

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

## 卵巣組織凍結・移植

—新しい妊孕性温存療法

Ovarian tissue cryopreservation new practice in fertility preserve



洞下由記(写真) 鈴木 直

Yuki HORAGE and Nao SUZUKI

聖マリアンナ医科大学産婦人科学

◎近年、生殖年齢患者に対する化学療法や放射線療法によって起こる妊孕性喪失は、非常に大きな問題であると認識されている。妊孕性温存療法は悪性腫瘍の種類や治療法、原疾患の治療開始までの期間、年齢、婚姻関係などにより選択が異なる特殊な治療である。そのなかでも卵巣組織凍結はまだ世界で30名前後の出産例があるのみの新しい技術であるが、どの年齢でも施行可能である点、数日という短期間で施行できる点、大量の原始卵胞を保存できる点で、他の妊孕性温存療法より優れた治療法である。しかし、卵巣転移の可能性が高い患者には移植時に癌細胞が再移入する可能性があり、施行不可能である。新しい凍結方法であるガラス化法による凍結融解後の妊娠例が最近報告された。今後さらに技術の確立と安全性など適応の検討が十分に必要であるものの、卵巣組織凍結は若年癌患者の妊孕性温存療法の主要な方法のひとつとして、近い将来確立されることが予想される。

**Key word** 妊孕性温存, 卵巣組織凍結, 化学療法, ガラス化法

### ● 妊孕性温存の現状

近年、若年癌患者の罹患率増加に加え、治療成績向上の結果として癌克服患者(cancer survivor)が増加していることから、癌の生命予後だけでなくQOL(quality of life)についても大きな関心が寄せられている。とくに生殖年齢患者に対する化学療法や放射線療法によって起こる妊孕性喪失は、非常に大きな問題であると認識されている。また、生殖医学の進歩によって少数の配偶子からの妊娠出産や生殖細胞や組織の凍結可能になり、妊孕性温存療法に大きな変革をもたらされた。癌治療後に卵巣機能不全となるリスクを表1に示す<sup>1)</sup>。

妊孕性温存のガイドラインとしては2006年、アメリカ臨床腫瘍学会(American Society of Clinical Oncology: ASCO)が若年癌患者における妊孕性温存に関する世界初のガイドラインを発表し、妊孕性温存の実施が不十分である現状を指摘した<sup>2)</sup>。また、癌治療後の月経再開をもって妊孕性

温存とすべきではないことが示された。その後のドイツ語圏を中心とした癌患者の妊孕性温存ネットワーク(FertiPROTEKT)のガイドラインでは、妊孕性温存療法は癌治療医の了解と同意のもとに施行すべきであり、それにより癌治療の延期や変更をすべきではないことが強調された<sup>3)</sup>。わが国においては2011年11月に日本がん・生殖医療研究会(NPO Japan Society for Fertility Preservation: JSFP)が設立され、日本の実情に合わせたガイドライン策定やネットワークの構築に向けての活動が開始されたばかりである(<http://www.j-sfp.org/>;「サイドメモ1」参照)。

### ● 妊孕性温存の方法

妊孕性温存療法は、悪性腫瘍の種類および治療法、原疾患の治療開始までに許された期間、年齢、婚姻関係によっても選択が異なる特殊な治療である。女性における悪性腫瘍の種類および治療法から考慮される妊孕性温存療法の選択法を図1に示

表 1 癌治療後に卵巣機能不全となるリスク(女性; ASCO 2013)<sup>1)</sup>

リスク	治療プロトコール	患者および投与量などの因子	使用対象疾患
High risk* <sup>1</sup>	アルキル化剤 <sup>#</sup> + 全身放射線照射		白血病への造血幹細胞移植の前処置, リンパ腫, 骨髄腫, Ewing肉腫, 神経芽細胞腫, 絨毛癌
	アルキル化剤 <sup>#</sup> + 骨盤放射線照射		肉腫, 卵巣に対して
	シクロホスファミド総量	5 g/m <sup>2</sup> (>40歳), 7.5 g/m <sup>2</sup> (<20歳)	乳癌, 非Hodgkinリンパ腫, 造血幹細胞移植の前処置
	プロカルバジンを含むレジメン	MOPP: >3コース, BEACOPP: >6サイクル	Hodgkinリンパ腫
	テモゾラミド or BCNUを含むレジメン + 全脳放射線照射		脳腫瘍
	全腹部あるいは骨盤放射線照射	>6 Gy(成人女性), >10 Gy(初経発来前), >15 Gy(初経発来後)	Wilms腫瘍, 神経芽細胞腫, 肉腫, Hodgkinリンパ腫, 卵巣に対 して
	全身放射線照射		造血幹細胞移植
	全脳放射線照射	>40 Gy	脳腫瘍
Intermediate risk* <sup>2</sup>	シクロホスファミド総量	5 g/m <sup>2</sup> (30~40歳)	乳癌など
	乳癌に対するAC療法	×4コース + パクリタキセル or ドセタキセル(<40歳)	乳癌
	FOLFOX4(フルオロウラシル・フォリン酸・オキサリプラチン)		大腸癌
	シスプラチンを含むレジメン		子宮頸癌
	腹部あるいは骨盤放射線照射	10~15 Gy(初経発来前), 5~10 Gy(初経発来後)	Wilms腫瘍, 神経芽細胞腫, 脊髄 腫瘍, 脳腫瘍, ALLやHodgkin リンパ腫再発
Lower risk* <sup>3</sup>	アルキル化剤以外の薬剤を含む レジメン	ABVD, CHOP, COP, 白血病に対する多剤療法	Hodgkin病, 非Hodgkinリンパ 腫, 白血病
	シクロホスファミドを含むレジメン	CMF, CEF, CAF(<30歳)	乳癌
	アントラサイクリン系 + シタラビン		AML
Very low or no risk* <sup>4</sup>	ビンクリスチンを用いた多剤療法 放射性ヨウ素		白血病, リンパ腫, 乳癌, 肺癌 甲状腺癌
Unknown* <sup>5</sup>	モノクローナル抗体(アバスチン <sup>®</sup> *, エルビタックス <sup>®</sup> , ハーセプチン <sup>®</sup> ) チロシキナーゼ阻害剤(タルセバ <sup>®</sup> , グリベック <sup>®</sup> )		大腸癌, 非小細胞肺癌, 頭頸部癌, 乳癌 非小細胞肺癌, 膵癌, CML, GIST

\*アルキル化剤: プスルファン, カルムスチン, シクロホスファミド, イホスファミド, ロムスチン, メルファラン, プロカルバジン.

\*アバスチン: 卵巣毒性を有する可能性あり.

\*<sup>1</sup>High risk: >70%の女性が治療後に無月経となる.

\*<sup>2</sup>Intermediate risk: 30~70%の女性が治療後に無月経となる.

\*<sup>3</sup>Lower risk: <30%の女性が治療後に無月経となる.

\*<sup>4</sup>Very low or no risk: 月経には影響ない.

\*<sup>5</sup>Unknown: 未知.

す。ASCO 2013のガイドラインでは妊孕性温存方法を、標準的治療(standard)と臨床試験段階治療(experimental)に分けている<sup>1)</sup>。以下、それぞれについて、ASCOガイドライン2013に基づいて説明する。

### 1. 胚(受精卵)凍結(カテゴリー: standard)

胚(受精卵)凍結は成熟卵を採卵し精子と受精さ

せて受精卵を体外で作成し凍結保存する方法であり、一般不妊治療としても行われているもっとも確立された技術である。配偶者の精子が必要で、月経開始後から約2~4週間の時間が必要である。

### 2. 卵子(未受精卵)凍結

(カテゴリー: standard)

卵子(未受精卵)凍結は成熟卵を採卵し受精させ

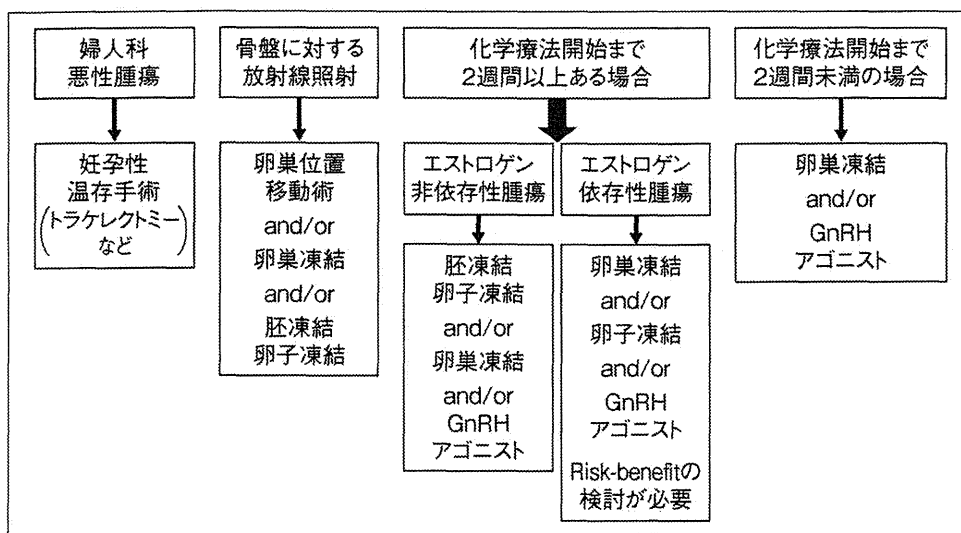


図 1 悪性腫瘍の種類および治療法から考慮される妊孕性温存療法の選択法

ないで凍結保存する方法であり、月経開始後から平均2~4週間の時間が必要である。移植当りの妊娠率は36~61%と報告されている<sup>4)</sup>。近年、凍結技術の進歩により妊娠率は改善しつつあるが、胚移植当りの生産率は悪くはないものの卵子当りの生産率は低い。配偶者がいなくても施行が可能であり、将来の婚姻関係に柔軟に対応できる利点がある。

