

ISSN 1881-9028

日本IVF学会雑誌

Vol.16 No.2

2013



論文集

論文

－ テクニカルノート －

経膈超音波ガイド下での簡便な胚移植法 2

古井 憲司, 松浦 大創, 藤田 智久, 野村 昌男, 北川 武司

医療法人愛育会クリニックママ

－ 総説 －

ガラス化法による卵巣組織凍結の実際 - 新たながん・生殖医療 7

鈴木 直¹, 橋本 周², 五十嵐 豪¹, 高江 正道¹, 洞下 由記¹,

杉下 陽堂¹, 竹之下 誠³, 細井 美彦⁴, 石塚 文平⁵, 森本 義晴²

¹ 聖マリアンナ医科大学産婦人科学 / ² IVF なんばクリニック / ³ イブバイオサイエンス / ⁴ 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科

/ ⁵ 聖マリアンナ医科大学高度生殖医療技術開発講座

経腔超音波ガイド下での簡便な胚移植法

古井 憲司, 松浦 大創, 藤田 智久, 野村 昌男, 北川 武司

医療法人愛育会クリニックママ 〒503-0807 岐阜県大垣市今宿 3-34-1

要旨: ARTにおける胚移植法には、プローブを腹部に当てて行う経腹法と、プローブを腔内に挿入して行う経腔法がある。経腹法は、予め尿や生理食塩水で膀胱を充満させる必要があり、患者に苦痛を強いることとなる。一方経腔法は、患者に尿を溜めてもらう必要がなく、子宮内膜のように比較的腔に近い部分において明瞭な断層像を得られ、ピンポイントで狙いどおりの位置に胚移植が可能であるが、従来の経腔法では手技に若干の慣れを必要とする。そこで、当院では従来の医師が1人で行う経腔超音波ガイド下胚移植法に工夫を加えた「医師と医療従事者(胚培養士)が協力して行う経腔超音波ガイド下胚移植法」を考案したので紹介する。我々が考案した経腔超音波ガイド下胚移植法によるHRT周期における臨床的妊娠率は52.4% (173/330)であり、着床率は51.3% (176/343)であった。
キーワード: 胚移植法, 経腔超音波, ETカテーテル, ETカテーテルガイド

緒言

1980年代後半より普及した経腔プローブの使用は、婦人科領域における超音波診断に大きな進歩をもたらした。Assisted Reproductive Technology (ART) では、Wiklandら¹⁾により、初めて経腔超音波を用いた採卵が行われた。その後、経腔超音波ガイド下での採卵の安全性と有用性が報告された²⁾。

ARTにおける超音波法には、胚移植などで広く行われているプローブを腹部に当てる経腹法と、採卵時に行われているプローブを腔内に挿入する経腔法がある。経腹法は、3.5～5.0 MHzと比較的低い超音波周波数を使用するため、下腹部の脂肪が厚い場合などプローブから観察対象までの距離が遠くなる程、明瞭な断層像が得られなくなる。その上、子宮や卵巣を描出する場合は、予め尿や生理食塩水で膀胱を充満させガスを含む腸管を他方に圧排し尿の充満した膀胱をacoustic window (音響窓) とする必要があるため、患者には苦痛を強いることとなる。一方経腔法は、プローブを直接腔内に挿入するためプローブと観察対象との距離が大幅に短縮でき、尚且つ5.0～8.0 MHzと比較的高い超音波周波数を使用するため、子宮内膜のように比較的腔に近い部分において明瞭な断層像を得ることが可能である。さらに経腹法のように膀胱を充満させる必要がないため、患者に強い苦痛は軽減できる。そのため、当院では2006年以降、経腔超音波のメリットを最大限に利用し明瞭に描出される子宮内膜を観察しながらETカテーテルを進め、経

腔超音波ガイド下に子宮底から1.0cmの位置にピンポイントに胚移植を施行している。しかし、従来の経腔超音波ガイド下胚移植法では、医師が経腔プローブとETカテーテルガイドを片手で固定しながらもう一方の手でETカテーテルを子宮腔内へ進めていく必要があるため、子宮が左右に偏位している場合、プローブとETカテーテルガイドの方向が一致せず医師ひとりでの操作では無理が生じETカテーテルを進入していく過程でETカテーテルの先端を見失うことがある。

本稿では、当院で行われている従来の医師が1人で行う経腔超音波ガイド下胚移植法に工夫を加えた「医師と胚培養士が協力して行う経腔超音波ガイド下胚移植法」を紹介する。これは、医師が経腔プローブとETカテーテルガイドを左右の手でそれぞれ固定し、ETカテーテルは胚培養士が医師の指示に従って子宮腔内へ進めていき胚移植を行う方法である。

