



図1 術前MRI所見
白矢印が子宮内膜

卵を行い、良好胚の凍結を考慮する。また、卵巣の予備能を確認し、良好胚ができるかどうかの判定のためにも、術前の採卵、胚凍結は有用である。術後3カ月で妊娠を許可する。

筋腫が不妊原因かどうか不明の場合は、着床障害の有無を確認するため早期のARTをすすめる。良好胚2回移植にても妊娠に至らない場合は手術をすすめる。できれば凍結胚を確保した上での手術が望ましい。

参考：多発子宮筋腫に対し、筋腫核出術後妊娠、分娩に至った症例

子宮の筋層内、粘膜下に無数の筋腫を認める症例で、特に術後の妊孕性温存を希望する場合は、術中出血、手術の完遂度、術後再発、術後Asherman症候群など、様々な問題を有する。今回われわれは、無数の筋腫に対し、可及的に筋腫核出を行ったのち、妊娠、分娩に至った症例を経験した。

〔症例〕36歳 0回経妊

〔現病歴〕

32歳時、子宮筋腫および貧血指摘されるも、治療は行わず、鉄剤にてフォロー。36歳にな

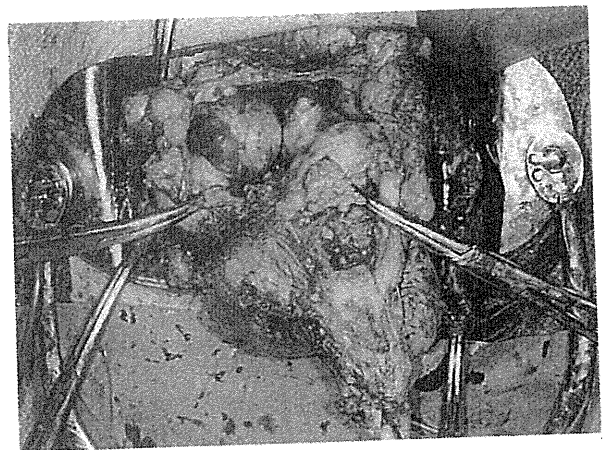


図2 手術時 内腔開放時所見

り、拳児希望出てきたため近医受診。最大径6cmの多発筋腫を認めたため、手術目的に当科紹介受診された。GnRHアゴニスト3course投与、自己血800mL準備した上で開腹子宮筋腫核出術の方針となった。

〔超音波〕

(GnRH投与後)子宮全体で115×81mm 最大の筋腫49×46mm

〔MRI〕

(GnRH投与後)子宮筋層内、粘膜下に最大5cmの無数の筋腫を認める(図1)。

〔手術経過〕

下腹部正中切開約8cmにて開腹。1/100希釈バゾプレッシンを10~20mL局注しながら筋腫核出。途中、インジゴカルミン液をHSG用カテーテルより注入し、子宮内腔を確認しながら開放した(図2)。内膜の損傷を最小限にするべく、厚みを指で確認しながら、突出度の低い筋腫は筋層側から、突出度の高い筋腫は内膜側から切除した。摘出物は24個、225g(図3)。内膜は3-0バイクリル®で修復。筋層は2-0バイクリル®を用いて、止血をしながら3-4層に縫合し、子宮切開部にセプラフィルム®を貼布した。子宮内腔癒着予防のため、FD-1®を挿入。手術時間2時間7分、出血990mL。自己血輸血800mL施行。

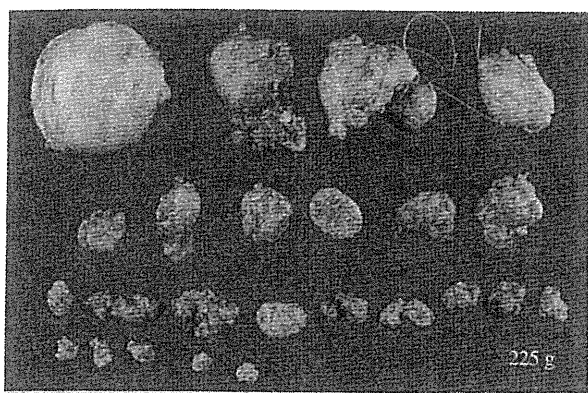


図3 摘出標本

〔術後経過〕

子宮内膜再生の目的に術後エストロゲン製剤投与。術後3カ月FD-1[®]抜去。術後6カ月より妊娠許可し、natural-IUI 2 cycle 行うも妊娠に至らず、早期の妊娠を目指すため、ARTの方針となった。

術後9カ月：子宮鏡検査にて、内腔に突出する小筋腫再発を認めたが、内膜再生の良好な部分も多いため、良好胚移植にて妊娠に至らなければ子宮鏡下手術の方針となった。

術後11カ月：long protocolにてCOH施行。発育卵胞数25個、採卵20個。卵巣過剰刺激症候群(OHSS)回避目的にて、胚移植キャンセル

し、胚盤胞3個を含む、7個の胚を凍結。

融解胚移植の方針としていたが、採卵直後の周期に自然妊娠成立。妊娠中は問題なく経過し、妊娠37週1日、選択的帝王切開術施行。腹腔内に明らかな癒着なく、3,082g女児をスムーズに娩出。

文献

- 1) Pritts EA, et al : Fibroids and infertility : An updated systematic review of the evidence. Fertil Steril 2009 ; 91 : 1215-1223.
- 2) Oliveira FG, et al : Impact of subserosal and intramural uterine fibroids that do not distort the endometrial cavity on the outcome of in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril 2004 ; 81 : 582-587.
- 3) Olive DL, et al : Fibroids and reproduction. Semin Reprod Med 2010 ; 28 : 218-227.
- 4) Yoshino O, et al : Decreased pregnancy rate is linked to abnormal uterine peristalsis caused by intramural fibroids. Hum Reprod 2010 ; 25 : 2475-2479.
- 5) Kuroda K, et al : Surgery-assisted reproductive technology hybrid therapy : A reproductive procedure for an infertile woman of late reproductive age with multiple myomas. J Obstet Gynaecol Res 2009 ; 35 : 827-831.

