

コラボレーション 超微小血管外科*癌治療後QOL

小児がん男児の妊孕性温存～超微小血管外科技術を用いた精巣移植・精巣凍結の可能性～

Kanit Samanpachin¹、中川 毅史²、野口 修平²、三原 誠²

¹タイ国立チェンマイ大学整形外科（タイ）、²東京大学医学部形成外科・美容外科（日本）

(Received 10 May 2009; accepted 5 June 2009)

Abstract

昨今、若年女児の医原性不妊症を回避するための妊孕性温存を目的として、未受精卵凍結、卵巣凍結の研究が進んできているが、その一方で若年男児に関しては、精子凍結技術の発達からあまり大きな問題とされていない。しかしながら、思春期前若年男児においては、精子形成が未熟なため精子を採取することができず、未だ妊孕性温存の治療法は開発されていない。今回我々は、思春期前小児癌男児の妊孕性温存を目的とした血管付精巣移植実験モデルを開発し、ラット精巣動静脈の血管吻合が現実のものとなった。さらに、マウス精巣組織を磁場環境下凍結技術によって凍結し、既存の凍結方法よりも組織破壊が減少できることを見出した。超微小血管外科技術と精巣凍結技術の応用によって、精巣の長期保存と移植研究の道を切り開いた。

キーワード 超微小血管外科技術、精巣移植、臓器凍結、癌治療後QOL

序文

小児癌患者の癌治療による不妊が問題となっており^{1,2)}。これまで若年女児においては、卵子凍結、卵巣凍結等の研究が進んでいる^{3,4)}。対して思春期前小児癌男児においては、妊孕性温存に関する配偶子保存の必要性はあまり問われてこなかった(表1)。思春期前小児癌男児は精子形成が未熟で、精原細胞の凍結保存が唯一の妊孕性温存治療となる。そのため、我々は2つのトライアルを開始している。1つ目のトライアルでは、精巣内精原細胞の保存を目指して、血管付精巣臓器の自家移植を行なう。2つ目のトライアルは、未成熟精子体外培養体外受精法(IVM-IVF)を考慮に入れて、精巣凍結を行なう。移植は精巣臓器または細断した精巣組織のどちらも想定し、成熟前の精巣を凍結し、癌治療後に自家移植することが目標である。

癌化学療法による男性の性機能障害

精巣は抗がん剤に対する感受性が高く、生殖細胞は抗がん剤の量に応じて障害を受ける。抗がん剤は、精巣に対して直接的に正常な精子形成に影響を与え、精巣の萎縮、乏精子症、無精子症、そして不妊をもたらす^{5,6)}。抗がん剤の中でもアルキル化剤は高度の精巣機能障害を引き起こし、18 Gy以上の放射線を受けると無精子症を患うことが多い。アルキル化剤と低容量の放射線療法の併用や、抗がん剤の多剤療法によって障害が軽減されるため様々な併用療法が研究されているが^{5,6)}、いずれも奇形精子の危険は回避できていない。癌治療によって不妊症

を患うのは精原幹細胞や精子形成を支持するセルトリ細胞が障害を受けるため、精子を保存できない患者の妊孕性を温存するには精巣の保存が必要である。

精子/精巣組織の凍結保存

1949年にPolgeらはグリセリンを保護剤として用いて牛精子の凍結保存が可能であることを報告し、精子バンクの先駆けとなった⁷⁾。1953年にはBungeとShermanがグリセリン及びドライアイスを用いた方法でヒト精子の凍結保存の安定化に成功している⁸⁾。融解後の精子の生存率は50%程度だが、生殖技術の進歩により精子の機能は良好である。そのため癌治療による不妊症への対策として、精子の凍結保存が行なわれている。しかし、思春期前の男児から精子を採取することはできず、成人男性でも治療を急ぐ必要性からタイミングが難しい。さらに、女性の10倍多いと言われている男性の胚細胞腫瘍や、もともと乏精子症、無精子症の方は、残された精子数が少ないため現在の技術では凍結保存が出来ない場合もある。

一方、精巣の凍結保存の歴史は浅く、1990年代半ばから動物実験で成功例が報告されてきた。精巣組織の凍結保存は、精巣組織を酵素で分離し、精巣細胞懸濁液を凍結する方法と、1～3 mm角に精巣組織を細断し、凍結する方法の2種類がある。