対象と方法

新鮮胚移植後の余剰胚および選択的全胚凍結症例における5日目、6日目胚盤胞をGardner分類³⁾により胚の評価を行った後、超急速ガラス化法⁴⁾によって凍結保存した。凍結融解胚移植は、子宮内膜を厚くするエストラーナテープ0.72 mg (久光製薬)を使用したHRT周期により施行した。融解胚移植は、胚移植用培養液としてUTM (Medi-Cult, Denmark)を使用し、キタザトETカテーテル(ET-TUC3040SM5-17;北里メディカル;

受付 2013年1月21日/受理 2013年4月12日

著者連絡先: 古井 憲司 e-mail [furui@clinicmama.jp]

長さ400 mm、外径1.0 mm)とキタザトETカテーテルガイド(ET-TUG3017ART-30;北里メディカル;3.0 Fr, ETカテーテル用ガイド30°)を用いて経腔超音波ガイド下にて施行した。経腔超音波はSONOVISTA-MSC(MODEL:MEU-1585;持田シーメンスメディカルシステム)を使用した。我々が考案した経腔超音波ガイド下

での胚移植法および従来の経腔超音波ガイド下での胚移植法を図1-a, 1-b, 図2-a, 2-b, 2-cに示す。

臨床成績は2011年12月から2012年11月に経腔超音波ガイド下で胚移植を施行した330症例を対象とし、臨床的妊娠率, 着床率を算出した。



図1-a 従来の胚移植法:子宮が正中に位置し、且つ後屈の場合



図1-b 従来の胚移植法:子宮が正中に位置し、且つ前屈の場合

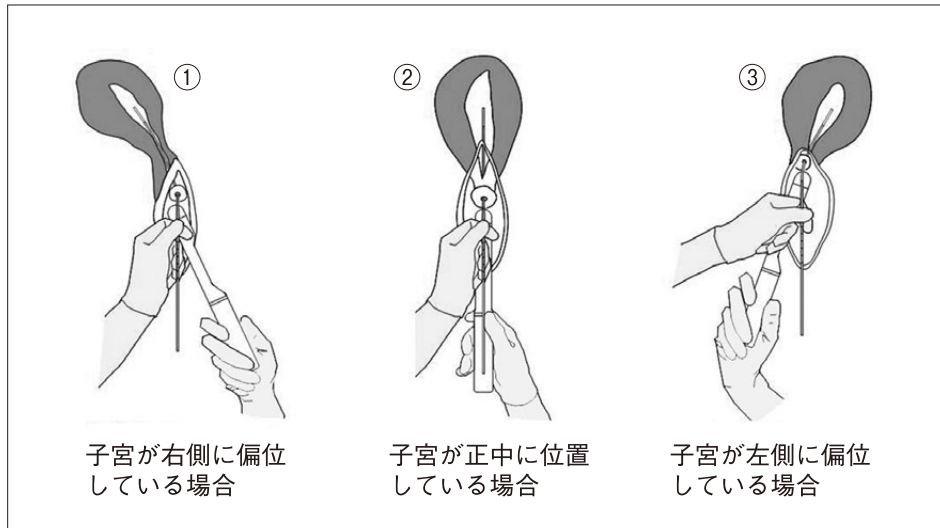


図 2-a 我々が考案した胚移植法 :ET カテーテルガイドと経膣プローブの位置関係

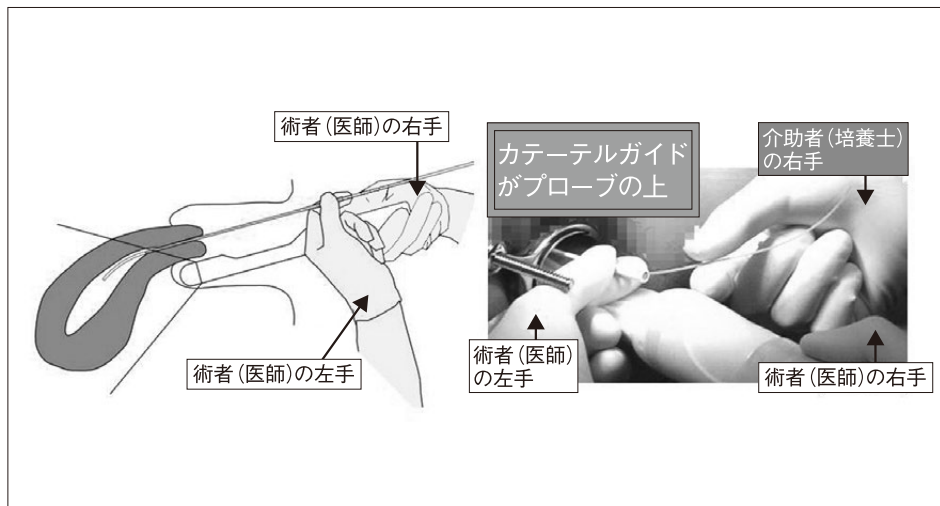


図 2-b 我々が考案した胚移植法 : 子宮が正中に位置し、且つ後屈の場合

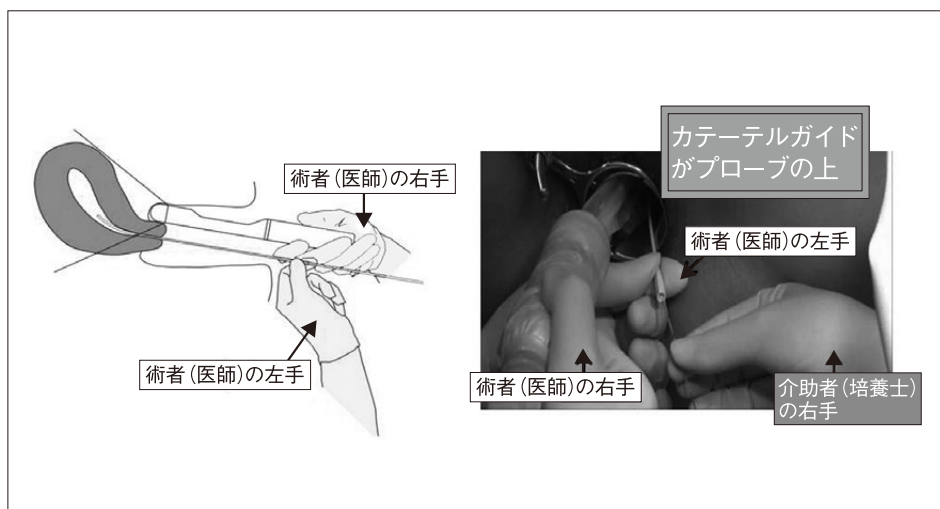


図 2-c 我々が考案した胚移植法 : 子宮が正中に位置し、且つ前屈の場合

