



---

産婦人科領域における細胞・組織の凍結保存

---

生殖細胞  
卵巣保存

京野 廣一    西中千佳子    京谷利彦    中條友紀子    石川孝之  
藤井和博    大和田哲男    羽鳥真功    山海直

## 生殖細胞 卵巣保存

京野 廣一<sup>\*1</sup> 西中千佳子<sup>\*1</sup> 京谷利彦<sup>\*1</sup> 中條友紀子<sup>\*1</sup> 石川孝之<sup>\*1</sup>  
藤井和博<sup>\*2</sup> 大和田哲男<sup>\*2</sup> 羽鳥真功<sup>\*3</sup> 山海直<sup>\*3</sup>

妊孕力保持目的でホジキン病・非ホジキンリンパ腫に限定して、卵巣切片を凍結保存、治療後に融解・移植することにより、4例出産、1例妊娠継続中、1例流産、1例化学的妊娠が報告されている。移植当たりの臨床的妊娠率は30% (6/20) である。しかし凍結・移植に伴う原始卵胞損失により短期間しか卵巣が機能しないことや、MRD (minimal residual disease) の問題がある。この医療は全卵巣凍結, super-microsurgery, MRD 検出方法の確立により多くの悪性腫瘍患者の福音となる。

### はじめに

悪性腫瘍患者の妊孕力保持の方法として卵巣温存手術、卵巣に対して影響力の少ない化学療法を選択、ターゲットのみに照射する放射線療法、卵巣を移動して影響を軽減、その治療中に影響を軽減する GnRH analogue 併用などの報告がなされている。本稿では悪性腫瘍患者の治療に際し、卵巣機能不全になる前に卵巣の一部を摘出、体外で凍結保存し、治療後あるいは妊娠希望のときに卵巣を融解・移植し、卵巣機能を回復する方法<sup>1)~7)</sup>を紹介する (表1)。

<sup>\*1</sup>Koichi KYONO, Chikako NISHINAKA, Toshihiko KYOYA, Yukiko NAKAJO, Takayuki ISHIKAWA  
京野アートクリニック

<sup>\*2</sup>Kazuhiro FUJII, Norio OWADA  
株式会社 アビー

<sup>\*3</sup>Masanori HATORI, Tadashi SANKAI  
独立法人 医薬基盤研究所 豊長類医学研究センター  
〒980-0014 宮城県仙台市青葉区本町 1-1-1 (京野アートクリニック)

### I. 卵巣切片・卵胞・全卵巣

卵巣は凍結・移植に際し、卵巣切片 (2×5×15 mm)、分離した卵胞 (30~50 μm)、全卵巣 (10×15×30 mm) の3通りに使用される。各々、凍結方法、移植に伴う問題 (血管再生の速度、血管吻合の必要性、原始卵胞消失の度合い、卵巣機能の期間)、MRD などの問題も異なってくる。ただし、現在報告されている妊娠・出産例はすべて卵巣切片の凍結・融解・移植によるものである。また未婚か既婚か、年齢がおおよそ15歳以下かそれ以上か、疾患別の卵巣転移の確率や化学療法・放射線療法までの待てる期間により卵子凍結、胚凍結、卵巣凍結を選択する<sup>7)</sup> (表2)。

### II. 卵巣凍結

現在、卵巣切片を凍結保護剤として DMSO (dimethyl sulfoxide) や PROH (propanediol), EG (ethylene glycol) を、凍結器具として

表1 卵巣凍結融解・移植後の妊娠・出産報告

国名	著者 (発表年)	原疾患	卵巣機能 回復 生着/移植	再移植 有無	IVF/自然	妊娠/移植	結果
ベルギー	Donnez et al. (2004)	Hodgkin	8/8	1	自然	1/8	出産
イスラエル	Meirow et al. (2005)	Non-Hodgkin	1/1	0	IVF	1/1	出産
デンマーク	Rosendahl et al. (2006)	Hodgkin	1/1 (hetero)*	0	IVF	1/1	化学的 妊娠
	Anderson et al. (2007)	?	8/8	2	IVF	2/8	妊娠継続中** 出産
ベルギー	Demeestere et al. (2006)	Hodgkin	1/1	0	自然	1/1	流産***
	Demeestere et al. (2007)	Hodgkin	1/1	1	自然	1/1	出産***