1996年にAvarbockらはDMSOを凍結保護剤として用いて、マウスの精巣細胞懸濁液をレシピエントに移植し、精子形成が観察されたことを報告した⁹⁾。しかし、産児は得られなかった。また、マウスとヒトの精巣細胞懸濁液中の細胞生存率はそ

れぞれ87%、66%で、各種凍結保護剤（グリセロール、DMSO、プロパンジオール、エチレングリコール）を使った凍結解凍後の生存率は52 - 58%であったことが示されている¹⁰⁾。

ヒトの精巣組織凍結は3例しか報告されておらず、うち2例は形態学的な解析にとどまり、精子形成機能については言及されていない^{11,12)}。Wynsらは片側停留精巣の2歳から11歳の男児から採取した未成熟精巣組織を凍結し、マウスに同所移植したところ、21日後も精原細胞とセルトリ細胞が生存し、ある

程度増殖活性も示していたことを報告している¹³⁾。

精巣凍結の問題点

精子は人間の細胞中最小であり水分も非常に少ないため、凍結に適していると言える。しかし、体積の大きい組織は凍結保護剤を浸透させることが難しく、凍結時に組織破壊が著しくなる。卵巣移植では虚血障害を回避するため細断化した組織ではなく、凍結した血管付卵巣の移植が試みられ、動物実験ではわずかに出産例が報告されているが、まだ実現可能性は低く臨床応用には至っていない。

細断化した卵巣組織の凍結には、高濃度の凍結保護剤と液体窒素を用いたガラス化法か、低濃度の凍結保護剤とプログラムフリーザーを用いた緩慢凍結法のどちらかが用いられ、昨今ではガラス化法が主流となりつつある。精子や卵子、受精卵、卵

巣組織もガラス化法にて凍結され、ヒトへの臨床応用も進んでいるが、精巣組織の凍結についてはどちらの方法が適しているのか未だ確立されていない。

臓器凍結と移植は主に、凍結による組織破壊と、血液が通わないことによる虚血障害という問題を抱えている。我々は、形成外科領域における超微小血管技術¹⁴⁾と、変動磁場環境下凍結¹⁵⁾という新しい凍結技術の応用によってこれらの問題をクリアできると考えている

方法

ラット精巣移植

2週齢または10週齢のラットをベントバルビタール腹腔内投与により全身麻酔し、仰臥位とした。その後、腹部正中切開より開腹し精巣動静脈を同定・血管温存した状態で精巣摘出、近交系ラットへ他家移植した。ドナーラットから精巣を摘出し、レシピエントラットへ移植する血流再開までは、2時間であった。レシピエント吻合血管は、大腿動静脈の分枝に端端吻合を行い、血管吻合後、精巣の生着を確認した。

	性成熟前	性成熟後 (未成年)	性成熟後 (未婚)	性成熟後 (既婚)
男性	✕ 精子/精巣凍結困難	○ 精子凍結可能	○ 精子凍結可能	○ 精子凍結可能
女性	✕ 卵子/卵巣凍結困難	✕~△ 卵子/卵巣凍結困難	✕~△ 卵子/卵巣凍結困難	○ 受精卵凍結可能

表1 現在の妊孕性温存技術

左表で示すように、小児癌患者において女兒の妊孕性温存は非常に難しい。理由は、受精卵凍結保存が安定しているのに比較し、卵子凍結は現段階では成功率が非常に低いためである。対して、男児は精子凍結技術の発達により、思春期以後の妊孕性温存は現実のものとなっている。逆に、精子採取が不可能な思春期前では、妊孕性温存は現段階では不可能である。女兒の妊孕性温存が社会的問題となっているが、思春期前男児の妊孕性温存も非常に重要な問題である。

