

氏名	遠藤 雄史
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博乙第4398号
学位授与の日付	平成25年 3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第5条第2項該当)
学位論文の題目	Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa involving clinical outcomes (簡単なヒト少数精子ガラス化凍結保存法の確立とその臨床応用)
論文審査委員	教授 舟橋 弘晃 教授 国枝 哲夫 准教授 辻 岳人

学位論文内容の要旨

The results of the current our studies indicated that both Cryotop (Kitazato Biopharma) and Cell Sleeper (Nipro) vitrification methods were clinically useful and reliable for single spermatozoon storage for severe male factor patients. Our simple methods could vitrified and warmed only the numbers of sperm cells needed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) without significant loss, and healthy child was born derived from a vitrified-warmed spermatozoon from a patient with non-obstructive azoospermia (NOA).

Techniques for the cryopreservation of small numbers of sperm have attempted to use various types of containers, but these are the only currently available options and the lack of an easily implemented technology has remained a major bottleneck. The present studies were aimed to develop novel methods.

We tried to vitrify a single spermatozoon using Cryotop, which is an open type system and has a simple structure to handle samples easily. Comparable sperm recovery rate was seen in both Cryotop and zona pellucida groups as sperm freezing containers. The frozen sperm obtained from ejaculates and testes could be recovered without significant loss and post-thaw motility rate was similar. The survival rate was significantly higher when sperm were treated with sucrose rather than with glycerol.

We also successfully developed another simple vitrification method for small numbers of human sperm using Cell Sleeper, which is a closed-vial type of cell-freezing container equipped with an inner tray. Cell Sleeper is commercially available and easy to prepare for use. On single sperm freezing, the best result obtained when sperm were frozen in 3.5 μ L of oil-free droplet and it was the most convenient volume for handling small numbers of sperm using an ICSI pipette equipped with a micromanipulator. Furthermore, we could recover sperm efficiently and quickly without significant loss.

We examined the clinical outcomes following intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with vitrified sperm from patients with severe male factor infertility. Three patients with severe oligozoospermia or NOA have undergone ICSI using vitrified-warmed sperm. Limited numbers of sperm were vitrified using Cryotop and Cell Sleeper. Four cycles underwent ICSI with vitrified sperm. Most warmed sperm were recovered successfully and injected individually into mature oocytes. Normally fertilized oocytes were developed and subsequently transferred to patient's uterus. A couple with NOA achieved a singleton pregnancy and concluded with full-term delivery of a healthy boy (2632 g).

論文審査結果の要旨

本提出論文は、ヒトの不妊治療で無精子症等の患者に施術される精巣内精子採取時に得られる少数精子の凍結保存方法の確立と臨床応用についての成果をまとめたものである。

先ず、これまで顕微授精に用いられる一つのヒト精子を失うことなく凍結保存するのに適した容器とその手法を見出すために、ヒトの卵母細胞のガラス化保存で広く利用されている Cryotop 法を改良した手法を、ヒト卵母細胞透明帯中に精子を入れてガラス化保存するこれまで報告されている方法を比較検討し、オープンタイプの Cryotop を用いたガラス化法による単数精子の効率的な凍結保存法を開発した。次に、汚染が危惧される液体窒素に直接接触しない閉鎖系の Cell Sleeper を用いたガラス化法での諸条件を検討し、少数精子の効率的な凍結保存・回収システムを開発することに成功した。さらに、これらの方法を臨床応用し、無精子症および乏精子症の患者の精巣から採取した少数の精子を Cell Sleeper を用いて開発したガラス化法で凍結保存し、加温後に実際に患者の配偶者の卵母細胞に顕微受精させて、健康な子を得ることに成功している。

以上の知見は、ヒト少数精子の凍結保存による長期保存技術として、さらにそれに係わる基礎資料として、高く評価できる。また、本提出論文が明らかにした知見は、生殖補助医療技術として人類の生殖に役立ち、医療上も極めて意義深いものである。また、本法を発表した欧州での学会では最も注目されたポスターに選ばれ、論文公表後は世界中の生殖補助医療機関から問い合わせが殺到し、多くの医療機関でこの手法が実施されている。

以上のことから、本学位審査委員会は、これらの成果をまとめた本論文の内容および参考文献を総合的に審査し、本論文は、博士（学術）の学位に値すると判断した。