\*hetero: heterotopic autotransplantation

\*\*妊娠継続中: 2007年7月3日現在 second trimester

\*\*\*同一患者にて流産と出産を報告

(文献7より引用)

表2 卵子凍結, 胚凍結, 卵巣凍結の比較

	卵子凍結	胚凍結	卵巣凍結*
適応	卵巣へ侵襲する確率が高い疾患	卵巣へ侵襲する確率が高い疾患	卵巣へ侵襲する確率が低い疾患
対象年齢	16歳以上 40歳まで	16歳~45歳	0歳から 40歳まで
未婚・既婚	未婚	既婚	未婚, 既婚
卵巣刺激	必須	必須	必要に応じて
化学療法までの期間	1~3カ月	1~3カ月	1~2週間
凍結方法	ガラス化法,	ガラス化法	緩慢凍結・急速融解(現在)
融解後生存率	90%以上	95%以上	切片, 卵胞, 全卵巣で異なる
妊娠手段: 自然 or ICSI	ICSI	ICSI (IVF)	自然 or ICSI (IVF)
出産	約 600例	多数	4例
インフォームド コンセント (治療)	研究段階	確立	研究段階
問題点	1回当たりの採卵数が限られ 児獲得まで10個以上の 成熟卵を要する	1回当たりの採卵数は限られるが, 凍結胚当たりの妊娠率は高い	MRDの問題 切片の場合, 卵巣機能期間 が数カ月~4年と短い

\*卵巣を自家移植する場合

(文献7より引用, 一部改変)

Cryovials を使用した緩慢凍結・急速融解方法が用いられている。徐々に簡易的なガラス化法に変わるであろう。また分離した卵胞はサイズが小さいので平衡化を短縮でき、凍結・融解は卵巣切片に比較し、容易である。1 個の全卵巣と血管を含めて凍結する方法（磁場環境下の凍結）<sup>9)</sup> が試みられているが研究段階である。この方法の長所は丸ごと卵巣凍結し、融解後、血管吻合により卵胞の消失を最小限に抑えて、長期間卵巣の機能を期待できることであり、今後の開発が切望される。また、卵巣を摘出した際、すぐに卵巣を凍結するのではなく、小さな卵胞を 19 gauge の針を穿刺して卵子を吸引し、未成熟卵子を体外培養して成熟卵子まで成熟させて凍結することも可能である。

Revel ら<sup>9)</sup>によれば平均年齢 16 歳の 18 例中 17 例で平均 8.5 個 (1~37 個)、total 167 個の卵子が回収でき、1 例は 37 個を未成熟のまますべて凍結を希望、残りの 16 例については残りの 130 個を体外培養して、total 76 個の成熟卵子を凍結できている。Huang ら<sup>10)</sup>も同様の方法により 4 症例で 8 個の成熟卵子を凍結保存している。もちろん穿刺後の卵巣はその後に通常どおり凍結保存する。現在の凍結方法では原始卵胞のみ生存し、胞状卵胞は死滅するので、少しでも拳児を得る可能性を高める有効な方法と考えられる。

### III. 移 植

卵巣切片の場合、正所移植として骨盤腔内・後腹膜腔、卵巣断面に、異所移植として腹直筋、前腕などに移植されている。問題点として生着するまでの血流回復にある。生着率を上げるために移植の 1 週間前に peritoneal window を形成したり<sup>1)</sup>、ゴナドトロピンやビタミン E を投与することが知られている。現状ではほぼ 100% 生着するが、原始卵胞の死滅のため、長期に機能するのが困難である。移植後の卵巣機能が低下あるいは消失した場合、再移植が行われる。Donnez ら<sup>1)</sup>や Demeestere ら<sup>6)</sup>の出産例は

再移植後によるものである。卵巣機能は移植後 4.5~5 カ月で回復し、数年機能する。Anderson ら<sup>5)</sup>による 6 例の移植患者は短いもので 7 カ月、長いもので 45 カ月機能している。そのうち 2 例は 16 カ月後、24 カ月後に再移植している。従って、卵巣を摘出する場合、再移植することも考慮し、卵巣機能を長期間保つために、片方の卵巣 1 個を摘出することを推奨している。