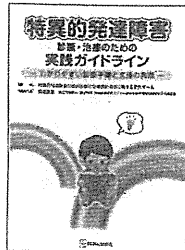
著者連絡先

〒113-8655

東京都文京区本郷7-3-1

東京大学医学部附属病院女性診療科・産科

藤本晃久



特異的発達障害 診断・治療のための実践ガイドライン

特異的発達障害の臨床診断と治療指針作成に関する研究チーム 編

国立精神・神経医療研究センター精神保健研究所知的障害研究部部长 稲垣真澄 編集代表

●B5判・148頁・定価3,990円(本体3,800円)税5% ISBN978-4-7878-1781-5

●特異的読字障害・特異的算数障害の診断用検査シートと詳細な解説から成るガイドライン。特異的発達障害を的確に判断・支援できる、小児科医はもちろん教育関係者も必読の一冊。



診断と治療社

〒100-0014 東京都千代田区永田町2-14-2山王グランドビル4F

電話 03(3580)2770 FAX 03(3580)2776

http://www.shindan.co.jp/ E-mail: eigyobu@shindan.co.jp

Human spermatozoal RNAs

Toshio Hamatani, M.D., Ph.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan

Objective: To provide a focused review of the scientific literature pertaining to spermatozoal RNA.

Design: Review of the literature and appraisal of relevant articles.

Setting: Not applicable.

Patient(s): Infertile male.

Intervention(s): None.

Main Outcome Measure(s): Spermatozoal RNAs as potential epigenetic modifiers in early embryo development and as clinical markers of male infertility.

Result(s): The nucleus of mature spermatozoa contains a complex population of mRNAs and miRNAs despite its transcriptionally inert state.

Conclusion(s): A specific set of functional RNAs are delivered into oocytes during fertilization and are thought to contribute extragenomically to early embryonic development. Even if spermatozoal RNAs is merely residual, it still has the potential to greatly improve the investigative and diagnostic potential of male infertility. (*Fertil Steril*® 2012;97:275-81. ©2012 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Sperm, RNA, miRNA, paramutation, microarray

Over the past decade, it has been documented that the nucleus of mature spermatozoa contains a complex population of RNAs that are transcriptionally inert. Upon fertilization, the spermatozoon delivers specific functional RNAs into the oocyte and these RNAs contribute extragenomically to early embryonic development. Even if spermatozoal RNAs are not proven to be functional, they may still serve as investigational and diagnostic tools for male infertility. Although microscopic evaluation based on sperm count and motility have been primarily used to diagnose male fertility, a normal semen profile does not guarantee fertility. Recently, the global analysis of spermatozoal mRNAs by microarray technologies has further contributed to our understanding of mRNA complexity which ultimately may lead to the discovery of clinical markers for male infertility.

TRANSCRIPTIONAL AND TRANSLATIONAL ACTIVITY IN MATURE SPERMATOZOA

Mammalian spermatogenesis consists of 3 phases of differentiation: mitotic,

meiotic and post-meiotic (spermiogenesis), beginning at the spermatogonial stages to eventual formation of spermatozoa. It includes haploidization and remarkable morphological changes such as the loss of cytoplasm and the formation of the acrosome and flagellum. Spermatozoal DNA, initially packaged by histones, is gradually repackaged by protamines during spermiogenesis (the haploid phase of spermatogenesis) to achieve nuclear compaction (1). By comparison, RNA synthesis, as measured by ³H-uridine incorporation and autoradiography, increases dramatically in early-pachytene spermatocytes and decreases in mid-pachytene spermatocytes. Although RNAs synthesized during meiotic prophase are found in spermatids, transcriptional activity is then continuously shutdown during spermiogenesis to allow chromatin repackaging (2).

Mature spermatozoa have a highly condensed chromatin architecture with protamines and little cytoplasm, which led to the long held view that mature spermatozoa are inert cells. Spermatozoal nuclei contain RNA polymerase

and abundant transcription factors (3), but a recent study by Grunewald et al. (4) failed to show any incorporation of radiolabeled uridine in ejaculated spermatozoa, suggesting a lack of intrinsic transcriptional activity in human mature sperm cells. It is now agreed that transcriptional and translational activities are present in the mitochondria of mature spermatozoa, but not in the cytoplasm (5, 6). Mature spermatozoa had been thought to lack 28S and 18S rRNAs, the essential components of 80S cytoplasmic ribosomes to support translational machinery, however, 18S rRNA, but not the large subunit backbone 28S rRNA, was recently shown to be present in highly purified spermatozoal RNA after rigorous elimination of somatic cells (7). Transmission electron microscopy (TEM) showed a significant number of electron-dense ribosomal structures in the spermatozoal cytoplasm, but they were mostly irregularly dispersed and suggestive of monosomes (7). Taken together, these findings suggest that cytoplasmic ribosomes in mature spermatozoa are not functional. Polysomal fractions contain 55S mitochondrial ribosomes and the incorporation of labeled amino acids into polypeptides during sperm capacitation is inhibited by mitochondrial translation inhibitors but not a cytoplasmic translation inhibitor (8). It is possible that non-functional

Received December 13, 2011; accepted December 20, 2011.

T.H. has nothing to disclose.

Reprint requests: Toshio Hamatani, M.D., Ph.D., Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University School of Medicine, Shinanomachi 35, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan (E-mail: toshiohamatani@z3.keio.jp).

