

## 総括研究報告書

課題番号：28-7

課題名：生殖補助医療の安全性評価に関する研究：日本産婦人科学会登録ビックデータ（2007～2013年）を用いた調査研究と実証試験

齊藤英和 国立成育医療研究センター  
周産期・母性診療センター  
副周産期・母性診療センター長

（研究成果の要約）本年度は、凍結融解胚移植が新生児出生体重に与える影響を検討し、さらに染色体異常の発症リスクを新鮮胚移植と比較検討した。さらに、累積妊娠率による評価のためには同一症例の複数年にわたる経過がデータとして収集できている必要があるため、徳島大学病院での成績をサンプルとして解析したところ、累積妊娠率は、患者年齢や採卵数により大きくことなり、これまでの周期あたりの成績と傾向は同じであるが、より実際の臨床に有用なデータとなることが示された。また、全国の連携医療機関から、染色体異常、インプリンティング疾患が疑われる患者と不妊症患者のゲノム DNA と臨床情報を集積した。これらの症例のゲノム・エピゲノム解析を行い、疾患発症機序を明らかとした。また、ヒトの性分化疾患原因遺伝子を欠失させたモデルマウスを作出し、その表現型を解析した。これにより、生殖に関与する新規遺伝子ネットワークについての情報が得られた。今後、これらの情報をもとに、児の健康に影響を与える母体因子や ART 手技を解明する。

## 1. 研究目的

我々はこれまで、生殖補助医療（以下 ART）が出生児の予後に与える影響について報告してきた。その中で、凍結融解胚移植後妊娠と新鮮胚移植後妊娠を比較して、正産期の出生児は出生体重が約 100 g 重くなることを報告した。また、胚の培養期間を胚盤胞まで延長することや、胚移植時にホルモンの補充を行うことにより、このリスクが低減されることを示してきた。一方、自然周期での採卵・新鮮胚移植は、卵巣刺激下に採卵・移植した場合と比較して低出生体重児（2,500 g 未満）となるリスクが増加することが知られている。以上の結果は、ART が児の予後に影響を及ぼすことを示唆している。

さらに昨年の解析から、ホルモン補充周期（以下、HRT 周期）での胚移植後妊娠は、自然排卵周期移植後妊娠と比較し

て、分娩時に帝王切開術の頻度が増加することが示唆された。帝王切開術は分娩に対する人為的介入であるため、母体の周産期予後に関わる一方で、児の出生時体重にも大きく影響を与える。一般的に帝王切開はその適応により、施行週数が異なる。骨盤位や胎盤の位置異常など、陣痛開始前に把握されている病態に対しては、通常妊娠 38 週までに介入が行われる。これらの群では、児の出生時体重は自然経過の後に経膈分娩した例と比較して小さくなる。

胚移植周期における母体の内分泌環境は、子宮の内膜および胎盤の形成に関わり、胚の培養、凍結融解操作は胎児のエピジェネティクスに影響を及ぼす可能性が報告されているものの、これら治療と出生児の予後に関しては十分に検討されておらず、治療により新生児の出生体重

に差が出る原因は未だ明らかではない。我々が以前に行った凍結融解胚を移植した場合の出生体重の増加についても、一時的な傾向なのか、連続して続いているのか、さらに出生前後の疾患発症、特に染色体異常の発症頻度に対する影響といった解析可能な課題についても、対象サンプル数が少ないために検体数を増えるのを待っての解析が必要であった。

そこで本年は、凍結融解胚移植が児の体重および染色体異常の発症に与える影響を明らかにすることを目的として解析を行った。解析対象を過去の2年分(2007、2008年)から、過去6年分(2007~2012年)に拡大して新生児の出生体重への影響および染色体異常の発症リスクについて詳細に検討した。

## 2. 研究組織

研究者	所属施設
齊藤 英和	国立成育医療研究センター
宮戸 健二	同上
深見 真紀	同上
苛原 稔	徳島大学

## 3. 研究成果

### 1) 妊孕性知識啓発の長期的効果に関する検討

本年度は、2007年から2011年の各年における胚移植あたり妊娠率を、新鮮移植および融解移植、胚の移植ステージ、個数別に検討した。

ARTにおける妊娠率、成功率の指標として用いられている「移植あたりの妊娠率」は、胚の状態(移植ステージ)および移植胚の数により変化するが、おおむね患者年齢の上昇とともに、その率は顕著に減少する。今回用いたデータは解析対象となるデータの母数が大きく、年齢、移植ステージなどの各要素別にサブ解析を実施しても、十分な統計的パワーを有しており、様々なサブ解析として有用かつ信頼性のあるデータを示すことが可能であった。一方、後方視的解析であること、データに含まれない患者背景や、施設、医師による方針の違いなどが解析結果に影響を与えている可能性を考慮しなければならない。