表1 経膈超音波ガイド下胚移植法施行症例の患者背景と臨床的妊娠率・着床率

対象症例	330
患者平均年齢	35.8 ± 4.5 (歳)
胚移植時の子宮内膜厚	10.9 ± 3.1 (mm)
既往妊娠回数	1.0 ± 1.1 (回)
既往流産回数	0.8 ± 0.8 (回)
胚移植数	1.0 ± 0.2 (個)
良好胚盤 (3BB 以上) 移植率	75.5% (259/343)
臨床的妊娠率 (%)	52.4% (173/330)
着床率 (%)	51.3% (176/343)

結果

臨床的妊娠率は52.4% (173/330) であり、着床率は51.3% (176/343) であった(表1)。

考察

Porterら⁵⁾は、経膈超音波ガイド下での胚移植によって、着床率、妊娠率、出生率を向上させることができると報告している。今回我々の経膈超音波ガイド下での胚移植における臨床的妊娠率は52.4%、着床率は51.3%であり、また患者に尿を溜めてもらう必要がないなど患者に負担の少ない経膈超音波ガイド下での胚移植は臨床成績と患者への精神的な負担の軽減から、推奨すべき手技であると考えられる。

胚移植の位置は、その後の妊娠率に影響を及ぼすことが報告されている。Friedmanら⁶⁾は、胚移植後のエアバブルの位置が子宮底から<10 mm, 10-20 mm, >20 mmの3群に分け、臨床的妊娠を検討したところ、妊娠率は<10 mmでは62.5%、10-20 mmでは42.0%、>20 mmでは38.3%であり、<10 mmは10-20 mm, >20 mmと比較して有意に妊娠率が高いことを報告した。我々が考案した経膈超音波ガイド下での胚移植法は、経膈超音波ガイド下での胚移植法よりも明瞭にETカテーテルの先端を確認できるためピンポイントで狙い通りの位置に胚移植することが可能であり、そのような観点からも着床率の向上に貢献するものと考えられる。我々の技術的な工夫は、医師が左手でプローブを保持し右手でETカテーテルガイドを固定し、医師ではなく介助者(胚培養士)がETカテーテルを子宮腔内に挿入する、つまり、医師と胚培養士が二人三脚で行うところにある。これによって、我々が考案したこの胚移植法は、**図2-a**