Fertility and Sterility® Vol. 97, No. 2, February 2012 0015-0282/\$36.00

Copyright ©2012 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
doi:10.1016/j.fertnstert.2011.12.035

cytoplasmic ribosomes in spermatozoa ensure that no post-fertilization translation of hazardous transcripts take place (7).

mRNA IN MATURE SPERMATOZOA

The total spermatozoal RNA content per mature sperm is estimated to be 100 fg in rat (9), 5 fg in domestic swine (10), and 10–400 fg in human (11, 12). To ensure that these low levels of spermatozoal RNA are not artifactual, sperm preparation procedures should exclude contamination by somatic and round germ cells. Double swim-up or density gradient centrifugation followed by a hypotonic treatment is usually employed (13). RT-PCR analysis of purified spermatozoal RNA should confirm the absence of somatic cell markers such as CD45 and E-cadherin (14).

The first specific mRNA identified in mature human spermatozoa was c-MYC mRNA (15). Subsequent studies using RT-PCR analysis or in situ hybridization (ISH) have identified a number of specific transcripts in mature human spermatozoa including those encoding protamines, progesterone receptors, estrogen receptors, CYCLIN B1, STAT4, DAZL, SRY, and PLC- ζ (16). Some ISH studies on human spermatozoa demonstrated that RNA is localized at the periphery of the nucleus, close to the nuclear envelope, and constitutes a structural part of the nuclear matrix (9, 17, 18). Other studies show spermatozoal RNAs are located in the mid- and principle piece of the tail (15, 19). The existence of a complex population of mRNAs in mature human ejaculated spermatozoa was also revealed by transcriptomic profiling using oligo DNA microarrays (13).

ROLE OF SPERMATOZOAL RNA

It was thought that spermatozoal RNA is comprised of remnants of untranslated mRNA during spermatogenesis. However, microarray analysis of mRNAs in human ejaculates suggests that the accumulated mRNAs in mature spermatozoa constitute a population of stable full-length transcripts that were consistently expressed from individual men between ejaculates, suggesting selective retention of RNAs during spermatogenesis (13). Furthermore, Miller et al. noted that there was selective retention of particular RNA species, including some that were premeiotically expressed testis-specific protein on the Y chromosome (the TSPY1 transcript can be detected in spermatozoal RNA), whereas the large subunit cytoplasmic 28S rRNAs were either removed or degraded (6). A functional role for these specific RNA species was observed by the finding that they were delivered to mouse oocytes and indeed detected in ensuing zygotes (20, 21). Using the hamster sperm penetration assay, clusterin and protamine-2 transcripts were shown to be consistently detected in human spermatozoa, but not in hamster oocytes, and were also shown to be retained in zygotes at 30 min and at 3 h post-fertilization (22). Spermatozoal transcripts such as the pregnancy-specific β -1-glycoprotein and human leukocyte antigen-E were even detectable 24 h after oocyte penetration (23). Furthermore, RNA encoding PLC- ζ was detected in mature spermatozoa and its injection into mouse eggs causes Ca²⁺ oscillations and egg activation (24). Taken together, these findings suggest that spermatozoal RNAs have an important role in early zygotic and embryonic development.

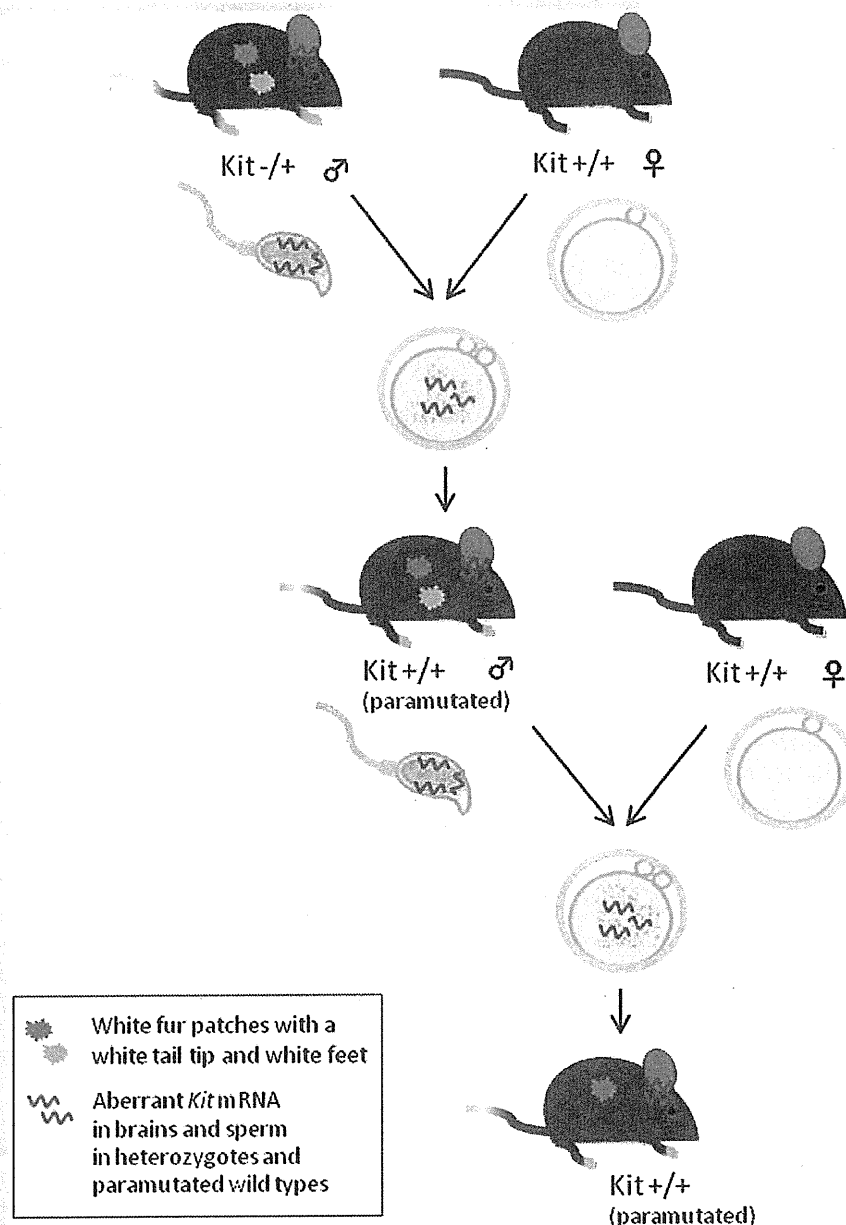
Spermatozoal RNA was shown to have a significant role in paramutations in a study showing that *Kit* mRNA microinjection into oocytes conferred non-mendelian inheritance by reverting the phenotype of a *Kit* tyrosine kinase receptor knockout (21). Paramutation is an allele-dependent transfer of epigenetic information, which results in the heritable silencing of one allele by another. This phenomenon was first observed in maize (25) and subsequently in a variety of plants (26). The *Kit* locus was first identified as an example of a paramutable gene in mice; *Kit*^{+/+} homozygotes born from *Kit*^{-/+} heterozygotes maintained and transmitted the white-spotted phenotype characteristic of the mutant heterozygote to their progeny (Fig. 1). This modified phenotype that has been efficiently inherited from either male or female parents had resulted from a decrease in *Kit* messenger RNA levels with the accumulation of non-polyadenylated RNA molecules of abnormal sizes in brain and testis in the heterozygotes. Although *Kit* transcription was essentially restricted to spermatogonia, with reduced levels in early meiotic cells in wild-type mouse germ cells (27–30), accumulation of the abnormal *Kit* RNA was observed in the mature epididymal sperm of the heterozygotes and paramutated mice. Microinjection of brain and sperm RNA from heterozygous mutants or of *Kit*-specific microRNAs into fertilized oocytes induced a heritable mutant phenotype (21). These experiments illustrated the concept of inheritance via RNA-mediated epigenetic changes and support the notion that the RNA delivered at fertilization can influence embryo development through epigenetic modifiers (16).