### 3. 精子凍結(カテゴリー：standard)

精子凍結は射出精子を洗浄濃縮し凍結保存する確立された技術であり、24~48時間ごとに施行可能である。将来凍結精子を使用するときには人工授精や体外受精が必要になる。癌克服患者における凍結精子を利用した生殖補助医療を用いての妊娠率は20~27%と報告がある<sup>5)</sup>。

### 4. 卵巣遮蔽や卵巣位置移動術 (カテゴリー：standard)

卵巣遮蔽や卵巣位置移動術は放射線照射時に金属板で卵巣を遮蔽する方法<sup>6)</sup>や、放射線照射範囲外に卵巣位置を移動固定する方法であり、移動術は外科的処置(通常は腹腔鏡)が必要である。骨盤放射線治療からは、79~100%の卵巣機能を温存できるが<sup>7)</sup>、移動術の場合、化学療法による影響は避けられない。

### 5. 卵巣組織凍結(カテゴリー：experimental)

卵巣組織凍結は卵巣を摘出して(全部または一部の組織)凍結保存し、後に凍結卵巣を融解して移植するか、移植せずに体外培養により卵子を得

る方法である(未確立技術)。腹腔鏡下手術で行い、1~4日間あれば施行可能である。まだ世界で30名前後の出産例があるのみの新しい技術である<sup>8)</sup>。卵巣転移の可能性が高い患者には施行不可能であるが、小児女児にとっては唯一の妊孕性保存方法になる。詳細は後に述べる。

### 6. 精巣組織凍結(カテゴリー：experimental)

精巣組織凍結は精巣を生検で摘出して凍結保存し、後に凍結精巣を融解して移植するか、移植せずに体外培養により精子を得る(未確立技術)。ヒトでの成功率の報告はない。

**サイド  
メモ  
1**

**日本がん・生殖医療研究会  
(JSFP)**

JSFPは、がん・生殖医療の実践と啓発のため、2012年11月3日に設立されたNPO法人である。「がん治療医と生殖医療医と患者の間に生じている妊孕性温存に関する情報のギャップをなくし、より安全かつ確実な方法で患者が妊孕性温存治療を選択することができる社会づくり」を目的とし、日本の実情に合わせたガイドライン策定やネットワークの構築に向けての活動を行っている。若年癌患者に対する妊孕性温存療法に関する正確な情報を的確なタイミングで提供できるように、腫瘍専門医と生殖医療を専門とする産婦人科の密接な医療連携構築をめざしている。詳細はHPを参照されたい(<http://www.j-sfp.org/>)。

## 7. 卵巣機能抑制方法(ホルモン療法)

(カテゴリー: experimental)

卵巣機能抑制方法(ホルモン療法)は Gn-RH アナログを用いて卵巣機能を抑制する方法である。癌治療の2~4週間前から行うのが理想的であるが、その効果に関しては相反する報告があり、最近の報告では効果は否定的である<sup>9,10)</sup>。また、放射線療法からは卵巣機能を温存できない。

## 8. その他

ASCO 2013 ガイドラインでは精子ドナー、卵子ドナー、胚ドナー、代理母、養子縁組が standard カテゴリーとして提唱されている。日本では精子ドナーと養子縁組のみ法的に認められている。

## 卵巣組織凍結

1997年に Donnez らによって卵巣組織凍結はヒトに応用されるようになり、2004年に同じグループにより凍結卵巣融解移植による最初の出産例が報告された<sup>10)</sup>。Donnez らは25歳の Hodgkin 病患者(IV期)の卵巣を化学療法施行前に腹腔鏡下に一部摘出し凍結保存し、初回治療から6年経過した完全寛解後、融解した卵巣組織を卵巣の血管近傍の腹膜と右卵管采近傍の腹膜に自家移植したところ、移植後約半年で排卵を有する血中ホルモン動態を示すようになり、移植11カ月後に自然妊娠が成立した。これがヒトでの初めての生児獲得に成功した報告となった<sup>11)</sup>。その後も技術開発は続き、2008年には7名の出産例が報告された。現在、ヨーロッパを中心に卵巣組織凍結・自家移植が行われており、2013年2月の時点で、本技術によって24名の生児が得られていて、そのうちの約半数が自然妊娠であった<sup>12)</sup>。

2013年の Dolmans らのレビューでは、1997~2012年に582名の患者の卵巣組織凍結保存が報告されている<sup>12)</sup>。2013年5月に示された ASCO の Guideline Update において、卵巣組織凍結はいまだ“試験的な技術”であるとされている<sup>1)</sup>が、近年では「卵巣不全発来や緊急体外受精を施行しなければならない卵巣毒性を有する治療を受けるすべての若年女性癌患者に、選択肢として提供すべき医療行為である」と認識されつつある。

## 卵巣組織凍結の重要性

—小児にとっては唯一の妊孕性温存方法

卵巣組織凍結保存は配偶子凍結や卵子凍結保存に比べてより多くの卵子を保存できるうえ、エストロゲン分泌によるホルモン補充が可能となることから、妊孕性の温存だけでなく卵巣欠落症状の改善や、エストロゲン低下による心血管系障害の予防や骨密度低下を緩和することができる可能性をもつ。

また、採卵を必要としないことから、小児にも施行可能であり、小児においては唯一の妊孕性温存方法になる。Poirot らは10歳の鎌状赤血球症患者の片側卵巣を摘出し、造血幹細胞移植後の13歳時に卵巣自家移植を行った。その結果、移植より8カ月後に初潮を認めることができたと報告しており、性成熟という点からも小児に対する卵巣移植の有用性が示されている<sup>13)</sup>。現在、小児に対する卵巣組織凍結保存は積極的に行われてきており、最近の卵巣凍結に関する報告の18%が14歳以下である<sup>14)</sup>。Jadoul は16歳以下の女兒58人に対して、Fabbri は平均年齢13歳の45人に対して卵巣組織凍結保存を施行したという報告しており、さらに Michaeli らが作成した小児癌患者の卵巣凍結に関する新しいガイドラインでは、その適応をこれまで提言されていた3歳ではなく1歳以上とし、場合によってはそれ以下でも可能であるとして年齢的な適応を拡大している<sup>15)</sup>。

## 卵巣組織凍結保存の適応疾患

—微小残存病変の問題

Donnez らの施設においては卵巣組織凍結の対象を悪性疾患に限定せず、良性疾患でも化学療法を必要とする疾患や妊孕性を低下させうる免疫抑制剤を使用する膠原病、Turner 症候群などの早発卵巣機能不全の高リスク症例などさまざまな疾患を対象としている。Donnez らの施設における卵巣組織凍結の原疾患のうち悪性腫瘍は全体の82%であり、その内訳は血液腫瘍疾患(Hodgkin 病、非 Hodgkin 病、白血病など)がもっとも多く(44.3%)、乳癌(22.6%)、卵巣癌(9.6%)、横紋筋肉腫(9%)、子宮頸癌(5%)、脂肪肉腫(3.8%)と続いている<sup>16)</sup>。

悪性疾患を対象とする場合にもっとも問題となるのが、摘出卵巣における微小残存病変(minimal residual disease: MRD)の存在である。MRDが存在すると、癌治療後に卵巣移植した際に癌細胞が混入し再発するリスクがある<sup>17)</sup>。MRDの検出のためには組織学的な検索だけでは不十分であるといわれ、現在MRD検出方法として免疫組織染色、PCR法、実験動物への異種移植が実施されている。これまでに、卵巣組織の再移植による再発例の報告はないが、エビデンスは不十分であり、個々の症例ごとに癌の種類や進行度によって慎重に判断すべきである。

### 1. 白血病

白血病患者においては血中の腫瘍細胞はすべての臓器に存在しうると考えられ、癌細胞再移入の理論的リスクが高いため注意が必要であり、卵巣組織凍結・移植は禁忌であると考えられる。Rosendahlらの2010年の報告では、26例の白血病患者から採取した卵巣組織の免疫組織検査では悪性細胞は存在しなかった。しかし、そのうちの8例にPCR法を施行したところ、6例が陽性であったとされている<sup>18)</sup>。一方で、PCR法が陽性でもかならずしも腫瘍細胞が生存して再発するとは限らない。Dolmansらは、PCR法で白血病陽性マーカーが陽性であった9症例の卵巣組織の一部を免疫不全マウスへ移植したところ、癌細胞の増殖を認めたのは4症例であったと報告している<sup>19)</sup>。