のようにプローブの長軸とETカテーテルガイドの長軸が一致しない時に特に有効であるが、実際にはプローブの長軸とETカテーテルガイドの長軸が一致しない場合が非常に多い。これが従来法の第1の問題点である。また、子宮が正中で且つ後屈の場合は、**図1-a**のように従来法でも医師は左手でプローブとETカテーテルガイドの両方を同時に把持し右手で胚移植することができるが、子宮が正中であっても前屈の場合は**図1-b**のように、ETカテーテルガイドのETカテーテル挿入口が左手掌で隠れてしまうため胚移植操作が困難になる。また、従来法は、医師が右手で受精卵を充填したETカテーテルを子宮腔内へ挿入する際に、医師の左手はプローブとETカテーテルガイドの両方を同時に把持しているためETカテーテル先端を追跡するためにプローブの先端を左右に振ることはできてもローリングすることはできない。これが従来法の第2の問題点である。我々が考案したこの胚移植法は、介助者(胚培養士)が受精卵を充填したETカテーテルを子宮腔内へ挿入する際に、医師が右手でプローブのみ把持していることによってプローブの先端を左右に振るだけでなく細かくローリングすることができるので、ETカテーテル先端をリアルタイムに追跡することができ、ETカテーテルを進入していく過程でその先端を決して見失うことはない。特に、胚移植の経験が浅い医師にとっては、こうした技術的な工夫が着床率の向上に繋がる可能性が大きいものと思われる。ただし、医師の指導下であっても、胚培養士が患者の子宮内にカテーテルを挿入していく行為の妥当性は検討、改善の必要がある。日本臨床エンブリオロジスト学会、日本哺乳動物卵子学会などの学会では、胚培養士を育成し認定している。教育機関として胚培養士教育プログラムを開設している大学、大学院は数校(北里大学、麻布大学、国際医療福祉大学大学院、徳島大学大学院、近

畿大学大学院) 存在する⁷⁾。それらの教育プログラムには、胚移植時の介助(カテーテルの子宮内への挿入)に関する教育内容が含まれているものもあるが、生殖医療現場における医療従事者の職域の妥当性を考慮すると、カテーテルの子宮内への挿入行為は看護師が実施し、ETカテーテル内への胚のローディングは胚培養士が実施するという選択肢が望ましい。

胚移植を施行する医師間の技術的な格差をなくし、適切な位置に胚移植することが妊娠率の安定化あるいは向上に繋がるが、我々が考案したこの胚移植法は、従来の胚移植法よりも技術的に簡便であり誰でもが容易に習得できる点が優れていると考えられる。

参考文献

- 1) Wikland, M., Enk, L., Hamberger, L.: Transvesical and transvaginal approaches for the aspiration of follicles by use of ultrasound. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 442: 182-194, 1985.
- 2) El-Shawarby, S., Margara, R., Trew, G., Lavery, S.: A review of complications following transvaginal oocyte retrieval for in-vitro fertilization. *Hum. Fertil (Camb)*, 7 (2): 127-133, 2004.
- 3) Gardner, DK., Schoolcraft, WB., Wagley, L., Schlenker, T., Stevens, J., Hesla, J.: A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 13 (12): 3434-3440, 1998.
- 4) Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O., Leibo, SP.: Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 11 (3): 300-308, 2005.
- 5) Porter, MB.: Ultrasound in assisted reproductive technology. *Semin. Reprod. Med.*, 26 (3) : 266-276, 2008.
- 6) Friedman, BE., Lathi, RB., Henne, MB., Fisher, SL., Milki, AA.: The effect of air bubble position after blastocyst transfer on pregnancy rates in IVF cycles. *Fertil. Steril.*, 95: 944-947, 2011.
- 7) 遠藤克：生殖補助医療胚培養士の誕生と今後について。日本IVF学会誌, 13: 24-25, 2010.

