

57. Platts AE, Dix DJ, Chemes HE, Thompson KE, Goodrich R, Rockett JC, et al. Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. *Hum Mol Genet* 2007;16:763–73.
58. Linschooten JO, Van Schooten FJ, Baumgartner A, Cemeli E, Van Delft J, Anderson D, et al. Use of spermatozoal mRNA profiles to study gene-environment interactions in human germ cells. *Mutat Res* 2009;667:70–6.
59. Nguyen MT, Delaney DP, Kolon TF. Gene expression alterations in cryptorchid males using spermatozoal microarray analysis. *Fertil Steril* 2009;92:182–7.
60. Garcia-Herrero S, Garrido N, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Meseguer M. Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. *Reprod Biomed Online* 2011;22:25–36.
61. Gye MC, Kim ST. Expression of cathepsin L in human testis under diverse infertility conditions. *Arch Androl* 2004;50:187–91.
62. Wright WW, Smith L, Kerr C, Charron M. Mice that express enzymatically inactive cathepsin L exhibit abnormal spermatogenesis. *Biol Reprod* 2003;68:680–7.
63. Kusakabe T, Nakajima K, Suzuki K, Nakazato K, Takada H, Satoh T, et al. The changes of heavy metal and metallothionein distribution in testis induced by cadmium exposure. *Biometals* 2008;21:71–81.

特集 社会医学的ハイリスク妊娠とその対策

不妊治療後の妊娠とその予後

Perinatal outcome and long-term prognosis of ART children

久慈 直昭*
KUJI Naohi

井上 治
INOUE Osamu

福永 朝子
FUKUNAGA Tomoko

菅原 かな
SUGAWARA Kana

小川 誠司
OGAWA Seiji

奥村 典子
OKUMURA Noriko

内田 明花
UCHIDA Akika

山田 満稔
YAMADA Michitoshi

佐藤 卓
SATO Suguru

浜谷 敏生
HAMAYA Toshio

吉村 泰典**
YOSHIMURA Yasunori

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 *講師 **教授

ART 由来妊娠は、単胎であっても早産・低出生体重児が多い、ART 由来出生児では、自然妊娠由来児に比べて先天異常罹患率が1.4倍、小児・青年期の癌発生率も1.4倍、脳性麻痺となる危険性が2倍程度高いが、これらのリスクはすべて多胎・不妊、あるいは早産といった因子により、ART 技術そのものが児の罹患率を増加させるという報告はない。一方、インプリンティング異常は、これまでの大規模調査では ART 由来出生児で発生率が増加するという報告はなく、認知発達に関してもこれまでの報告では自然妊娠と差がないというものが多い。

Key Words

生殖補助医療(ART)、先天奇形、認知発達

■ はじめに

体外受精・顕微授精技術によって生まれた子ども(以下、ART 由来出生児)の予後が、この10年ほど全世界で精力的に解析されている。わが国で出生の2%、北欧諸国では全出生の3~4%を占めるようになった生殖補助技術(以下 ART)の安全性が、地球規模で人々の関心事となっているためである。

ART 由来出生児の予後は、20世紀末まで言われてきた「自然妊娠・分娩の場合と比較してほとんど変わらない」という表現から、現在では「不妊夫婦という特殊な集団に、卵巣刺激・体外受精/体外培養といった非生理的な技術を用いる以上、理論的に risk は存在することが考えられ、また統計上有意に異常発生率が高い。しかし、実施してはならないほどの危険性はなく、異常発生率が

多くなるのは卵巣刺激・体外受精/体外培養といった技術以外の、不妊や多胎という因子によるところが大きい」という、より妥当な論調に変化しつつある。

本項では第一に、21世紀に入って急速に蓄積されてきた ART 由来妊娠の周産期予後や出生児の先天異常についての知見を紹介し、ART 由来出生児でわずかだが有意に自然妊娠より高い異常発生率に関与する因子、集積する異常の種類について概説する。第二に、現在 ART 由来出生児で罹患率が高くなる可能性があると考えられている異常として、インプリンティング異常と認知発達障害の2つについて、危険性が高いと考えられている理由と、研究の現状を解説する。

■ ART 妊娠や出生児には周産期異常・先天異常が多いのか？

この疑問は、体外受精児が世界中で生まれ始め

た1980年代から継続して問われ続けられてきたが、2000年頃まで信頼性のある報告はなかった。その第一の原因は、体外受精で生まれる子どもの数が比較的少なかったため、低頻度で発生する児の異常について母集団との有意差検定が出来なかったためである。第二に、前述のように2000年までの多くの報告が主に単一医療機関で生まれた子どもをボランティアベースで聞き取り・アンケート調査したものであったために、医療機関を受診する患者の偏りや、調査に参加するかどうかといった交絡因子(たとえば重度の障害を抱えた子どもの親は調査への参加を断り、逆に健常児を得ることが出来た親は感謝の気持ちから調査へ積極的に参加する傾向がある、など)を排除できなかったことが原因であった。

しかし、21世紀に入り、体外受精の総数が増加するとともに妊娠率が上昇し、結果的に生まれる子どもの数がある程度数になったことによって、とくに北欧など、国民がうけたすべての医療記録を統計解析できる国から、ARTの周産期異常、あるいは出生児の先天異常についての知見が次々に報告されている。

1. ARTによって成立した妊娠(以下、ART由来妊娠)の周産期予後

ART由来妊娠に早産・低出生体重児が多く、また周産期死亡率が高いことは以前よりいわれていたが、当初、この原因はARTで頻発していた多胎によるという意見が大勢であった。しかし次第に、単胎妊娠だけを比較しても、やはりART由来妊娠は自然妊娠よりこれらの周産期リスクが高いことがさまざまな報告から明らかになった^{1)~4)}。次に起こってくる疑問は、このリスク上昇が母親集団自体の違いによるのか、あるいは同じ母親でもARTを利用して子どもをつくった場合にリスクが高くなるのかというものである。

2008年のノルウェーのpopulation-based studyでは⁵⁾、ARTによって単胎出産した8,229人、自然妊娠により単胎出産に至った1,200,922人を比較するのに加え、単胎自然妊娠・分娩と単胎

ART妊娠・分娩を両方経験している母親2,546人(56%がART由来妊娠の後で自然妊娠、44%では自然妊娠が先行)からの子どもについて周産期異常の多寡を解析している。いうまでもなく、後者については、両親の遺伝的素因を排除するために比較を行っているわけである。その結果、母体年齢や在胎週数、経産回数、出生児の性別、出生年、前回出産から今回出産までの期間などを補正しても、ART由来児は自然妊娠由来児に比較して出生体重が小さいとともに在胎期間が短く、低出生体重児(在胎週数に相当する体重の-2.0 SD以下)となる危険性が1.26倍と有意に高かった。しかしながら、自然妊娠とART由来妊娠の両方を経験している母親から生まれた子の中だけで、ART由来出生児と自然妊娠由来出生児を比較すると、前述と同様の補正をした後ではART由来出生児と自然妊娠由来児には出生体重、在胎期間、低出生体重児発生危険率ともに有意差はなく、周産期死亡率はむしろART由来児で低いという結果が得られたという(なお、出生順位によってはこの結果は影響されていないという)。この結果から、彼らはART由来出生児と自然妊娠由来児で見られた周産期異常発生率の差は、ART技術そのものではなく親が不妊であるという事実、あるいは不妊となった機序に関係しており、生殖補助治療技術そのものには関係がないと考えられると結論している。なお、この報告中では、体外受精とICSI、凍結胚移植利用の有無によって周産期異常の発生率に差は見られていない。

2. 先天異常

2005年にKällénらは、スウェーデンのpopulation-based studyにより、1982年から2001年に生まれたART由来出生児16,280人をART以外で生まれた出生児と比較した。ART由来出生児では、先天奇形罹患率が1.42倍と有意に高くなるが、母体年齢・経産回数・多胎・不妊の有無などの交絡因子の影響を除外すると有意差がなくなってしまうことを報告している⁶⁾(表1)。この報告では、体外受精では先天奇形発生率(神経管

表1 IVF 由来出生児と全出生児における先天異常発生率の比較

(調整項目)	全症例		大奇形のみ	
	OR	95%CI	OR	95%CI
出生年	1.42	1.32-1.52	1.52	1.29-1.66
出生年・母体年齢	1.40	1.30-1.60	1.48	1.30-1.62
出生年・経産回数	1.39	1.29-1.49	1.50	1.28-1.64
出生年・母体年齢・経産回数	1.33	1.24-1.43	1.44	1.32-1.57
出生年・母胎	1.30	1.20-1.41	1.39	1.26-1.53
出生年・多胎	0.92	0.91-1.15	0.98	0.76-1.21
出生年・多胎・不妊期間	1.05	0.95-1.18	1.12	0.99-1.28
出生年・多胎・母体の喫煙	1.04	0.90-1.16	1.12	0.98-1.27
出生年・多胎・母胎	1.07	0.95-1.21	1.11	0.98-1.29
出生年・多胎	0.86	0.70-1.06	0.94	0.73-1.19

(Källén B et al, 2005⁹⁾ より改変)