A dynamic role of spermatozoal RNAs in epigenetic reprogramming of spermatozoal chromatin was also proposed (31). During spermiogenesis, somatic histones were progressively replaced by transition proteins and then by protamines (32). The histone to protamine exchange process was incomplete, with a small percentage (5–15%) of the genome bound to nucleosomes in human (33, 34). Because RNA was a known component of the nuclear envelope, it is possible that spermatozoal RNA act to stabilize an interaction between the envelope and histone-bound DNA. Spermatozoal RNAs could have a passive role in chromatin reorganization or an active role in delineating or marking DNA sequences for histone packaging. A recent study (35) has shown that nucleosomes retained in sperm were not simply randomly distributed remnants of inefficient protamine replacement, but were instead significantly enriched at many loci important for embryo development, including genes encoding key embryonic transcription factors and signaling pathway proteins. Histones were also significantly enriched at the promoters of miRNAs and imprinted genes (36). Spermatozoal mRNA possibly facilitates the selective escape of nascent potentiated histone-bound sequences from repackaging by protamines, leaving them in the potentiated conformation and setting up the boundaries between protamine- and histone-packaged DNA.

SMALL NON-CODING RNAS INCLUDING MICRO-RNAS (miRNAs) IN MATURE SPERMATOZOA

Post-transcriptional regulation of gene expression via small non-coding RNA molecules, including miRNA, is recognized

FIGURE 1



Paramutable inheritance of a modified phenotype via spermatozoal RNA. White fur patches, a white tail tip, and white feet are characteristic of the mutant heterozygote. Although *Kit* transcription is essentially restricted to spermatogonia and not found in mature spermatozoa, aberrant *Kit* mRNA (non-polyadenylated RNA of abnormal sizes) is accumulated in brain and sperm in the heterozygotes. *Kit*+/+ homozygotes born from *Kit* -/+ heterozygotes maintain and transmit the white-spotted phenotype to their progeny via spermatozoal aberrant *Kit* mRNA.

Hamatani. Human spermatozoal RNAs. *Fertil Steril* 2012.

as an important mechanism in fine-tuning translational regulation during cell differentiation which is highly active during spermatogenesis (37). Increased miRNA levels coincided with the activation of large-scale gene transcription, peaking at the pachytene spermatocyte stage and the post-meiotic stage during spermatid development (38, 39). Very few studies have investigated miRNA expression in testicular tissues and purified populations of germ cells at different stages of maturation. One small scale quantitative RT-PCR (qPCR)

analysis consisted of 28 testis-specific miRNAs in cell populations isolated from mouse testes including Sertoli cells, spermatogonia, pachytene spermatocytes, round and elongating spermatids as well as spermatozoa (38). Microarray analysis has been performed on purified spermatogonia, spermatocytes and spermatids to examine global miRNA expression in these cell populations (40). These two studies revealed that most miRNA were preferentially expressed in the meiotic germ cells, and the former identified miRNAs, such as mir-t19 and

mir-t20, in mature mouse spermatozoa. Another study, using microarray and qPCR analysis, demonstrated that mouse mature spermatozoa contain a broad profile of miRNAs, and that potential mRNA targets of these miRNAs are expressed in metaphase II oocytes (41). However, coinjection of MII oocytes with sperm heads plus anti-miRNAs to suppress miRNA function did not perturb pronuclear activation or preimplantation development. Furthermore, expression levels of miRNAs in spermatozoa were low relative to those in oocytes. Thus, mouse spermatozoa miRNAs are suggested to play only a limited role in fertilization or early preimplantation development (41).

