


学 位 論 文 の 要 旨

専攻名	物質生産工学専攻	ふりがな 氏名	おおつ えいこ 大津 英子	
学位論文題目	受精卵核をターゲットとした FISH 法の生殖補助医療への応用			
<p>現在、日本における出生児の55人に1人が体外受精児であることが報告されており、生殖補助医療は大変身近なものになっている。しかし、その妊娠率は30%程度に停滞しており、流産率も約30%と高率といった問題を抱えている。そのため多くの臨床医や研究者が、新しい技術を考案し、それを生殖補助医療に応用している。しかし、それら新しい技術の安全性の確認は、実際に児が出生するまではほとんど行われていないといった問題がある。この安全性を臨床応用前に明らかにすることができれば、生殖補助医療の高度化が可能となる。染色体の数的異常や構造異常の解析に利用されている FISH法 (fluorescence in situ hybridization) は、生体組織などを破壊せずに目的のタンパク質や遺伝子を特異的に蛍光染色し、検出する方法である。この方法は、細胞周期に関わらず使用できるという利点があり、生殖補助医療技術の臨床応用前での検討に有利な方法である。また、FISH法は着床前診断にも応用することができることから、診断率向上のために有効であると期待される。本研究においては、このFISH法を利用して、近年求められるようになった胚の再凍結についての安全性を臨床応用前に明らかにすると共に、着床前診断への応用について検討した。着床前診断については、ヒト胚の割球サイズと核の有無について、割球のサイズと染色体構造に相関について、臨床での診断効率について検討した。</p> <p>胚の凍結融解は広く臨床応用されている現状にあるが、凍結融解時に細胞融合によって、染色体異常細胞が増加するとの懸念がある。1度の凍結融解では現在のところ児の異常率に差は認められていないが、複数回に及ぶ凍結融解に関する安全性は不明である。このことをふまえ、本研究では、インフォームドコンセントにより実験使用に同意された胚を使用して、2度にわたる凍結融解による染色体異常率の変化を調査した。胚盤胞期胚では細胞数が多く、従来のギムザ染色をおこなう染色体検査は困難であり、またすべての細胞を染色体中期とすることは今までは不可能であった。しかし、FISH法を使用することで、胚盤胞期胚のすべての細胞の検査が可能となった。結果として、本研究では、染色体異常率は増加しないことを明らかにし、再凍結胚の安全性に問題がないことを証明した。</p> <p>着床前診断は国内において、日本産科婦人科学会倫理委員会の承認のもと臨床研究という形でのみ許可されている。理由は倫理的問題もあるが、診断の確実性が未だ疑問視されているという点も挙げられる。診断のための生検は、通常8分割期である受精後3日目に行われる。しかし、ヒト胚は細胞サイズの均等な8分割であることは少なく、多くの胚は細胞の大小不同やフラグメンテーションが認められる。ある程度の大きさの割球でも無核のフラグメンテーションである場合が考えられ、固定の失敗と誤認されることがある。このため本研究ではまず、割球のサイズと核の有無についてFISH法を用いて検討した。結果として通常の大さの割球でも無核のフラグメンテーションの場合があり、生検時には核膜に覆われた核が、確実に存在する割球の採取の重要性が明らかとなった。</p>				

ヒト初期胚（主に分割期胚）では、同一胚中の細胞であっても、異なる染色体構造を持つことが比較的高頻度に認められる。これは、染色体モザイクといわれ、誤診の最大の原因とされる。本研究では割球のサイズと染色体構造に相関があるか調査を行った。結果として、最大の割球の直径が同一胚内割球直径平均値の2倍以下の細胞を持つ軽度の大小不同の胚では染色体構造に差は認められなかった。しかし、最大の割球の直径が同一胚内割球直径平均値の2倍以上の細胞を持つ重度の大小不同が認められた胚の大割球中には、多倍体が多く観察され、生検時には注意が必要であることを見出した。

以上の着床前診断に関する検討を考慮し、臨床での診断率について検討した。3倍体と4倍体のモザイク胚の事前の予測は困難であったが、核が目視できる細胞のみ生検することにより診断効率（固定率）は100%であり、正診率も100%（3/3）であることを明らかにした。

以上のように、本研究ではFISH法を用いることによって、胚盤胞期胚のすべての細胞の検査が可能となり、再凍結胚の安全性に問題がないことを証明し、着床前診断に関して有用な知見を見出した。これらの成果は、生殖補助医療において、有益な知見となり得ると期待できる。

学位論文審査結果の要旨

専攻	物質生産工学専攻	氏名	大津 英子
論文題目	受精卵核をターゲットとした FISH 法の生殖補助医療への応用		
主査	氏家 誠司		
審査委員	飯尾 心		
審査委員	豊田 昌宏		
審査委員	楢原 久司		
審査委員	酒井 謙二		
審査委員	石川 雄一		
審査結果の要旨 (1000 字以内)			
<p>本論文においては、非破壊で目的のタンパク質や遺伝子などを特異的に蛍光染色し、検出する方法である FISH 法 (fluorescence in situ hybridization) が細胞周期に関わらず使用できることを利用して、受精卵核をターゲットとした研究成果をまとめている。本論文の内容は、2つの研究内容に分けられる。一つは、FISH 法を用いて近年求められるようになった胚の再凍結についての安全性を臨床応用前に明らかにすることを試みた研究であり、もう一方は、着床前診断への FISH 法の応用についての研究である。これらの研究によって、FISH 法を利用することによって、胚盤胞期胚のすべての細胞の検査が可能となり、再凍結胚の安全性に問題がないことを証明し、ヒト胚の割球のサイズと染色体構造の相関および臨床での診断効率について、着床前診断の事例に際して処置方針を判定する有用な知見を見出した。</p> <p>本論文の研究成果は、生殖補助医療において受精卵核をターゲットとした FISH 法を適切に用いることで、安全性や効率性の向上に資する有益な知見を見出したことである。特に、今まで行われてこなかった臨床応用前における生殖補助医療技術の安全性を明らかにし、着床前診断に関しても処置方針を判定するための診断法の開発において重要な成果をあげている。以上のように、本研究では、FISH 法の生殖補助医療への有用性を明らかにしており、今後の生殖補助医療技術の向上に寄与するところが大きいものとする。よって、本研究は博士 (工学) の学位論文に値するものと認める。</p>			