

## 第7回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## ヒト卵子の凍結保存 —ヒト卵子バンクの実際—

桑山 正成

加藤レディスクリニック 先端生殖医学研究所

### はじめに

我が国では現在10組に1組の夫婦が不妊で悩んでおり、その5分の1が不妊医療を受け、新生児のうちすでに97人に1人が体外受精由来である。不妊原因は男性因子と女性因子に二分されるが、遺伝的材料となる卵子と胚が着床する子宮を持つ女性要因が全体の7割を占める。不妊症は、治療しなくとも直接身体的には重大な支障をきたすものではなく、また不妊である事実を認めたくない患者が多いため、概して治療の開始時期が遅れがちである。一方で、女性には年齢要因による絶対不妊があり、治療開始年齢が高い場合には、その疾病的不妊原因が解決されても、年齢要因により妊娠することができない。女性の妊孕性は35才頃から減少し、39才を超えるとその傾向は顕著になり、妊娠率が有意に低下するだけでなく、胎児の染色体異常率の上昇も見られる。そして閉経を待たず、45才をもって卵子の老化により妊娠の可能性はほぼゼロとなる。

当院では年間1万例以上の体外受精治療を行っているが、患者の平均年齢は約39才であり、多くの女性患者が年齢性不妊という一般不妊治療のタイムリミットに直面している。

一方、男性不妊に対する近年の治療技術開発は目覚ましく、体外受精や顕微授精技術の確立により、精巣内から1精子でも得られれば、これをもとに正常な産子へと結びつけることが可能となった。さらに無精子症患者においても、その一部は精巣内に、精子細胞あるいは精母細胞など、精子のもととなる精細胞が存在しており、これらを用いた治療法が臨

床応用されつつある。しかしながら、男性患者の妻が高齢であった場合、夫の治療を待つ間に妻の卵子が老化し、妊娠することができなくなるケースが少なくない。そこで、妻の卵子を少しでも若いうちに採取し、凍結保存しておくことで、卵子の老化を防ぐことが可能となる。我々はもともとこの目的、すなわち夫婦間の不妊治療の一環として、卵子の将来的本人利用のための卵子セルフバンクを実現するため、卵子凍結保存技術の開発を行った。

### ヒト卵子凍結保存/卵子バンク設立の背景

1972年、マウス胚で成功例が示された凍結保存技術（緩慢凍結法）は、その後様々な動物種の胚や卵子への応用が試みられ、実に多くの哺乳動物胚で素晴らしい保存性が示された。この技術は1983年よりヒト体外受精プログラムに導入され、基幹技術の一つとして広く世界中に普及し、胚の凍結保存に日常的に用いられてきた。しかしながら受精前の卵子は低温感受性が高くかつ物理抵抗性に乏しいため、緩慢凍結法による保存は極めて困難であった。1985年、新しい凍結保存法、ガラス化保存法が開発され、従来の緩慢凍結法では凍結保存が困難であった偶蹄類胚など耐凍性の低い胚の迅速かつ効率的な凍結保存が可能となった。しかし依然これらのガラス保存法を応用しても、物理抵抗性の低い卵子では凍結失敗例が相次ぎ、その原因として高濃度の凍結保護物質を含むガラス化液によるMIIプレートの損傷が指摘された。手法の改良がすでに80年代に行き詰まっている緩慢凍結法を尻目に、ガラス化保存法はその後、

多くの低温生物学者らの手によって改良され続け、近年、冷却/加温法の劇的な改善により、課題であった溶液の毒性問題が解決され、細胞非侵襲的な、極めて有効な卵子/胚の凍結保存法として完成された<sup>1)</sup>。

この低毒性ガラス化液と超急速な冷却/加温法を用いた最少容量冷却法、すなわち Cryotop 法 (図3) では、各種動物、発育ステージの胚はもちろん、ヒト未受精卵子においても保存融解後の極めて高い生存率が得られ、さらに顕微授精後の正常受精率が90%以上と、非凍結卵子の成績と比較しても遜色がなく、その後の胚発生や胚移植成績も良好であった。これまで凍結保存卵子由来胚を移植した29症例 (平均移植胚数2.2個/移植) のうち12例に妊娠成立 (GS 確認: 妊娠率41.3%) が確認され、すでに5例の正常な児が得られている。この手法が追試された米国、メキシコ、コロンビアにおいても同様の好成績が得られ、同技術の再現性も証明されている。マウス未受精卵子を用いたアニマルモデル試験でも同法によりほぼ100%の生存率が得られ、従来のガラス化保存法で問題となっていたスピンドルの異常も Cryotop 法では発生しないことが明らかとなり、その安全性の高さが証明されている。この効果的かつ安全なガラス化保存技術の完成により、卵子を臨床治療目的で一時的に保存する卵子バンクの設立が可能となった。