表2 観察された先天奇形とその危険率(染色体異常56例を除く)

奇形	ART 由来児			
	観察値	期待値	OR	95%CI
神経管欠損	25	7.4	4.8	3.3-8.0
無脳児	5	0.6	7.8	2.5-7.7
二分脊椎	20	4.1	5.1	3.4-7.8
脳ヘルニア	0	0.7	0.0	0.0-5.8
神経管欠損以外の水頭症	13	7.5	1.7	1.0-3.0
口唇口蓋裂	68	28.5	2.4	1.9-3.1
心大血管奇形(動脈管閉鎖、第一臍動脈を除く)	262	51.7	1.7	1.5-2.0
重度心大血管奇形	50	24.2	2.1	1.5-2.8
孤発性のVSD、ASD	156	51.1	2.8	2.2-3.4
後鼻孔閉鎖	7	1.5	4.6	1.9-9.5
消化管閉鎖	58	28.8	1.9	1.5-2.5
食道閉鎖	8	4.7	1.0	0.6-6.3
小腸閉鎖	19	3.3	6.4	4.2-9.6
鎖肛	23	5.2	4.7	3.2-6.9
腹壁破裂	3	4.8	0.8	0.9-3.6
小頭症	10	10.3	1.0	0.9-2.5
四肢欠損	10	1.9	5.3	3.0-25.1
尿道下裂	75	42.5	1.7	1.4-2.1

(Källén B et al, 2005⁹⁾ より改変)

欠損、消化管閉鎖、心大血管奇形、尿道下裂などが特に多い)が高いものの(表2)、その差は年齢や不妊といった親の条件によるものであり、またIVFとICSI・卵巣刺激の有無・凍結保存といった体外受精手技によって先天奇形発生率は変わらないとしている。同じグループは、これに続く2001～2006年にスウェーデンで出生したART出生児(15,570人)を、同時期に出生した全出生児(689,157人)と比較して前述の解析と比較しているが、やはりARTによって先天奇形の発生率は高くなり、心大血管奇形、少指症、神経管欠損、

心房心室中隔欠損、食道閉鎖などの発生率が高くなることを報告している¹⁾。

3. 小児癌発生率

同じくKällénらは2010年に、同様のスウェーデンのpopulation-based studyから、ART出生児では小児・青年期の癌発生リスクが全体としてやや高くなると報告している¹⁾。この解析では、1982～2005年にARTで生まれた26,692人の子どものうち2006年までに53人(0.2%)が癌を発生し、これはART以外で生まれた子どもの癌発

表3 小児期・青年期の癌発生に關与する新生児期の危険因子

	OR	95%CI
妊娠週数		
<32	1.21	0.95-1.58
<37	1.16	1.05-1.28
出生体重		
<1,500g	1.06	0.78-1.45
<2,500g	1.07	0.95-1.21
≥4,500g	1.21	1.07-1.38
子宮内発育		
SGA <2.0SD	0.91	0.77-1.08
LGA >2.0SD	1.34	1.21-1.47
呼吸不全	1.07	0.92-1.23
Apgar		
5分値7以下	1.33	1.08-1.63

(Källén B et al, 2010⁷⁾より改変)

生率の1.42倍(95% CI: 1.09-1.87)と有意に高い。この解析では、ARTをうけた母親の年齢、経産回数、喫煙の有無、不妊、流産既往、BMI、多胎などの因子と、出生児(ART由来、非ART由来の双方を含む)の癌発生に有意な相関は見られなかったが、高出生体重児(4,500g超)、早産児、あるいは酸素吸入を必要とするような胎児仮死あるいは低Apgarスコアは、癌発生リスク因子と考えられると報告している(表3)。さらにART由来児で特定の癌が集積する傾向は見られなかったが、histiocytosisという稀な異常のみが有意にART児で多い結果となったという。

■ゲノム インプリントング異常

ゲノムインプリントングとは、個体中のすべての細胞において、父親・母親から受け継いだ2つの対立遺伝子のうち片方だけが発現する遺伝様式をいう。通常、両親から受け継いだ1対の遺伝子は等価であり両方ともが発現するが、これらの遺伝子の発現様式はこの遺伝の原則に従わない。このような遺伝子はそれほど多くなく、現在までに約80種類が報告されているだけであるが⁹⁾、その多くが胎盤形成・発生に重要であり、その異常は先天性疾患や成人病、あるいは癌発症にも関わっているとされている。

ARTとインプリントング異常の関連が議論されだしたのは、動物胚の体外培養によって胚移植後に子宮内での過剰胎児発育が起こり、出生した産仔の死亡率・弛緩の罹患率が高くなる、いわゆるLarge Offspring syndrome(以下LOS)¹⁰⁾の病因解析の結果からである。LOSを起こした産仔ではゲノムインプリントング遺伝子であるIGF-2Rの発現低下と、この遺伝子の発現調節部位のメチル化消失が見られ¹¹⁾、このメチル化異常は動物における排卵誘発、あるいは体外培養に由来すると推測され、同様の操作を行うヒトのARTでもメチル化異常による刷り込み遺伝子関連疾患の発生頻度増加が懸念されたのである。

1. 配偶子発生・初期発生と刷り込み～人為的介入による刷り込み異常の発生機序

インプリントング異常がART治療のどの段階で起きるのかについては、さまざまな説があり現在までのところ明確ではない。

排卵誘発については、PMSGで過排卵処理したマウスと、処理をしていないマウスで、採取された卵子DNAのメチル化パターンに差があることが報告されている¹²⁾。この報告ではメチル化の差が本当に刷り込み部位に起こっているかどうかは検討されていないが、最近、佐藤らはヒトおよびマウス卵で、過排卵によってインプリントング遺伝子のメチル化異常が増加する可能性を報告している¹³⁾。

また、乏精子症患者の精子において刷り込みの異常が増加するという報告も見られる¹⁴⁾。Marquesらは、乏精子症患者や刷り込み異常をもつ男性の精子において、H19やMESTなどを支配する領域のDNAメチル化が変化していることを報告している¹⁵⁾。乏精子症患者での刷り込み遺伝子の異常による疾病が増加するかどうかは検討課題であるが、Silver-Russell症候群など、不妊を呈する疾患をARTで治療した際に、子どもに刷り込み異常が伝播するという報告もあり、その機序の説明としてもこの報告は重要である。

2. ARTで発生頻度が増加する可能性のあるインプリンティング異常による疾患

1) Beckwith - Wiedemann 症候群(BWS)

BWSは、過成長、巨舌、臍帯ヘルニアを三主徴とする症候群であり、そのほかに新生児期低血糖、耳垂の線状溝、腹腔内臓器腫大、腎奇形、片側肥大、口蓋裂などの症状を呈し、約10%の患児にWilms腫瘍、肝芽腫、横紋筋肉腫などの胎児性腫瘍が発生する。この疾患では新生児期に最も徴候が顕著で、成長とともに症状が軽快する。

BWSのほとんどは孤発例で、家族例は15%程度で常染色体優性遺伝形式をとり、その場合母由来の異常が子に受け継がれた時のみ発症する。その責任遺伝子座は11p15.5領域で、IGF2など成長関連遺伝子の過剰発現が原因と考えられている。BWSでも他のインプリンティング異常による疾患と同じく、染色体構造異常を含むさまざまな病因が存在するが、インプリンティングの異常による症例が3～5割に達するという¹⁰⁾。

生殖補助医療によって生まれた子において、この疾患の頻度が高くなるという報告がある¹⁷⁾。この報告では、米国での通常妊娠におけるBWS発生頻度は0.8%であるが、ARTの場合はその約6倍、4.6%と有意に高く、ARTで生まれたBWS患者では、7例中5例に母由来imprinting control centerであるKvDMR1のメチル化喪失、H19-DMRの高メチル化などの異常があり、ARTに関連する手技がimprinting control centerのメチル化に影響を及ぼすことが推測されるという。

2) Angelman 症候群(AS)

ASは、精神発達遅滞、てんかん、失調歩行、容易に引き起こされる笑いなどを主徴とする疾患である。責任遺伝子座は15番染色体15q11-q13の領域で、SNRPNやUBE3Aといった遺伝子が含まれる。

2002年、CoxらはICSIで生まれたAS2例を、またOrstavikらはやはりICSIで生まれた1例を報告し、いずれもSNRPN遺伝子のimprinting control centerが低メチル化となっており、インプリンティング異常であることを確認している。

3) 網膜芽細胞腫やその他の小児癌

網膜芽細胞腫では13番染色体q14にあるRB1遺伝子の変異が認められるが、この片側性症例の中にはインプリンティング異常による症例も認められる。Mollらは、体外受精で生まれた網膜芽細胞腫の5例を報告し、ARTでリスクが高くなる可能性を指摘している¹⁸⁾が、この著者自身の最近の報告も含め¹⁹⁾、リスクは変わらないという報告も多い。なお、いずれの報告でも、RB1遺伝子の詳しい解析はなされていない。