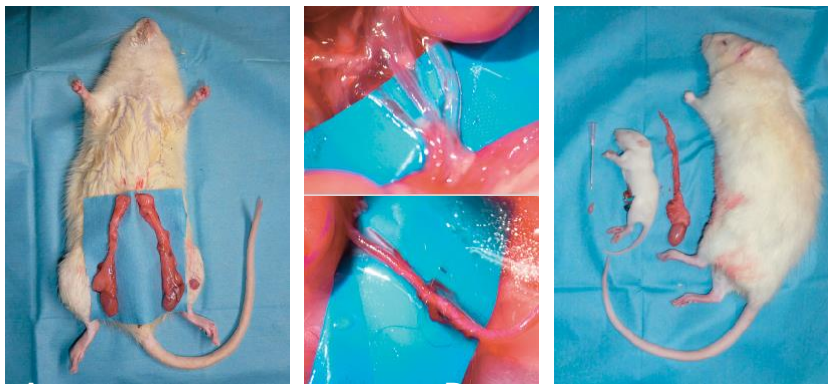
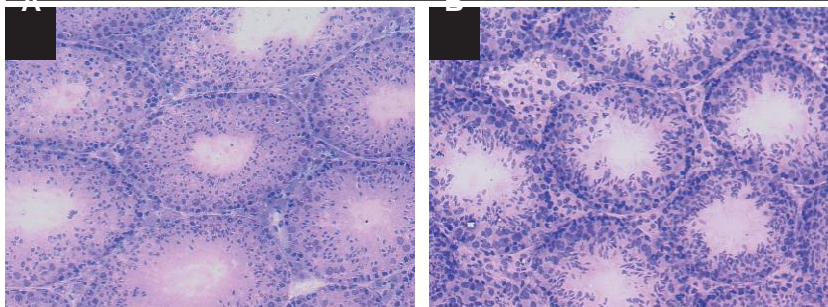


図1 ラット精巣移植

ベントバルビタールにてラットを全身麻酔し、腹部正中切開により血管付精巣を採取した。精巣動脈は、腎動脈分枝部まで剥離し、精巣静脈は、腹部大静脈分枝部まで剥離を行なって、血管付精巣を採取した。血管付精巣を、近交系ラットに移植した。ラット精巣動脈は0.5 mmの血管径であり、12-0ナイロンを用いて血管吻合を行い、移植精巣の血流再還流を確認した左は生後3週間の幼若ラット、右は生後20週齢の成ラット。矢印は、各々から採取した血管付精巣である。サイズの比較のために、18G針を置いている。成ラットの精巣動脈血管径は0.5 mm前後であったものの比較し、幼若ラットの精巣動静脈血管径は、0.2~0.3 mm前後と現在の技術では血管吻合は不可能であった。

図2 マウス精巣凍結

マウスの精巣を摘出し、細断せずにOCTコンパウンドで包埋しながら液体窒素 (A) または変動磁場環境下 (B) で凍結した。凍結切片を作製後、HE染色し、組織学的に評価した。



カニクイザルの精巣移植

全身吸入麻酔下のカニクイザル（体重3～5kg）において腹部正中切開を行い、腹部大動脈を展開した。腹部大動脈を直視下にて確認後、腹部大動脈から分岐する腎動脈を同定した。続いて、腎臓を露出させ、腹部大動脈と尿管を確認した。

凍結実験

マウスはペントバルビタール腹腔内投与により全身麻酔し、仰臥位とした。その後、腹部正中切開より開腹し精巣を摘出した。精巣を生理食塩水で洗浄し、OCTコンパウンドで包埋した後、液体窒素または変動磁場を発生する凍結装置（アビー）で凍結した。凍結装置のブライン槽に60%エチレングリコールを満たし、可能な限り空気を除いてナイロンバックに封入した精巣を、重りのついたゲージに入れてブライン層に沈めた。磁場強度は0.1～0.2 mTで、-30℃で凍結した。凍結した組織はクライオスタットで4～5 μmに薄切し、HE染色を行なった。

結果

精巣移植

ラットにおける血管付精巣移植モデルの開発を行った。成ラットの精巣動静脈の血管径は0.5～0.6 mm前後と比較的太く、超微小血管外科技術の応用(14)によって、血管吻合が現実のものとなった(図1)。対して、未成熟精巣の移植を仮定して幼若ラットを用いた血管付卵巣移植も試みたが、精巣動静脈は、0.1～0.2 mm前後と非常に細く、現状の血管吻合技術では、実験が不可能であることがわかった。今後、成マウス、成ラットに加えて、よりサイズが大きな動物で研究を行う必要がある。

