

生殖補助医療のための高い着床能を  
有するヒト胚の非侵襲的選抜に  
関する研究

**Studies on noninvasive selection of  
human embryos with high  
implantation potential for assisted  
reproductive technology**

溝部 大和  
2017

# 目次

頁

略語一覧・・・ 1

## 要約

要旨・・・ 3

英文要旨・・・ 5

第 I 章 序論・・・ 7

## 第 II 章 ICSI を用いて細胞膜が脆弱な卵子から作出した胚の発育能

緒言・・・ 13

材料および方法・・・ 14

結果・・・ 16

考察・・・ 17

## 第 III 章 ヒト胚の初期卵割様式がその後の体外発生および着床に及ぼす影響

緒言・・・ 27

材料および方法・・・ 28

結果・・・ 30

考察・・・ 31

## 第IV章 適切なコンパクション時間に基づいた高い着床能を有するヒト胚盤胞

### の選抜

緒言	43
材料および方法	44
結果	46
考察	47
総括	55
謝辞	56
参考文献	57

# 略語一覧

AMH (Anti-Mullerian hormone)	抗ミュラー管ホルモン
ART (assisted reproductive technology)	生殖補助医療
COH (controlled ovarian hyperstimulation)	調節卵巣刺激
E <sub>2</sub> (estradiol)	エストラジオール
FSH (follicle stimulating hormone)	卵胞刺激ホルモン
GnRH (gonadotropin-releasing hormone)	性腺刺激ホルモン放出ホルモン
hCG (human chorionic gonadotropin)	ヒト性腺刺激ホルモン
hMG (human menopausal gonadotropin)	ヒト閉経期尿性ゴナドトロピン
HTF (human tubal fluid)	ヒト卵管液
ICSI (intracytoplasmic sperm injection)	卵細胞質内精子注入法
IVF ( <i>in vitro</i> fertilization)	体外受精

LH (luteinizing hormone)

黄体形成ホルモン

OHSS (ovarian hyperstimulation syndrome)

卵巣過剰刺激症候群

PZD (partial zona dissection)

透明帯部分切除法

SUZI (subzonal insemination of sperm)

囲卵腔内精子注入法

# 要旨

体外で精子、卵子および胚を操作する生殖補助医療 (Assisted reproductive technology: ART) は、不妊症の最も重要な治療法となっている。ART の最終目的は患者の妊娠および産子の獲得であるが、近年では、患者の高齢化に伴って採取可能な卵子数が減少することや採取された卵子の質が低下することにより、妊娠や出産に至らない症例が増加している。また、ART においては自然妊娠と比較して多胎妊娠率が高い傾向にあるため、日本産科婦人科学会の指針により移植する胚は基本的に単一とされている。以上のことから、上記の目的を達成するためには、採取された卵子を有効活用してできるだけ多くの胚を作出した後、その中から最も質の高い胚を選抜して移植する技術を確認することが重要となる。そこで本研究では、最初に卵子の有効活用を目的として、ART の主要技術である顕微授精を実施している際にしばしば観察される細胞膜が脆弱な卵子の受精能、体外発生能および妊孕能について検討した。その結果、細胞膜が脆弱な卵子は受精能が低く変性しやすいが、受精後の体外発生率および妊娠率は正常な細胞膜を有する卵子に由来する胚と同等であることが明らかになった。このことから、細胞膜が脆弱な卵子も ART に使用できることが示された。次に質の高い胚の選抜を目的として、胚盤胞への体外発生能が高い胚にみられる発生初期段階の特徴について調べた。さらに、高い妊娠率を得るためには選抜した胚をどの発生段階で移植すれば良いか検討した。その結果、不均等分割の有無にかかわらず第 1 卵割で 2 細胞および第 2 卵割で 4 細胞を形成し、それぞれの卵割が培養 25.90 および 37.88 時間以内に完了した胚が胚盤胞への体外発生能が高い胚であり、このような特徴をもつ胚盤胞を移植することにより、55.8%の妊娠率が得られることが明らかになった。最後にそのような基準をもとに選抜した胚の移植後の妊娠率を改善するために、コンパクションおよび胚盤胞形成時間によってさらなる胚の選抜を試みた。その結果、上記の基準をもとに選抜した胚の中から培養 79.93 時間以内にコンパクションを完了した胚を選んで胚盤胞期に移植することにより、74.6%の妊娠率を得ることに成功した。本研究の結果から、高い着床能を有するヒト胚を非侵襲的に選抜して移植し得る