4) 成人病との関係

高血圧や糖尿病は、生活習慣以上に出生時体重の影響が大きく、出生時体重が低くて早くcatch upする場合に最も発症のリスクが高いといわれている。20年以上前、Barkerらは、成人病は胎児期にその原因を求めることができるという仮説を唱えたが、これをインプリンティング現象で説明するとすれば、胎児期に低栄養にさらされると、飢餓状態の胎内環境で生き抜くために胎児は細胞代謝応答系に関わる遺伝子をエピジェネティックに変化させ、この変化は出生後栄養状態が改善しても一生続くために、過剰栄養暴露により成人病を発症しやすくなる、というものである²⁰⁾。成人病発生については、ART出生児はこれからその年代に差し掛かるわけで、現在はデータがないが、これら生活習慣病を含めたART児の長期follow upは早晚必要になることが予想される。また、インプリンティング異常は細胞の癌化にも大きな関係があり、成人期の癌の発生については今後の調査が必要である。

3. ARTとゲノムインプリンティング異常に関する大規模調査の解析結果

2005年から2007年にかけて、デンマーク・イギリス・オランダにおいて、ARTが本当にインプリンティング異常を増加させるかどうかを検討する大規模調査が次々に行われた。デンマークでは1995年以降、2001年までのpopulation-based studyの結果、ART由来出生児6,052例と非ART出生児442,349例の4年間の長期予後調査を比較

して、BWS、ASなどの発症は1例もなく、ARTはインプリンティング疾患を増加させないと結論している²¹⁾。イギリスの報告では、登録された213例のBWS、384例のAS、522例のPWD、および38例の新生児一過性低血糖症例について、患者へARTを利用したかどうかについてのアンケート調査を行い、BWSとASについてはARTとの関連が考えられたが、他については関連が認められなかったという²²⁾。さらに、最新のオランダの報告では、BWS、AS、PWSなどについてイギリスの報告と同様、ARTを利用したかどうかを患者にアンケート調査し、不妊ということとこれらの疾患の発症が関連することが示唆された一方で、それを除いて考えると、これらインプリンティング異常疾患がART手技そのもので増加するという結論は導けないと述べている²³⁾。

このように大規模調査の結果からは、これまでのところヒトにおいて、ART手技によりインプリンティング異常が増加することを積極的に示唆する報告はない。しかし、これらの疾患はいずれも発生率が非常に低いため、症例がさらに加えられれば危険性が再確認されることもありうる。

■ 神経学的発達異常

早産児や低出生体重児の頻度が高いことが判明しているART由来出生児では、その影響として脳性麻痺や、自閉症、神経学的発達の異常が見られるかどうかに関心事となる。ただ、これらの神経学的な異常については、解剖学的な異常を呈する疾患と比べて診断が困難で、また診断確定までに時間がかかるなど、統計学的にリスク評価をするうえでさまざまな問題がある。しかし、21世紀に入ってから、さまざまな統計学上の工夫によっていくつかの信頼に足るデータが出てきている。

1. 脳性麻痺(cerebral palsy ; CP)

脳性麻痺は、運動障害と認知発達を含む神経学的異常の両方を含むが、疾患名として記録されて

るために、神経学的疾患の中ではpopulation-based-studyに適している。

2002年から2005年にかけて報告された北欧諸国(スウェーデン、デンマーク)のpopulation-based studyの結果^{24)~26)}、ART由来出生児に脳性麻痺が多いことが推測されていた。Hvidtjørnらはこれまで行われた脳性麻痺・自閉症・神経学的発達障害に関わる研究をまとめたmeta-analysis²⁷⁾で、ART由来出生児は自然妊娠由来児に比べて2.18倍(95% confidence interval : 1.71-2.77)脳性麻痺となる危険性が高いと考えられると述べている。この報告の中で、自閉症関連疾患や認知発達障害については危険性が増すかどうか意見が分かれること、卵巣刺激のみでこれらの疾患の危険性が高くなるかどうかは不明である、としている。

脳性麻痺が多い原因は、多くの研究で多胎・低出生体重・早産に関係するといわれている。前述のHvidtjørnらは、Denmarkで1995~2003年に生まれた588,967人の子どもの対象としたpopulation-based studyから、ART由来出生児は自然妊娠児に比較して脳性麻痺となる危険性が高く、それは主に多胎と早産が関与していると結論している²⁸⁾。この報告の中では、彼らは排卵誘発で生まれた子どもやはり脳性麻痺発生の危険性が自然妊娠に比べて有意に高いこと、ARTでの単胚移植(single embryo transfer)はこれからも出生児の予後改善に必要であるとしている。

2. 認知発達(cognitive development)

認知発達とは、知覚・理解・記憶・思考・学習・推論・問題解決など人間の高次認知機能の発達をいう。具体的には言語理解、計算など、学業成績に最も関係してくる機能であり、社会的関心も高い。ただ、ある一定地域で統一的な試験を行っているような特殊な環境がないと信頼性のあるデータを得ることは困難となる。

Carsonらは、英国のART由来単胎出生児99人と対照10,574児を比較した研究から、ART由来単胎出生児は、1)性別・母体年齢・親の職業をmatchさせた対照群対照群、2)不妊群(妊娠

まで12カ月以上かかった), 3) 妊孕性良好群(妊娠まで12カ月以内), 4) 自然妊娠全体, の4群のいずれよりも3歳時点での認知発達に有意に優れており, ART由来であることは認知発達に悪い影響がないと結論づけている²⁹⁾. Mainsらは米国アイオワ州のART由来出生児463人の認知機能試験の結果, 全国平均や同一の学区から選んだ対照と比較してもART由来児は有意に高いスコアであり, 認知発達で必ずしも遅れているわけではないと報告している³⁰⁾. Wagenaarらは, 9~18歳のART由来児139人を対照と比較し, 親の目から見てやや内向的で, 教師の目から見るとやや引っ込み思案だったり, うつ傾向であったりという差はあるものの, 全体として性格や社会行動については対照と差はないと報告している³¹⁾. ただ, 異なったART技術で児の認知発達が異なるというデータも報告されている. Goldbeckらは, 69人のART由来出生児に5~10歳で知能検査を行い, ICSI由来児はIVF由来児よりIQが有意に低く, 認知発達が遅れているという³²⁾.

■ おわりに

ART由来妊娠は, 単胎であっても早産・低出

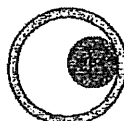
生体重児が多く, それは両親の不妊という形質と強く相関があると考えられている. 生まれてくるART由来出生児では先天異常罹患率が1.4倍ほど高くなり, 心大血管奇形, 神経管欠損, 消化管閉鎖, 尿道下裂などが多くなるが, 多胎・不妊という形質と強い相関がある. また, ART由来出生児では小児期・青年期の癌発生率も1.4倍高く, 高出生体重(>4,500g), 早産, 胎児仮死が癌発生のリスク因子と考えられる. さらに, ART由来出生児は, 自然妊娠児に比較して脳性麻痺となる危険性が2倍程度高く, 多胎と早産が関与していると考えられている. 一方, ARTで罹患率が高くなると懸念されるインプリンティング異常は, これまでpopulation-based studyを含む大規模調査では発生率が増加するという報告はない. また, ART由来出生児の認知発達に関しても, これまでの報告では自然妊娠と差がないというものが多い.

ART由来妊娠・ART由来出生児は今後さらに増加することが予想され, また人種差がある可能性もあることから, 諸外国の報告を注視し続けていくとともに, わが国でもしかるべき方法で独自の監視体制をとることが必要であろう.

文 献

- 1) Helmerhorst FM, Perquin DAM, Donker D, et al: Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ* 328: 261-265, 2004.
- 2) Jackson RA, Gibson KA, Wu YW, et al: Perinatal outcomes in singletons following in vitro fertilization: a meta-analysis. *Obstet Gynecol* 103: 551-563, 2004.
- 3) McDonald SD, Murphy K, Beyene J, et al: Perinatal outcome of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 27: 449-459, 2005.
- 4) McGovern PG, Llorens AJ, Skurnick JH, et al: Increased risk of preterm birth in singleton pregnancies resulting from in vitro fertilization-embryo transfer or gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis. *Fertil Steril* 82: 1514-1520, 2004.
- 5) Romundstad LB, Romundstad PR, Sunde A, et al: Effects of technology or maternal factors on perinatal outcome after assisted fertilisation: a population-based cohort study. *Lancet* 372(9640): 737-743, 2007.
- 6) Källén B, Finnström O, Nygren KG, et al: In vitro fertilization (IVF) in Sweden: risk for congenital malformations after different IVF methods. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73(3): 162-169, 2005.
- 7) Källén B, Finnström O, Lindam A, et al: Congenital malformations in infants born after in vitro fertilization in Sweden. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88(3): 137-143, 2010.
- 8) Källén B, Finnström O, Lindam A, et al: Cancer risk in children and young adults conceived by in vitro fertilization. *Pediatrics* 126(2): 270-276, 2010.
- 9) Lewis A, Reik W: How imprinting centres work. *Cytogenet Genome Res* 113(1-4): 81-89, 2006.
- 10) Young LE, Sinclair KD, Wilmut I: Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev Reprod* 3