カニクイザルの精巣動静脈は0.5～0.8 mm前後の血管径で、血管吻合は可能であることを確認した(図3)。

精巣凍結

マウスの精巣を液体窒素または変動磁場環境下で凍結し、凍結切片で精巣を組織学的に評価した。その結果、変動磁場環境

下凍結の方が組織破壊が低減していたことが分かった(図2)。

考察

これまで男性の不妊症対策として、精子凍結技術の発達がその福音となっていた。精子は、非常に細胞が小さい上に、DNAの採取さえ可能であれば、顕微授精により産児を得ることが可能である。このような観点から、小児癌男児の妊孕性温存に関しては、これまで大きな問題として取り上げられることが少なかった。思春期前男児においては精子採取が不可能であるため、精原細胞の採取・成熟が今回の研究の柱となる。我々は、思春期前の小児癌患者の妊孕性温存を目標として、血管付精巣の臓器凍結保存法と、精巣の組織凍結保存法の開発を進めている。今回の研究によって、成ラットで血管付精巣臓器移植を行なうことができ、磁場環境下における精巣凍結保存が有効であることが分かった。血管付の精巣移植と、細断した精巣組織移植のどちらの可能性も想定しており、以下にそれぞれの利点と欠点を記す。

(1) 血管付精巣臓器凍結法

利点：精巣臓器内の精原細胞が多数採取できる；血管吻合により解凍・再移植後の虚血障害が回避できる。

欠点：手術手技が非常に難しく、全身麻酔が必要；磁動環境下凍結技術について学術的に究明されていない。

(2) 精巣の組織凍結保存法

利点：局所麻酔下で採取が可能；1つの精原細胞から多数の精子が発生する

欠点：再移植後の虚血障害の可能性が高い；精子IVM-IVF技術の発展が望まれる。

体外で配偶子を成熟させるIVM-IVF法は、未成熟卵子で発達している。しかし、わが国においては、未成熟卵子のIVM-IVFは1999年から臨床応用されているが、現実には10に満たない

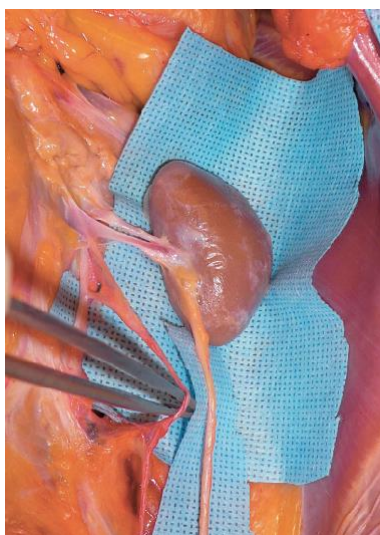
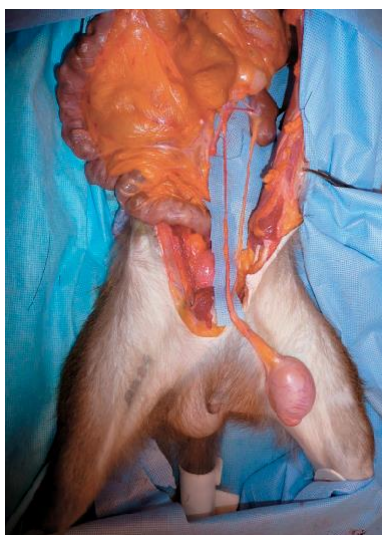


図3 カニクイザルの精巣移植

カニクイザルの精巣動静脈は、腎動脈から分岐するケース、腹部大動脈から直接分岐するケースもあり、症例に応じて血管剥離の手順を変える必要がある。精巣動静脈自体は、0.5 - 0.8 mm前後の血管径で、血管吻合は可能であることを確認した。

施設が臨床応用を継続しているのが実情である。未成熟精子のIVM-IVFに関しては基礎的な研究が進んでいるのみである。今後、思春期前小児男児癌患者の妊孕性温存を目的として、研究を進めていく必要がある。

精巣の凍結・移植実験プロトコルの確立

精巣凍結と精巣移植の研究は今後必ず活発となる分野であると確信しているが、現在はまだプリミティブな状態であるため、まずはプロトコルを確立することを目指す。

精巣を腹腔外（陰嚢内）に移植し、経時的に入念なエコー検査を行なう。具体的には、精巣内の精原細胞の変化、精巣内の血流の状態、組織量の増減等について検査する。他家近交系ラットの腹腔内に解冻した精巣の移植を行う。その際に、大腿動静脈分枝に吻合する事で、血流の温存を図る。体外受精による妊娠、出産を行う予定である。出産に関しては、世界でもまだ行われていない。

