

Title	精子の凍結保存 : とくに悪性腫瘍治療前の凍結保存について
Author(s)	石川, 博通; 岡崎, 雅子
Journal	歯科学報, 107(5): 505-512
URL	http://hdl.handle.net/10130/113
Right	

精子の凍結保存 - とくに悪性腫瘍治療前の凍結保存について

石川博通¹⁾ 岡崎雅子²⁾

はじめに

少子化が急速に進行する現在では生殖補助技術 (ART) を駆使した不妊治療は社会的に有用な医療のひとつとなってきた。それに伴い ART に関する医学も大きく進歩し、同時に多くの技術が開発された。これらの中で精子の凍結保存は必須の手段であるとともに治療成績を決定する重要な因子となった。

本稿では精子の凍結保存に関して、細胞凍結とその傷害、精子凍結保存の歴史、精子凍結保存の実際および精子凍結保存の臨床応用の順で述べ、最後に悪性腫瘍治療前の精子凍結保存について当院リプロダクションセンターでの実績を中心にその詳細を解説する。

細胞凍結とその傷害¹⁻³⁾

1) 傷害の発生機序

細胞外に水溶液がある状態で冷却されると、まず細胞外凍結がおきる。細胞外に氷晶ができ、細胞の原形質膜は水は透過しても氷は透しにくいために細胞は脱水状態となり収縮する。さらに細胞の過冷却が進むと細胞内凍結が起こり、細胞内に氷晶が形成される。これによって細胞内微細構造が破壊され、形態変化、細胞分裂能および各種機能低下が起こる。

2) 冷却速度

冷却速度が速いと細胞内脱水が起こりにくく、水

分が多く残り細胞内氷晶形成により細胞内凍結が起こりやすくなる。また冷却速度が遅いと細胞外凍結が起こりやすく、細胞内外の溶液が濃縮して細胞は脱水収縮される。すなわち冷却速度が速すぎても、遅すぎても細胞の生存率を低下させるためそれぞれの細胞において至適冷却速度を見出すことが凍結保存を行う上で重要である。

3) 細胞による傷害性の相違

前述のごとく細胞傷害には細胞内凍結の方がより大きく影響する。このため細胞内凍結を起こしにくい小型で、水に対する透過性の高い細胞で凍結後生存率が高くなる。このため形成過程で細胞質が濃縮して小型化した精子は、他の細胞に比べより凍結保存に適した細胞であるといえる。

4) 細胞傷害の防御

細胞の凍害を防止するために凍結保護剤が用いられる。これには細胞膜透過型と非透過型とがある。前者は溶液の氷点を下げて氷晶形成を減らし、細胞内外の塩濃度の濃縮を抑え、細胞内凍結を抑制する。このような利点がある一方溶解時保護剤を取り除く際これらの膜透過速度が水に比べて遅いため水が急激に流入して細胞浮腫を起こすという欠点がある。グリコ-ル、ショ糖、アミド類などがこれに属す。後者は氷点を降下させ細胞外の塩濃度の上昇を抑制して、細胞膜を安定化する。欠点は組織浸透性が極めて低いことである。この代表がポリビニルピロリドン (PVP) である。精子は前述のごとく細胞

キーワード：精子、凍結保存、悪性腫瘍

¹⁾東京歯科大学市川総合病院泌尿器科

²⁾東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンター (2007年8月23日受付)

(2007年9月3日受理)

印刷請求先：〒272 8513 市川市菅野5-11-13

東京歯科大学市川総合病院泌尿器科 石川博通

Hiromichi ISHIKAWA¹⁾ and Masako OKAZAKI²⁾: Cryopreservation of sperm-Clinical application for patients with malignancy (Department of Urology¹⁾ and Reproduction Center²⁾, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College)