ガラス化法による卵巣組織凍結の実際 - 新たながん・生殖医療

鈴木直¹, 橋本周² 五十嵐豪¹, 高江正道¹, 洞下由記¹, 杉下陽堂¹, 竹之下誠³,
細井美彦⁴, 石塚文平⁵, 森本義晴²

¹ 聖マリアンナ医科大学産婦人科学 〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

² IVFなんばクリニック 〒550-0015 大阪市西区南堀江1丁目17-28 なんばSSビル3F

³ イブバイオサイエンス 〒648-0003 和歌山県橋本市隅田町山内513

⁴ 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科 〒649-6433 和歌山県紀の川市西三谷930

⁵ 聖マリアンナ医科大学高度生殖医療技術開発講座 〒216-8511 神奈川県川崎市宮前区菅生 2-16-1

要旨: 近年のがん医療全般における診断法ならびに治療法の着実な進歩によって, がんを克服する患者 (Cancer Survivor)が増加している。また, それに伴いCancer Survivorの生活の質についても大きな関心が寄せられており, 特に生殖年齢がん患者に対する化学療法や放射線療法によって生じる妊孕性の喪失は非常に大きな問題であると認識されてきている。一般的に医療者と若年がん患者は, まずは何よりも病気を乗り切ることが唯一のゴールであるという共通の概念を有するため, がん医療によるこれらの合併症を許容せざるを得ない現状がある。一方, 若年がん患者は「がん」による将来の恐怖のみならず, 若年だからこそ「妊孕性消失」に関する将来の不安を抱えることとなる。がん患者に対する妊孕性温存の診療は古くから試行されてきたが, 新たな妊孕性温存療法として卵巣組織凍結・移植の技術が注目されている。本稿では, ガラス化法による卵巣組織凍結の実際に関して最近の知見を含めて概説する。

キーワード: がん・生殖医療, 卵巣組織凍結, 卵巣組織移植, 妊孕性温存, ガラス化法

緒言

1998年にDonnezがヒトで初めて卵巣組織凍結を施行した4症例に関してHuman Reproduction Update誌に報告している¹⁾。その中で, 「卵巣組織あるいは卵の凍結は実現可能となったのかもしれない。しかし, 現状では倫理的, 医学的そして社会的な議論がまだ必要である。母親と出生児に対する危険性は? 本技術による出産の際に遺伝的な危険性は? 本技術による治療後の妊婦の心理的サポートの必要性は?」と記している。Donnezによる初めての卵巣組織凍結施行の報告から15年が経過し, 初めてのホジキン病患者における生児獲得の報告から9年が経過した現在²⁾, 欧米では「卵巣組織凍結保存は, 早期閉経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」と認識されている³⁾。しかし, 本技術の安全性や有効性などに関する再評価が必要である。

若年がん患者に対する卵巣組織凍結に関する指針

本技術の臨床応用への成功を機に, International Society for Fertility Preservation (ISFP: 初代ISFP会長 Donnez) による第1回会議が2009年にベルギーで開催され (World Congress of Fertility Preservation), 2年に1度世界中の研究者が集まり議論を展開している。そして, ISFP2代目会長のKimらにより「若年がん患者に対する妊孕性温存療法の推奨」が2012年6月にJARG (Journal of Assisted Reproduction and Genetics) 誌に掲載され, 本推奨が若年がん患者の妊孕性温存療法に関する最新の指針となっている⁴⁾。ISFP推奨の適応疾患 (がん) はリンパ腫と乳がんとなっており, 一方白血病は卵巣内におけるがん細胞の存在の可能性によって適応から除外されている。しかし, リンパ腫に対する標準的化学療法であるABVD療法 (アドリアマイシン, ブレオマイシン, ビンブラスチン, ダカルバジン) は卵巣機能不全リスクが低い治療法であることから, リンパ腫での骨髄移植/造血幹細胞移植施行症例かあるいは緊急的な妊孕性温存療法として行う場合にはオプションとして卵巣組織凍結が適応となるとしている。