- (3) : 155–163, 1998.
- 11) Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, et al : Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27(2) : 153–154, 2001.
 - 12) Shi W, Haaf T : Aberrant methylation patterns at the two-cell stage as an indicator of early developmental failure. *Mol Reprod Dev* 63(3) : 329–334, 2002.
 - 13) Sato A, Otsu E, Negishi H, et al : Aberrant DNA methylation of imprinted loci in superovulated oocytes. *Hum Reprod* 22(1) : 26–35, 2007.
 - 14) Filipponi D, Feil R : Perturbation of genomic imprinting in oligozoospermia. *Epigenetics* 4(1) : 27–30, 2009.
 - 15) Marques CJ, Costa P, Vaz B, et al : Abnormal methylation of imprinted genes in human sperm is associated with oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 14(2) : 67–74, 2008.
 - 16) Sasaki K, Soejima H, Higashimoto K, et al : Japanese and North American/European patients with Beckwith-Wiedemann syndrome have different frequencies of some epigenetic and genetic alterations. *Eur J Hum Genet* 15(12) : 1205–1210, 2007.
 - 17) DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP : Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72(1) : 156–160, 2003.
 - 18) Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, et al : Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet* 361(9354) : 309–310, 2003.
 - 19) Marees T, Dommering CJ, Imhof SM, et al : Incidence of retinoblastoma in Dutch children conceived by IVF : an expanded study. *Hum Reprod* 24(12) : 3220–3224, 2009.
 - 20) Barker DJ : The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261(5) : 412–417, 2007.
 - 21) Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN : Imprinting diseases and IVF : Danish National IVF cohort study. *Hum Reprod* 20(4) : 950–954, 2005.
 - 22) Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, et al : Assisted reproductive therapies and imprinting disorders – a preliminary British survey. *Hum Reprod* 21(4) : 1009–1011, 2006.
 - 23) Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, et al : Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances : a Dutch study. *Hum Reprod* 22(9) : 2476–2480, 2007.
 - 24) Ericson A, Nygren KG, Olausson PO, et al : Hospital care utilization of infants born after IVF. *Hum Reprod* 17(4) : 929–932, 2002.
 - 25) Strömberg B, Dahlquist G, Ericson A, et al : Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation : a population-based study. *Lancet* 359(9305) : 461–465, 2002.
 - 26) Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN : Imprinting diseases and IVF : Danish National IVF cohort study. *Hum Reprod* 20(4) : 950–954, 2005.
 - 27) Hvidtjørn D, Schieve L, Schendel D, et al : Cerebral palsy, autism spectrum disorders, and developmental delay in children born after assisted conception : a systematic review and meta-analysis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 163(1) : 72–83, 2009.
 - 28) Hvidtjørn D, Grove J, Schendel D, et al : Multiplicity and early gestational age contribute to an increased risk of cerebral palsy from assisted conception : a population-based cohort study. *Hum Reprod* 25(8) : 2115–2123, 2010.
 - 29) Carson C, Kurinczuk JJ, Sacker A, et al : Cognitive development following ART : effect of choice of comparison group, confounding and mediating factors. *Hum Reprod* 25(1) : 244–252, 2010.
 - 30) Mains L, Zimmerman M, Blaine J, et al : Achievement test performance in children conceived by IVF. *Hum Reprod* 25(10) : 2605–2611, 2010.
 - 31) Wagenaar K, van Weissenbruch MM, Knol DL, et al : Behavior and socioemotional functioning in 9–18-year-old children born after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 92(6) : 1907–1914, 2009.
 - 32) Goldbeck L, Gagsteiger F, Mindermann I, et al : Cognitive development of singletons conceived by intracytoplasmic sperm injection or in vitro fertilization at age 5 and 10 years. *J Pediatr Psychol* 34(7) : 774–781, 2009.



特集・不妊診療のすべて

B・ART(生殖補助医療)

精子・卵子・卵巣の凍結保存とその安全性

Efficacy and safety for cryopreservation of human gametes and ovarian tissue

久慈 直昭*
KUJI Naoki

井上 治
INOUE Osamu

福永 朝子
FUKUNAGA Tomoko

菅原 かな
SUGAWARA Kana

小川 誠司
OGAWA Seiji

奥村 典子
OKUMURA Noriko

山田 満稔
YAMADA Mitsutoshi

浜谷 敏生*
HAMATANI Toshio

吉村 泰典**
YOSHIMURA Yasunori

慶應義塾大学医学部産婦人科学 *専任講師 **教授

Key words

精子, 精子幹細胞, 卵子, 卵巣, 凍結保存

悪性腫瘍患者の治療率が向上するに従い、妊孕性保存の可能性を治療の一部として考える患者や医師が増えてきている。そのための方法としては、治療そのものの最適化、放射線の場合などに照射野の外に生殖腺を外科的に移動するなど、いくつかの方法があるが、ここでは精子、卵子・卵巣の凍結保存により妊孕性を保存する方法について、その必要性、現状、そして問題点を概観する。

男性の妊孕性保存法

1. 精子凍結保存法はほぼ確立されているが、妊娠成立には ICSI が必要である

悪性腫瘍治療前男性の妊孕性保存法は、通常精子凍結保存法が用いられる。精子凍結の安全性は、減数分裂を完了してプロタミンにより DNA が強固に保護されている精子の構造からも、畜産分野における種々の動物での膨大なデータ、および AID で生まれた子どものデータからも、ほぼ確立されている。

米国における実際の精液凍結保存の臨床データをみてみると、現病としては精巣腫瘍・悪性リンパ腫(とくに Hodgkin 病)・白血病が多く、これ

はこれらの疾患の治療に用いられる化学療法剤が生鮮への毒性が強いためである¹⁾。平均年齢 29.5 歳、164 症例の精液凍結保存を行い、これまで凍結精液を使用した 6 名(IUI 3 名, IVF-ICSI 3 名)のうち、IVF-ICSI で 2 症例が分娩している。この報告からわかるように、凍結をする際には患者に将来顕微授精が必要となる場合が多いこと、またそれであれば(妊娠成立までに必要となる精子数はきわめて少なくてもよいので)必ずしも複数回の採取は必要ないことを説明すべきであろう。

2. 凍結時に無精子症の症例では、精巣に精子が存在することがある

一方、治療前に精液凍結を試みたとき、すでに

射出精液に精子が認められない症例が少なからず存在することに临床上は注意が必要である。無精子症の原因は、悪性腫瘍による発熱や、病巣部から放出される成長因子や炎症性サイトカインが造精機能を障害するためであると考えられている。このような症例に対して原病手術時に TESE を行った報告があるが、精巣腫瘍で6症例、43%、悪性リンパ腫で8症例、47%で精巣から精子を回収可能であったという²⁾。回収精子の遺伝的 normalcy や、児への遺伝的影響については確認されていないが、とくに精巣腫瘍手術では患者への侵襲が増えるものではないことから、患者の強い希望があれば考慮してもよい方法であろう。

3. 精巣組織(精子幹細胞)保存はまだ実験段階で、臨床応用までには解決すべき多くの問題がある

成熟精子を持っていない性成熟期前の男児に対しては、妊孕性温存のため精原細胞移植や精巣内精子幹細胞凍結が考えられている。

精巣組織を凍結保存して治療後に再移植する方法が考慮されるようになったのは、マウスにおいて精巣由来細胞移植により移植細胞由来の産仔をえたという1994年の報告³⁾からであるが、この報告では非凍結細胞を移植しており、凍結精子幹細胞由来の動物実験による産仔は未だ報告されていない。

凍結法に関しては、有望な結果が得られている。Keros らは、凍結保護剤として5% dimethyl sulphoxide (DMSO) を使用した凍結緩慢法を用い、5人の男児より精巣組織を採取・凍結し、融解後に形態学的には正常な精原細胞・セルトリ細胞

を全例で認めたという⁴⁾。また、このうち、10歳の男児では1つの精巣から再移植に十分な量である 83×10^6 の生殖細胞を採取できたとしている。また、実際に家族に同意をとってみると、同意する家族の割合は説明をした症例の6割強であったという別の報告もあり⁵⁾、この治療を希望する患者・親が多いことが示されている。

ただ、仮に融解後に妊孕性ある精子幹細胞が得られたとしても、成熟のために自家移植を行うとすれば悪性腫瘍再移植の危険性が問題となり、いまのところこの方法でうまれた子どもがいなかったことから、現段階ではこの方法は実験段階で、一般的ではない。凍結細胞を妊孕性のために用いることができるのは悪性細胞がないことを確認できる場合や、体外培養で精子が得られるようになってからのことであろう。また、患者が若年のため凍結保存の理解が得られないことなど、倫理的な面でも問題が多い。

女性の妊孕性保存法

女性の妊孕性保存法としては、卵子凍結保存と卵巣凍結保存が考えられる(表1)。それぞれに適応・長所・短所があるが、長所として技術的に成熟していること、悪性細胞を再移植する危険がないことから、現時点では卵子凍結保存がより臨床応用範囲は広い。

既婚成人女性については通常、生児獲得率の高い受精卵凍結保存を選択することをすすめる医師が多いが、海外では受精卵凍結後に夫婦が離婚、別の女性と再婚した夫が受精卵の使用を拒否して、妻が使用を求めて裁判所に提訴するという案件が