質が濃縮しているため凍害を受けにくい細胞であるが、凍結保護剤としては現在グリセリンおよび卵黄が用いられる。前者は細胞内に浸透して細胞内氷晶形成を抑制し、後者は細胞表面を被覆して細胞膜の傷害を軽減すると考えられている。

精子凍結保存の歴史

ヒト精子は凍結という観点でみられた最初の細胞である。それは1776年のイタリアの Lazaro Spallanzani による [精子を雪の中に入れて動きがなくなる] という記載から始まる⁴⁾。1866年には Mantegazza が氷点下の環境で精子を観察するとともに精子バンクの必要性について言及している。その後 Jahne(1938) が -269 での生存, -79 での凍結保存を確認し, Shettles(1940) は融解に成功した。精子バンクといえるものは Polge ら(1949) の偶然に発見されたグリセリンを保護剤として用いた牛精子の凍結保存が最初である⁵⁾。また1952年には Polge らはこの方法で凍結した精子を融解して、人工授精を行った⁶⁾。

1953年には Sherman らがグリセリンおよ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。これについて本邦でも1958年に凍結保存精液を用いた非配偶者間人工授精(AID)により児が得られた。さらに1976年には Sherman が世界での凍結精子を用いた人工授精による1500の出産例について報告している⁵⁾。

精子凍結保存の実際

細胞凍結時の傷害に関しては前述したが、融解時の昇温過程でもいったん融解した氷晶の再結晶や細胞内への水の流入などにより細胞は傷害され生存率が低下する。

培養細胞などでは融解後の生存率が低くても分裂増殖により細胞数を回復できる可能性はあるが、分裂能のない精子ではより高い蘇生率を要求されることとなる。このことを念頭に入れ以下のような手順で精子の凍結保存および融解を行う。

1) 精子の洗浄濃縮

抗生物質を添加した精子培養液(20mMHepes緩衝化Hanks液-pH7.4)で精液を希釈した後等張化99%Percoll液を用いた撈拌密度勾配法で精子を洗

表1 KS- 精子保存液

溶液 A		精子保存液	
Hepes	4.77 g	卵黄	50 ml
NaCl	6.42 g	セファロチン	0.005 g
KCl	0.35 g	ホスミシン	0.001 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.295 g	プルロニックF68	1.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075 g	グリセリン	120 ml
NaHCO ₃	2.10 g	ショ糖	68.0 g
グルコース	0.50 g		
乳酸 Na (98%)	1.73 ml		
ビルビン酸 (99%)	0.02 ml		
純水	1000ml		

溶液Aで1000mlとし、遠心分離上清を濾過滅菌後凍結保存

浄濃縮する^{7,8)}。

2) 精子凍結保存液の添加

精子を洗浄濃縮した後凍結保存液を等量添加する。凍結保存液としてKS- (表1)を用いる。これには凍結保護物質としてグリセリン, ショ糖, 卵黄水可溶性分画さらに界面活性剤プルロニック F-68 (ethyleneoxide-propyleneoxide copolymer, 旭電化工業)が含まれている。すなわちグリセリン, ショ糖には脱水および細胞内氷晶形成を抑制する作用があり, 卵黄には機序の不明な点も多いが細胞表面を被覆する作用があるとされている。またプルロニック F-68は卵黄の可溶化を促進してその作用を増強すると考えられている^{3,9)}。

3) 精子凍結法

最近まで行われてきた凍結法には 液体窒素直接浸漬法, プログラムフリーザー法, ドライアイス錠剤化法, 液体窒素蒸気法がある¹⁰⁻¹²⁾。は精子の蘇生率が悪く, は精子に用いるには凍結速度が遅く, 高価なため両法ともあまり行われなくなった。は簡便なため動物の精子凍結には頻用されるが, 検体の個別化が困難なため, 臨床でのヒト精子凍結にはほとんど利用されていない。この結果精子蘇生率がよく, 精子個別化が容易で, かつ安価な液体窒素蒸気法が多く用いられるようになった。当院でもこの方法で凍結を行ってきたが, 可変型二重腔容器(図1)の開発に伴い, これの外容器と内容器の間の空気が急激な凍結を緩和して高い精子蘇生率が保障されるため, より簡便な液体窒素直接浸漬法を再び用いるようになった。