また、卵巣機能不全リスクが高い治療法を受ける思春期前のリンパ腫患者に対しては卵巣組織凍結が唯一の妊孕性温存療法となる。

一方、2006年にThe American Society of Clinical Oncology (ASCO)は、がん患者における妊孕性温存に関する指針を示している⁵⁾。その中で既に確立された治療法として胚凍結、放射線療法時の卵巣遮蔽、卵巣位置移動術などが記されており、卵凍結や卵巣組織凍結、GnRHアナログやアンタゴニストによる卵巣機能の保護は臨床試験の段階の技術として記されている⁵⁾。ASCOのがん患者における妊孕性温存に関するガイドラインは近日中に見直しが計画されているが(Oktay私信)、しかしOncofertilityという概念の生みの親でもある米国のWoodruffが構築したOncofertilityコンソーシアムにおいても、卵巣組織凍結は研究的技術ではあるが早急に妊孕性温存を考慮する際の最高のオプションとなりうると推奨されている。Oncofertilityコンソーシアムにおける卵巣組織凍結の適応外疾患は白血病、リンパ腫そして卵巣がんとなっている (<http://oncofertility.northwestern.edu>)。同様に、2006年に世界で初めてのがん患者の妊孕性温存ネットワークとして構築されたドイツ語圏を中心としたFertiPROTEKT (<http://www.fertiprotekt.de>)でも、卵巣組織凍結の適応外疾患として白血病と卵巣がんをあげている。凍結卵巣を移植するには卵巣組織内の微小残存がん病巣(MRD: Minimal residual disease)が問題となることから適応疾患を慎重に選択すべきであり、白血病では組織所見ならびに免疫組織化学染色でMRDが認められなかった症例の75%で染色体異常がPCR法にて検出されたとの報告もあることから⁶⁾、これまで述べてきたように白血病は卵巣組織凍結の適応とはならない。またAndersenらによる同様の報告も存在し、免疫組織染色にて残存腫瘍細胞が陰性であった組織に対してReal time qPCRを施行した結果、7例中4例が陽性であったという⁷⁾。しかしそれらの組織をヌードマウスに移植し、5カ月後にがん細胞の再発について検索を行ったが、Real time qPCRでは再発を確認できなかったことから、ヌードマウスへの移植によって悪性腫瘍の発生の有無を確認する実験系の限界が示唆されている⁷⁾。

乳がんに関しては、初期の乳がん患者51症例のHEならびにWT-1を用いた免疫組織化学染色による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⁸⁾。現在、欧米においては進行乳がん患者が妊孕性温存療法の適応とならないことから、卵巣組織凍結適応となる乳がん患者は卵巣への転移に関して安全であるとされており、乳がん患者が卵巣組織凍結保存の適応疾

患の上位となっている。

卵巣組織凍結法—緩慢凍結法

現在の標準的な卵巣組織凍結保存は緩慢凍結法であり、これまで卵巣凍結によって得られた生児は全て緩慢凍結法によるものである^{2,3)}。しかし、緩慢凍結法によって移植後の内分泌機能がどの程度維持されるかに関してはまだ十分に検証されておらず、採卵で卵子が回収できないempty follicleの増加、得られた卵子の発育能の低下も明らかにされている⁹⁾。最近Andersenらは、がん患者に対する緩慢凍結法による妊孕性温存療法に関する18症例の経験を報告している¹⁰⁾。報告によると、18例の患者の年齢の中央値は28.5歳(9-38)で、卵巣を片側摘出した後、卵巣組織片は5×5×1mmの大きさを緩慢凍結が施行されている。移植までの期間は中央値で2年(1-5)、また移植の際全患者は無月経(FSHの中央値74IU/L(43-200))であり、保存してある卵巣組織の20～60%(6-12片)が同所性あるいは異所性(前腹壁あるいは骨盤壁)に移植され、移植片が機能した期間の中央値は26カ月(0-88)であったという。なお、対象患者は以下の如くである：ホジキン病5例、乳がん4例、非ホジキンリンパ腫2例、自己免疫性血管炎2例、その他5例(ユーイング肉腫、子宮頸がん、再生不良性貧血、発作性夜間血色素尿症、溶血性尿毒症症候群)。12症例で計72周期のART治療の結果、65個の卵が獲得され、受精率は40%で最終的に5症例に妊娠が成立し(妊娠率：6.9%(5/72))、2例の生児が獲得された(生産率：2.8%(2/72))。対象疾患などのバイアスなどから生産率2.8%に関する評価は難しいが、Andersenらは満足のいく結果ではないと謙虚に述べている。緩慢凍結法では細胞外に形成される氷晶による細胞への物理的障害が予想されるため、融解後の卵胞発育過程における卵母細胞の発育と顆粒膜細胞の成熟のバランスが損なわれているとも考えられている¹¹⁾。

一方、ヒト卵巣組織におけるガラス化法による基礎的研究報告も散見されており、Hovattaらは、ヒト卵巣組織を緩慢凍結法あるいはガラス化法で凍結した後に電子顕微鏡で形態を比較した結果、有意にガラス化法(プロパンダイオール、エチレングリコール、DMSOやPVPを用いた溶液)で間質の形態が良好であったと報告している¹²⁾。さらに近年Amoriumらも、ヒト卵巣組織を用いたガラス化法(エチレングリコールとトレハロースとFBSを用いた溶液)を組織学的に評価しており、長年緩慢凍結法による卵巣組織凍結を行ってきたDonnezらのグループもガラス化法の臨床応用へ模索している¹³⁾。