自然妊娠を待つか積極的に IVF を行うか、ゴナドトロピンを投与するか否か、FSH, LH の上昇に対して GnRH agonist, antagonist の投与するか否かについても議論の余地が残されている。分離した卵胞の場合は follicular basal lamina の働きにより悪性腫瘍細胞からの侵襲の心配が少なく（病理学者の意見では疑問が残る）、小さいため凍結保護剤による平衡化が短縮でき、移植後の迅速な血管再生が期待できるため、虚血時間の短縮、原始卵胞の損失を軽減できる長所がある<sup>11)</sup>。全卵巣の場合は理論的には super-microsurgery の技術により血管吻合して移植することにより、原始卵胞の死滅を最小限にして、長期間機能させることが可能になるであろう<sup>12)</sup>。

### IV. M R D

病理組織学的あるいは免疫組織化学的手法によって検索されるが、検出方法は疾患によって異なる。その例を下記に示す。ホジキン病では Reed-Sternberg cells を検出するための卵巣組織の病理学的検索や the surface markers CD15 and CD 30 を表現する悪性腫瘍細胞の存在を、慢性骨髄性白血病では Philadelphia chromosome を検出するために、RT-PCR が行われている。乳癌では病理学的検索 (HE 染色) と同時に specific tumor antigens を使用して卵巣組織の免疫組織化学的検討 Cam-5.2, GCDFP-15, ki-67 が実施されている。Sanchez ら<sup>13)</sup>の報告では乳癌患者で 58 例中 2 例 (3.4%) に悪性腫瘍細胞が検出されている。今後は確実に 100%

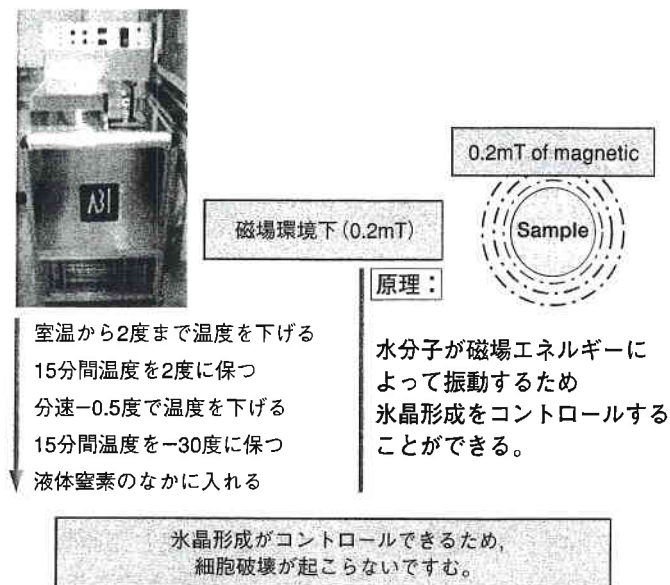


図1 磁場環境下卵巣凍結保存方法

MRDを検出できる方法の確立が必須である。

#### V. 卵巣への転移率

Donnezらはreview<sup>14)</sup>でリンパ腫の場合、卵巣への転移がほとんど0に近いと主張しており、ヨーロッパにおいてはホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫の場合に限定して移植されている。数名がこれを肯定する報告をしている。Yada-Hashimotoら<sup>15)</sup>は日本人64例の卵巣転移の症例を分析している。それによれば悪性卵巣腫瘍304例中64例、21.1%が転移性悪性卵巣腫瘍であり、婦人科臓器原発の腫瘍は26例、他の器官からの転移が38例であった。子宮体部由来15例23%、子宮頸部由来9例14%、卵管由来が2例3%であった。他の器官の場合、胃が15例23%、乳房9例14%、腸7例11%、その他7例11%（1例が悪性リンパ腫）であった。1981～2005年の25年間における日本での40歳未満の女性悪性腫瘍患者5,571例の剖検例（頻度の多い7大疾患；白血病2,027例、胃癌1,095例、リンパ腫736例、乳癌648例、子宮癌428例、肺癌381例、小腸・大腸癌256例）を調べてみた。それによると卵巣転移は多い順に胃

癌55.8%、小腸・大腸癌26.6%、乳癌24.1%、肺癌23.4%、子宮癌13.1%、リンパ腫12.0%、白血病8.4%であった。従って、リンパ腫といえども、転移率0%でなく、迅速かつ正確なMRDを検出する方法の開発が必須である。現状では転移の可能性が高い場合、絶対安全とはいえないが卵子の状態を凍結保存するのが望ましい。将来は原始卵胞からの体外培養技術が確立した場合にはその成熟卵子を使用し、MRD検出方法と全卵巣の凍結技術が確立した場合にはsuper-microsurgeryにより血管吻合して移植することになるであろう。