#### 生殖医療分野における卵子凍結保存の意義： 卵子バンク

卵子バンクには、自己の卵子を将来本人が利用するために保存するセルフ卵子バンクと、卵子提供プログラムに用いる第三者の卵子を保存するドナー卵子バンクの2種類がある。

##### (1) 卵子セルフバンク (本人利用のための卵子バンク)

###### 1) ガン患者における治療後の妊孕性維持

未婚女性における白血病などでは、骨髄移植をはじめとする造血幹細胞移植によりその多くが治療可能となった反面、化学治療のため多量に投与された抗癌剤および放射線治療の副作用によりほぼ全例が不妊となる現実がある。

しかしながら、骨髄移植治療前の寛解期に、男性の場合は精子、既婚の女性の場合は受精卵を採取して凍結保存し、治療後、それらを融解して IVF-ET

することにより、この医源性不妊を回避することが可能となっている。しかし未受精卵子は、その凍結保存技術が確立されていなかったため、未婚の女性ガン患者にはその道は閉ざされていた。2001年、我々が卵子の凍結保存技術を確立したことを知った血液内科医から、未婚の白血病女性患者の卵子を骨髄移植治療前に凍結保存してもらえないか、という依頼があった。直ちにその実現へ向けて、採卵の可能性、リスク、タイミングやスケジュールなど、専門家技術会議および倫理委員会において十分に検討、協議された後、同年に第一例が実施された。

###### 2) 高齢不妊に備えた若年時における卵子保存

女性の妊孕性は一般に35才頃から減少をはじめ、その傾向は40才を越えると顕著となる。そして45才をもって閉経を待たずに、ほぼ全ての女性は妊娠する能力を失う。しかしながら現代社会においては多くの女性が、晩婚や職業的理由などによりこの生殖年齢内に伴侶と出会い、子を生む機会を逸する場合が少なくない。晩年においても自らの子を得ることができる男性と性の差があるにも関わらず、男性型の社会構造により、女性にとっての出産が、それまで積み上げてきたキャリアの致命的なハンディとなる現実問題が存在している。これらの性差別を解消し、自分の人生の、適した時期に子供を持てるようにする技術として卵子のセルフバンキングが注目されはじめています。

###### 3) 夫が不妊治療中である高齢婦人の妊孕性維持

生殖補助医療では、男性因子不妊症において、精液あるいは精巣中に例え1細胞でも正常精子が存在すれば、顕微授精 (Intra Cytoplasmic Sperm Injection; ICSI) により正常な受精卵を作出することが可能となっている。無精子症患者の約15%には、精巣内に精子のもととなる精細胞、すなわち精子細胞、精母細胞あるいは精祖細胞が存在しており、現在、これらの細胞を体外で精子に発育させる技術が確立されつつある。しかしながら、40才を越えた女性は段階的に卵子老化によって絶対不妊へと移行するため、不妊男性の妻がこの精子形成/完成培養技術を用いた治療法の臨床応用を待つ間に、年齢を重ねて子供を作る機会を失うこととなる。そこで、あらかじめ、妻の健康な卵子を凍結保存しておくことによって、この高齢由来不妊に対応することが可能である。

## (2) 卵子バンク（第三者利用のためのバンク）

欧米をはじめとする多くの国では、早期卵巣不全や両側卵巣摘出女性など、本人卵子による妊娠が不可能、あるいは困難な場合、精神的、身体的に健康な第三者からの提供卵子を用いた体外受精が、不妊治療の一つとして日常的に実施されている。我が国では現在、この卵子の Donation は日本産科婦人科学会のガイドラインで認められていないが、近く、患者に卵子が全くない症例に限って実施可能となる見通しである。

提供者の卵子が凍結保存によりバンクできるようになれば、提供者が都合の良い時に採卵でき、凍結卵子の状態、必要な場所まで輸送、使用時まで保管が可能となり、空間的、時間的制約が解除され、卵子の利用性が飛躍的に向上する。さらに、患者の治療に必要な数だけ凍結卵子を融解し、受精させることにより、限られた貴重な卵子を、無駄なく有効に利用することが可能となる。