表1 悪性腫瘍治療前女性の妊孕性保存法

	適 応	長 所	短 所
卵子凍結	成人女性、とくに未婚者	技術的成熟	保存卵子数が少ない
卵巣凍結	卵巣に悪性腫瘍転移の可能性がある場合	悪性細胞再移植の危険なし	保存卵子数多い
卵子凍結	患者期前の女性	自然妊娠が可能	技術的に未成熟
卵巣凍結	悪性腫瘍再移植		

起こっているので注意が必要であろう。

1. 良性疾患においても卵巣不全発症前の卵子・卵巣凍結が試みられている

若年女性の妊孕性温存が必要となるのは、悪性腫瘍治療前・骨髄移植患者など医原性卵巣不全が予想される場合のほか、一部の自己免疫性疾患や Gonadal dysgenesis がある。Gonadal dysgenesis の一種であるターナー症候群中で45XOの3~8%、45XO/46XXのmosaicの12~21%に自然発来 of 月経があるといわれているが、その月経は不順で期間は短く、多くの例では20歳代で早発卵巣不全(POF)になるといわれている。結婚して挙児希望があれば若年での排卵誘発が考えられるが、結婚前であれば卵子・卵巣凍結により妊孕性温存が期待できる。Kavoussiらは、ターナー症候群(mosaic)の28歳女性で、GnRH antagonist protocolにて、ゴナドトロピンを使用し排卵誘発を行った。E₂のピーク値は4,507 pg/mlであり、15個の卵細胞を採卵できている⁶⁾。Huangらは、ターナー症候群(mosaic)の16歳女性で、腹腔鏡下に卵巣組織を採取したところ11個の未熟卵を認め、IVMにて8個の成熟卵の培養に成功している。約73%を成熟卵に培養させることができたが、IVMの成功率はMosaicで高く、45XOでは低かったという⁷⁾。以上の実験事実より、これらの患者に卵子・卵巣凍結を応用する可能性は存在する。

2. 卵子凍結保存はガラス化法により臨床応用可能な技術となっている

卵子凍結法には現在、従来から用いられてきた緩慢凍結法と、ガラス化法の二つの方法が用いられている。緩慢凍結法では、1.0~1.5M程度の凍結保護剤(プロパンジオールまたはDMSO)に平衡させた裸化卵子を、-30~-40℃まで毎分0.3℃でゆっくり冷却し、その後液体窒素温度まで急冷する⁸⁾。これに対してガラス化凍結法は、卵子を6M程度の高張なガラス化液に平衡させた後、直ちに液体窒素に投入して急冷、凍結する⁹⁾。

卵子凍結保存は、1984年に最初の成功例が報告されてから1990年代に至るまで、ほとんど妊娠出産例の報告はなく成功率は非常に低かった。その第1の理由は、凍結過程で起きる浸透圧変化により卵子に人工的活性化が起こり、表層反応による透明帯の硬化および卵子形質膜の性状変化が起こって、体外受精では受精障害が起こるためであった。第2の理由は、MII期卵子の紡錘体構造が温度感受性であることで、これまでの緩慢凍結法ではプログラムフリーザー中で氷結するまでに長時間低温にさらされるため、紡錘体構造に乱れが生じ第一卵割以降に染色体異常を発生しやすくなってしまいう可能性が考えられてきた。

しかし、現在の卵子凍結法では、ICSIによって凍結保存卵子の受精率が改善し、またガラス化法の確立によって低温への暴露時間が極めて短時間になったことで、紡錘体構造をはじめとする卵子の温度感受性変化を最小限に抑えることができるようになったと考えられている。実際、これらの技術改善が行われた1990年代から、凍結卵子由来妊娠の報告が次第に多くなってきている。

Noyesらは、これまで世界で報告された900例以上の凍結卵子由来妊娠を、緩速凍結法とガラス化法に分けて集計している(表2)¹⁰⁾。これによれば、緩速法・ガラス化法それぞれの平均融解後生存率・受精率はそれぞれ68% vs 81%、73% vs 79%と差がなく、報告された出生児数および融解卵子あたり生児獲得率はそれぞれ282人 vs 285人、2.3% vs 5.2%であり、奇形発生率も各3例、1%程度である。したがって、卵子凍結保存で以前から指摘されていた染色体異常や奇形の増加は、これまでのところ認められていない。さらに、この総説における集計では、緩速法を用いた場合の出生児男女比が0.70に対してガラス化法は1.19であり、ガラス化保存法が卵子の潜在的な遺伝的異常発生という面から見ても、緩速法に劣るとはいえないことが推測できる。この報告では、いずれの方法がより優れているかは現時点では結論できないとされているが、もし効率や安全性が同等であったとしても、高価なプログラム

表2 凍結卵子由来児の予後

	緩速凍結法	ガラス化法
報告数	23	9
凍結卵子	11,890	5,435
生存	8,056 (68%: 22~90)	4,392 (81%: 69~99)
受精(2PN)	(73%: 50~86)	(79%: 59~93)
胎移植	1,974	834
出生児	282	285
生存率(%)	2.3%	5.2%
男児比	0.70	0.51
先天異常	VSD, choanal atresia, Rubinstein-Tajbi 症候群	VSD (2), 総腸管閉鎖, duproct, 海綿状血管腫

(Noyes N, et al : Reprod Biomed Online, 2009¹⁰⁾より改変)

フリーザーが不要で、凍結にかかる時間も短くて簡便なガラス化法が、今後さらに普及することは明らかであろう。

3. 卵胞期や黄体期であっても卵子凍結は不可能ではない

悪性腫瘍治療の場合、治療をすぐに始めなければならない場合が多く、たとえ自然周期でも排卵期を待っていることができないことがある。このような場合、卵胞期や黄体期に採取した未成熟卵を体外成熟させて凍結保存する方法が考えられている。

卵胞期に採取した未成熟卵については、PCO患者で採取卵子を体外成熟・凍結融解後にICSIして妊娠した例がすでに報告されている¹¹⁾。この症例は悪性腫瘍患者ではないが、原病による影響を受けていない症例で、かつある程度の卵胞成熟が認められる時期であれば、場合によっては試みてよい方法であると考えられる。

また、黄体期に採取した卵子についても、最近の報告で3例の悪性腫瘍治療前の患者から採取した黄体期GV期卵子を体外成熟させて得られたMII期卵子を凍結しているものがある¹²⁾。この報告では、3例からそれぞれ7, 5, 7個の卵子がhCG注射後36時間で採取され、それぞれ5, 3, 5個の体外成熟MII卵子が凍結されている。黄体

期に採取された卵子の妊孕性がどの程度あるかは不明であるが、黄体期に採取した卵子を体外成熟させた初期のChaらの報告¹³⁾や、黄体期の延長である帝王切開時に採取された卵子を提供卵子とした妊娠例の報告¹⁴⁾があることから、確率はともかく可能性としてはあると考えられる。

4. 卵巣凍結保存は悪性細胞再移植の危険性が問題である

卵巣凍結による妊孕性保存の長所は、第一に多数の卵子を保存できる可能性があること、第二に性周期や自然妊娠を含めて卵巣機能そのものを保存することができることである。ヒト卵巣凍結では、凍結保存した卵巣組織を融解後自家正所移植、つまり患者の卵巣が元あった部位(後腹膜、あるいは残存卵巣上)に移植する方法で、これまで文献上、世界で数例の妊娠・出産例の報告がなされており、現在までに報告されている妊娠例はすべて緩慢凍結法によっている¹⁰⁾。緩慢凍結法では、卵巣皮質を2mm角、あるいは10×5×2mm程度の短冊状に切り出して、1.5M DMSOを凍結保護剤としてプログラムフリーザーで緩慢凍結する。一方、最近わが国の香川・桑山らによって開発されたガラス化法は、10mm×10mm×1mmの卵巣切片を作成し、特殊な容器を用いて液体窒素に直接投入して凍結するもので、緩慢法に

比して卵胞への凍結障害に加えて卵胞への形態学的な障害が少ないと報告されている¹⁰⁾。この方法では、間質の障害も少ないと報告されていることから、後述する機能期間の延長にも今後期待が持たれる¹¹⁾。

卵巣凍結の問題点として、第一に現在の技術では有効に保存できる卵胞数が少ないこと、第二に融解後移植する卵巣に悪性細胞が含まれる危険性があることがあげられる。

第一の問題点については、融解後に卵巣組織片が機能する期間が短いという事実によって推測される。この主たる原因は、融解後、自家移植する卵巣片が生着するまで血流が途絶していることによると言われており、この阻血期間(低酸素状態となる)に多くの卵胞が死滅するとされている。解決法として、現在は移植の1~2週間前に移植部(後腹膜など)に手術操作を行ってあらかじめ血管新生を促しておき、移植後の阻血時間を短くしようという試みがなされているが、画期的な方法とはなっていない。別の方法として、血管をつけたままで卵巣を(皮質片とせず)そのまま凍結する方法が考えられているが、この方法の問題点はもし血管が血栓などで閉塞しまうと全卵巣機能が失われることにあり、動物実験でどの程度の割合で生着するかが明らかにならないと臨床応用は困難と考えられる。結局、現時点では皮質片の移植後の卵胞生存率を高めるのが現実的と考えられる。