方法が確立された。この移植胚選抜法を活用することにより、多くの不妊患者が産子を獲得できるようになると期待される。

# Studies on noninvasive selection of human embryos with high implantation potential for assisted reproductive technology

**Yamato Mizobe**

**Abstract:** Assisted reproductive technology (ART), in which sperm, oocytes and embryos are manipulated *in vitro*, represents the most promising mode of treatment for human infertility. The mean age of patients seeking ART is increasing, and both the number and quality of oocytes collected are known to decrease as patient ages increase. To prevent multiple pregnancies, which occur more frequently with ART than with natural pregnancy, the Japan Society of Obstetrics and Gynecology suggests that only one embryo should be transferred in an ART treatment. Therefore, it is important to produce as many embryos as possible from collected oocytes, to enable selection of the best embryo for transfer. Because oocytes with fragile oolemmae (fragile oocytes) are often observed during intracytoplasmic sperm injection (ICSI), which is a principal technique in ART, their potential for fertilization and development has now been examined. The results showed that the frequency of fertilization after ICSI into fragile oocytes was lower than that of oocytes with a normal oolemma (normal oocytes). However, the embryos produced from fragile oocytes had the same developmental potential as embryos derived from normal oocytes, indicating the eligibility of fragile oocytes for ART. To establish a noninvasive system for selection of embryos with a high implantation potential, the relationship between the first and second division patterns of embryos and their subsequent development *in vitro* and *in vivo* was evaluated. The results showed that high



pregnancy rates were most likely with transfer of blastocysts derived from embryos that formed two cells during the first division and four cells during the second division (regardless of the presence or absence of fragmentation), and that completed the first and second divisions within 25.90 h and 37.88 h after culture, respectively (early cleaved embryos). To improve the selection system, the relationship between the compaction and blastocyst-formation times of early cleaved embryos and the pregnancy rates after transfer was evaluated. The results showed that selection of early cleaved embryos that completed compaction within 79.93 h after culture, and transfer at the blastocyst stage, improved pregnancy rates. In conclusion, a noninvasive selection system has been established for human embryos with a high implantation potential, based on early cleavage patterns and the time of completion of compaction. This system would enable many infertile patients to have their own children.

# 第 I 章

## 序論

生殖補助医療 (Assisted reproductive technology: ART) は、不妊症の最も重要な治療法である。1978年7月25日に、イギリスで世界初の体外受精胚移植児であるルイズ・ブラウンが誕生した (Steptoe and Edwards, 1978)。それ以降、1980年にオーストラリアにおいて Lopata (1980)が、さらに1981年にアメリカにおいて Jones et al. (1982)が体外受精児の誕生を報告している。日本においては、1983年に東北大学から体外受精児の誕生が報告された (Suzuki et al., 1983)。その後、体外受精-胚移植の技術は不妊症の治療法として日本はもちろんのこと全世界に広がり、様々な創意工夫が施され、現在に至っている。日本産科婦人科学会平成27年度倫理委員会・登録・調査小委員会報告 (2014年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2016年7月における登録施設名)によると、2014年においては47,322人の児がARTにより誕生しており、これは日本の年間出生数 (1,001,000人) の4.7%を占めている。累積出生児数は431,626人に上り、日本の人口動態に影響を及ぼすまでに増加している。2014年においては393,745周期ものARTが行われており、2016年7月において598の施設が日本産科婦人科学会のART施設として登録されている。