### 2. 乳癌

乳癌は生殖年齢女性に高頻度に発症する悪性腫瘍である。58例の乳癌患者の卵巣組織を凍結し異なる3カ所から切片を作成し免疫組織化学染色を行ったところ、3.4%に乳癌細胞が検出されたとの報告もある<sup>20)</sup>。一方で、初期の乳癌患者51症例の報告では卵巣組織に転移は認められなかったという結果もあることから<sup>21)</sup>、乳癌の安全性および危険性についても一定の見解が得られていない。また、遺伝性乳癌・卵巣癌症候群の観点から、遺伝性乳癌(BRCA1・BRCA2遺伝子変異)患者に対する取扱いは慎重に行うべきである。

Rosendahlらの報告では、乳癌I～III期の51例から採取した卵巣皮質生検標本を対象とした病理組織検査と免疫染色では悪性腫瘍細胞は存在せ

ず、それらを免疫不全マウスに異種移植したが、いずれも再発を認めなかった<sup>22)</sup>。

## ● 卵巣組織の凍結方法

### — 新しいガラス化法の可能性

卵子や胚の凍結技術は、①緩慢凍結法と②ガラス化法の大きく2つに分かれる。緩慢凍結法は古くから開発された技術で、プログラムフリーザーを用いて凍結保護剤で処理した検体を一定の速度で冷却する方法である。この方法は高価な装置が必要で数時間の時間がかかり、組織へのダメージが比較的大きいことがデメリットであった。一方、ガラス化法(vitrification法)は、凍結保護剤で処理した検体を直接液体窒素に投入し急速に凍結する方法である。簡単なキットが開発されており、組織へのダメージが少なく短時間(約40分)で行えるメリットがあり、液体窒素の管理が可能であればどの施設でも施行可能である。現在の生殖医療現場での卵子や胚凍結はほとんどガラス化法で行われている。

これまでヨーロッパにて卵巣凍結によって得られた生児がすべて緩慢凍結法であることから<sup>23)</sup>、現時点では緩慢凍結法が標準的な卵巣組織凍結保存である。しかし、ヒト卵巣組織を用いた最近の検討では、ガラス化法のほうが緩慢凍結法よりも卵巣組織の形態や内分泌機能を保持する点で優れているとする報告がみられるようになった<sup>24,25)</sup>。ガラス化法は緩慢凍結法と比較して超急速に冷却するため氷晶形成が起こりにくく、組織へのダメージが少ない。しかし、グリセリンやDMSO、propandiolなどの細胞毒性を有する高濃度の耐凍剤に直接的に触れるため、組織への化学的障害が起こる可能性があり、安全性の確認や至適条件の検討が今後も必要である。実験レベルではガラス化法の有用性は十分に示されていて、今後ヒトでの臨床応用が期待される。

著者らの研究グループ(IVFなんばクリニック・森本義晴、橋本周、矢持隆行、近畿大学生物工学部遺伝子工学科・細井美彦、イブバイオサイエンス研究所・竹之下誠)はクライオサポートを用いた卵巣組織のガラス化法を開発し、ガラス化法を用いた凍結卵巣の融解自家移植を行っ



た。そして霊長類ではじめて、移植卵巢から採卵した卵子を用いた受精卵の獲得に成功した<sup>26-28)</sup>。現在、聖マリアンナ医科大学倫理委員会によって承認された臨床試験“若年女性癌および免疫疾患患者のQOL向上を志向した卵巢組織凍結ならびに自家移植”を進め、わが国ではじめてガラス化法の臨床応用を開始し、2013年12月現在、41症例に対して卵巢組織凍結・移植を施行している。

著者らは進行性に原始卵胞数が減少する早発閉経患者に対しても卵巢組織凍結の技術を応用し、卵巢組織を卵管へ移植した結果(IVA技術と併用)、2012年12月に世界ではじめてガラス化法によって生児を得ることができた<sup>29)</sup>。現在、あらたに妊娠継続中の患者がもう1人いることから、わが国の癌患者への応用が期待される。なお、2013年12月の段階で、わが国では7施設(岡山大学、聖路加国際病院、聖マリアンナ医科大学、順天堂大学、札幌医科大学、岐阜大学、滋賀医科大学)において、各施設のIRBにて本技術の臨床応用が承認されている。

## ● 卵巢組織凍結の将来

若年癌患者の妊孕性温存療法においては、原疾

サイド  
メモ  
2

### IVFからIVG-IVMへ

IVF(*in vitro* fertilization)体外受精は成熟卵胞を採取して受精させる生殖補助技術であるが、IVM(*in vitro* maturation)は未熟卵子を採取して体外培養し成熟させてから受精させる方法である。両者とも臨床的に確立された方法であり、一定の妊娠率を得ることができている。一方、IVG(*in vitro* growth)とは、さらにその前段階の卵胞そのものを体外で培養し卵子を得ようとする方法であり、ヒトにおける成功例はまだない。現在、ヒトのIVGでは、前胞状卵胞までは組織培養を行い、組織中で透見できるまでに成長してから卵胞を単離し培養して成熟卵を得ることに成功している。IVGが可能になれば、凍結卵巢組織を移植しなくても体外で成熟卵を得ることができるようになり、数万個の原始卵胞を活用できるようになる。今後さらに研究が発展し、IVG-IVMの臨床応用が可能となることを期待したい。

患が診断されて治療開始までの与えられた期間は長くても1カ月以内であることが多い。つまり体外受精し胚凍結が行えたとしても1~2クールが限界であり、一生分の妊孕性温存としてはけっして満足な治療にはならないが、卵巢凍結は多数の原始卵胞を1回に凍結することが可能であり、その方法は世界中で技術改革が試みられている。凍結組織切片の大きさや耐凍剤の種類や濃度の調整、凍結のデバイスなど技術に関する基礎研究も日々進歩している。凍結卵巢を移植しなくても体外で培養し成熟卵を得ることが可能になれば、微小残存病変混入のリスクはなくなる。その開発が進んでいることから、臨床応用がおおいに期待される(「サイドメモ2」参照)。

新しい凍結方法であるガラス化法による卵巢凍結の臨床結果は数年のうちにわが国において蓄積されると予想され、その安全性が確立されれば、緩慢凍結法に代わって今後一般的になる可能性がある。ガラス化法での卵巢組織が一般的になれば、施行できる施設の数も増え、妊孕性温存を希望する患者がより効率的に治療を受けられる環境ができる。卵巢組織凍結は採卵が必要ないためどの年齢でも施行可能である点、手術さえ可能な状態であれば数日という短期間で施行できる点、大量の原始卵胞を保存できる点で、他の妊孕性温存療法より優れた治療法である。今後もさらに技術の確立と安全性など適応の検討が十分に必要であるものの、若年癌患者の妊孕性温存療法の主要な方法のひとつとして近い将来確立されることが予想される。卵巢組織凍結・移植が若年癌患者の未来への希望につながることを期待している。

## 文献

- 1) Loren, A. W. et al. : *J. Clin. Oncol.*, **19** : 2500-2510, 2013.
- 2) Lee, S. J. et al. : *J. Clin. Oncol.*, **24** : 2917-2931, 2006.
- 3) Von Wolff, M. et al. : *Arch. Gynecol. Obstet.*, **284** : 427-435, 2011.
- 4) Pfeifer, S. et al. : *Fertil. Steril.*, **99** : 37-43, 2013.
- 5) van Casteren, N. J. et al. : *Fertil. Steril.*, **90** : 2245-2250, 2008.
- 6) Nakagawa, K. et al. : *Bone Marrow Transplant.*, **37** : 583-587, 2006.
- 7) Wo, J. Y. and Viswanathan, A. N. : *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **73** : 1304-1312, 2008.
- 8) Silber, S. J. : *Mol. Hum. Reprod.*, **18** : 59-67, 2011.

- 9) Bedaiwy, M. A. et al. : *Fertil. Steril.*, **95** : 906-914, 2010.
- 10) Hubinont, C. et al. : *Lancet*, **380** : 107-108, 2012.
- 11) Dolmans, M. M. et al. : *Fertil. Steril.*, **99** : 1514-1522, 2013.
- 12) Dolmans, M. M. et al. : *J. Assist. Reprod. Genet.*, **3** : 305-314, 2013.
- 13) Poirot, C. et al. : *Lancet*, **379** : 588, 2012.
- 14) Rosendahl, M. et al. : *Reprod. Biomed. Online*, **22** : 162-171, 2010.
- 15) Michaeli, J. et al. : *Obstet. Gynecol. Int.*, **2012** : 139193, 2012.
- 16) Schlatt, S. et al. : *Pediatr. Blood Cancer*, **53** : 274-280, 2009.
- 17) Dolmans, M. M. et al. : *Fertil. Steril.*, **99** : 1514-1522, 2013.
- 18) Rosendahl, M. et al. : *Fertil. Steril.*, **94** : 2186-2190, 2010.
- 19) Dolmans, M. M. : *Blood*, **116** : 2908-2914, 2010.
- 20) Sánchez-Serrano, M. et al. : *Hum. Reprod.*, **24** : 2238-2243, 2009.
- 21) Rosendahl, M. et al. : *Fertil. Steril.*, **95** : 2158-2161, 2011.
- 22) Rosendahl, M. et al. : *Reprod Biomed. Online*, **22** : 162-171, 2011.
- 23) Donnez, J. et al. : *Ann. Med.*, **43** : 437-450, 2011.
- 24) Isachenko, V. et al. : *Reproduction*, **138** : 319-327, 2009.
- 25) Oktem, O. et al. : *Fertil. Steril.*, **95** : 2661-2664, 2011.
- 26) Hashimoto, S. et al. : *Reprod. Biomed Online*, **21** : 501-509, 2010.
- 27) Igarashi, S. et al. : *Hum. Cell*, **23** : 26-34, 2010.
- 28) Suzuki, N. et al. : *Hum. Reprod.*, **27** : 2420-2429, 2012.
- 29) Kawamura, K. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** : 17474-17479, 2013.