#### VI. 新しい凍結技術の紹介<sup>8)</sup>

磁場環境下に卵巣を丸ごと凍結するプロトコルを紹介する（図1）。この方法の場合、凍結保護剤や植氷の手技を必要とせず、原始卵胞だけでなく、前胞状・胞状卵胞をも生存させる可能性を秘めた技術である。5頭のカニクイザルの両側卵巣を月経初日に摘出、磁場環境下に凍結し、1カ月間液体窒素中で保存、融解後の異所性移植（筋肉や腎被膜下）を行った結果、5頭とも月経を発生した。このうち1頭は57

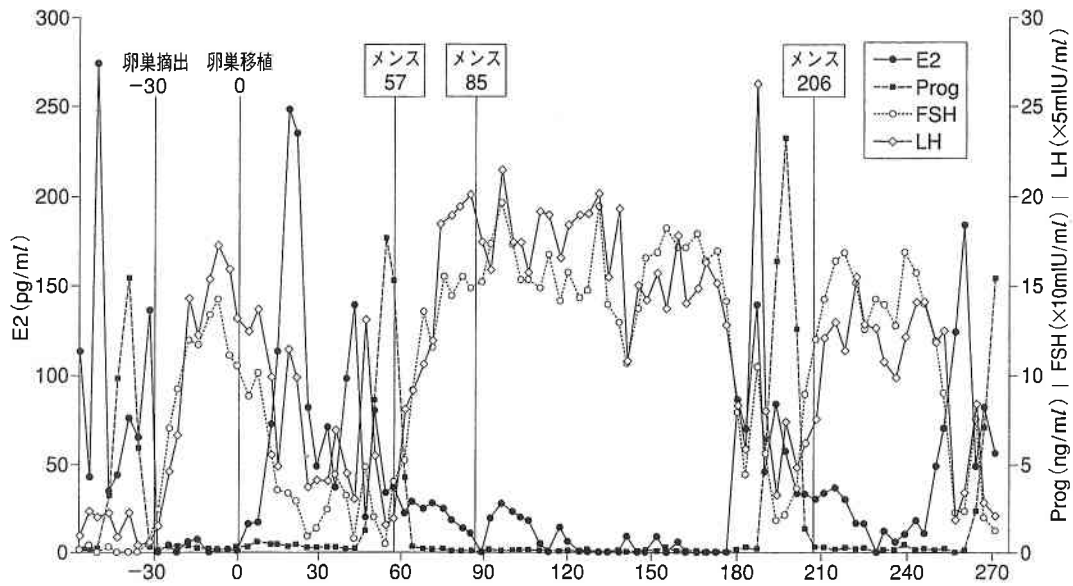


図2 卵巣摘出, 卵巣移植後のホルモン状態と月経 (カニクイザル1頭目)

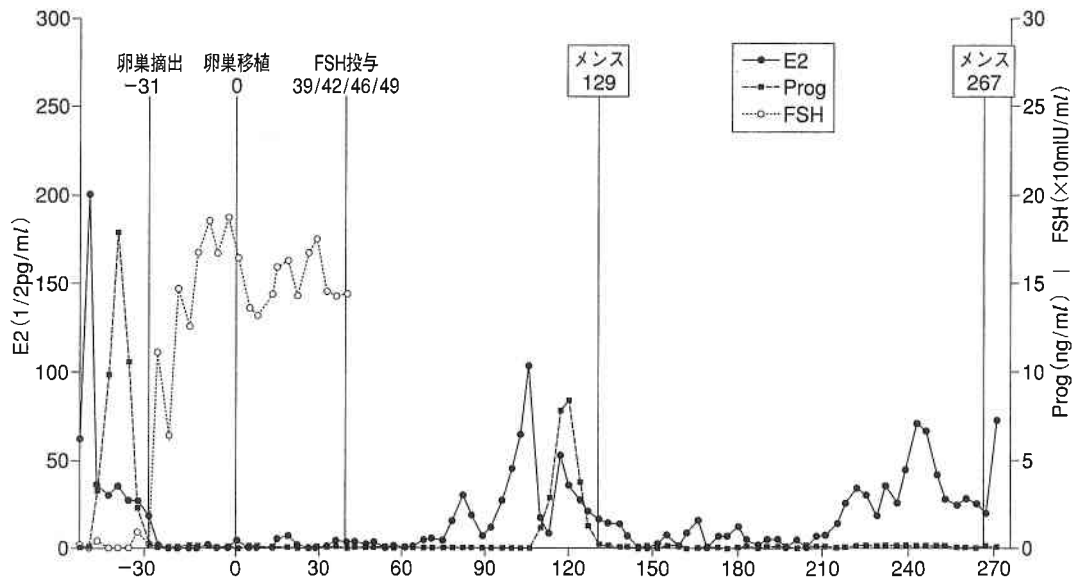


図3 卵巣摘出, 卵巣移植後のホルモン状態と月経 (カニクイザル2頭目)

