of cryoprotective agents containing L-glutamine and methyl-beta-cyclodextrin in a preincubation medium yields a high fertilization

rate for cryopreserved C57BL/6J mouse sperm. *Lab Anim* 2010; 44: 132-137.

52. Koshimoto C, Mazur P. Effects of Cooling and Warming Rate to and from 70°C, and Effect of Further Cooling from -70 °C to -196°C on the Motility of Mouse Spermatozoa. *Biol Reprod* 2002; 66: 1477-1484.

53. Diercks A-K, Bürgers HF, Schwab A, Schenkel J. Improved assessment of frozen/thawed mouse spermatozoa using fluorescence microscopy. *J Vet Sci* 2012; 13: 315-322.

54. Bianchi PG, Manicardi GC, Urner F, Campana A, Sakkas D. Chromatin packaging and morphology in ejaculated human spermatozoa: evidence of hidden anomalies in normal spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 1996; 2: 139–144.

55. Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 1995; 52: 709-720.

56. Meirow D, Schenker JG. Cancer and male infertility. *Hum Reprod*. 1995; 10: 2017-22.

57. Agarwal A (2000) Semen banking in patients with cancer: 20-year experience. *Int J Androl* 23,16–19.

58. Agarwal A, Ranganathan P, Kattal N, Pasqualotto F, Hallak J, Khayal S, Mascha E. Fertility after cancer: a prospective review of assisted reproductive outcome with banked semen specimens. *Fertil Steril* 2004; 81: 342–348.

59. Baert Y, Van Saen D, Haentjens P, in't Velt P, Tournaye H, Goossens E. What is the best cryopreservation protocol for human testicular tissue banking? *Hum Reprod* 2013; 28: 1816-1826.

60. Jemma A Moody, Kamran Ahmed, Catherine Horsfield, Malene R V Pedersen, Tet Yap, Majid Shabbir. Fertility Preservation in Testicular Cancer - Predictors of Spermatogenesis. *BJU Int.* 2018; 122: 236-242.
61. Joensen UN, Jørgensen N, Rajpert-De Meyts E, Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome and Leydig cell function. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008; 102: 155-161.
62. Delouya G, Baazeem A, Boman JM, Violette P, Saad F, Zini A. Identification of spermatozoa in archived testicular cancer specimens: implications for bench side sperm retrieval at orchidectomy. *Urology* 2010; 75: 1436-1440.
63. Choy JT, Wiser HJ, Bell SW, Cashy J, Brannigan RE, Köhler TS. Predictors of spermatogenesis in orchiectomy specimens. *Urology* 2013; 81: 288-292.
64. Beaud H, Tremblay AR, Chan PTK, Delbes G. Sperm DNA Damage in Cancer Patients. *Adv Exp Med Biol* 2019; 1166: 189-203.
65. Gandini L, Sgrò P, Lombardo F, Paoli D, Culasso F, Toselli L, Tsamatropoulos P, Lenzi A. Effect of chemoradiotherapy on sperm parameters of testicular cancer patients. *Hum Reprod* 2006; 21: 2882-2889.
66. Trottman M, Becker AJ, Stadler T et al. Semen quality in men with malignant diseases before and after therapy and the role of cryopreservation. *Eur Urol.* 2007; 52: 355-367.
67. Jemma A Moody, Kamran Ahmed, Catherine Horsfield, Malene R V Pedersen, Tet Yap, Majid Shabbir. Fertility Preservation in Testicular Cancer - Predictors of

Spermatogenesis. *BJU Int.* 2018; 122: 236-242.

68. Akanksha Mehta, Alexander Bolyakov, Peter N Schlegel, Darius A Paduch. Higher Pregnancy Rates Using Testicular Sperm in Men with Severe Oligospermia. *Fertil Steril* 2015; 104: 1382-1387.

69. Sandro C. Esteves, Matheus Rnque, Cara K. Bradley and Nicolas Garrido. Reproductive outcomes of testicular versus ejaculated sperm for intracytoplasmic sperm injection among men with high levels of DNA fragmentation in semen: systematic review and meta-analysis. *Fert Steril* 2017; 108: 456-467.