第二の問題点である悪性細胞再移植については、すでに1996年に lymphoma を発症させた雌の卵巣を別の recipient 雌に移植したところ、recipient 雌は lymphoma を発症、9~43日後に死亡したという報告がある¹⁰⁾。ヒトでは、これまでのところ悪性細胞再移植の実例は確認されていないが、考慮しなければならない危険であり、緩速法であってもガラス化法であっても自家移植をする限り、その危険性は決して0にはならない。

悪性細胞再移植の危険性を解決するには、自家移植による卵胞発育を避けるため、異種移植、あるいは卵巣組織や単離した未熟卵胞の体外培養系の確立が必要である。しかし、異種移植は、ヒ

ト卵巣を移植した動物からの母胎・あるいは胎児への病原菌感染の危険性があり、一方卵巣組織・未熟卵胞の体外培養はマウスなどの齧歯類で少数の成功例が報告されているものの、その発育率がきわめて低いことから、臨床応用されるにはかなり長い期間が必要と考えられる。そこで、現在卵巣凍結時に同時に卵子を凍結保存する方法が考えられている(次項)。

5. 卵巣組織凍結時の非刺激 GV 期卵子の利用

卵巣組織凍結の最大の問題点は悪性細胞再移植の危険性であり、もし凍結卵巣組織に悪性細胞を認めれば、凍結した卵巣組織の自家移植は不可能となる。しかし、卵巣凍結時に一定数の卵子を凍結することができれば、このような卵巣凍結の弱点をカバーできる。

一方、成熟卵子凍結に必要な卵巣刺激や、hCG 投与による卵巣過剰刺激症候群は、悪性腫瘍の治療開始を遅らせてしまう。また、乳癌などのホルモン感受性腫瘍では刺激自体が原病を増悪させる可能性がある。しかし、非刺激 GV 期卵を妊孕性温存治療に利用できるとすれば、体内のホルモン状態を変化させず、また原病治療開始までの時間を延長させず、さらに妊孕性保存を行わなければならない場合でも月経周期に関係なく卵子を得ることができる。

GV 期卵子を妊孕性保存に利用する際の安全性に関しては、主に PCO 症例に対して hCG 刺激を行って得た GV 期卵子由来の子どもについてはすでに多数出産例があり、異常は増加しないと報告されている¹⁰⁾。また、ウシ・ブタなどの畜産動物では、産仔作出のための卵子は屠場由来の非刺激卵巣から採取した GV 期卵子が一般的に用いられ、これによって産仔の異常が増加するという報告はないことから、実験的技術ではあるが許容できる範囲であると考えられる。そこで、卵巣凍結時に摘出卵巣から GV 期卵子を採取し、これを妊孕性保存に利用する試みが行われている。

得られた GV 期卵子は、通常体外成熟させ、MII 期になったものを凍結する。ただ、体外成熟

の成功率や得られた卵子の妊孕性は、成熟卵子と比べるとまだ満足すべき率ではない、この低い発生率の一因は、GV 期卵子の体外培養法が現在開発途上であり、市販の培養液の体外成熟率が低いことにあると考えられる。そこで、わが国でもっとも多数の卵巣凍結症例をもつ施設の一つである加藤レディースクリニックの香川らは、将来 GV 期卵の体外成熟技術が改善されることを期待して、GV 期卵をそのままガラス化法にて凍結す

るという新しい方法を臨床に用いている (personal communication)。マウスでは、凍結保存 GV 期卵から体外培養・体外受精を行って産仔を得たという報告があり、さらにガラス化法によって融解後の発生率は高くなると報告されていることから²⁰⁾、一つの有望な方法と考えられる。

いずれにしても、卵巣凍結時の GV 期卵子の利用は、とくに卵巣に高率に転移する乳癌患者などを中心に、有望な妊孕性保存法となると考えられる。

文 献

- 1) Chung K, Iranl J, Knee G, et al : Sperm cryopreservation for male patients with cancer : an epidemiological analysis at the University of Pennsylvania. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 113 (Suppl 1) : S7-11, 2004.
- 2) Schrader M, Müller M, Sofikitis N, et al : "Onco-teste" : testicular sperm extraction in azoospermic cancer patients before chemotherapy-new guidelines ? *Urology* 61(2) : 421-425, 2003.
- 3) Brinster RL, Avarbock MR : Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 (24) : 11303-11307, 1994.
- 4) Keros V, Hultenby K, Borgström B, et al : Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod* 22(5) : 1384-1395, 2007.
- 5) Ginsberg JP, Carlson CA, Lin K, et al : An experimental protocol for fertility preservation in prepubertal boys recently diagnosed with cancer : a report of acceptability and safety. *Hum Reprod* 25(1) : 37-41, 2010.
- 6) Kavoussi SK, Fisseha S, Smith YR, et al : Oocyte cryopreservation in a woman with mosaic Turner syndrome : a case report. *J Reprod Med* 53 : 223-226, 2008.
- 7) Huang J, Tulandi T, Holzer H, et al : Cryopreservation of ovarian tissue and in vitro matured oocytes in a female with mosaic Turner syndrome : case report. *Hum Reprod* 23 : 336-339, 2008.
- 8) Porcu E, Fabbri R, Damiano G, et al : Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 169(1-2) : 33-37, 2000.
- 9) Kuwayama M, Vajta G, Kato O, et al : Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 11(3) : 300-308, 2005.
- 10) Noyes N, Porcu E, Borini A : Over 900 oocyte cryopreservation babies born with no apparent increase in congenital anomalies. *Reprod Biomed Online* 18(6) : 769-776, 2009.
- 11) Chian RC, Gilbert L, Huang JY, et al : Live birth after vitrification of in vitro matured human oocytes. *Fertil Steril* 91(2) : 372-376, 2009.
- 12) Demirtas E, Elizur S, Holzer H, et al : Case report : immature oocyte retrieval in the luteal phase to preserve fertility in cancer patients. *Reprod Biomed Online* 17 : 520-523, 2008.
- 13) Cha KY, Do BR, Chi HJ, et al : Viability of human follicular oocytes collected from unstimulated ovaries and matured and fertilized in vitro. *Reproduction, Fertility and Development* 4 : 695-701, 1992.
- 14) Hwang JL, Lin YH, Tsai YL : Pregnancy after immature oocyte donation and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 68(6) : 1139-1140, 1997.
- 15) Donnez J, Dolmans MM, Demyelle D, et al : Live-birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364(9443) : 1405-1410, 2004.
- 16) Kagawa N, Silber S, Kuwayama M : Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod Biomed Online* 18(4) : 568-577, 2009.
- 17) Silber S, Kagawa N, Kuwayama M, et al : Duration of fertility after fresh and frozen ovary transplantation. *Fertil Steril* 2010[Epub ahead of print]
- 18) Shaw JM, Bowles J, Koopman P, et al : Fresh and cryopreserved ovarian tissue samples from donors with lymphoma transmit the cancer to graft recipients. *Hum Reprod* 11(8) : 1668-1673, 1996.
- 19) Chian RC, Buckett WM, Tan SL : In-vitro maturation of human oocytes. *Reprod Biomed Online* 8 : 148-166, 2004.
- 20) Aono N, Abe Y, Hara K, et al : Production of live offspring from mouse germinal vesicle-stage oocytes vitrified by a modified stepwise method, SWEID. *Fertil Steril* 84(Suppl 2) : 1078-1082, 2005. ?



RAPID COMMUNICATION

Common nucleotide sequence of structural gene encoding fibroblast growth factor 4 in eight cattle derived from three breeds

Sho SATO,¹ Toshikiyo TAKAHASHI,² Hiroshi NISHINOMIYA,² Makiko KATOH,² Ryu ITOH,² Masaki YOKOO,¹ Mari YOKOO,¹ Momoe IHA,¹ Yuki MORI,¹ Kano KASUGA,¹ Ikuo KOJIMA¹ and Masayuki KOBAYASHI¹

¹Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Akita, and ²Livestock Experiment Station, Akita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Daisen, Japan

ABSTRACT

Fibroblast growth factor 4 (*FGF4*) is considered as a crucial gene for the proper development of bovine embryos. However, the complete nucleotide sequences of the structural genes encoding *FGF4* in identified breeds are still unknown. In the present study, direct sequencing of PCR products derived from genomic DNA samples obtained from three Japanese Black, two Japanese Shorthorn and three Holstein cattle, revealed that the nucleotide sequences of the structural gene encoding *FGF4* matched completely among these eight cattle. On the other hand, differences in the nucleotide sequences, leading to substitutions, insertions or deletions of amino acid residues were detected when compared with the already reported sequence from unidentified breeds. We cannot rule out a possibility that the structural gene elucidated in the present study is widely distributed in cattle. To the best of our knowledge, this is the first determination of the complete nucleotide sequence of the structural gene encoding bovine *FGF4* in identified breeds.

Key words: amino acid sequence, cattle, *FGF4*, fibroblast growth factor 4, structural gene.