## ガラス化保存の理論と実際

### (1) ガラス化保存理論

ガラス化保存法とは、高濃度の凍結保護物質を添加した溶液によって細胞を十分に脱水濃縮後、液体窒素への直接注入による急速な冷却により、細胞内外を非結晶化（アモルファス状態）して凍結保存する手法である。

この手法は細胞への冷温障害を回避できるだけでなく、保存中溶液内に有害な氷晶が発生しないために、従来の緩慢凍結法に比較して、より高い凍結保存後の生存性が得られる。また従来法に比較して処理が極めて簡易で、プログラムフリーザーなど特別な機器も必要としないため、実用的観点から臨床応用に極めて有効な手法である。

### (2) ガラス化保存の歴史

高濃度の凍結保護物質（Cryoprotectant; CPA）を添加した水は、低温下においても水素結合による氷晶形成が著しく阻害されるため、液体の分子状態のまま固化する。すなわち物理的な損傷無く、細胞を低温で永久保存することが可能である。1937年、低温生物学者 Luyet により提唱されたこの凍結手法は Vitrification（ガラス化保存）法と名付けられた<sup>2)</sup>。しかしながら十分に毒性の低い凍結溶液（ガラス化

液）が開発できず、最初の画期的な成功は実に半世紀後の1985年（マウス胚<sup>3)</sup>）になってからであった。その後、ウサギ胚、ウシ<sup>4)</sup>、ブタ<sup>5)</sup>など11種以上の動物種において保存後の生存が報告され、今日ではその多くの種において実用的にガラス化保存技術が利用されている。

手法的には、初期に用いられた高濃度のCPAを添加したガラス化液は90年代に入り、より低い濃度の溶液<sup>6)</sup>へ、また同時に、添加するCPAの種類や、超急速な冷却-加温法<sup>7)</sup>の検討、さらに、専用のガラス化コンテナ<sup>1,8)</sup>が開発され、現在すでに不妊治療分野におけるヒト卵子/胚において、好成績が報告されている<sup>9,10)</sup>。

### (3) 卵子のガラス保存プロトコール

我々が用いている卵子のガラス化保存のプロトコールを図1に示した。

採取された卵子はまず卵丘細胞を除去して裸化し、細胞内へCPAを浸透させるために平衡液へ浸漬する。浸透圧差により一時的に収縮した卵子細胞体積が回復するのを待ち、細胞内外の氷晶形成を抑制するため、凍結しても氷晶が形成されないガラス化液中へ卵子を導入し、細胞外液を完全に置換後、ガラス化保存用に開発した凍結保存容器、クライオトップへ載せる。直ちに液体窒素中（ $-196^{\circ}\text{C}$ ）に容器を投入して急速に冷却、保存する。この温度域では細胞がほとんど劣化しないため、品質を良好に保持したまま、半永久的に保存が可能である。解凍は、 $37^{\circ}\text{C}$ に加温した解凍液中に、直接凍結卵子を導入することにより急速に行い、ショ糖を1および0.5モル添加した希釈液を用いて段階的に卵子細胞内のCPA

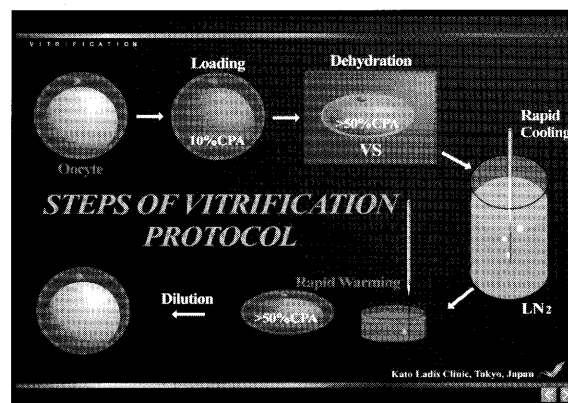


図1 Vitrification プロトコール

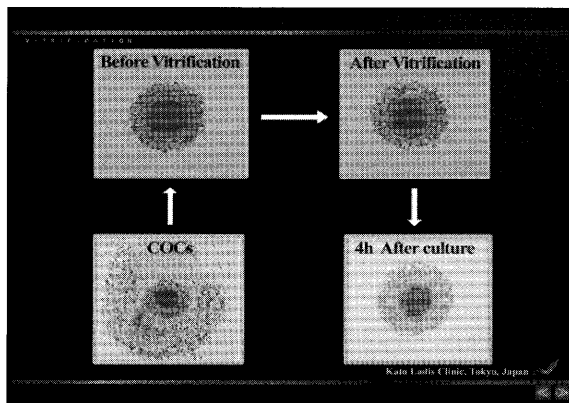


図2 Vitrification 前後のヒト卵子

を希釈除去する。4時間の培養により細胞膜の機能回復を待ってから顕微授精法により媒精し受精させ、さらに5日間の発生培養後に胚盤胞期へ発育した胚を患者の子宮内に非手術的に移植する。