\* \* \*



# 未受精卵子凍結保存の現状

河村 和弘 杉下 陽堂 鈴木 直

## はじめに

近年の凍結保存技術の向上により、未受精卵子の凍結保存が妊孕性温存のための方法として用いられるようになってきた。しかし、現状においても凍結未受精卵子を使用した体外受精胚移植の成績は、凍結胚を用いた融解胚移植の成績に劣る。しかし、女性の社会進出に伴う初婚年齢の上昇や未婚のがんサバイバーの増加から未受精卵子の凍結保存のニーズは増加している。

2013年9月に日本生殖医学会は、社会適応ならびに医学適応による未受精卵凍結保存ガイドライン仮案を提言し、2014年5月に日本産科婦人科学会は、医学適応による未受精卵子および卵巣組織の採取、凍結、保存に関する見解を会告として発表した。本稿では、社会的にも注目が集まっている未受精卵子凍結保存の現状について概説する。

## 未受精卵子凍結の対象

卵子の源である原始卵胞は、精子と異なり出生後にその数は新たに増加せず、母体内の胎生6か月の時期に卵巣内に約700万個を保有することで、一生分の卵子を有する状態で出生する。その数は出生時には40万個へと減少し、さらに初経時には20万個と減少する。通常、排卵の約6か月前に休眠している原始卵胞の

中から数百個の原始卵胞が選択され、活性化の後に発育を開始する。これらの卵胞は発育過程においてアポトーシスによる卵胞閉鎖が起こり、ほとんどは消失する。最終的には胞状卵胞に到達した数十個の卵胞のうち、月経周期におけるゴナドトロピンの調節作用により、主席卵胞のみが発育を続け、1個の卵子が排卵される<sup>1-3)</sup>。加齢に伴い出生時に保有していた20万個の原始卵胞は徐々に減少し、閉経時には残存原始卵胞数は1,000個を下回ると考えられている<sup>4)</sup>。さらに、加齢により卵子の質の低下も進み、その結果卵巣内の残存卵胞数の減少と卵子の質の低下の双方により妊孕性が低下する。また、たとえ妊娠に至っても、高齢患者では卵子の染色体異常の増加により流産率も上昇する<sup>5)</sup>。これらの問題を解決するための1つの方法として、未婚の女性が加齢による妊孕性低下の起こる以前に卵子を保存する方法が考えられてきた。この発想は、加齢ではなく病的な卵巣機能低下（早発卵巣機能不全）にも当てはまる。病的な卵巣機能低下は不可逆的で進行性であるため、完全に卵巣機能が廃絶して閉経する前に卵子凍結により将来の妊孕性への希望を残すことが可能となる。しかし、この場合には凍結保存可能な卵子数は少ない場合が多く、卵子の質が低下している高齢患者では難しい。

若年者のがん罹患率は近年増加傾向を示しているが、手術療法、化学療法そして放射線療法などを中心とした集学的治療や診断方法の進歩

かわむら かずひろ：聖マリアンナ医科大学産婦人科学 聖マリアンナ医科大学病院生殖医療センター  
 (〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生2-16-1)  
 すぎした ようどう：聖マリアンナ医科大学産婦人科  
 すぎき なお：聖マリアンナ医科大学産婦人科学

などに伴い、その治療成績は向上してきており、がん患者の生存率が改善してきている<sup>9)</sup>。しかし一部の若年女性がん患者は治療によって原疾患が寛解するが、生殖腺毒性のある化学療法および放射線療法後に卵巣機能不全となり、閉経の早期発来や妊孕性消失など女性としてのQOLの低下といった問題を抱える<sup>7)</sup>。がん患者が妊孕性を温存する方法としては、胚凍結、未受精卵子凍結、卵巣組織凍結といった技術がある。

既婚者では、生殖腺毒性のある抗がん治療前に体外受精を行い、胚凍結を行うことが可能である。しかし、未婚者の場合は、受精させることができないため、未受精卵子の凍結が適応となる。この凍結はがんの確定診断ののち、抗がん治療を実施する前までの限られた期間に行う必要がある。そのため、多数の未受精卵子を凍結保存することは通常困難である。抗がん治療前に一定数の卵子を凍結保存する方法として、卵巣組織凍結がある。卵巣組織凍結では、卵巣皮質を凍結保存することで非常に多くの卵子を初期卵胞の状態で確保することが可能となるが、白血病などの卵巣にがん細胞が存在しうる疾患においては、原疾患の寛解後に卵巣組織の解凍移植を行うことで、がん細胞を再度体内に移入させてしまう可能性が出てくる<sup>8)</sup>。また、卵巣組織凍結では凍結解凍による卵胞へのダメージの問題や、卵巣組織移植の際の正着率などの課題がある。

## 未受精卵子の凍結方法

### —超急速ガラス化法

現在、着床前期胚および未受精卵子の凍結保存は、超急速ガラス化保存法が主流である。1972年 Whittingham<sup>9)</sup>により緩慢凍結法によるマウス胚における凍結保存の成功例が報告され、ヒト胚の凍結保存に用いられてきた。一方、1985年 Rall と Fahy<sup>10)</sup>により、マウス8細胞胚のガラス化保存が報告され、現在主流となっている超急速ガラス化保存法<sup>10)</sup>が、2000

年から2007年にかけて桑山らによって確立されている<sup>11)</sup>。ガラス化保存法とは、培養液に高濃度の凍結保護物質を添加することによって、細胞内の水分同士の結合を阻害し、氷の結晶が発生しない状態で卵子を固化、極低温保存する手法である。超急速冷却ガラス化保存法は、 $-20,000\text{C}/\text{分}$ 以下のものと定義され、一度保存された胚および卵子は、半永久的に液体窒素中に保存が可能となる<sup>15)</sup>。超急速ガラス化法では、凍結保存するため細胞内を脱水し、氷晶形成が起こりづらい物質に細胞内液を置換する。凍結保護物質として、エチレングリコール、プロパンダイオール、グリセロール、ジメチルスルホキシドなどが知られており、いずれも細胞毒性を有する。そのため、より細胞毒性の少ない物質をより低濃度で細胞内液と置換できるかどうか、いまだ検討され続けている。

成熟卵子は細胞体積が大きく球形であるため、単位体積あたりの表面積が最小となり、浸透圧変化による物理的影響を受けやすく、細胞膜透過性が低いことや染色体の異常をきたしやすいため、凍結未受精卵子を用いた妊娠・出産の成功例はきわめて少なかった<sup>16)</sup>。

しかし、最近の報告では凍結未受精卵子の解凍・体外受精胚移植による妊娠出産は凍結胚の解凍胚移植後の妊娠率と比較すれば非常に低いものの、以前の緩慢凍結法のデータを主体に報告されていた数%という低値ではなくなり、Rienziら<sup>17)</sup>は15.8%であったと報告している。その成績向上の背景には、以下の技術的改善が関与している。

### ●凍結保護物質の高濃度化

凍結保護剤は細胞内脱水のために用いるが、凍結保護剤自体に細胞毒性がある。緩慢凍結時には凍結保護剤濃度を1.5 mol/L程度で凍結を実施するが、ガラス化法ではその濃度を4~8 mol/Lと上げるため、急速に細胞内脱水が起き、細胞内水分と凍結保護剤の置換が行われる。そのため、短時間で実施することが可能となり、凍結液保護物質の細胞毒性を減少させることに成功している。結果、細胞変性率の低下

とともに、細胞内外の氷晶形成率も減少し、凍結融解後の細胞生存率が改善してきている。

#### ■超急速冷却

氷晶が最もできやすい温度変化とは、 $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$ であり、細胞のガラス化が開始される $-120^{\circ}\text{C}$ 付近での細胞内環境がしっかりと凍結保護剤に置換されていれば、液相と固相が混在することで細胞内にクラックが生じ、細胞死を誘起することを避けることができる。 $-20,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ にてガラス化が開始されるが、それを上回る $-23,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の過冷却を実現する卵子（胚）保存のデバイスが開発され、最も不安定な温度領域を瞬時に $-196^{\circ}\text{C}$ まで冷却することが可能となった<sup>18)</sup>。