In humans, RNA isolated from the ejaculate spermatozoa of 6 normal fertile men was directly hybridized to detect oligonucleotide arrays containing 10,000 elements (42). This study revealed 68 shared RNAs, some of which were similar to those previously defined as miRNAs (e.g., mir-182), whereas others were the antisense of the previously computer-predicted transcripts. Furthermore, in a recent study RNAs of <200 bases in length were isolated from the ejaculates from three fertile men and used to generate RNAs of 18-30 nucleotides in length to construct sequencing libraries with the next-generation sequencer (43). The total number of reads that mapped to a single location in the human genome was 110,498, 276,923, or 492,096 in each library prepared from the three ejaculates. The bioinformatic analysis characterized multiple classes of small RNAs in human spermatozoa. The primary classes included miRNAs (~7%), Piwi-interacting RNAs (piRNAs) (~17%), and repeat-associated small RNAs that mapped to known repeat sequences including retrotransposon such as long terminal repeat (LTR) and non-LTR (short/long interspersed nuclear element [SINE/LINE]) (~65%). A minor subset of short RNAs within the transcription start site/promoter fraction (~11%) frames were histone promoter-associated regions enriched in genes involved in early embryonic development. piRNAs, originally thought to be absent from mature sperm, were observed for the first time. The sequence reads corresponding to a total of 1,137 piRNAs were shared among the three libraries. It has been proposed that piRNAs protect the genome from the deleterious effects of invasive elements (44) and/or perhaps the means to achieve confrontation and consolidation. In conclusion, the complex and large populations of small non-coding RNAs in human ejaculated spermatozoa might include modifiers of gene expression upon fertilization. Thus, these RNA molecules might play a role in early embryo development and may become potential markers of male fertility.

SPERMATOZOAL RNAs AS CLINICAL MARKERS OF MALE INFERTILITY

Spermatozoal RNA, though designated to be residual and as yet not definitively proven to be involved in early embryo development, may still be useful as biomarkers for predicting male infertility. Protamines play a crucial role in sperm chromatin condensation and protection of the paternal genome from DNA damage. Sperm haplo insufficiency for the protamine-1 (Prm1) or protamine-2 (Prm2) genes resulted in aberrant sperm chromatin condensation and structure that failed to give rise to offspring in mice (45). Human protamine

genes, PRM1 and PRM2, were transcribed in the post-meiotic haploid spermatid, during early stages of spermiogenesis (46). Translation of PRM1 and PRM2 mRNAs were repressed until the elongation stage, leaving small amount of the protamine mRNAs retained in mature human spermatozoa (18). An aberrant PRM1/PRM2 protein ratio in ejaculated spermatozoa of infertile men is considered responsible for an unstable chromatin condensation leading to increased chances of DNA strand breaks (47, 48). In addition, a recent study demonstrated that the PRM1/PRM2 mRNA ratio in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa significantly differ between infertile men and fertile controls (49). Spermatozoa from the same semen sample evidenced higher level of PRM1 mRNA in low motile fractions than in its high motile counterpart (14). Abnormally elevated protamine mRNA retention in ejaculates was often associated with deregulation of protamine translation (50). Furthermore, levels of both PRM1 and PRM2 transcripts in ejaculated spermatozoa were lower in asthenozoospermic men than in fertile controls (51). Thus, protamine mRNAs appear to have a role in the formation of fully functional mature spermatozoa and as such, have potential as a diagnostic tool for male infertility.

Recent progress in RNA amplification methods and microarray platforms has enabled spermatozoa RNAs to be analyzed on a large scale. The global analysis of spermatozoal mRNAs using microarray technologies greatly contributed to the understanding of mRNA complexity in mature spermatozoa, and has revealed specific mRNA patterns that correlate with male fertility and infertility (52-56), teratozoospermia (57), smoking (58), and cryptorchidism effects (59).

Microarray profiling of spermatozoal RNAs from 24 healthy donors identified a series of invariable transcripts that were present in all the donor samples (12). In this study, gene expression in only one sample poorly correlated with the other 23 samples, suggesting that spermatozoal RNA profiling could be clinically applied to mark outliers. Another microarray study identified 157 transcripts in spermatozoa that were either up- or down-regulated in oligozoospermic infertile men compared to normospermic fertile individuals (56). In sperm of oligozoospermic infertile men, there was a remarkable reduction in expression of genes involved in spermatogenesis, sperm motility and germ cells anti-apoptotic process (e.g., *PRM2*, *SPZ-1*, *SPATA-4*, *MEA-1*, *CREM*) as well as a significant decrease in expression of genes involved in DNA repair (e.g., *NIPBL*), oxidative stress regulation (e.g., *PARK7*), and histone modification genes expression (e.g., *DDX3X*, *JMJD1A*) (56). Furthermore, microarray analysis in sperm from fertile and infertile men with normal semen parameters successfully demonstrated significant differences in spermatozoal mRNA profiling (53). Focusing on differentially-expressed genes showing at least a 10-fold difference in expression level, 136 genes were under-expressed but only 3 genes were over-expressed in sperm from infertile men. It was also notable that these genes encoded several ribosomal proteins and spermatogenesis factors that were unlikely to be related to controlling the number of sperm produced.