4) 精子融解法

精子は最も傷害の少ないと考えられる微温湯中で

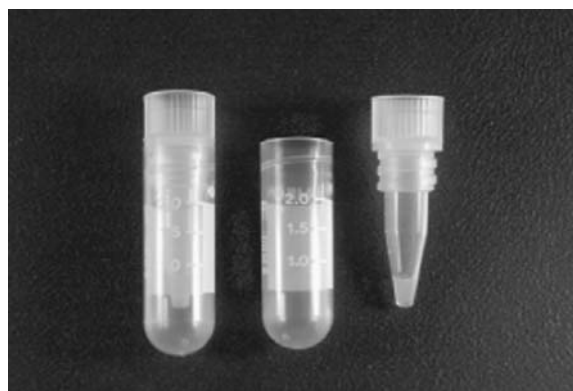


図1 可変型二重腔容器

振盪，融解する。融解後ただちに Hanks 液で緩徐に希釈して攪拌密度勾配法により，凍結保存液を除去する。

精子凍結保存の臨床応用

1) 精液所見不良例での備蓄

乏精子症もしくは精子無力症例で人工授精，体外受精の際に質のよい精子が必要数得られないと思われるときに，何回かに分けて洗浄濃縮により運動性および形態良好な精子を蓄えておく。

2) 精巣精子採取術での備蓄

非閉塞性無精子症例および閉塞性無精子症で精路再建が不可能な症例では精巣組織を採取し，その中精子をとりだして備蓄する。

3) 逆行性射精症例での備蓄

逆行性射精症例では膀胱内に精子が射出される。

それを回収して洗浄濃縮後凍結保存する。

4) 非配偶者間人工授精(AID)に使用する精子の備蓄および感染症対策

AID に使用するため提供者の精子を備蓄する。また感染症対策として精子凍結後一定期間において提供者の感染症検査を行い，検査陰性者の精子のみを使用する。

5) 悪性腫瘍治療前の凍結保存

若年男子に好発する精巣腫瘍，白血病，悪性リンパ腫などの多くは積極的治療で根治が望めるようになった。このため治療後の QOL を考慮することがより必要となり，とりわけ妊よう性の維持は最も重要な課題のひとつとなった。一方悪性腫瘍根治のためには精子形成機能を犠牲にせざるを得ないため，強力な治療を行う前の精子凍結保存が現状では妊よう性を保つ，すなわち治療後に児をえるための唯一の方法である。このような観点に立ち東京歯科大学市川総合病院リプロダクションセンターでは2002年9月より治療前精子凍結保存を開始した¹³⁾。

1. 倫理的事項

日本不妊学会(現日本生殖医学会)(表 2)および日本癌治療学会(表 3)の精子もしくは配偶子の凍結保存に関する見解に従って，腫瘍専門医および生殖医療専門医が腫瘍の治療と精子形成機能低下の関係，保存方法，保存期間，凍結精子を用いた生殖補助医療の実際，費用などについて十分な説明をすること。実施にあたって施設内倫理委員会の承認を

表 2 「医学的介入により造精機能低下の可能性のある男性の精子の凍結保存」に関する日本不妊学会の見解(抜粋2003 . 9 . 30)

1. 悪性腫瘍の治療などによって造精機能の低下をきたす可能性のある場合には、精子を凍結保存することができる。
2. 希望者が成人の場合には本人の同意に基づいて、また未成年者の場合には本人および親権者の同意を得て、凍結保存を実施することができる。
3. 実施にあたっては、以下の事項について口頭および文書にて十分に説明し、インフォームドコンセントを得ること。
4. 凍結精子は本人から廃棄の意志が表明されるか、あるいは本人が死亡した場合、直ちに廃棄する。廃棄する凍結精子は研究目的には使用しない。
5. 本人および親権者は、凍結精子を第3者に提供することはできない。