卵巣組織凍結におけるガラス化法の開発 —カニクイザルを用いた前臨床試験

我々の研究グループ(IVF なんばクリニック:森本義晴, 橋本周, 矢持隆行, 近畿大学生物理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, 聖マリアンナ医科大学産婦人科学:石塚文平, 五十嵐豪, 洞下由記, 高江正道, 杉下陽堂; 敬称略)は霊長類であるカニクイザルを用いて卵巣組織凍結・移植の前臨床試験を行った。卵巣組織凍結の標準的方法は緩慢凍結法であったことから, ①ガラス化法による新しい卵巣組織凍結方法の開発を目的とし, さらに実験モデル上異所性移植モデルとなることから, ②異所性卵巣組織移植部位の検討も同時に目的として研究を2006年に開始した。まず予備実験として至適なガラス化溶液の検討を行い, VSEGP 溶

液 (Ethylene glycol (EG), Polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.5 M Sucrose) と VSED 溶液 (EG, DMSO, 0.5 M Sucrose) の溶液を作成し, 平衡時間は5分, 10分, 20分で検討し, 評価方法は卵巣組織片のHE染色ならびに電子顕微鏡像で判定を行った¹⁵⁾。その結果, VSEGP 溶液で平衡時間5分の条件で研究を進めることとした(表1)。カニクイザルを用いた卵巣組織ガラス化凍結ならびに移植の結果を表2, 3に示す。ストロー (1×1×1mm:n=4)ならびに新しいデバイスであるクライオサポート (10×10×1-2 mm:n=3)(表2)を用いて検討した結果, 中央値131日目(116-207)にホルモン周期の回復が確認され, 最終的に2頭から3回異所性移植卵巣組織(大綱, 卵管間膜, 後腹膜, 子宮漿膜)から質の高い卵子の採取と, 顕微授精による受精卵の獲得に成功した^{14,16)}。

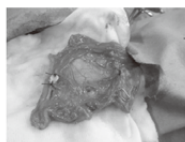
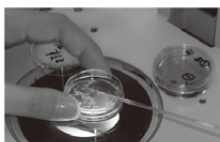
表1 ガラス化法の条件

【ガラス化溶液:VSEGP 溶液】
5.64 M(35% v/v) EG(ethylene glycol) + 5% PVP(Polyvinylpyrrolidone) + 0.5 M sucrose
【平衡時間】
5分

- ◆EG は, 最も一般的に使用される浸透性の耐凍剤
- ◆EG は細胞毒性が低く, 浸透も速い
- ◆非浸透性耐凍剤:PVP や糖類(sucrose) などの高分子物質は, 細胞を効果的に脱水させ, 耐凍剤による暴露時間を減少させる
- ◆耐凍剤による暴露時間の減少は, 卵巣組織内の卵母細胞の生存能力を支えるために不可欠

表2 ガラス化凍結卵巣組織を用いた異所性自家移植実験 (n=7)

No.	1	2	3	4	5	6	7
年齢(歳)	6	5	4	4	3	9	10
移植部位	R	R U	R O U	O	R O M	R O M	R O U
卵巣組織の大きさ	1×1×1 mm	1×1×1 mm	1×1×1 mm	1×1×1 mm	10×10×1-2mm	10×10×1-2 mm New device	10×10×1-2 mm New device
ホルモン周期の回復	127 日目	無し	207 日目	179 日目	116 日目	138 日目	131 日目
ガラス化凍結	ストロー				クライオサポート		



R: 後腹膜
O: 大綱
U: 子宮漿膜
M: 卵管間膜

表3 異所性移植卵巢組織からの卵子回収と ICSI 後の発育能

	移植部位	採卵数	受精卵数	胚の数 (8-16細胞期)
No.5 1回目	大綱	1	1	0
No.5 2回目	大綱 卵管間膜	4	2	2
No.7	後腹膜 子宮漿膜	4	3	2
		9	6	4

おわりに

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を進めており、2013年1月現在55症例（早発卵巢機能不全症例も含む）に対して卵巢組織凍結を施行している。Andersenの報告にもあるように、緩慢凍結法による卵巢組織凍結の生児獲得率は決して満足のいく結果とはなっていない。卵巢組織凍結保存は、より多くの卵子を保存できるだけでなくエストロゲン分泌によるホルモン補充ができるというメリットがあり、妊孕性の温存だけでなく卵巢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も有している。さらに、がんによる将来の「恐怖」のみならず、若年だからこそ妊孕性消失に関する将来の「不安」を抱える思春期患者も含む若年がん患者においては、緊急対応可能な技術である卵巢組織凍結による妊孕性温存はがん治療に臨む際の若年がん患者の精神的支えともなりうると考える。現在、本邦でも当学を含む4施設で卵巢組織凍結が実際に可能となり（2013年1月現在）、本技術が妊孕性温存可能である若年がん患者にとって福音となっているが、しかし、本技術の有効性と安全性に関しては引き続き検証を行っていく必要がある。

参考文献

1) Donnez, J., Bassil, S.: Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Human. Reprod. Update.*, 4: 248-259, 1998.