INTRODUCTION

In mice, fibroblast growth factor 4 (*FGF4*) secreted from the inner cell mass, founder cells for the epiblast, of blastocysts maintains the polar trophectoderm in a proliferative state (Tanaka *et al.* 1998). Immediately after implantation, *FGF4* secreted from the epiblast stimulates the proliferation of extraembryonic ectoderm derived from the polar trophectoderm (Niswander & Martin 1992; Feldman *et al.* 1995; Tanaka *et al.* 1998). With the progression of embryogenesis, the epiblast and extraembryonic ectoderm give rise to the fetus and the placenta, respectively. Therefore, *FGF4* is a crucial growth factor especially for the development of the placenta in a mouse embryo, and *Fgf4* null mice show a peri-implantation lethal phenotype (Feldman *et al.* 1995).

High rates of early embryonic, neonatal or postnatal abnormalities have consistently been observed in bovine cloning (Cibelli *et al.* 1998; Kato *et al.* 1998). Recently, aberrant expression patterns of genes, including *FGF4*, were detected in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer (Amarnath *et al.* 2007; Fujii *et al.* 2010). Accordingly, *FGF4* seemed to be a crucial gene for the proper development of

not only mouse embryos but also bovine embryos. However, the complete nucleotide sequence of the structural gene encoding bovine *FGF4* already reported (GenBank accession no. U15969, Yu *et al.* 1995) was derived from unidentified breeds.

In this study, we identified a common structural gene encoding *FGF4* by determining the complete nucleotide sequences in three Japanese Black (JB), two Japanese Shorthorn (JS), and three Holstein (HO) cattle.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of genomic DNA

Blood samples collected with heparin from two JB, two JS and three HO cows, were centrifuged at 4°C (1400 × *g*, 15 min). Genomic DNA was extracted from buffy-coat cells

Correspondence: Masayuki Kobayashi, Laboratory for Advanced Animal Cell Technology, Graduate School of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, Akita 010-0195, Japan. (Email: makoba@akita-pu.ac.jp)
Received 24 May 2011; accepted for publication 13 October 2011.

obtained from centrifuged samples and freeze-thawed sperm cells collected from one JB bull using a NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) in accordance with the manufacturer's instructions. These JB, JS and HO cattle were confirmed as being unrelated within the respective breeds at least for one-, three- and two-generations, respectively.

Determination of the complete nucleotide sequences of the structural gene for bovine *FGF4*

The genomic DNA region containing the complete structural gene for bovine *FGF4* was amplified by PCR as follows. Genomic DNA samples prepared in the present study were used as templates. PCR amplifications were performed in a 20- μ L reaction volume with 200 ng of template, KOD-plus DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Japan), and a primer set (5'-CACCCACGGACGACGCGCCGAGGGCGGGG-3', forward primer; 5'-GGGGGTGCTTTGTCTTCCA-3', reverse primer). PCR was performed as follows: hot start 2.5 min at 98°C followed by 50 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 54°C and 2.5 min at 68°C, and a final extension for 5 min at 68°C. PCR products were separated by 1% low melting point agarose gel electrophoresis and purified from excised gel pieces using a NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel) in accordance with the manufacturer's instructions. Nucleotide sequences of the purified DNA fragments were determined using a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan) in accordance with the manufacturer's instructions.

RESULTS AND DISCUSSION

The complete nucleotide sequences of PCR products (~2.2 kb) containing the full-length structural gene for *FGF4* comprised of three coding exons were determined, in addition to two introns. The nucleotide

sequences have been submitted to DDBJ/EMBL/GenBank databases under the accession numbers AB633205, AB633206 and AB633207 for HO, AB633208, AB633209 and AB633210 for JB, and AB633211 and AB633212 for JS cattle. As shown in Figure 1, the deduced primary sequences of the FGF4 protein were completely identical among the JB, JS and HO cattle examined. The nucleotide sequences of their protein coding regions also completely matched. The amino acid sequence deduced from the previously reported nucleotide sequence, U15969, contained two substitutions, A6T (from GCG to ACG) and R57G (from CGC to GGC), with the letter after the number indicating the amino acid residue for U15969, one amino acid residue insertion of a leucine residue (CTG) between positions 54 and 55 for JB, JS and HO cattle, and one deletion (GCG) A31- ('-' indicates no corresponding amino acid residue in U15969). The incomplete amino acid sequence deduced from results of whole-genome shotgun sequencing (AAFC03111659 derived from Hereford genome, Zimin *et al.* 2009) is also indicated, while there were no differences from each other. From these results, nucleotide sequences leading to a common primary sequence for FGF4 protein were elucidated in all JB, JS and HO cattle examined. To date, primers for RT-PCR analysis of bovine *FGF4* transcript have been designed (Degrelle *et al.* 2005; Amarnath *et al.* 2007; Fujii *et al.* 2010; Rodriguez-Alvarez *et al.* 2010) from that in U15969. Thus, it is noteworthy that differences in nucleotide sequences are valuable, basic scientific knowledge for such analyses. On the other hand, in introns of the *FGF4* gene, differences in nucleotide

JB, JS and HO	1	MAGPGAAAAALLPAVLLAVLAPWAGRGGAAPTAPNGTLEAELERRWESLVARSLARLP	59
	1	T.....-.....L..G..	59
U15969			
HE (AAFC03111659)			
JB, JS and HO	60	VAAQPKEAAVQSGAGDYLLGIKRLRLRYCNVGIGFHLQVLPDGRIGGVHADTSDSLLELS	119
	60		119
U15969			
HE (AAFC03111659)	1		6
JB, JS and HO	120	PVERGVVSIFGVASRFFVAMSSRGRLYGSPFFTDECRFREILLPNYNAYECDRHGMFI	179
	120		179
U15969			
HE (AAFC03111659)	7		66
JB, JS and HO	180	ALSKNGKAKKGNRVSPTMKVTHFLPRL	206
	180		206
U15969			
HE (AAFC03111659)	67		93

Figure 1 Alignment of the deduced primary sequences of bovine FGF4 proteins. FGF4 genes used in this alignment are from three Japanese Black (JB), two Japanese Shorthorn (JS), and three Holstein (HO) cattle (determined in this study), bovine control (GenBank accession no. U15969), and Hereford (HE) cattle (AAFC03111659). For each FGF4, a period indicates sequence identity to FGF4 from JB, JS and HO cattle. A dash represents a gap introduced to optimize the alignment. The nucleotide sequence of the structural gene for HE was partially determined, and unidentified regions are indicated as blanks and amino acid positions are indicated in accordance with the partial sequences. An arrowhead indicates a possible processing site estimated from that of human FGF4 (Delli-Bovi *et al.* 1988).

sequences were identified, such as observed in one HO cow (AB633205) showing an insertion of GC nucleotides after position 613 (numbers indicate positions from the adenine base in the initiation codon) and one JS cow (AB633211) showing a G770T mutation. Because sample sizes were small in the respective breeds examined, it was still unknown whether the differences in nucleotide sequences for introns of the *FGF4* gene detected in this study were attributed to inter- or intra-breed differences.

In conclusion, nucleotide sequences of the structural gene encoding FGF4 protein were completely identical in all examined cattle derived from the three breeds. Therefore, we cannot rule out a possibility that this type of structural gene is widely distributed in cattle. To the best of our knowledge, this is the first determination of the complete nucleotide sequence in identified breeds.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kazuhiro Rikimaru (Livestock Experiment Station, Akita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center, Daisen, Japan) for invaluable comments on the manuscript. This work was supported in part by a research grant from the President of Akita Prefectural University to M. K.

REFERENCES

- Amarnath D, Li X, Kato Y, Tsunoda Y. 2007. Gene expression in individual bovine somatic cell cloned embryos at the 8-cell and blastocyst stages of preimplantation development. *Journal of Reproduction and Development* **53**, 1247–1263.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. 1998. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* **280**, 1256–1258.
- Degrelle SA, Champion E, Cabau C, Piumi F, Reinaud P, Richard C, Renard JP, Hue I. 2005. Molecular evidence for a critical period in mural trophoblast development in bovine blastocysts. *Developmental Biology* **288**, 448–460.
- Delli-Bovi P, Curatola AM, Newman KM, Sato Y, Moscatelli D, Hewick RM, Rifkin DB, Basilico C. 1988. Processing, secretion, and biological properties of a novel growth factor of the fibroblast growth factor family with oncogenic potential. *Molecular and Cellular Biology* **8**, 2933–2941.
- Feldman B, Poueymirou W, Papaioannou VE, DeChiara TM, Goldfarb M. 1995. Requirement of FGF-4 for postimplantation mouse development. *Science* **267**, 246–249.
- Fujii T, Moriyasu S, Hirayama H, Hashizume T, Sawai K. 2010. Aberrant expression patterns of genes involved in segregation of inner cell mass and trophoblast lineages in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *Cellular Reprogramming* **12**, 617–625.
- Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* **282**, 2095–2098.
- Niswander L, Martin GR. 1992. Fgf-4 expression during gastrulation, myogenesis, limb and tooth development in the mouse. *Development* **114**, 755–768.
- Rodriguez-Alvarez L, Cox J, Tovar H, Einspanier R, Castro FO. 2010. Changes in the expression of pluripotency-associated genes during preimplantation and peri-implantation stages in bovine cloned and in vitro produced embryos. *Zygote* **18**, 269–279.
- Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis A, Nagy A, Rossant J. 1998. Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science* **282**, 2072–2075.
- Yu JC, DeSeabra AJ, Wang LM, Fleming TP, Chedid M, Miki T, Heidaran MA. 1995. An unexpected transforming gene in calf-thymus carrier DNA: bovine hst. *Gene* **162**, 333–334.
- Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Marcais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke JA, Salzberg SL. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology* **10**, R42.