#### ■超急速加温

解凍の際には、凍結時と同様に $-20\sim-80^{\circ}\text{C}$ が最も氷晶形成率が高いが、解凍時にも同様に氷晶形成しやすい温度を瞬時に越える技術が必要となる。実際に瞬時に解凍するデバイスが存在し、加温板の上で加温することで $+43,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で解凍することが可能となり、氷晶形成やクラックの出現がほとんど生じなくなる<sup>18)</sup>。

#### ■凍結保護剤の排出

解凍時には、細胞内の凍結保護剤の相対濃度は50%以上となっているが、これを浸透圧により排出しなければならない。濃度勾配が強い場合には、細胞の膨張状態が起こり、細胞死に至る。そのため細胞膜を透過しない高濃度解凍液（シュークロース添加解凍液）に細胞をつけることで凍結保護剤が流出し、細胞内に水分が入る。あまりにも濃度が濃い場合には、細胞膜水が継続して細胞障害を起こす可能性があるため、その濃度勾配が重要であり、その方法が確立されつつある。

## 成熟卵子の凍結保存に関するASRMのガイドライン

2013年にアメリカ生殖医学会（American Society of Reproductive Medicine：ASRM）が、成熟卵子の凍結保存に関するガイドライン

を発表した。ガイドラインによれば、37歳以下の女性群と35歳の女性群の凍結未受精卵子を使用して体外受精胚移植を施行した場合、卵子1個当たりの妊娠率は4%と5.1%であったと報告している<sup>19,20)</sup>。この結果は、単純計算では100%の妊娠率となるためには約20個近くの卵子を凍結保存しておく必要があることを示唆している。一見非常に多くの卵子が必要であると感ぜられるかもしれないが、以前は2%以下の妊娠率と考えられていたため<sup>17)</sup>、技術が進歩しASRMでは未受精卵子凍結保存は、臨床研究の域を脱し、臨床技術であると定めた<sup>21)</sup>。

またこのガイドラインでは、凍結未受精卵子由来の児のリスクについても言及している。超急速冷却ガラス化法にて凍結保存した未受精卵子から生まれた200人の児は新鮮胚移植にて妊娠した児と比較した場合、出生体重、奇形など特に有意な異常所見は認められないと報告している。また、38歳以上の未受精卵子凍結については、十分に検討を有すると言及している<sup>22)</sup>。

## 社会的適応による卵子凍結保存に関する指針

日本生殖医学会では、2013年9月に社会的適応による未受精卵子の凍結保存ガイドラインを提言しており、以下にその内容を紹介する。

- (1) 加齢等の要因により性腺機能の低下を来す可能性を懸念する場合には、未受精卵子を凍結保存することが出来る。
- (2) 凍結・保存の対象者は成人した女性であり、未受精卵子等の採取時の年齢は、40歳以上は推奨出来ない。また凍結保存した未受精卵子等の使用時年齢は、45歳以上は推奨出来ない。
- (3) 本人の同意に基づき、未受精卵子等を凍結・保存することが出来る。
- (4) 実施時は、目頭および文章を用いて、未受精卵子等の採取、凍結と保存や、凍結さ

れた未受精卵子等による生殖補助医療（顕微授精）について十分に説明し、本人の同意を得るインフォームド・コンセントを実施しなければならない。

- (5) 未受精卵子等は、本人から破棄の意志が表明されるか、本人が死亡した場合には、直ちに破棄する。また、本人の生殖可能年齢を過ぎた場合には、通知の上破棄することが出来る。
- (6) 未受精卵子等を本人の生殖以外の目的で使用することはできない。
- (7) 本人から破棄の意志が表明され、また凍結された未受精卵子等を本人が生殖医学の発展に資する研究に利用することを許諾した場合であっても、当該研究等の実施に当たっては、法律や国、省庁のガイドラインに沿い、ICなどを含めた必要な手続きを改めて施行しなければならない<sup>23)</sup>。

本提言では、未婚成人女性の本人の希望により妊孕性を温存する指針が、本邦で初めて示された。

## 医学的適応による卵子凍結保存に関する指針

日本生殖医学会は2013年9月に、日本産科婦人科学会は2014年4月に、未受精卵子および卵巣組織の採取、凍結、保存に対する見解を発表している。ここでは日本産科婦人科学会の提言を一部抜粋する。

- (1) 原疾患の治療により卵巣機能低下が予想され、未受精卵子凍結、卵巣組織凍結を施行することが被実施者の妊孕性温存と原疾患の治療の実施に著しい不利益とならないと判断されるものを対象とする。
- (2) 原疾患の状況、予後など、本法を行なうことが原疾患治療に及ぼす影響を把握するために、原疾患主治医から文書による適切な情報提供がなされていることを要す。
- (3) 以下の項目について医師が、被実施者に対して説明する。①現疾患の治療と卵巣機

能低下の関連性、②原疾患の状態、予後、③本法の実施が原疾患の予後に影響を及ぼす可能性、④本法の詳細、⑤凍結未受精卵子を用いたARTの詳細、⑥凍結未受精卵子により将来、被実施者が妊娠する可能性と妊娠した場合の安全性、など

である<sup>24)</sup>。なお、日本産科婦人科学会では、未受精卵子および卵巣組織の凍結を取り扱う場合には、各医療施設での倫理委員会の審査のうえ、日本産科婦人科学会への施設登録申請を求めている。

社会的ならびに医学的卵子凍結保存指針では、凍結した未受精卵子の売買、譲渡は認めていない。ただし被実施者が破棄する場合には、医学研究の際にのみ、法律や国、省庁のガイドラインに沿い、必要な手続きを改めて施行すれば未受精卵子を使用することが可能となる。

## 未受精卵子凍結の今後

成熟卵子の凍結保存に関するガイドラインによれば、凍結未受精卵子を用いた体外受精胚移植の臨床成績は、卵子提供が盛んな国から得られたデータが基盤となっており、実際の妊娠率に関する統計は30歳以下のドナーから得られた凍結未受精卵子によるものが多いと述べられている<sup>25)</sup>。したがって、凍結未受精卵子を用いた体外受精胚移植の臨床成績について患者に情報提供をする場合は、高齢患者では加齢による卵子の老化により、その成績はさらに低下する可能性が高いことを十分に伝える必要がある。現在の本邦の社会状況を鑑みると、今後は社会的な未受精卵子の凍結保存を希望する女性が増加してくるのではないかと考えられる。一方、医学的に妊孕性を温存するための未受精卵子凍結は、FertiProtektというドイツ、スイス、オーストリアのおよそ70施設を中心に妊孕性温存を行っている団体の治療指針では14歳から40歳までの患者において卵子凍結を推奨している<sup>26)</sup>が、年齢の上限については採卵可能期間と推定採卵数に基づいた議論が必要と考え

る。卵巣組織凍結はヒト卵胞の完全体外培養が可能となれば、組織内の残存がん細胞を考慮する必要はなく、多くのがんに適応可能となる。さらには、体細胞からの始原生殖細胞を介した卵子再生技術が完成すれば、倫理的な問題はあつものの、加齢、病的因子、生殖腺毒性のある治療により閉経した女性においても、若年女性と同等の質をもつた成熟卵子が無限に得られる可能性がある。