腹腔外に存在する精巣の臓器・組織凍結保存は、腹腔内に生殖器を持つ女兒の卵巣組織採取と比較して侵襲が低く、より早く臨床にフィードバックできるのではないかと考えている。また、精巣は精原幹細胞の凍結保存と体外での精子形成が可能となれば、凍結・解冻後の精巣細胞の生存率が低くても臨床上是

有用であると考えられる。

結論

超微小血管吻合を応用し、ラット精巣移植実験モデルの開発を行なった。ラット精巣動静脈の血管径はそれぞれ0.5 mm、0.7 mmであり、血管吻合が可能であることが証明された。今後、精巣凍結を行い、解冻・自家移植後の精原細胞の

成熟過程の評価を行なう必要がある。

〈争点1 精子成熟の可能性〉

未成熟精子を体外で成熟させ、受精させるのか、あるいは移植後自然に成熟するのか、今後研究の進展が待たれる。

〈争点2 移植後の奇形種発生の可能性〉

凍結精子を用いた体外受精では、奇形のある精子は除かれる。凍結・解冻によって影響を受けた精子が受精する可能性がある。

〈争点3 精巣の臓器凍結と組織凍結の比較〉

精巣を臓器ごと凍結する方が良いのか、組織凍結した方がいいのかは議論の余地がある。

●文献

- 1) Dunson DB, Baird DD, Colombo B : Increased infertility with age in men and women. *Obstet Gynecol*, 2004;103(1):51-6.
- 2) Hull MG, Glazener CM, Kelly NJ, et al : Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 1985;291(6510):1693-7.
- 3) Bedaiwy MA, El-Nashar SA, El Saman AM, et al : Reproductive outcome after transplantation of ovarian tissue: a systematic review. *Hum Reprod*, 2008;23(12):2709-17.
- 4) Demeestere I, Simon P, Emiliani S, et al : Orthotopic and heterotopic ovarian tissue transplantation. *Hum Reprod Update*, 2009.
- 5) Mitchell RT, Saunders PT, Sharpe RM, et al : Male fertility and strategies for fertility preservation following childhood cancer treatment. *Endocr Dev*, 2009;15:101-34.
- 6) Puscheck E, Philip PA, Jeyendran RS : Male fertility preservation and cancer treatment. *Cancer Treat Rev*, 2004;30(2):173-80.
- 7) Polge C, Smith AU, Parkes AS : Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*, 1949;164(4172):666.
- 8) Bunge RG, Sherman JK : Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature*, 1953;172(4382):767-8.
- 9) Avarbock MR, Brinster CJ, Brinster RL : Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nat Med*, 1996;2(6):693-6.
- 10) Brook PF, Radford JA, Shalet SM, et al : Isolation of germ cells

from human testicular tissue for low temperature storage and autotransplantation. *Fertil Steril*, 2001;75(2):269-74.

- 11) Keros V, Rosenlund B, Hulténby K, et al : Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod*, 2005;20(6):1676-87.
- 12) Kvist K, Thorup J, Byskov AG, et al : Cryopreservation of intact testicular tissue from boys with cryptorchidism. *Hum Reprod*, 2006;21(2):484-91.
- 13) Wyns C, Curaba M, Martinez-Madrid B, et al : Spermatogonial survival after cryopreservation and short-term orthotopic immature human cryptorchid testicular tissue grafting to immunodeficient mice. *Hum Reprod*, 2007;22(6):1603-11.
- 14) Ong CW, Nakagawa T, Noguchi S, et al : Super-Microsurgery for vascularized ovarian transplantation and cryopreservation. *ACSC*, 2009;1(1):30-3.
- 15) Mihara M, Nakagawa T, Noguchi S, et al : MRI, Magnetic resonance influenced, organ freezing method under magnetic field. *ACSC*, 2009;1(1):34-7.

●参考Website

- ・がんの子供を守る会
<http://www.ccaj-found.or.jp/>
- ・日本小児血液学会
<http://www.jsph.info/>
- ・東京大学学術連携研究会
<http://gakujutu.umin.jp/>