70. Furuhashi K, Ishikawa T, Hashimoto H, Yamada S, Ogata S, Mizusawa Y, Matsumoto Y, Okamoto E, Kokeyuchi S, Shiotani M.

Onco-testicular sperm extraction: testicular sperm extraction in azoospermic and very severely oligozoospermic cancer patients. *Andrologia* 2013; 45: 107-110.

71. M Roque, M Sampaio, P G de Oliveira Salles, S Geber. Onco-testicular Sperm Extraction: Birth of a Healthy Baby After Fertility Preservation in Synchronous Bilateral Testicular Cancer and Azoospermia. *Andrologia* 2015; 47: 482-485.

72. Nakata K, Yoshida K, Yamashita N. Preclinical evaluation of a new cryopreservation container for a limited number of human spermatozoa. *J Reprod Dev* 2019; 9; 65: 297-304. doi: 10.1262/jrd.2017-086.

73. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: Comparison of protocols with glycerol,

propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. Hum Reprod. 2005; 20: 1676-1687.

74. Curaba M, Poels J, Langendonck A, van, Donnez J, Wyns C. Can prepubertal human testicular tissue be cryopreserved by vitrification? Fertil Steril 2011a; 95: 2123.

75. Unni S, Kasiviswanathan S, D'Souza S, Khavale S, Mukherjee S, Patwardhan S, Bhartiya D. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. Fert Steril 2012; 97: 200-208.

76. Pacchiarotti J, Ramos T, Howerton K, Greilach S, Zaragoza K, Olmstead M, Izadyar F. Developing a clinical-grade cryopreservation protocol for human testicular tissue and cells. Biomed Res Int 2013; 2013: 930-962.

77. Baert Y, Braye A, Struiji RB, Pelt AMM, van Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter in vitro cell dynamics. Fert Steril 2015; 104: 1244-1252.

78. Poels J, Van Langendonck A, Many M-C, Wese F-X, Wyns C. Vitrification preserves proliferation capacity in spermatogonia. Hum Reprod 2013; 28: 578-589.

79. Yango P, Altman E, Smith JF, Klatsky PC, Tran ND. Optimizing cryopreservation of human spermatogonial stem cells: comparing the effectiveness of testicular tissue and single cell suspension cryopreservation. Fertil Steril 2014; 102: 1491-1498.

80. Jens O.M. Karlson and Mehmet Toner. Long term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials 1996; 17: 243-256.

81. Hauser R, Bibi G, Yogev L, Carmon A, Azem F, Botchan A, Yavetz H, Klieman SE, Lehavi O, Amit A, Ben-Yosef D. Virtual azoospermia and cryptozoospermia--fresh/frozen testicular or ejaculate sperm for better IVF outcome? *J Androl* 2011; 32: 484-490.
82. Ito D, Wakayama S, Kamada Y, Shibasaki I, Kamimura S, Ooga M, Wakayama T. Effect of trehalose on the preservation of freeze-dried mice spermatozoa at room temperature. *J Reprod Dev* 2019; 9; 65: 353-359.
83. Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology* 1977; 272: 251-272.
84. Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol* 1984; 247: C125-C142.
85. Enrique Criado Scholz and Cristina González Navas, The Maining of Cryopreservation for in-vitro Fertilization Patients. *Recent Advances in Cryopreservation Chapter 6*: 83-122.
86. Poels J, Van Langendonck A, Dehoux JP, Donnez J, Wyns C. Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. *Theriogenology* 2012; 77: 1008-1013.
87. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, Hata K, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun* 2014; 5: 4320.
88. GEORGE MORRIS CURTIS. THE MORPHOLOGY OF THE MAMMALIAN SEMINIFEROUS TUBULE. AUTHOR'S ABSTRACT OF THIS PAPER ISSUED BY THE BIBLIOGRAPHIC SERVICE, JULY 19, 339-390.