ARTは体外で卵子や胚を操作する生殖医療技術であるが、普及・発展に貢献した技術は、採卵術、胚の凍結保存、顕微授精である。採卵術の簡便化として、経膈超音波法が開発された (Dellenbach et al., 1985)。このことにより腹腔鏡下にて採卵を行う必要がなくなり、患者の負担が少ない採卵術が可能となった。また、gonadotropin-releasing hormone (GnRH) アナログを加味した調節卵巣刺激法 (controlled ovarian hyperstimulation: COH) の導入 (Fleming et al., 1988) により、卵胞発育のモニタリングも大幅に簡素化され、採卵日をあらかじめ設定する予定日採卵が可能となった。近年では、GnRH agonist long 法、GnRH agonist short 法 (Hughes et al., 1992) および GnRH antagonist 法 (Olivennes et al., 1994) が主に用いられている。GnRH agonist long 法は前周期の高温期7日目から使用し、GnRH agonist short 法は月経周期の開始に合わせて使用することで、内因性の gonadotropin 分泌を抑制し、luteinizing hormone (LH) サージを抑える方法である。GnRH antagonist 法は

follicle stimulating hormone (FSH)あるいは human menopausal gonadotropin (hMG)による卵巣刺激中に、卵胞発育をモニターし、最大卵胞径が 14mm を超えた時点で GnRH antagonist を同時投与することで内因性の gonadotropin 分泌を抑制し、LH サージを抑える方法である。卵巣刺激の最終段階は、LH 刺激による卵子の減数分裂再開と排卵の誘起である。LH サージの検出は不確定であるが、通常は卵胞径が 18~20mm の時点で human chorionic gonadotropin (hCG) を投与する (Abdalla et al., 1987; Wikland et al., 1995; Ludwig et al., 2003)。hCG の LH 作用を利用し、投与 36 時間後には排卵するため、その直前に採卵を行う (Abdalla et al., 1987; Wikland et al., 1995; Ludwig et al., 2003)。hCG は LH よりも半減期が長く、作用も長期化するため、卵巣過剰刺激のリスクは高くなる。COH の代表的な副作用として卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome: OHSS) が挙げられるが、OHSS は重症化すると血栓症や腎不全を引き起こすため十分に注意しなければならない (Olivennes et al., 2000; Delvigne and Rozenberg, 2003)。

採卵術の簡便化以外で ART の普及に大きく貢献したのは凍結技術の向上である。胚の凍結保存は緩慢凍結法からガラス化凍結保存法へ技術改良されてきた (Trounson et al., 1987)。ガラス化凍結保存法とは、培養液に高濃度の凍結保護物質を添加することによって細胞内の水分子同士が結合するのを妨害し、冷却しても氷の結晶が発生しない状態で胚を固化、極低温保存する手法である。ガラス化凍結保存法では緩慢凍結法において生じる細胞外氷晶からの物理的障害が発生しないことから、凍結保存による胚へのダメージを減少させることが可能である。さらに、凍結保存後の生存性消耗がほとんどない超急速ガラス化凍結保存法が開発された (Kuwayama et al., 2005; Kuwayama, 2007)。超急速ガラス化凍結保存法は冷却速度が $-20,000^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 以上のものと定義され、胚に致命的なダメージを与える冷温域を急速に通過して冷温傷害を回避できるため、高い生存率が得られる。また、緩慢凍結法と比較して処理が簡易かつ短時間であり、特別な器機を必要としないため、凍結保存の新しい標準法として、世界中で普及、利用されている。凍結保存が可能になったことで、胚を無駄なく効率的に利用できるようになった。具体的には、余剰胚を凍結して次治療周期に用いることが可能

となった。例えば、OHSS の危険がある患者に対しては新鮮胚移植せずに一旦胚を凍結し、次周期に移植を行うことができる。また、多数の胚が得られた場合は、余剰胚の凍結が可能であることから、複数の胚を移植する必要はなく、単一新鮮胚移植を行うことで、多胎妊娠のリスクを減少させることができる。