### ● 文献

- 1) Markstrom E, Svensson ECh, Shao R, et al : Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction* 123 : 23-30, 2002
- 2) Faddy MJ, Gosden RG : A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum Reprod* 11 : 1484-1486, 1996
- 3) Tilly JL, Nilkura Y, Rueda BR : The current status of evidence for against postnatal oogenesis in mammals : a case of ovarian optimism versus pessimism? *Biol of Reprod* 80 : 2-12, 2009
- 4) Barvieri RL : *Reproductive endocrinology* : chap 21 : 517-546, 2009
- 5) Pellestor F, Andreo B, Arnal F, et al : Maternal aging and chromosomal abnormalities : new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes : *Hum Genet* 112 : 195-203, 2003
- 6) Lee SJ, Schover LR, Partridge AH, et al : American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J Clin Oncol* 24 : 2917-2931, 2006
- 7) Lutchman Singh L, Davies M, Chatterjee R, et al : Fertility in female cancer survivors : pathophysiology, preservation and the role of ovarian reserve testing. *Human Reprod Update* 11 : 69-89, 2005
- 8) M. Dolmans, C. Marinescu, J. Donnez, et al : Reimplantation of Cryopreserved ovarian tissue from patients with acute lymphoblastic leukemia is potentially unsafe. *Blood* 116 : 2908-2912, 2010
- 9) Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P : Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269°C. *Science* 178 : 411-418, 1972
- 10) Rall WF, Fahy GM : Ice-free cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Nature* 313 : 573-575, 1985
- 11) Kuwayama M : In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 41 : 231, 1994
- 12) Kuwayama M, Kato O : All round vitrification of human oocytes and embryos. *J Assist Reprod Gentic* 17 : 477, 2000
- 13) Kuwayama M, Vajta G, Ieda S, et al : Vitrification of human embryos using the CryoTop™ method, reproductive. *Bio Medicine Online* 11 : 608-614, 2005a
- 14) Kuwayama M : Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos, The Cryo Top method. *Theriogenology* 67 : 73-80, 2007
- 15) 齋川則子, 桑山正成 : 卵子凍結保存と卵子バンク, 卵子学. 京都大学出版社, 941-946, 2011
- 16) Tham YL, Sexton K, Kramer R, et al : The rates of chemotherapy-induced amenorrhea in patients treated with adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide followed by a taxane. *American Journal of Clinical Oncology* 30 : 126-132, 2007
- 17) Rienzi L, Cobo A, Ubaldi FM, et al : Consistent and predictable delivery rates after oocyte vitrification : an observational longitudinal cohort multicentric study. *Hum Reprod* 6 : 1606-1612, 2012
- 18) 向田哲規, 岡 親弘, 高橋克彦 : 卵子・胚凍結の理論と実際, 卵子学. 京都大学出版社, 948-960, 2011
- 19) Grifo JA, Noyes N : Delivery rate using cryopreserved oocytes is comparable to conventional in vitro fertilization using fresh oocytes : potential fertility preservation for female cancer patients. *Fertil Steril* 93 : 391-396, 2010
- 20) Kim TJ, Laufer LR, Hong SW : Vitrification of oocytes produces high pregnancy rates when carried out in fertile women. *Fertil Steril* 93 : 467-474, 2010
- 21) Mature Oocyte Cryopreservation a guideline : *Fertil Steril* 99 : 37-43, 2013
- 22) Borini A, Levi Setti PE, Scaravelli G, et al : Multicenter observational study on slow-cooling oocyte cryopreservation : clinical outcome. *Fertil Steril* 94 : 1662-1668, 2010
- 23) 未受精卵および卵巣組織の凍結保存ガイドライン, 日本生殖医学会 : <https://ec.ssicenter.jp/jsrm/opinion/input.php>
- 24) M von Wolff, M. Montag, B Laurenz, et al : Fertility preservation in women- a practical guide to preservation techniques and therapeutic strategies in breast cancer, Hodgkin's lymphoma and borderline ovarian tumours by the fertility preservation network FertiPROTEKT. *Arch Gynecol Obstet* 284 : 427-435, 2011

## 特集 がん治療と生殖医療

### 標題：『がん患者に対する生殖医療の現状と課題』

著者：高江 正道<sup>1</sup>、鈴木 直<sup>2</sup>

所属：1, 聖マリアンナ医科大学 産婦人科学 助教

2, 聖マリアンナ医科大学 産婦人科学 教授

#### はじめに

近年、検診の普及による悪性腫瘍の早期診断および集学的治療法の発達により、その生存率は飛躍的に改善している。さらに若年患者の増加も相まって、がんを克服した Cancer Survivor が増加していることから[1]、それら生存患者の権利 (Survivor ship) や QOL(Quality of life) に対して大きな関心が寄せられている[2]。なかでも、小児や若年者を含めた生殖年齢の患者に対する化学療法や放射線療法によって誘発される妊孕能 (妊娠できる能力) の喪失は大きな問題となっている[3]。さらに本邦を含む先進国における晩婚化の影響により、乳がん患者などに行われる5年以上の長期にわたるホルモン療法によって、生殖年齢を過ぎてしまうという問題も起こっている。

このような背景から、米国では2006年 Woodruffらによって、腫瘍学 (Oncology) と生殖医学 (Fertility) を合わせた "Oncofertility" (がん・生殖医療) という概念が提唱された。Woodruffらは、これまで独立した概念であった両者を結びつけ、これまで顧みられることが少なかった妊孕能の問題に対して目を向けさせた。また同年、ASCO (American Society of Clinical Oncology; 米国臨床腫瘍学会) は、ASRM (American Society for Reproductive Medicine; 米国生殖医学会) と共同して、化学療法や放射線療法などの治療によって妊孕

能を喪失する可能性のある患者を対象にした妊孕能温存療法に関する初のガイドラインを示し、さらに2013年には新たなガイドラインが示され、今や "Oncofertility" は生殖医療の新しい一分野として認識されつつある。

本邦においては、悪性腫瘍患者のための妊孕能温存および治療後の患者に安全な生殖医療を提供することを目的に、2012年11月『日本がん・生殖医療研究会 (Japan Society for Fertility Preservation: JSFP)』が設立され、すべての国民がそれぞれの地域でがん・生殖医療を享受できるよう、地域ネットワークの構築に力を注いでいる。本稿では、がん・生殖医療における基本的知識および本邦における現状と問題点について概説する。

#### 1. がん治療が妊孕能に与える影響

現行の考え方では、卵子は精子と異なり出生後にその数は新たに増えず、母体内の胎生6ヶ月の時期に卵巣内に約700万個の原始卵胞を保有し、出生時には40万個へと減少し、初経時には20万個へと減少するとされている。そのなかから500-1000個の原始卵胞が発育を開始し、約6ヶ月かけて最終的に1個の卵が排卵する[4-6]。その結果、加齢とともに卵の数は徐々に減少し、閉経時には残存卵数は1000個を下回るとされている。さらに卵の老化も徐々に進み、受精能も低下することから、臨床的には妊孕能は約30歳を境に低

下するとされている[7, 8]。卵巣の機能を予測する方法としては、古典的には血液中の卵泡刺激ホルモン(FSH)値の測定が有用と考えられており、正常な卵巣機能ではFSH値は卵巣期初期に12mIU/ml以下とされている[9]。近年では、血液中の抗ミュラー管ホルモン(AMH: Anti Mullerian Hormone)値によって卵巣機能を評価する方法が導入され、生殖医療の現場において頻用されている。AMHについての基礎的な説明は他稿に譲るが、閉経の約5年前には既にAMH値が測定感度以下になるとの報告もあり、AMH値の測定によって閉経時期をある程度予測することが可能となる[10]。したがって、悪性腫瘍の治療開始前や寛解後にFSHやAMH値を測定することは、若年がん患者の卵巣機能を評価する上で重要な指標になりうると考えられる。男女を問わず性腺組織は化学療法および放射線療法に対して非常に影響を受けやすく[3]、その障害が永続的となり得る。特に女性の場合、化学療法の結果生じた稀発月経、無月経や無排卵症などの卵巣機能不全は化学療法誘発性無月経と称されており、その発症頻度は20-100%と報告されている[11]。化学療法誘発性無月経は、治療開始から1年以内に発症した3ヶ月以上の無月経と定義され、その発生頻度は①年齢、②抗がん剤の種類、③抗がん剤の投与量が関係する[12]。特にシクロホスファミドに代表されるアルキル化剤に属する抗がん剤が卵子および顆粒膜細胞に与えるダメージが最も大きく、投与量依存性に誘発される卵巣機能不全の結果、難治性不妊症になるリスクが高い[13]。その結果として、がん治療後患者はコントロール群に比べて30-50%程度出産に至る割合が低いと報告されている[14]。また、放射線照射に関しては

成人で4-6Gy、小児では10-20Gyで卵巣機能が低下するとされ、10歳で18.5Gy、20歳で16.5Gy、30歳で14.3Gy以上の照射で97.5%に不可逆性の卵巣機能不全が起こるといわれている[15]。男性においても同様にアルキル化剤および放射線療法の影響は強く、さらに悪性腫瘍そのものの存在によっても精子所見が悪化する[16-18]。特に化学療法によって精子のDNA損傷が生ずることから、ASCOの新ガイドラインにおいても化学療法前の妊孕性温存が強く勧められている[19]。表1および2に、がん治療における女性および男性の性腺不全のリスク分類を示す。

(ASCO: Guide lines data supplement:

[http://www.asco.org/sites/www.asco.org/files/fp\\_data\\_supplements\\_012914.pdf](http://www.asco.org/sites/www.asco.org/files/fp_data_supplements_012914.pdf))

## 2. がん患者における生殖医療と医学的問題点

がん患者における生殖医療は、主に体外受精を含めた不妊治療と妊孕性温存療法に分けられる。体外受精は妊孕性温存療法である胚凍結および卵子凍結とほぼ同義であることから共通の問題点を抱えていることから、本稿では妊孕性温存療法を中心に概説する。

男性における妊孕性温存療法としては、精子凍結保存のみが確立された治療であるとされており[19]、患者が既に無精子症である場合や採取困難な場合にはMD-TESE(顕微鏡下精巣内精子回収法)の適応があり、いわゆる”Onco-TESE”として施行されている[20]。また、精巣組織凍結に関しては未だ試験的な段階であるとされている[19]。