Physiological function of hyaluronan in mammalian oocyte maturation

Masaki Yokoo · Eimei Sato

Received: 23 February 2011 / Accepted: 2 June 2011 / Published online: 29 June 2011
© Japan Society for Reproductive Medicine 2011

Abstract Despite its structural simplicity, hyaluronan exhibits a broad spectrum of biological activities. Cumulus expansion observed during oocyte maturation in mammals is also induced by hyaluronan accumulation in cumulus–oocyte complexes. It has been demonstrated that this volumetric change in cumulus–oocyte complexes correlates with the progression of oocyte maturation. We have investigated the molecular mechanism of oocyte maturation in mammals, focusing on hyaluronan accumulation in cumulus–oocyte complexes during cumulus expansion. In this review, we describe the physiological function of hyaluronan, emphasizing the progression of oocyte maturation in mammals based on our previous findings.

Keywords CD44 · Cumulus expansion · Hyaluronan · Meiotic resumption · Oocyte

Introduction

In vitro maturation of human oocytes retrieved from antral ovarian follicles is a new option for assisted reproductive technology (ART). The major benefits of in vitro

maturation, especially for polycystic ovarian syndrome patients, include avoiding the risk of ovarian hyperstimulation syndrome, reduced cost and less complicated treatment; however, the efficiency of current in vitro maturation techniques is suboptimal in terms of obtaining the number of mature oocytes. In addition, the quality of oocytes is poor after in vitro maturation, showing increased frequency of retarded cleavage and inhibited development. Thus, in vitro maturation of oocytes for ART in humans still leaves some room for improvement.

In mammals, the oocyte is surrounded by several layers of compacted cumulus cells, forming a cumulus–oocyte complex (COC). After the preovulatory gonadotropin surge, the oocyte recommences meiotic resumption, completes germinal vesicle breakdown (GVBD), and progresses to metaphase II before ovulation. During oocyte maturation, the COC expands dramatically; this phenomenon is termed cumulus expansion. This expanded matrix is critical for normal and efficient reproduction because it binds the oocyte and the cumulus cells together, and protects the oocyte from the proteolytic and mechanical stresses during ovulation. Moreover, cumulus expansion contributes to the success of oocyte fertilization by stabilizing the structure of the zona pellucida and by stimulating sperm activation and motility [1–3]. Because this volumetric change in the COC occurs not only in vivo but also in vitro maturation, the physiological significance of cumulus expansion is important in the study of the developmental competence of mammalian oocytes matured and fertilized in vitro [4–7]. We have investigated the molecular mechanism of oocyte maturation in mammals, with special emphasis on hyaluronan accumulation in COCs during cumulus expansion. The physiological function of hyaluronan during oocyte maturation is the focus of this review.

M. Yokoo (✉)
Laboratory of Animal Reproduction, Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University, 2-2 Aza Minami Ogata Village, Minamikita-gun, Ogata 010-0444, Japan
e-mail: myokoo@akita-pu.ac.jp

E. Sato
Laboratory of Animal Reproduction,
Graduate School of Agricultural Science,
Tohoku University, Sendai 981-8555, Japan

Hyaluronan synthesis during cumulus expansion

Hyaluronan is an unbranched polymer composed of repeating glucuronic acid and *N*-acetyl glucosamine disaccharide units. Unlike other glycosaminoglycans that form proteoglycans, hyaluronan is not linked to a core protein. Despite its structural simplicity, hyaluronan exhibits a broad spectrum of biological activities by interacting with hyaluronan-binding proteins. Hyaluronan is known as an important component of extracellular matrices and body fluids through its binding to other matrix molecules such as proteoglycans, thereby organizing the architecture and regulating the mechanical properties of tissues such as cartilage. Hyaluronan provides a highly hydrated environment that is favorable for actively growing, moving, and renewing cells and tissues. It can also activate many signaling events in cells, thereby influencing processes such as apoptosis, adhesion, proliferation, migration, and development of cell shape [8–11].

Cumulus expansion is reportedly also the result of synthesis and accumulation of hyaluronan around the cumulus cells [12–14]. The hyaluronan synthesis of COCs is critically dependent upon two signal events: (1) stimulation by follicle stimulating hormone/equine chorionic gonadotropin (FSH/eCG), and (2) paracrine signals secreted by the oocyte, termed the cumulus expansion-enabling factors (CEEFs). Hyaluronan is synthesized by hyaluronan synthase (HAS), which has been reported to exhibit 3 isoforms (HAS1, HAS2, and HAS3) [15]. Studies on mice,

pigs, and cattle have demonstrated that HAS2 mRNA is strongly expressed in the cumulus cells stimulated by FSH/eCG, and that it controls cumulus expansion [16–18]. A transient increase of intercellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) is triggered by FSH treatment, and dbcAMP, a synthetic analog of cAMP, induces similar effects on hyaluronan synthesis, suggesting that FSH action is mediated by this cyclic nucleotide [19, 20]. In addition to FSH/eCG stimulation, expansion of the COC requires an oocyte-secreted paracrine signal. Studies in vitro have also shown that cumulus cells dissected from mouse COCs and cultured without oocytes do not produce significantly higher amounts of hyaluronan when stimulated with FSH but do so when oocytes or oocyte-conditioned medium are present [12]. In mice, the oocyte-specific member of the transforming growth factor-beta superfamily, growth differentiation factor-9 (GDF-9) and bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) also promote cumulus expansion, suggesting that GDF-9 and/or BMP-15 are CEEFs [21–23]. Thus, synthesis of hyaluronan by mouse cumulus cells requires the combined action of FSH/eCG and CEEFs produced by the oocyte. On the other hand, pig, bovine, and rat oocytes all produce CEEF because they enable the FSH-stimulated expansion of mouse oocyctomized complexes. Nevertheless, the oocyte does not need to be present at the time of cumulus expansion [24–26]; hence, the absolute requirement for the CEEF for cumulus expansion to proceed may be restricted to the mouse.

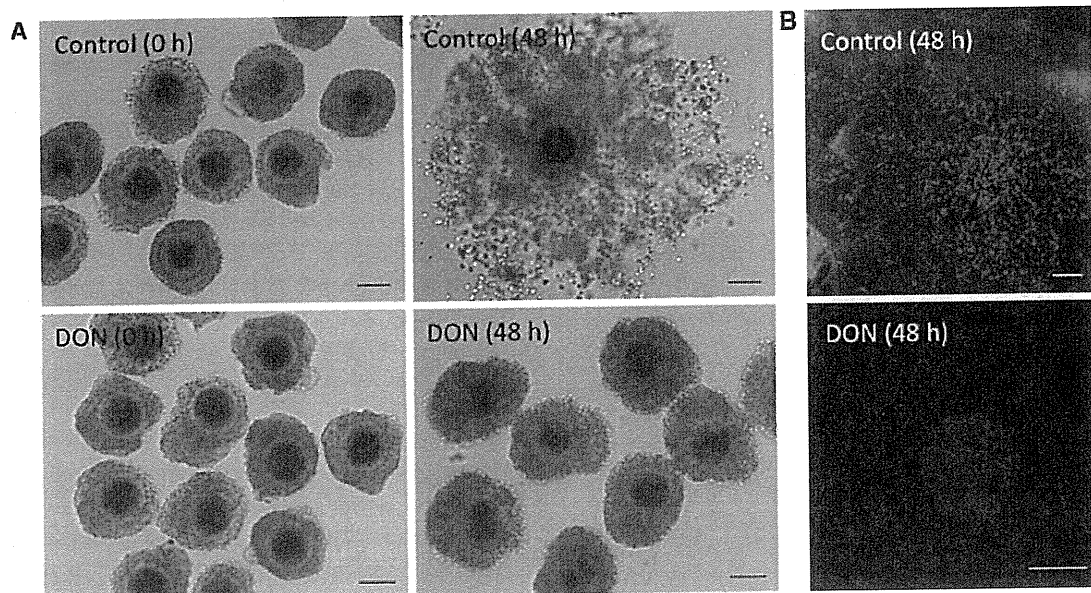


Fig. 1 Accumulation of hyaluronan in cumulus-oocyte complexes (COCs) during cumulus expansion. **a** Morphological observation of cumulus expansion in COCs during in vitro maturation with or

without 6-diazo-5-oxo-1-norleucine (DON). **b** Localization of hyaluronan in porcine COCs as detected by immunofluorescence by using biotinylated hyaluronan-binding protein. Bars 100 μ m