

氏 名（本籍） 萬 代 泰 男

学位の種類 博 士 （ 医 学 ）

学位記番号 医 第 2393 号

学位授与年月日 平 成 4 年 2 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最終学歴 昭 和 60 年 3 月 26 日
東北大学医学部医学科卒業

学位論文題目 ハムスター未受精卵に対する凍結融解法の検討
－ハムスターテストおよび体外受精による生存
性の評価－

（主 査）

論文審査委員 教授 矢 嶋 聰 教授 折 笠 精 一

教授 信 永 利 馬

論文内容要旨

【目 的】

ヒト体外受精・胚移植プログラムにおいて、初期胚の凍結保存に起因する諸問題を回避するためや、oocyte banking, oocyte donation の概念の臨床応用のために未受精卵の凍結保存が検討されている。哺乳動物未受精卵の凍結融解後の生存率、受精率は一般に低く、マウス未受精卵の凍結保存法の報告以来、ラットや家兎などで成功しているに過ぎない。本研究では、ハムスター未受精卵をモデルとして、凍結融解条件として凍結保護剤の濃度および卵丘細胞の存在の影響につき検討し、融解後の生存性を①透明帯除去卵へのヒト精子侵入、②同種精巢上体尾部精子との体外受精により検討してみた。

【実験方法】

【実験1】PMSG-HCGにより過排卵処理を行なった性成熟雌ゴールデンハムスターより排卵卵子を採取した。凍結前の hyaluronidase 処理の有無により卵丘細胞(-)群と卵丘細胞(+)群に分けた。0.5M~3.0Mの6種類の濃度のDMSOおよび1.5M PROH+0.25M ショ糖を凍結保護剤として用い、室温で10分間平衡後、植氷点まで毎分2℃の速度で冷却、手動植氷後、-40℃まで毎分0.3℃の速度で冷却し、液体窒素に浸漬する急速凍結法を行なった。37℃温水中で急速融解を行ない、凍結保護剤を希釈除去、形態学的に正常な卵のみを用いた。swim-up法にて運動良好ヒト精子を回収し、前培養後、trypsin処理により透明帯を除去したハムスター卵との媒精を行なった。4時間後、卵細胞質内の膨化精子頭部および雄性前核形成により精子侵入率を求めた。

【実験2, 3】1.0M, 2.0M DMSOおよび1.5M PROH+0.25M ショ糖を凍結保護剤として用い、卵丘細胞に包まれた状態の排卵卵子に実験1と同様の凍結融解操作を行なった。また、凍結保護剤の毒性および高浸透圧性が卵の受精能におよぼす影響を検討するため、2.0M DMSO, 1.5M PROHおよび1.5M PROH+0.25M ショ糖を用い、室温で凍結保護剤の添加・希釈除去操作のみを行なった。同種精巢上体尾部精子を受精能獲得のために2~4時間の前培養を行ない、濃度を 50×10^4 /mlに調整し、融解した卵を5%CO₂ in air, 37℃で体外受精を行なった。4~6時間後、囲卵腔内精子侵入・卵細胞質内での膨化精子頭部・精子尾部を伴った雄性前核形成をもって受精と判定した。

【実験結果】

【実験1】卵丘細胞（－）群および卵丘細胞（＋）群とも0.5M DMSOを用いた場合、形態学的正常率が低く、凍結保護作用が不十分であった。1.0～2.0M DMSO および1.5M PROH+0.25M ショ糖を凍結保護剤として用いた場合、新鮮卵の精子侵入率：73%と差がなく、2.5M, 3.0M DMSOを用いた場合、形態学的正常性が保たれているが、高濃度の凍結保護剤の影響のために精子侵入率の低下がみられた。1.0～2.0M DMSO および1.5M PROH+0.25M ショ糖を用いた場合は、卵丘細胞（＋）群の方が、形態学的正常率がやや良好であった。

【実験2, 3】凍結融解実験では、1.0M および2.0M DMSO 群は新鮮卵群と同等の受精率（95%、96%；90%）であったが、多精子受精率はやや高い傾向（15%、16%；7%）にあった。1.5M PROH+0.25M ショ糖群では受精率（67%）が他の群に比べて有意に低く、受精像で受精途上卵率（37%）が有意に高かった。溶液対照実験でも、1.5M PROH 単独群およびDMSO 群においては新鮮卵と受精率（97%、97%；92%）に有意差を認めず、1.5M PROH+0.25M ショ糖群の受精率（62%）は他の群に比べて有意に低く、受精途上卵率（32%）は有意に高かった。非浸透性凍結保護剤として添加されたショ糖が融解後の受精過程に影響した可能性が示唆された。