表3 悪性腫瘍治療前患者の配偶子凍結保存に関する倫理委員会の見解(癌治療学会 - 概略2004.10)

1. 配偶子凍結保存にあたっては、腫瘍専門医は生殖医療専門医に必要な十分な情報を提供すべきである
2. 配偶子凍結保存の実施にあたっては事前に実施施設内倫理委員会の承認を得たインフォームドコンセントを作成し、十分な説明の上で同意を得ることを周知させるべきである
3. 卵子の凍結保存技術は未だ開発の途上にあり、安全性が確立されるまでは「臨床研究」に留めるべきである
4. 配偶子の凍結保存期間の設定、期間延長、患者の死亡時の取り扱いなどについては、今後関連学会と連携を取りながら十分な検討が必要である
5. 凍結保存された配偶子は売買の対象とされるべきではない

表4

同意書

私はこの度貴院において精子の凍結保存を実施していただきたくお願い致します。なお、下記の事項に付き説明を受け理解し同意致します。

平成 年 月 日
住所
氏名 印
凍結期間 平成 年 月 日 ~ 平成 年 月 日
東京歯科大学市川総合病院院長殿

記

1. 凍結期間は私の生存中であることとし、私が死亡した場合または私との意志疎通ができなくなった場合には凍結を中止することに同意いたします。
2. 住所または居所を変更した場合には、必ず貴院のリプロダクションセンターに連絡いたします。
3. 凍結開始時に本書をもって1年間の契約を結び、1年ごとに契約を更新することに同意いたします。
4. 契約期間を過ぎて3ヶ月間私の方から貴院のリプロダクションセンターに連絡をしなかった場合には、自動的に凍結を中止することに同意いたします。また私の方から中止を希望する場合には、リプロダクションセンターより説明を受け、同意書を提出いたします。
5. 凍結保存料金を1年間以上滞納した場合には、凍結が中止されることに同意いたします。
6. 貴院が私に関する秘密を厳守することを条件に、匿名で学術研究のために私の資料が使われることに同意します。
7. 災害等やむを得ない事情により凍結保存中の精子が使用不可能になった場合には、貴院の責任を問わないことに予め同意します。

得たインフォームドコンセント(実際には2002年7月9日に東京歯科大学倫理委員会で承認された)を作成し十分な説明の上で同意をとること。患者死亡時の取り扱いを充分検討すること。精子を売買の対象にしないことなどを念頭に入れ同意書(表4)を作成した。その内容の骨子は凍結は本人の生存中に限る。1年ごとに契約を更新する。契約期間を過ぎて3ヶ月連絡しないか、凍結料金を1年以上滞納した場合は凍結を中止する。匿名で学術研究のために個人の資料が使用されることに同意する。やむを得ない事情で凍結精子が使用不能に

なった場合は責任を問わないなどである。しかし2006年9月に日本生殖学会から新しいガイドライン案(表5)が出されたため、改めて保存責任、費用負担に関して検討し、同意書に盛り込む予定である。

2. 患者背景

2002年9月から2007年3月までの4年6ヶ月間に治療前精子凍結目的で来院した患者は225例であった。

初診時年齢

年齢は最低16歳で最高60歳であった。年齢分布

表 5

「精子の凍結保存について」ガイドライン案
(日本生殖医療学会 2006.9.)