Garcia-Herrero et al. (60) compared the transcriptomic profile of spermatozoa after intracytoplasmic sperm injection

(ICSI) cycles in an oocyte donation program and compared those that achieved a pregnancy (group P) to those that did not achieve pregnancy (group NP). Among 16,035 sequences that were commonly expressed in group P and NP, only 44 sequences were over expressed in group P versus NP and five in group NP versus P. Notably, the 44 differentially-expressed genes in group P included four cathepsins and six metallo-thioneins. Cathepsins are a family of cystein proteases that likely prevent atrophy of seminiferous tubules and support spermatogenesis to pachytene spermatocytes (61, 62). Metallothioneins, on the other hand, function as detoxicants to prevent tissue damage of testes by heavy metals (63). Furthermore, the ontology analysis found 'embryo development ending in birth or egg hatching' as the top-ranked gene ontology (GO) term for 1,358 exclusively-expressed transcripts in group P. The exclusively-expressed genes corresponding to this GO term include adducin 1 (*ADD1*), activin A receptor type-II like 1 (*ACVRL1*), androgen receptor (*AR*), and aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator (*ARNT*). These genes can be considered as a potential pregnancy success markers rather than potential fertilization makers because of the fact that ICSI skips the physiological process of sperm entry.

In another study, Platts et al. (57) profiled human spermatozoal transcripts from 13 fertile males who had fathered at least one child and compared them to sperm from eight teratozoospermic individuals. The teratozoospermic group lacked RNAs encoded by genes related to the ubiquitin-proteasome pathway and those transcribed at late stages of spermatogenesis including an egg-activating sperm factor *PLCZ1*, acrosomal proteins such as *ACRV1* and *SPAM1*, and non-tubulin components of sperm tails, *ODF1-4*. These findings are indicative of the failure of late-stage spermatogenesis in teratozoospermia. All samples were successfully discerned between normal and teratozoospermic groups by unsupervised hierarchical clustering, suggesting diagnostic accuracy by spermatozoal RNA profiling.

Men with undescended testes have an increased risk of developing germ cell tumors and infertility. A microarray study was performed to identify differential spermatozoal RNA patterns between patients with cryptorchidism and controls. The mean semen volume was similar in controls and patients with cryptorchidism, but the mean sperm density was significantly lower in patients with cryptorchidism than in controls. Only 43 genes were differentially expressed between the two groups. Thirty-eight genes were significantly under-expressed in the cryptorchid samples, including many transcriptional factors (e.g., *CUL3*, *PRM1*, *HSPCD35*) and a testis-specific cell-adhesion gene (*TPX-1*) involved in germ cell maturation and sperm tail formation. By comparison, an anti-apoptotic gene (*TNFAIP3*) was highly over-expressed in the cryptorchid samples compared to controls.

Paternal exposure to genotoxic compounds is thought to contribute to diseases in the offspring. Transcriptomic profiles of ejaculated spermatozoa from four cigarette smokers were compared with four non-smokers. A total of 781 genes were found to be differentially expressed in spermatozoa of smokers compared to non-smokers. An additional 200 genes, including *SALF* and *TRIM26*, were selected on the basis of the

positive correlation between their expression levels and the concentration of cotinine in seminal plasma. Pathway analysis showed an enrichment in the spermatozoa of smokers of NF κ B regulated genes that plays a central role in stress response. Thus in this instance, spermatozoal RNAs could also be useful biomarkers of male germ cell exposure to genotoxins.

The global analysis of spermatozoal mRNAs using microarray technologies has been employed to explore clinical markers for male infertility. However, an appropriate study design with a larger number of biological replicates rather than technical ones is necessary for accuracy and reproducibility of microarray data. It is also necessary to prepare sperm samples to eliminate contamination with somatic and round germ cells. If the genes identified as sperm quality markers by microarray studies are successfully attributed to pathogenesis of male infertility, then the microarray strategy could be used as a clinical diagnostic tool for male infertility.

CONCLUSION

The nucleus of mature spermatozoa contains a complex population of mRNAs and miRNAs despite its transcriptionally inert state. A specific set of functional RNAs are delivered into oocytes during fertilization and are thought to contribute extra genomically to early embryonic development (e.g., paramutation phenomenon). Even if spermatozoal RNAs are merely residual, they still have the potential to greatly improve the investigative and diagnostic potential of male infertility. Recent advances in microarray technologies have enabled global analyses of spermatozoal mRNAs and have contributed further to the understanding of mRNA complexity and to the discovery of clinical markers for male infertility. Spermatozoal RNA profiling has the potential to identify sperm-related factors required for early development.

REFERENCES

1. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction* 2010;139:287-301.
2. Dadoune JP, Siffroi JP, Alfonsi MF. Transcription in haploid male germ cells. *Int Rev Cytol* 2004;237:1-56.
3. Pittoggi C, Magnano AR, Sciamanna I, Giordano R, Lorenzini R, Spadafora C. Specific localization of transcription factors in the chromatin of mouse mature spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 2001;60:97-106.
4. Grunewald S, Paasch U, Glander HJ, Anderegg U. Mature human spermatozoa do not transcribe novel RNA. *Andrologia* 2005;37:69-71.
5. MacLaughlin J, Terner C. Ribonucleic acid synthesis by spermatozoa from the rat and hamster. *Biochem J* 1973;133:635-9.
6. Miller D, Ostermeier GC. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. *Hum Reprod Update* 2006;12:757-67.
7. Cappallo-Obermann H, Schulze W, Jastrow H, Baukloh V, Spiess AN. Highly purified spermatozoal RNA obtained by a novel method indicates an unusual 28S/18S rRNA ratio and suggests impaired ribosome assembly. *Mol Hum Reprod* 2011;17:669-78.
8. Gur Y, Breitbart H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. *Genes Dev* 2006;20:411-6.
9. Pessot CA, Brito M, Figueroa J, Concha II, Yanez A, Burzio LO. Presence of RNA in the sperm nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;158:272-8.
10. Yang CC, Lin YS, Hsu CC, Wu SC, Lin EC, Cheng WT. Identification and sequencing of remnant messenger RNAs found in domestic swine (*Sus scrofa*) fresh ejaculated spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2009;113:143-55.