【結論】

- (1) 1.0～2.0M DMSO および1.5M PROH+0.25M ショ糖を凍結保護剤として用い、急速凍結・急速融解を行なった場合、ハムスターテストでのヒト精子侵入率は新鮮卵と有意差がなかった。
- (2) 卵丘細胞（－）群と卵丘細胞（＋）群では、融解後の形態学的正常率およびハムスターテストでのヒト精子侵入率に有意差を認めなかった。卵丘細胞（＋）群では、凍結保護剤の添加・除去、凍結容器への封入・回収といった一連の操作が極めて容易であり、卵の成熟・生理的な受精過程という面を考え併せると卵丘細胞を付着させたまま凍結操作を行なうことの有用性が示唆された。
- (3) 1.0M および2.0M のDMSOを凍結保護剤として用い、卵丘細胞が付着したままの状態ですぐ急速凍結・急速融解することにより、新鮮卵と同等の体外受精能を保持することが初めて証明された。
- (4) 1.5M PROH+0.25M ショ糖を凍結保護剤として用いた場合の体外受精能の低下は、溶液対照実験より、非浸透性凍結保護剤であるショ糖の併用に起因するものと推察された。

審査結果の要旨

ヒトの体外受精・胚移植プログラムにおいて、初期胚の凍結保存はすでに臨床応用され、妊娠率の向上に寄与しつつある。

一方、初期胚の凍結保存に起因する諸問題を回避するためや、oocyte banking や oocyte donation の概念の臨床応用のために、未受精卵の凍結保存が検討されている。しかし、哺乳動物未受精卵の凍結融解後の生存率、受精率は一般に低く、マウス未受精卵の凍結保存法の成功の報告以来、ラットや家兎など限られた種で成功しているに過ぎない。

本研究では、ハムスター未受精卵をモデルとして、未受精卵の凍結融解法を試みている。凍結融解条件として凍結保護剤の種類・濃度および卵丘細胞の存在の及ぼす影響につき検討し、融解後の生存性を①透明帯除去卵へのヒト精子侵入（ハムスターテスト）、②同種精巢上体尾部精子との体外受精により検定し、以下の知見が得られている。

- (1) 1.0～2.0M DMSO および 1.5M PROH+0.25M ショ糖を凍結保護剤として用い、急速凍結・急速融解を行なった場合、ハムスターテストでのヒト精子侵入率は、対照である新鮮卵と有意差がないことが証明された。卵細胞質内の完全な脱水をきたす緩速凍結法よりは多少の水分を残して急冷をする急速凍結法を応用するのが適切であることが示唆された。
- (2) 卵丘細胞（-）群と卵丘細胞（+）群では、融解後の形態学的正常率およびハムスターテストでのヒト精子侵入率に有意差を認めなかった。卵丘細胞（+）群では、凍結保護剤の添加・除去、凍結容器への封入・回収といった一連の操作が極めて容易であり、卵細胞の機械的障害よりの保護、卵の成熟・生理的な受精過程という面を考え併せると、卵丘細胞を付着させたまま凍結操作を行なうことの有用性が示唆された。
- (3) 1.0M および 2.0M の DMSO を凍結保護剤として用い、卵丘細胞が付着したままの状態で急速凍結・急速融解をすることにより、凍結融解ハムスター未受精卵が新鮮卵と同等の体外受精能を保持することが初めて証明された。
- (4) 1.5M PROH+0.25M ショ糖を凍結保護剤として用いた場合の体外受精能の低下は、溶液対照実験より、非浸透性凍結保護剤であるショ糖の併用に起因するものと推察された。受精卵にとっては凍結融解後の生存性を高めるために添加されたショ糖が未受精卵においては受精能の低下をきたしたことは新たな知見である。

以上、本研究は、種として初めてハムスターの未受精卵の凍結融解法を確立し、生存性を体外受精により証明したものである。得られた知見・手技はヒトをはじめとした他の哺乳動物の未受精卵にも応用できるものであると考えられ、その研究意義は大きく、学位論文に充分値するものと判断される。