1. 精子凍結保存する施設は精子凍結保存依頼者に対して、文書及び口頭で、凍結保存精子を用いて生殖補助医療を実施する際のリスクや問題点を含む留意すべき点について十分な説明を行い、文書により同意を得た上で、精子を凍結保存する。
2. 精子の凍結期間に関して
精子を凍結保存期間は精子の由来する本人が生存している期間とする。また、定期的に凍結継続の意思確認と本人生存の確認をとることを奨励する。
3. 保存責任について
凍結保存していた精子が天災など予期せぬ事情(地震、火災、液体窒素の不足など)により使用不可能になった場合、依頼者がそれまでに支払った精子保管料程度を弁済すること(それ以上の責任は問わないこと)を明文化するよう奨励する。
4. 費用負担について
前項に関連し精子の凍結保存の費用に関しては有償であることを奨励する。

表 6 初診時年齢

年齢	症例数(例)	割合(%)
～19	10	4.4
20～29	94	41.8
30～39	98	43.6
40～49	15	6.7
50～	8	3.5
合計	225	100.0

表 7 結婚状況

年齢	未婚	既婚	計
～19	10	0	10
20～29	75	19	94
30～39	69	29	98
40～49	6	9	15
50～	5	3	8
合計	165(73.3%)	60(26.7%)	225(100.0%)

表 8 原疾患

原疾患	症例数	割合(%)
精巣腫瘍	92	40.9
白血病	55	24.4
悪性リンパ腫	27	12.0
骨髄異形成症候群	11	4.9
前立腺癌	7	3.1
再生不良性貧血	7	3.1
直腸癌	4	1.8
多発性骨髄腫	3	1.3
咽頭癌	2	0.9
膀胱癌	2	0.9
その他	15	6.7
合計	225	100.0

では30歳代が最も多く98例(43.6%)であり、20歳代の94例(41.8%)がそれに続いた(表6)。

結婚状況

225例中既婚者は60例(26.7%)であった。また20歳代および30歳代は70%以上が独身であった(表7)。

原疾患

原疾患は精巣腫瘍が92例(40.9%)と最も多く、白血病(55例 - 24.4%)悪性リンパ腫(27例 - 12.0%)、骨髄異形成症候群(11例 - 4.9%)がそれに次いで多かった(表8)。

前治療の有無

来院前に悪性腫瘍に対する何らかの治療を行ったものが65例(28.9%)であった。主な原疾患でその内訳をみると、精巣腫瘍が4例(1.8%)、白血

表9 前治療の有無

原疾患	未治療	既治療	計
精巣腫瘍	88	4(1.8%)	92
白血病	14	41(18.2%)	55
悪性リンパ腫	19	8(3.6%)	27
骨髄異形成症候群	8	3(1.3%)	11
その他	31	9(4.0%)	40
合計	160	65(28.9%)	225

表10 凍結の可否

原疾患	凍結可	凍結不可	計
精巣腫瘍	82	10(4.4%)	92
白血病	42	13(5.8%)	55
悪性リンパ腫	20	7(3.1%)	27
骨髄異形成症候群	10	1(0.4%)	11
その他	38	2(0.9%)	40
合計	192	33(14.6%)	225

病が41例(18.2%)悪性リンパ腫が8例(3.6%)、骨髄異形成症候群が3例(1.3%)であった(表9)。凍結の可否

225例中凍結不可症例は33例(14.6%)であった。主な原疾患でその内訳をみると、精巣腫瘍が10例(4.4%)、白血病が13例(5.8%)悪性リンパ腫が8例(3.1%)、骨髄異形成症候群が1例(0.4%)であった(表10)。

主な疾患の精液所見

主な疾患の精液所見を比較すると、精子濃度では未治療群において精巣腫瘍が白血病および悪性リンパ腫に比べ、有意に低値を示した。精子運動率は白血病の未治療群が既治療群に比べ、有意に高かった(図2)。

3. ART(生殖援助技術)の実施

リプロダクションセンター開設前の精子凍結保存例を含めて、8例の妻に計9回(顕微授精-5回、人工授精-4回)のART実施した。このうち3カップルで妊娠が成立し、5児を得た(症例1および4では2児)(表11)。