#### (4) ガラス化保存したヒト卵子の生存性

これまでに解冻した107個の卵子の生存率は98%で、従来の緩慢凍結法(22%)に比較して明らかに高い良好な成績であった。また生存卵子を顕微授精後、90%が雌雄両前核の形成を伴う正常受精卵となり、培養後、91%が分割、さらに4日後、その50%が分化した正常な胚盤胞へ発生した。この成績は凍結保存していない卵子と比較しても遜色のない良好な値であり、凍結による卵子のViability lossが最小限であったことが証明された。従来の緩慢凍結法では、生存卵子の半数が受精したものの胚盤胞への発生は見られなかった。これまでの緩慢法では妊娠が減多に得られなかったことがこの結果からも示される。

現在までに同手法を用いて187人の不妊治療中患者より498個の卵子が凍結保存されている。

#### おわりに

毒性の低いガラス液と最速の冷却/融解方法で構成された最少容量冷却法によるガラス化保存法を用いることによって、従来、極めて困難とされていたヒト卵子の凍結保存が可能となった。これにより、白血病患者や卵巣ガン患者など、卵巣あるいはその機能消失によって妊孕能を失う状況に置かれた女性が、自己卵子の凍結保存により、その後の人生において、自分自身の拳児を得る道が開かれた。

すでに、日本、米国および中南米諸国において演

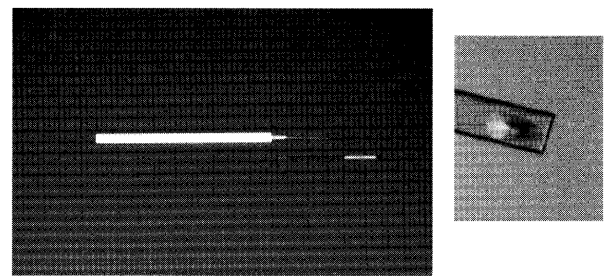


図3 卵子のVitrification用容器「クライオトップ」(左)と卵子をのせた状態の同先端部(右)

者の技術指導のもとにヒト卵子セルフバンク施設が設立され、100名を越える女性達に利用されている。

近年の卵子体外成熟培養技術の確立により、PCOs患者など、その臨床応用場面が広がった未成熟卵子や、さらに基礎段階で画期的な成果が報告されつつあるさまざまなステージの発育途上卵母細胞の不妊治療への利用性拡大のため、これらの卵母細胞、あるいは卵巣組織に適したガラス化保存法の開発を実施中である。

#### 引用文献

- 1) Kuwayama, M., Osamu, Kato. All round vitrification of human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Gentic.* 17(8): 477, 2000.
- 2) Luyet, B.J. The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica* 29: 1-14, 1937.
- 3) Rall, W. F. & Fahy, G. M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos by vitrification. *Nature* 313: 573-575, 1985.
- 4) Kuwayama, M., Hamano, S. and Nagai, T. Vitrification of bovine blastocysts obtained by in vitro culture of oocytes matured and fertilized in vitro. *J. Reprod. Fert.* 96: 187-193, 1992.
- 5) Kuwayama, M., Holm, P., Jacobsen, H., Greve, T. & Callesen, H. Successful cryopreservation of porcine embryos by vitrification. *Veterinary Record* 141: 365, 1997.
- 6) Kuwayama, M. In straw dilution of bovine IVF-blastocysts cryopreserved by vitrification. *Theriogenology* 41: 231, 1994.
- 7) Vajta, G., Kuwayama, M., Holm, P., Booth, P.J., Jacobson, H., Greve, T. & Callesen, H. Open pulled straw vitrification: a new way to reduce cryoinjuries

- of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 33-58, 1998.
- 8) Lane, M., Schoolcraft, WB., Gardner, DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 72(6): 1073-8, 1999.
- 9) Kuleshova, L., Gianaroli, L., Magli, C., Ferraretti, A. & Trounson, A. Birth following vitrification of a small number of human oocytes. *Human. Reprod.* 14: 3077-3079, 1999.
- 10) Kuwayama, M., Kato, O. Vitrification of human oocytes, Annual meeting of American Society of Reproductive medicine. Proc. P201, 2000.