11. Goodrich R, Johnson G, Krawetz SA. The preparation of human spermatozoal RNA for clinical analysis. *Arch Androl* 2007;53:161–7.
12. Lalancette C, Platts AE, Johnson GD, Emery BR, Carrell DT, Krawetz SA. Identification of human sperm transcripts as candidate markers of male fertility. *J Mol Med* 2009;87:735–48.
13. Ostermeier GC, Dix DJ, Miller D, Khatri P, Krawetz SA. Spermatozoal RNA profiles of normal fertile men. *Lancet* 2002;360:772–7.
14. Lambard S, Galeraud-Denis I, Martin G, Levy R, Chocat A, Carreau S. Analysis and significance of mRNA in human ejaculated sperm from normozoospermic donors: relationship to sperm motility and capacitation. *Mol Hum Reprod* 2004;10:535–41.
15. Kumar G, Patel D, Naz RK. c-MYC mRNA is present in human sperm cells. *Cell Mol Biol Res* 1993;39:111–7.
16. Dadoune JP. Spermatozoal RNAs: what about their functions? *Microsc Res Tech* 2009;72:536–51.
17. Dadoune JP, Pawlak A, Alfonsi MF, Siffroi JP. Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculate spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 2005;11:133–40.
18. Wykes SM, Visscher DW, Krawetz SA. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 1997;3:15–9.
19. Modi D, Shah C, Sachdeva G, Gadkar S, Bhartiya D, Puri C. Ontogeny and cellular localization of SRY transcripts in the human testes and its detection in spermatozoa. *Reproduction* 2005;130:603–13.
20. Hayashi S, Yang J, Christenson L, Yanagimachi R, Hecht NB. Mouse preimplantation embryos developed from oocytes injected with round spermatids or spermatozoa have similar but distinct patterns of early messenger RNA expression. *Biol Reprod* 2003;69:1170–6.
21. Rassoulzadegan M, Grandjean V, Gounon P, Vincent S, Gillot I, Cuzin F. RNA-mediated non-mendelian inheritance of an epigenetic change in the mouse. *Nature* 2006;441:469–74.
22. Ostermeier GC, Miller D, Huntriss JD, Diamond MP, Krawetz SA. Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature* 2004;429:154.
23. Avendano C, Franchi A, Jones E, Oehninger S. Pregnancy-specific {beta}-1-glycoprotein 1 and human leukocyte antigen-E mRNA in human sperm: differential expression in fertile and infertile men and evidence of a possible functional role during early development. *Hum Reprod* 2009;24:270–7.
24. Sone Y, Ito M, Shirakawa H, Shikano T, Takeuchi H, Kinoshita K, et al. Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:690–4.
25. Brink RA. A Genetic Change Associated with the R Locus in Maize Which Is Directed and Potentially Reversible. *Genetics* 1956;41:872–89.
26. Chandler VL, Stam M. Chromatin conversations: mechanisms and implications of paramutation. *Nat Rev Genet* 2004;5:532–44.
27. Manova K, Nocka K, Besmer P, Bachvarova RF. Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1990;110:1057–69.
28. Motro B, van der Kooy D, Rossant J, Reith A, Bernstein A, Sorrentino V, et al. Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1991;113:1207–21.
29. Sorrentino V, Giorgi M, Geremia R, Besmer P, Rossi P, Manova K, et al. Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Oncogene* 1991;6:149–51.
30. Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, et al. Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis Contiguous patterns of c-kit and steel expression: analysis of mutations at the W and Sl loci Expression of the c-kit proto-oncogene in the murine male germ cells Gonadal expression of c-kit encoded at the W locus of the mouse. *Development* 1998;125:4585–93.
31. Miller D, Ostermeier GC, Krawetz SA. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends Mol Med* 2005;11:156–63.
32. Brewer L, Corzett M, Balhorn R. Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J Biol Chem* 2002;277:38895–900.
33. Tanphaichitr N, Sobhon P, Taluppeth N, Chalermisarachai P. Basic nuclear proteins in testicular cells and ejaculated spermatozoa in man. *Exp Cell Res* 1978;117:347–56.
34. Wykes SM, Krawetz SA. The structural organization of sperm chromatin. *J Biol Chem* 2003;278:29471–7.
35. Hammoud SS, Nix DA, Zhang H, Purwar J, Carrell DT, Cairns BR. Distinctive chromatin in human sperm packages genes for embryo development. *Nature* 2009;460:473–8.
36. Carrell DT, Hammoud SS. The human sperm epigenome and its potential role in embryonic development. *Mol Hum Reprod* 2009;16:37–47.
37. McIver SC, Roman SD, Nixon B, McLaughlin EA. miRNA and mammalian male germ cells. *Hum Reprod Update* 2012;18:44–59.
38. Ro S, Park C, Sanders KM, McCarrey JR, Yan W. Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Dev Biol* 2007;311:592–602.
39. Yan N, Lu Y, Sun H, Tao D, Zhang S, Liu W, et al. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction* 2007;134:73–9.
40. Marcon E, Babak T, Chua G, Hughes T, Moens PB. miRNA and piRNA localization in the male mammalian meiotic nucleus. *Chromosome Res* 2008;16:243–60.
41. Amanai M, Brahmajosyula M, Perry AC. A restricted role for sperm-borne microRNAs in mammalian fertilization. *Biol Reprod* 2006;75:877–84.
42. Ostermeier GC, Goodrich RJ, Moldenhauer JS, Diamond MP, Krawetz SA. A suite of novel human spermatozoal RNAs. *J Androl* 2005;26:70–4.
43. Krawetz SA, Kruger A, Lalancette C, Taggett R, Anton E, Draghici S, et al. A survey of small RNAs in human sperm. *Hum Reprod* 2011;26:3401–12.
44. O'Donnell KA, Boeke JD. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* 2007;129:37–44.
45. Cho C, Willis WD, Goulding EH, Jung-Ha H, Choi YC, Hecht NB, et al. Haploinsufficiency of protamine-1 or -2 causes infertility in mice. *Nat Genet* 2001;28:82–6.
46. Steger K, Klonisch T, Gavenis K, Drabent B, Doenecke D, Bergmann M. Expression of mRNA and protein of nucleoproteins during human spermiogenesis. *Mol Hum Reprod* 1998;4:939–45.
47. Balhorn R, Reed S, Tanphaichitr N. Aberrant protamine 1/protamine 2 ratios in sperm of infertile human males. *Experientia* 1988;44:52–5.
48. Aoki VW, Emery BR, Liu L, Carrell DT. Protamine levels vary between individual sperm cells of infertile human males and correlate with viability and DNA integrity. *J Androl* 2006;27:890–8.
49. Steger K, Wilhelm J, Konrad L, Stalf T, Greb R, Diemer T, et al. Both protamine-1 to protamine-2 mRNA ratio and Bcl2 mRNA content in testicular spermatids and ejaculated spermatozoa discriminate between fertile and infertile men. *Hum Reprod* 2008;23:11–6.
50. Aoki VW, Liu L, Carrell DT. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. *Mol Hum Reprod* 2006;12:41–50.
51. Kempisty B, Depa-Martynow M, Lianeri M, Jedrzejczak P, Darul-Wasowicz A, Jagodzinski PP. Evaluation of protamines 1 and 2 transcript contents in spermatozoa from asthenozoospermic men. *Folia Histochem Cytobiol* 2007;45(Suppl 1):S109–13.
52. Lalancette C, Miller D, Li Y, Krawetz SA. Paternal contributions: new functional insights for spermatozoal RNA. *J Cell Biochem* 2008;104:1570–9.
53. Garrido N, Martinez-Conejero JA, Jauregui J, Horcajadas JA, Simon C, Remohi J, et al. Microarray analysis in sperm from fertile and infertile men without basic sperm analysis abnormalities reveals a significantly different transcriptome. *Fertil Steril* 2009;91:1307–10.
54. Garcia-Herrero S, Meseguer M, Martinez-Conejero JA, Remohi J, Pellicer A, Garrido N. The transcriptome of spermatozoa used in homologous intrauterine insemination varies considerably between samples that achieve pregnancy and those that do not. *Fertil Steril* 2009;94:1360–73.
55. 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.
56. Montjean D, De La Grange P, Gentien D, Rapinat A, Belloc S, Cohen-Bacrie P, et al. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet* 2011. Epub October 12, 2011.