日目と206日目に、2頭目は129日目にホルモン産生 (E2, P) を伴って月経を発生した。この事実は凍結・融解・移植後に原始卵胞と前胞状・胞状卵胞の両方が生存したことを示唆するものである (図2, 3)。

### おわりに

妊孕性温存を望む患者は確実に増加している。骨髄移植例ではすべて卵巣機能不全になることが報告されている<sup>16)</sup>。生命維持が最優先されるが、治療後のQOLも切望されている。現状でも妊孕性を保存するために卵巣・胚・卵子



を凍結保存することは可能である。妊孕性温存を望む患者のため、まずできるところから始めるべきではなからうか？ 地道に症例を重ね、学会報告、啓蒙することにより定着していくことを期待する。

## 文 献

- 1) Donnez J, Dolmans MM, Demylle D, et al : Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, **364** : 1405-1410, 2004.
- 2) Meirou D, Levron J, Eldar-Geva T, et al : Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med*, **353** : 318-321, 2005.
- 3) Rosendahl M, Loft A, Byskov AG, et al : Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue : Case report. *Hum Reprod*, **21** : 2006-2009, 2006.
- 4) Demeestere I, Simon P, Buxant F, et al : Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation : Case report. *Hum Reprod*, **21** : 2010-2014, 2006.
- 5) Anderson C, Loft A, Ernst E, et al : Assisted reproductive techniques after autotransplantation of frozen/thawed ovarian tissue. *Hum Reprod*, **22** suppl 1 : i41, 2007.
- 6) Demeestere I, Simon P, Emiliani S, et al : Ongoing pregnancy after a second cryopreserved ovarian tissue transplantation procedure. *Hum Reprod*, **22** suppl 1 : i43-44, 2007.
- 7) 京野廣一 : 妊孕性温存のための卵巣組織の凍結保存. *産婦治療*, **96** : 72-76, 2008.
- 8) Kyono K, Hatori M, Sultana F, et al : Cryopreservation of the entire ovary of cynomolgus monkey in a magnetic field environment without using cryoprotectants. *Hum Reprod*, **23** : i198, 2008.
- 9) Revel A, Aizenman A, Porat-Katz A, et al : At what age can human oocytes be obtained ? *Hum Reprod*, **22** suppl 1 : i43, 2007.
- 10) Huang JYJ, Tulandi T, Holzer H. et al : Combining ovarian tissue cryobanking with retrieval of immature oocytes followed by in vitro maturation and vitrification : an additional strategy of fertility preservation. *Fertil Steril*, **89** : 567-572, 2008.
- 11) Martinez-Madrid B, Dolmans MM, Van Langendonck A, et al : Ficoll density gradient method for recovery of isolates human ovarian primordial follicles. *Fertil Steril*, **82** : 1648-1653, 2004.
- 12) Mihara M : Super Micro-surgery for mammalian ovary transplantation and vascularised whole organ cryopreservation. *25th AMJSFI*, p 78, 2008.
- 13) Sanchez M, Rosello-Sastre E, Teruel J, et al : Incidence of micrometastasis in women with breast cancer requesting ovarian cryopreservation to preserve fertility. *Hum Reprod*, **22** : i43, 2007.
- 14) Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, et al : Ovarian tissue cryopreservation and transplantation : a review. *Hum Reprod Update* : 1-17, 2006.
- 15) Yada-Hashimoto N, Yamamoto T, Kamiura S, et al : Metastatic ovarian tumors : a review of 64 cases. *Gynecol Oncol*, **89** : 314-317, 2003.
- 16) Schmidt KLT, Anderson CY, Loft A, et al : Follow-up of ovarian function post-chemotherapy following ovarian cryopreservation and transplantation. *Hum Reprod*, **20** : 3539-3546, 2005.