女性における妊孕性温存療法として以下に記す選択肢が挙げられる。それらの選択は主に、『原疾患の治療が開始されるまでに残され



表 1. 化学療法および放射線療法の性腺毒性に対するリスク（女性）

2014年1月修正版

	治療プロトコール	患者および投与量などの因子	使用対象疾患
High Risk (>70%)	アルキル化剤(ブスルファン, カルムスチン, シクロホスファミド, イホスファミド, ロムスチン, メルファラン, プロカルバジン) + 全身放射線照射		白血病への造血幹細胞移植の前処置, リンパ腫, 骨髄腫, ユーイング肉腫, 神経芽細胞腫, 絨毛がん
	アルキル化剤 + 骨盤放射線照射		肉腫, 卵巣に対して
	シクロホスファミド総量	5g/m <sup>2</sup> (> 40歳), 7.5g/m <sup>2</sup> (< 20歳)	様々な悪性腫瘍, 乳がん, 非ホジキンリンパ腫, 造血幹細胞移植の前処置
	プロカルバジンを含むレジメン	MOPP: >3サイクル, BEACOPP: > 6サイクル	ホジキンリンパ腫
	テモゾラミド or BCNUを含むレジメン + 全脳放射線照射		脳腫瘍
	全腹部あるいは骨盤放射線照射	>6 Gy(成人女性), >10 Gy(初経発来後), >15 Gy(初経発来前)	ウィルムス腫瘍, 神経芽細胞腫, 肉腫, ホジキンリンパ腫, 卵巣に対して
	全身放射線照射 全脳放射線照射	>40 Gy	造血幹細胞移植 脳腫瘍
Intermediate Risk (30-70%)	シクロホスファミド総量	5g/m <sup>2</sup> (30-40歳)	様々な悪性腫瘍, 乳がんなど
	乳がんに対するAC療法	×4コース + パクリタキセル/ドセタキセル(<40歳)	乳がん
	モノクローナル抗体(ペバシズマブ)		大腸がん, 非小細胞肺癌, 頭頸部がん, 乳がん
	FOLFOX4 (フルオロウラシル・フォリン酸・オキサリプラチン)		大腸がん
	シスプラチンを含むレジメン 腹部あるいは骨盤放射線照射	10-15 Gy(初経発来前), 5-10 Gy(初経発来後)	子宮頸がん ウィルムス腫瘍, 神経芽細胞腫, 脊髄腫瘍, 脳腫瘍, ALLあるいは非ホジキンリンパ腫再発
Lower Risk (<30%)	アルキル化剤以外の薬剤を含むレジメン(ABVD, CHOP, COP, 白血病に対する多剤療法)		ホジキンリンパ腫, 非ホジキンリンパ腫, 白血病
	シクロホスファミドを含む乳がんに対するレジメン(CMF, CEF, CAF)	< 30歳	乳がん
	アントラサイクリン系 + シタラビン		AML
Very low No Risk	ピンクリスチンを用いた多剤療法		白血病, リンパ腫, 乳がん, 肺がん
	放射性ヨウ素		甲状腺がん
Unknown	モノクローナル抗体(セツキシマブ, トラスツズマブ) チロシンキナーゼ阻害剤(エルロチニブ, イマチニブ)		大腸がん, 非小細胞肺癌, 頭頸部がん, 乳がん 非小細胞肺癌, 膵臓がん, CML, GIST

た時間』、『がん細胞のエストロゲン受容体の有無』、『患者年齢』、『婚姻状況』等の様々な因子によって決定される。図1に、ドイツにおけるがん・生殖医療の中心団体である Ferti PROTEKT が提唱する、40歳未満の患者に対するがん・生殖医療の選択に関する図を示し[21]、以下にそれらの治療法について述べる。

### 1) 胚(受精卵)凍結保存

胚凍結は、2012年までは確立された唯一の治療法であり、最も一般的な妊孕性温存療法である[22]。がん患者においてもその成績は一般の不妊治療患者と同等で、採卵時の患者の年齢に依存するといわれている[14]。ただし、通常採卵を行うためには月経周期に依存して

表 2. 化学療法および放射線療法の性腺毒性に対するリスク (男性) 2014年1月修正版

	治療プロトコール	患者および投与量などの因子	使用対象疾患
High Risk (治療後、一般的に無精子症が遷延、持続する)	アルキル化剤 <sup>※1)</sup> +全身放射線照射		白血病への造血幹細胞移植の前処置、リンパ腫、骨髄腫、ユーイング肉腫、神経芽細胞腫
	アルキル化剤 <sup>※1)</sup> +骨盤(精巣)放射線照射		肉腫、精巣に対して
	シクロホスファミド総量	>7.5g/m <sup>2</sup>	様々な悪性腫瘍、造血幹細胞移植の前処置
	プロカルバジンを含むレジメン	MOPP:>3サイクル、BEACOPP:>6サイクル	ホジキンリンパ腫
	テモゾラミド or BCNUを含むレジメン+全脳放射線照射		脳腫瘍
	全腹部あるいは骨盤放射線照射	>2.5Gy(成人男性) >6Gy(小児)	ウィルムス腫瘍 ALL、肉腫、胚細胞腫瘍、非ホジキンリンパ腫、精巣に対して
	全身放射線照射 全脳放射線照射	>40Gy	造血幹細胞移植 脳腫瘍
Intermediate Risk (治療後、無精子症が遷延することがある)	シスプラチンを含むレジメン BEP シスプラチン総量 カルボプラチン総量	2-4サイクル >400mg/m <sup>2</sup> >2g/m <sup>2</sup>	精巣腫瘍
	散乱による精巣への放射線照射	1-6Gy	ウィルムス腫瘍、神経芽細胞腫
Lower Risk (一時的な造精能低下)	アルキル化剤以外の薬剤を含むレジメン	ABVD, CHOP, COP, 白血病に対する多剤療法	ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、白血病
	精巣に対する放射線照射 アントラサイクリン系+シタラピン	<0.2-0.7Gy	精巣腫瘍 AML
Very Low / No Risk (影響なし)	ピンクリスチンを用いた多剤療法 放射性ヨウ素		白血病、リンパ腫、肺がん 甲状腺がん
	散乱による精巣への放射線照射	<0.2Gy	様々な悪性腫瘍
Unknown	モノクローナル抗体(ペバシツマブ、セツキシマブ)		大腸がん、非小細胞肺がん、頭頸部がん
	チロシンキナーゼ阻害剤(エルロニチブ、イマチニブ)		非小細胞肺がん、膀胱がん、CML、GIST

※1) アルキル化剤: プスルファン、カルムスチン、シクロホスファミド、イホスファミド、ロムスチン、メルファラン、プロカルバジン

2週間から6週間という期間を要するため、原疾患の治療開始まで時間的猶予のない患者に対して有効に行うことができない可能性がある[23]。近年では“Random start”という月経周期に依存しない卵巣刺激方法が報告され、一定の成果をあげてはいるものの、未だ一般的ではない[24]。また採卵の際に行う卵巣刺激によって一過性とはいえ血中エストロゲン濃度が上昇するた

め、エストロゲン受容体陽性の乳がんを増悪させる可能性がある。諸外国において積極的に使用されているアロマターゼ阻害薬を併用した卵巣刺激方法でも、血中エストロゲンのピークは自然の月経周期よりも若干高値である事が報告されている[25]。諸家の報告では、本法による明らかな乳がんの再発リスクの上昇は認めなかったとされはいるものの[26]、アロマターゼ阻害薬そのも

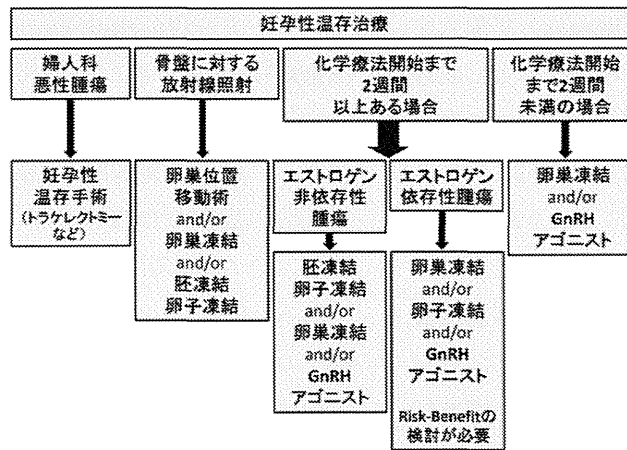


図1, 成人における悪性腫瘍の種類および治療法から考慮される治療法の選択法。

の安全性とともに今後更なる検証が必要であり、安全かつ効果的な卵巣刺激方法の開発が急務であると考えられる。なお、化学療法を1-2コース施行後の胚凍結保存に関しては得られる卵子数の少なさや薬剤による先天異常発生のリスクという観点から推奨されておらず[27]、さらに本邦では配偶者のいない患者では胚凍結の適応はない。また最近の報告では、卵巣がんの患者において手術の際に摘出した卵巣組織より未成熟卵を採取し、体外培養ののちに受精卵を胚移植して生児出産に至った例も報告されており、高次医療機関におけるがん・生殖医療の可能性が示されたといえる[28]。

## 2) 卵子凍結保存

配偶者のいない患者や法律および宗教的・倫理的な理由から胚凍結を望まない患者に対する妊孕性温存方法の一つとして、卵子凍結保存が挙げられる。卵子は凍結保護剤の浸透性が胚に比べて低く、これまで試験段階の技術とされていたが、近年の治療成績の向上によって既に1,000例以上の出生例の報告があり[29]、新ガイドラインからは“確立された治療”とされている[19]。しかし、がん・生殖医療として行われた卵子凍結による出生例の報告は未だ2例しかなく、今後のさらなる報告が期待される[22]。近年の多施設による前方視的研究では、3,000個以上の凍結卵子において85%の卵子生存率、15.1%の生産率であったと報