2) Donnez, J., Dolmans, MM., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., Martinez-Madrid, B., van Langendonck, A.: Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet.*, 364: 1405-1410, 2004.

3) Donnez, J., Silber, S., Andersen, C., Demeestere, I., Piver, P., Meirou, D., Pellicer, A., Dolmans, MM.: Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live births. *Ann. Med.*, 43: 437-450, 2011.

4) IFSP Practice Committee/ Kim, S., Donnez, J., Barri, P., Pellicer, A., Patrizio, P., Rosenwaks, Z., Nagy, P., Falcone, T., Andersen, C., Hovatta, O., Wallace, H., Meirou, D., Gook, D., Kim, SH., Tzeng, CR., Suzuki, S., Ishizuka, B., Dolmans, MM.: Recommendation for fertility preservation in patients with lymphoma, leukemia, and breast cancer. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 29: 465-468, 2012.

5) Lee, SJ., Schover, LR., Partridge, AH., Patrizio, P., Wallace, WH., Hagerty, K., Beck, LN., Brennan, LV., Oktay, K.: American Society of Clinical Oncology recommendations on fertility preservation in cancer patients. *J. Clin. Oncol.*, 24: 2917-2931, 2006.

6) Ajala, T., Rafi, J., Larsen-Disney, P., Howell R.: Fertility Preservation for Cancer Patients: A Review. *Obstet. Gynecol. Int.*, 160386, 2010.

7) Greve, T., Clasen-Linde, E., Andersen, MT., Andersen, MK., Sørensen, SD., Rosendahl, M., Ralfkiaer, E., Andersen, CY.: Cryopreserved ovarian cortex from patients with leukemia in complete remission contains no apparent viable malignant cells. *Blood.*, 120: 4311-4316, 2012.

8) Rosendahl, M., Timmermans, WV., Nedergaard, L., Kristensen, SG., Ernst, E., Rasmussen, PE., Anderson, M., Schmidt, KT., Andersen, CY.: Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation: no evidence of malignant cell contamination in ovarian tissue from patients with breast cancer. *Fertil. Steril.* 95: 2158-2161, 2011.

- 9) Dolmans, MM., Donez, J., Camboni, A., Demylle, D., Amorim, C., Van Langendonck, A., Pirard, C.: IVF outcomes in patients with orthotopically transplanted ovarian tissue. *Hum. Reprod.*, 24: 2778-2787, 2009.
- 10) Greve, T., Schmidt, KT., Kristensen, SG., Ernst, E., Andersen, CY.: Evaluation of the ovarian reserve in women transplanted with frozen and thawed ovarian cortical tissue. *Fertil. Steril.*, 97: 1394-1398, 2012.
- 11) Nottola, SA., Camboni, A., Van Langendonck, A., Demylle, D., Macchiarelli, G., Dolmans, MM., Martinez-Madrid, B., Correr, S., Donnez, J.: Cryopreservation and xenotransplantation of human ovarian tissue: an ultrastructural study. *Fertil. Steril.*, 90: 23-32, 2008.
- 12) Keros, V., Xella, S., Hultenby, K., Pettersson, K., Sheikhi, M., Volpe, A., Hreinsson, J., Hovatta, O.: Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Human. Reprod.*, 24: 1670-1683, 2009.
- 13) Amorim, CA., Davis, A., Langendonck, AV., Dolmans, MM., Donnez, J.: Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. *Fertil. Steril.* 95: 1094-1097, 2012.
- 14) Igarashi, S., Suzuki, N., Hashimoto, S., Takae, S., Takenoshita, M., Hosoi, Y., Morimoto, Y., Ishizuka, B.: Heterotopic autotransplantation of ovarian cortex in cynomolgus monkeys. *Hum. Cell.*, 23: 26-34, 2010.
- 15) Hashimoto, S., Suzuki, N., Yamanaka, M., Hosoi, Y., Ishizuka, B., Morimoto, Y.: Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues. *RBM. Online.*, 21: 501-509, 2010.
- 16) Suzuki, N., Hashimoto, S., Igarashi, S., Takae, S., Yamanaka, M., Yamochi, T., Takenoshita, M., Hosoi, Y., Morimoto, Y., Ishizuka, B.: Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. *Human. Reprod.*, 27: 2420-2429, 2012.