2008年のSET導入の影響を確認するためには、2胚移植(Double Embryo transfer, DET)が普遍的であった2007年データの

特徴を確認することが重要である。2007年当時、新鮮周期(初期胚移植、胚盤胞移植)および凍結初期胚移植においてはSETよりDETの成績が上回り、治療成績を上昇させるために複数胚を移植することの有効性が示され手いる。一方、凍結胚盤胞移植ではSET,DET間の差が少なく、凍結胚盤胞移植においては、予後不良と思われる症例や胚の質が良好でない場合にDETが行われる傾向があったと推測される。SETが導入された2008年以降のデータでは、SETとDETの差が少なくなり、場合により逆転していることも、同様の背景が影響していると推測される。

一般的に初期胚より胚盤胞の成績は上回るが、患者背景が同一ではないことや、施設毎の判断基準が異なることも考慮する必要がある。新鮮胚と凍結胚の比較においても、同様である。

新鮮/凍結、移植ステージ、移植胚数をそろえ、各年毎の成績を比較すると、SET導入後の2008年以降は、おおむね年齢別の妊娠率に変化はなく、ART技術の向上には一定の限界があることが示唆される。凍結移植の場合、2009年以降の成績が上昇する傾向があり、凍結周期に関わる技術の向上か、全凍結や背景因子の影響に関して、詳細な検討が必要と考えられる。全凍結周期の影響を考慮した検討のために、2014年以降のデータには各データの連結項目が含まれており、これらの要因を含む検討が今後の課題である。

### 3) 凍結胚治療による新生児の体重増加の分子機構の解明

モデル動物としてC57BL/6マウスの精子と卵を体外授精させることによって凍結胚を作製し、メタボローム解析および遺伝子発現解析用に用いた。また、胚移植によって得られた産仔の体重について経時的に測定し、同様の体重増加が凍結融解によって引き起こされるかどうか、その後の成長曲線について検討を行った。

### 4) 凍結胚治療が児に与える染色体レベルでの影響および不妊症の分子基盤の解明

#### (イ) 検体集積

平成28年度-29年度において、合計150例以上のインプリンティング疾患疑い症

例の検体を集積した。また、成長障害や先天奇形を呈する症例を1000例以上集積した。

#### (ロ) DNA メチル化解析

30例において疾患原因となるDNAメチル化異常を同定した。またインプリンティング疾患における多座位インプリンティング異常を同定した。さらに、精子形成過程で生じる複雑ゲノム再構成が卵巣機能障害の原因となることを明確とした。また、常染色体劣性性腺機能不全に関与する新規遺伝子変異を同定した。

#### (ハ) ゲノムコピー数解析と染色体構造解析

原因不明の胎児発育障害患者において、多彩なゲノム再構成を同定した。現在これらの病的意義の検討を進めている。

#### (ニ) モデル動物の解析

Maml1 欠失マウスの表現型解析から、精子形成において MAMLD1 が関与する新規遺伝子ネットワークが存在する可能性を見出した。

#### 5) 年齢と累積妊娠率の関連性

移植周期回数ごとの妊娠率、および全体の累積妊娠率では、移植回数による妊娠率の低下は顕著では無いが、5回目の移植後は、妊娠例の実数としての増加は限定的であり、5回胚移植までの累積妊娠率が、累積妊娠率として有用であることが示唆された。

採卵個数が16個以上の群と10-15個の群に累積妊娠率の有意差を認めなかったが、採卵数が9個以下の群では、採卵数と累積妊娠率の間に関連性を認めた。年齢では、32歳以下の群と33-36歳の群に累積妊娠率の有意差を認めなかったが、37歳以上の群では、年齢と累積妊娠率の間に関連性を認めた。

#### 4. 研究内容の倫理面への配慮

本研究の遺伝子解析研究は、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守して実施した。研究参加への同意は全て患者本人もしくは両親から書面で取得され、同意書および患者と匿名化番号の対応表は、個人情報管理者により厳重に保管されている。この規定の遵守については、毎年、外部委員の監査を受けている。

本研究に関し、下記課題が承認されている。

(1) 性分化疾患・性成熟疾患・生殖機能障害における遺伝的原因の探索 (国立成育医療研究センター課題番号512; 代表 深見真紀)

(2) 卵巣機能不全の分子基盤の探索 (国立成育医療研究センター課題番号646; 代表 深見真紀)

実験動物を用いる研究については、国立成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施した(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめた。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮を行った。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行った。ヒト精漿タンパク質の使用について倫理委員会から承認された(女性の生理機能に影響を与える男性由来タンパク質および脂質の探索と作用機序の解明 宮戸健二 受付番号821)。

臨床データ解析に関しては、治療に必要な既に検査された値の解析のみである。マウスを用いた実験については、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う予定である。