告されているが、胚凍結と同様に、患者が妊娠できる可能性は採取できる卵子数（8個以上の成熟卵）や年齢（38歳未満など）に大きく依存する[30]。

## 3) 卵巣組織凍結保存

卵巣組織凍結は、2013年の新ガイドラインにおいても未だ“試験的な治療”であり、現時点では採卵行為ができない“小児のみに適応”とされている[19]。また、化学療法や放射線療法を遅らせることができない患者においても適応があるとされている[22]。卵巣組織凍結の歴史はまだ浅く、2004年に最初の出生例が報告された後[31]、現在までに当院での出生例も含めて約30例の報告しかないが、移植60症例に関する検討では卵巣移植を受けた93%の患者で卵巣機能が回復したと報告されている[32, 33]。そのような流れから、近年では「卵巣組織凍結は、早期閉経をきたしうる卵巣毒性を有する治療を受ける全ての若年女性がん患者に選択肢として提供すべき医療行為である」とされている[34]。2014年5月現在、本邦においても9施設で卵巣組織凍結が施行可能となっているが、卵巣組織凍結のメリットとして胚や卵子凍結に比べて保存できる卵子の数が圧倒的に多く、妊孕性温存療法として非常に有利となる可能性があることが挙げられる。また月経周期に左右されず、短期間で保存が完了することも非常に大きなメリットである。一方、デメリットとしては凍結した卵巣組織に微小残存癌病

巢 (MRD: Minimal Residual Disease) が混入する危険性が挙げられる。Kyono らは日本人における乳がん患者の病理解剖の結果、24.2%に卵巣転移を認めたと報告していることから[35]、乳がん患者における卵巣組織凍結をおこなう際には悪性腫瘍混入の可能性について留意するべきである。初期の乳癌患者 51 症例の報告では卵巣組織に転移は認められなかったという結果もあり[36]、初期の乳癌がん患者における卵巣組織凍結の安全性は高い可能性がある。ただし、遺伝性乳癌・卵巣癌症候群の観点から、遺伝性乳癌 (BRCA1・BRCA2 遺伝子変異) 患者に対する卵巣組織凍結保存は更に慎重に行われるべきである。さらに白血病では MRD 混入のリスクが高いため、卵巣組織凍結保存および移植は推奨されていない[37]。現時点では 100%の確率で MRD を検出する方法はないが[37]、MRD の検出や卵胞の完全体外培養など研究の進歩によっては、卵巣組織凍結保存は極めて有用なツールになり得る。

#### 4) GnRH アゴニスト

ラットやサルを用いて GnRH アゴニストがシクロホスファミドによる卵巣毒性に予防効果があると Ataya らが報告して以来、GnRH アゴニストによる卵巣保護が臨床の現場で用いられてきた。しかし、近年ではその効果を否定する報告も多く、現段階では GnRH アゴニストに関しては一定の見解が得られておらず[38]、新ガイドラインでもその使用については推奨されていない[19]。しかし 2014 年 6 月に開催された ASCO annual meeting では、乳がん患者に対するランダム化第Ⅲ相試験(POEMS study)の結果、GnRH アゴニストの使用によって化学療法による早発卵巣不全の減少と妊娠率の向上に有用であったとの報告がなされており、今後の動向が注目されている。

#### 5) トラケクトミー

子宮頸癌に対する妊孕性温存療法として、トラ

ケクトミー(Tracherectomy:広汎性子宮頸部摘出術)が挙げられる。トラケクトミーとは広汎子宮全摘出術を行う代わりに子宮頸部を広汎に摘出し、膣と子宮体部を接続する術式であるが、大部分の症例で自然妊娠が可能であり[39]、900 症例以上の手術症例の検討では 41-79%の妊娠率であった[40]。一方で 200 症例に関する報告では、66%の症例で生産児を得られたものの、全例が帝王切開分娩で約 3 割の症例が早産であり、その約半数が 32 週未満の早産であった[41]。また、妊娠中期の流産率が 8-10%、早産率 20-30%との報告もある[40]。さらに安全性に関する 550 症例での検討では、トラケクトミー後の子宮頸癌再発率は 5%であり、死亡率は 2-3%であったことから、一定の条件下で行われた場合には (Ib1 期まで、または腫瘍径が 2cm 未満など) 広汎子宮全摘術に劣らない治療法であるといえる[42]。本邦では、20 歳および 30 歳代の女性で最も罹患率の高い悪性腫瘍は子宮頸癌であることから、トラケクトミーは認容性温存療法として重要な手術であると考えられる。さらには子宮頸癌の予防そのものが最重要であり、検診および HPV ワクチンの普及が課題である。本邦では、HPV ワクチンが 2013 年 4 月より定期接種として組み入れられた直後に、複合性局所疼痛症候群 (CRPS: Complex Regional Pain Syndrome)や失神などの副作用の報告によって積極的な推奨を中止することになった経緯がある。しかしながら、性的活動開始前の女子に HPV ワクチンが普及することによって約 60-70%の子宮頸癌が予防できると推測されていることから[43, 44]、接種に関する今後の厚生労働省の速やかな判断が望まれている状況である。

#### 6) 卵巣位置移動術および性腺遮蔽

骨盤腔に対する放射線療法のみを行う場合では、卵巣位置移動術が有効であり、照射野外への卵巣の移動によって卵巣の被爆量を顕著に減らすことができる。例えば 40 歳以下の患者でこの

治療を行ったところ、90%の症例で整調な月経と排卵を認めたという報告があり、少ない確率（約1%）で発症する卵巣への悪性腫瘍転移の問題をクリアできれば、非常に有効な治療法である[21, 45, 46]。また、精巣もしくは卵巣を遮蔽して放射線療法を行う方法も報告されており、完全ではないものの性腺への被曝量を顕著に低下させることが示されている[48]。しかし性腺へのがん転移の問題からその適応は限定的であり[37]、特に白血病などでは妊娠予後増悪および再発リスクの増加の点からも、患者の長期的なフォローが必要とされている[49]。

### 3. がん・生殖医療を取り巻く諸問題

#### 1) 妊孕能に関する認識の問題

がん・生殖医療の問題点として、『妊孕能に関する認識の問題』が挙げられる。がん・生殖医療の先進国である米国では、前述の ASCO[50]、ASRM[51]、American Academy of Pediatrics（米小児科学会）[52]が『全ての生殖可能年齢のがん患者に対して、原疾患の治療を行う前に妊孕性についての問題を話し、生殖医療の専門家に紹介すること』を推奨している。しかしながら Schover らは、90%以上のがん治療医が妊孕性温存について賛成しているにもかかわらず、約50%の症例でしか妊孕性についての説明がなされなかったと報告しており[53]、妊孕性の低下について患者自身も気づいていない場合があるとしている[54]。その原因として、悪性腫瘍の治療を担当する医師の認識不足や医師の中での優先順位、家族や両親による情報の制限、原疾患の担当医が小児や思春期の患者に対して両親や家族が同伴のもとで妊孕性について話すことに困難を感じる、などの理由が推測されている[47]。本邦での状況はさらに深刻であることが予測され、医師および医療者のだけではなく、患者も含めた社会に対する啓発が急務であると考えられる。社会に対する啓発の一例として、米国の Oncofertility

Consortium では、4つの大学が協力し

Oncofertility National Science Education

(ONSEN) というプログラムを実施している

[55]。この試みは Oncofertility および科学に関する教育も兼ねて、これまで250の高校で行われている教育プログラムであり、教育の過程で妊孕能の問題に触れる機会を設けている。JSFP では、2014年より患者とその家族も参加できる公開シンポジウムを開催し、社会全体に向けた啓発活動を開始している。

#### 2) 地域におけるがん・生殖医療ネットワークの構築

2013年より JSFP は米国の Oncofertility Consortium より、Oncofertility Consortium JAPAN として関連団体に位置付けられている。JSFP が目指すところの Oncofertility とは、悪性疾患に罹患した患者が遅滞なくがん・生殖医療を行うことのできる生殖治療医に紹介できるネットワークを形成することである。岐阜県では、地域ネットワークのモデルケースとして『岐阜県がん・生殖医療ネットワーク (GPOFs)』が2013年に設立され、地域におけるがん治療施設と生殖医療施設の強い連携が成り立っている。JSFP は地域のネットワーク作りの支援を行ってゆくことで、将来的には日本全国の都道府県において、悪性腫瘍に罹患した若年患者が遅滞なくエビデンスレベルの高いがん・生殖医療を受けることができる社会づくりを目指している。ここで地域モデル (the Colorado Oncofertility Program model) の一例を紹介する。米国のコロラド大学では、地域のがん治療施設から依頼があった場合、がんの治療を遅延させることがないよう24-48時間以内に専門の生殖医療医を受診できるようにスケジュール調整がなされる。そのうえ、受診までにインターネットを利用した質問票やメールのやり取りを行う。さらには受診の待ち時間を無駄にしないよう、院内でタブレットを使用することによって臨床試験の登録などを行い、限られ