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 満穂
YAMADA Mifichitoshi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く、

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の数になったことよって、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¹¹⁻¹⁴⁾。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
単胎	1.30	1.20-1.41	1.39	1.26-1.53
多胎	0.92	0.91-1.15	0.90	0.70-1.21
生後追加不妊期間	1.05	0.91-1.15	1.12	0.99-1.28
上記に追加母体の喫煙	1.04	0.96-1.16	1.12	0.98-1.27
単胎	1.07	0.95-1.21	1.11	0.95-1.29
多胎	0.86	0.79-1.06	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	4.9	3.0-8.0
無脳症	3	0.6	7.8	2.5-7.1
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	69	28.5	2.4	1.9-3.1
心大血管奇形(動脈管閉鎖・第一鎖動脈を除く)	262	51.7	1.7	1.5-2.0
重度心大血管奇形	60	24.2	2.1	1.5-2.8
孤発性のVSD、ASD	156	61.1	2.6	2.2-3.1
後鼻孔閉鎖	7	1.6	4.6	1.9-9.8
消化管閉鎖	55	28.8	1.9	1.5-2.5
食道閉鎖	16	4.7	4.0	2.6-6.3
小腸閉鎖	19	3.3	6.4	4.2-9.6
鎖肛	23	5.2	4.7	3.2-6.9
膈嚢破裂	3	4.8	1.8	0.9-3.6
小頭症	10	10.2	1.0	0.9-1.1
四肢欠損	14	9.7	1.5	0.8-2.6
尿道下裂	75	44.5	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⁹⁾。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
生胎週数		
<32	1.21	0.93-1.58
<37	1.18	1.05-1.28
出生体重		
<1,500g	1.06	0.78-1.45
<2,500g	1.07	0.96-1.21
≥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、癌発生の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。

■ 遺伝子 ゲノムインプリンティング異常

ゲノムインプリンティングとは、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とインプリンティング異常の関連が議論されたのは、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ティング遺伝子である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

インプリンティング異常がART治療のどの段階で起きるかについては、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ティ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患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¹⁶⁾。

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に、症例がさらに加えられるれば危険性が再確認されることもありうる。

■ 関連 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人の子どもを対象とした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供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度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が有意に優れており, 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) Filippini 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, Dablquist 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

S-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 Naoshi井上 治
INOUE Osumu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 恭典**
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

悪性腫瘍患者の治癒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見てみると、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いことから、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 卵巣に悪性腫瘍転移の可能性がある場合	技術的に成熟 悪性細胞再移植の危険なし	保存卵子数が少ない
卵巣凍結	性成熟期の女性	保存卵子数多い 自然妊娠が可能	技術的に未成熟 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%に自然発来のもので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