4. 問題点

既治療例が多かったこと

全体の28.9%(65例)が原疾患治療後に来院し、これらのうち20例は凍結不可(凍結不可例の30.8

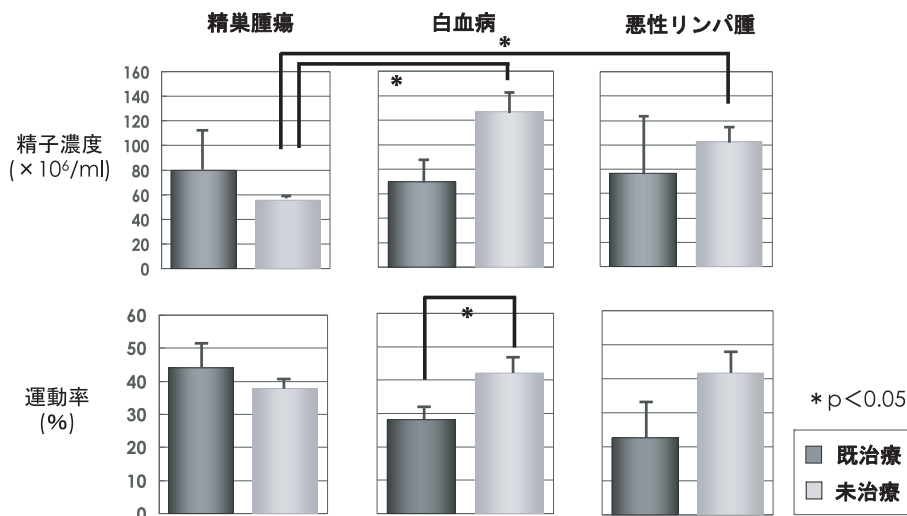


図2 主な疾患の精液所見

表11 ARTの実施

NO.	原疾患	凍結時期	年齢	結婚	ARTの種類	施行時期	転帰
1	骨髄異形成症候群	1994.8	24	既婚	顕微授精	1999.7 1999.10 2000.5 2003.10	妊娠 妊娠
2	悪性リンパ腫	1996.9	21	未婚	顕微授精	2004.9 2005.8	
3	悪性リンパ腫	2003.10	30	既婚	人工授精 顕微授精	2005.9 2006.1	
4	精巣腫瘍	2004.1	33	既婚	顕微授精	2004.10 2007.1	妊娠 妊娠
5	精巣腫瘍	2004.3	34	既婚	人工授精	2006.4 2007.1	妊娠
6	骨髄異形成症候群	1996.2	22	未婚	人工授精	2006.9 2007.1	
7	停留精巣	2003.8	38	未婚	顕微授精	2006.8	
8	直腸癌	2004.12	42	既婚	人工授精	2006.12	

%)であった。また凍結可能であった45例でも精液所見不良の傾向にあった。既治療例の68.3%が白血病患者であり、当然のことながら生命予後を重視した速やかな治療を行う必要があったとも考えられるが、他の疾患も含めて診断時に治療前の精子凍結保存について説明されていない例も存在した。このため治療前精子凍結保存を組織的に行っている施設が極めて少ないという現状では、われわれが腫瘍専門医もしくは患者に対して積極的に啓蒙活動をすることが重要であると思われる。

未婚者が多かったこと

全体の73.3%(165例)が未婚であり、ART実施率は既婚者で60例中6例(10.0%)であるのに対して、未婚者では165例中2例(1.2%)と極めて低かった。これは精子凍結保存が生殖可能年齢に対する治療であるため、当然の結果ともいえるが、大きな問題である。すなわち悪性腫瘍患者のQOLを第一義的に考えた場合精子凍結保存は重要なことであるが、本人が結婚相手を求める際、原疾患のこと、精子を保存していることを告げなければならないので大きな障害となることは間違いない。またパートナーが承諾したとしてもその精神的ならび身体的負担は少ないとは言えない。一部には精子凍結保存は既婚者のみを対象にしたほ