関連論文

1. Nakata K, Yamashita N, Noda Y, Ohsawa I. Stimulation of human damaged sperm motility with hydrogen molecule. *Med Gas Res.* 2015 Jan 10; 5: 2.
2. The Well-of-the-Well system: an efficient approach to improve embryo development. Vajta G, Korösi T, Du Y, Nakata K, Ieda S, Kuwayama M, Nagy ZP. *Reprod Biomed Online.* 2008; 17:73-81.
3. Production of the first offspring from oocytes derived from fresh and cryopreserved pre-antral follicles of adult mice. Kagawa N, Kuwayama M, Nakata K, Vajta G, Silber S, Manabe N, Kato O. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14: 693-9.
4. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K, Honjo T, Ogura A. *Hum Reprod.* 2002; 17: 3039-45.
5. Improved postimplantation development of rabbit nuclear transfer embryos by activation with inositol 1,4,5-trisphosphate. Inoue K, Ogonuki N, Yamamoto Y, Noguchi Y, Takeiri S, Nakata K, Miki H, Kurome M, Nagashima H, Ogura A. *Cloning Stem Cells.* 2002; 4: 311-7.

謝辞

MAYU®の開発から特許出願、実験場所、実験費用、論文投稿費用について、全面的にご協力、ご支援をいただきました、医療法人社団煌の会 山下湘南夢クリニック 山下直樹院長にはひとかたならぬお世話になりました。深謝申し上げます。

MAYU®の製品開発にあたって、試作品を何度も作製していただいた株式会社 STREX の石田敬雄社長に感謝申し上げます。

極少数の精子凍結の実験につきまして、実験動物委員会への書類作成や申請、マウスの実験場所とレスピエントマウスの飼育、産仔の経過観察、論文のご指導をいただきました、桐蔭横浜大学医工学部生命医工学科の吉田薫教授に感謝申し上げます。

精巣がん患者の組織凍結融解の実験につきまして、組織のご提供、実験環境を与えてくださった金沢大学大学院医学系研究科集学的治療分野泌尿器科の溝上敦教授、金沢大学の倫理委員会に提出する書類作成、精巣がん患者へのインフォームドコンセントから精巣組織の切り出し、論文の内容を加筆修正いただいた飯島将司先生、実験場所の提供と精巣内の精子の確認、組織標本の評価、論文の内容を加筆修正いただいた仲田浩規先生に感謝申し上げます。

マウス精巣組織の凍結融解の実験につきまして、実験計画から実験動物委員会への書類作成や申請、実験へのご協力ならびに論文の内容を懇切丁寧にご指導いただいた、山梨大学生命環境学部生命工学科の若山照彦教授、若山清香先生に深謝申し上げます。


学位審査にあたりまして、温かなご意見、ご指導をいただきました、黒澤尋教授、幸田尚教授、岸上哲士教授に心から感謝申し上げます。

医療法人社団煌の会 山下湘南夢クリニックのスタッフの皆様、山下湘南夢クリニックの倫理委員会の倫理委員の先生の皆様、株式会社 STREX の社員の皆様、MAYU のデモンストレーションにご協力してくださった、ミオ・ファイティリティ・クリニックの見尾保幸先生、培養室の皆様、松田ウイメンズクリ

ニックの松田和洋先生、培養室の皆様、国際医療福祉大学の柳田薫先生、培養室の皆様、桐蔭横浜大学の研究員、学生の皆様、金沢大学の泌尿器科の医師の皆様、研究員の皆様、山梨大学の研究員、学生の皆様にも感謝申し上げます。

最後になりますが、大学院博士号を取得するにあたって、理解し協力してくれた家族、また、今は天国にいると思いますが、博士号を取ることをいつも応援し、夢をあきらめないことを教えてくれた育ての母親である祖母に、心から感謝しています。

本当にありがとうございました。

※ 甲第	号	学位申請者氏名	鎌田 久美子
論文目録			
1 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」			
2 関係論文			
(1) 論文題目 Preclinical evaluations of a new cryopreservation container for a limited number of human spermatozoa.			
著者名 Kumiko Nakata, Kaoru Yoshida, Naoki Yamashita			
J Reprod Dev 2019; 9: 65: 297-304.			
本文第1章、第2章に対応			
			学位申請者 鎌田 久美子 

※印の欄は記入しないこと。