うがよいという意見もあるが、本人のQOLを重視すればそうとも言い切れない難しい課題である。

未成年者が契約したこと

未成年者10例が契約した。説明書には、本人の意思で精子凍結保存を行うと言う意味から契約者は成人が望ましいと記載しているが、未成年の希望者も多く、また人権を考慮すれば契約は避けることはできない。しかし実際に話をすると、ほとんどの契約が両親の意向で行われているため、成人後に本人の意思を明確にしてもらった上で再契約することが重要と思われる。

高齢者が契約したこと

生殖医療の対象としては高齢と考えられる50歳以上の8例が契約し、そのうち3例は未婚であった。未婚者および未成年者の場合と同じようにQOLを考慮すれば必要なことと言えるが、とくに未婚の3例については、ARTと言う観念からすると全く無意味と思われるので、契約しないよう説得したが強い希望で契約せざるを得なかった。今後ART以外の目的での精子凍結保存も検討するつもりである。

契約者死後の精子の取り扱い

契約者の死後、2例の妻が夫の精子を使用してのARTを希望した。契約に凍結保存は本人の生存中に限ると言う項があるため、説得して精子の

凍結保存を中止した。一方最近行われた裁判では当事者の死後凍結精子を用いて誕生した児がその子と認知されなかった。これらのことから現時点では次世代(生まれてくる子)の人権を尊重する意味で契約者死後の精子はARTに供すべきではないことは明らかであるが、社会の混乱を避ける意味で速やかな法制化が望まれるところである。

本論文の要旨は、第283回東京歯科大学学会(2007年6月2日、千葉)において、特別講演したものである。

文献

- 1) 朝比奈英三: 生物細胞の凍結 酒井 昭編 凍結保存 動物・植物・微生物, 朝倉書店, 東京, p3, 1987.
- 2) 高橋恒夫: 動物細胞の凍結傷害と凍害防御剤の作用機序 酒井 昭編 凍結保存 動物・植物・微生物, 朝倉書店, 東京, p15, 1987.
- 3) 入谷 明: 動物精液の凍結保存 酒井 昭編 凍結保存 動物・植物・微生物, 朝倉書店, 東京, p131, 1987.
- 4) Anger JT, Gilbert BR, Goldstinn M: Cryopreservation of sperm: Indication, methods and results. J Urol 170: 1079, 2003.
- 5) Sherman JK: Cryopreservation of human semen in C-RC Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility. Keel BA, Webster BW, eds., CRC Press, Boca Raton p.229, 1990.
- 6) Polge C, Rowson LEA: Fertilizing capacity of bull spermatozoa after freezing at -79. Nature Lond 169: 626, 1952.
- 7) 真田利男: 攪拌密度勾配法による精子洗浄濃縮 とくに配偶者間人工授精への応用, 慶應医学, 66: 341, 1989.
- 8) 小林俊文, 兼子 智, 他: 洗浄濃縮精子の凍結保存に関する研究, 日不妊誌, 33: 639, 1988.
- 9) 栢田博司: 精子の凍結保存 森澤正昭, 星 元紀編 精子学, 東京出版会, 東京, p224, 1992.
- 10) 翁 文開: 洗浄濃縮精子の凍結保存に関する研究 特に非配偶者間人工授精への応用, 慶應医学, 66: 679, 1989.
- 11) 李顕金光: 錠剤化凍結法によるヒト精子凍結保存に関する研究 特に配偶者間人工授精(AIH)への応用, 慶應医学, 66: 845, 1989.
- 12) Devroey P, Silber S, Nagy Z et al: Ongoing pregnancies and birth after intracytoplasmic sperm injection with frozen-thawed epididymal sperm. Human Repro 10: 903, 1995.
- 13) 石川博通: 悪性腫瘍治療前の精子凍結保存, 第283回東京歯科大学学会プログラム, 1p, 2007.