さらに ART の発展に貢献した技術として欠かせないものとして顕微授精が挙げられる。顕微授精には透明帯に精子の通過する孔を開ける方法（透明帯部分切除法：partial zona dissection：PZD）（Cohen et al., 1988）、透明帯下の囲卵腔に精子を注入する方法（囲卵腔内精子注入法：subzonal insemination of sperm：SUZI）（Ng et al., 1988）および卵細胞質内に極細のガラス管を刺し精子を注入する方法（卵細胞質内精子注入法：intracytoplasmic sperm injection：ICSI）がある。症例の増加に伴って重度の不妊症に対しては PZD や SUZI の治療効果は乏しいことが明らかとなったため、現在の主流は ICSI となっている。この技術により、男性不妊の治療域が格段に広がり、重度の男性不妊においても妊娠が可能となった。最初のヒト ICSI による妊娠・分娩の成功は、ベルギーの Palermo et al. (1992) により報告された。

ART において、ヒト配偶子および胚の体外培養は必須であり、その間、発生過程の形態学的観察を行わなければならない。観察の度にインキュベーターから取り出すことは胚に対する様々なダメージを助長する可能性があるが、観察回数を減らせば十分な情報が得られなくなる。そこで Payne et al. (1997) は、配偶子および初期胚発生の詳細な解析のため、倒立顕微鏡ステージ上でそれらを培養し、その状況を連続撮影して記録するシステムを立ち上げた。このシステムを用いて ICSI 施行後の卵子を連続観察（17～20 時間）し、詳細な解析を行ったが、この検討は観察期間が短く、前核形成までの期間に限られていた。Mio (2006) は、この状況を踏まえて、培養環境が安定し、非侵襲的に長時間観察撮影できる体外培養装置を独自に構築し、ヒト初期胚の動的解析を行った。さらに 2011 年、日本において、タイムラプスインキュベーターが販売され、ヒト胚の詳細な観察が行われるようになった。しかし、日本においてタイムラプスインキュベーターを使用している施設は少なく、全体の 10～20%程

度である。普及しない理由として、高額な費用がかかることやメンテナンスの複雑さが挙げられるが、今後、値段が低下することで、広く普及していくものと思われる。

近年、不妊治療の現場では、社会情勢やライフスタイルの変化に伴って高齢で挙児を望む夫婦の割合が増えている。しかし、患者の年齢が上昇するのに伴って採取可能な卵子数は減少し、採取された卵子の質も低下してしまう。その結果、上記のように著しく発展してきた ART を用いても妊娠や出産に至らない症例が増加している。また、ART においては自然妊娠と比較して多胎妊娠率が高い傾向にある。そのため、日本産科婦人科学会は、移植する胚は基本的に単一とする指針を示している。以上のことから、患者の妊娠および産子の獲得という ART の最終目的を達成するためには、採取された卵子を有効活用してできるだけ多くの胚を作出した後、その中から最も質の高い胚を選抜して移植する技術を確立することが重要となる。そこで本研究では、卵子の有効活用を目的として、ICSI を実施している際にしばしば観察される細胞膜が脆弱な卵子も ART に使用できるか検討した。また、質の高い胚の選抜を目的として、患者に移植する前に高い着床能を有する胚を非侵襲的に見極める方法の確立を試みた。

## 第Ⅱ章

ICSI を用いて細胞膜が脆弱な卵子か  
ら作出した胚の発育能

## 緒言

ICSI は微小のガラスピペットを成熟卵子の卵細胞膜に貫通させ、細胞質に精子を直接注入する授精法である。ICSI は現在の ART において必須の技術である (Palermo et al., 1992; Vanderzwalmen et al., 1996; Dumoulin et al., 2001; Orief et al., 2004)。しかし、ICSI は細心の注意を払っても、処理後に卵子が変性してしまうことがある。Rosen et al. (2006) は、ICSI 後の卵子の変性はすべての ICSI 術者が共通して経験する現象であることを示唆している。Van Steirteghem et al. (1993) は、平均で約 10%の卵子が ICSI 後に変性しているのではないかと報告している。卵細胞膜が非常に脆弱な場合には卵子の変性が特に明らかとなり、ICSI 施行時に卵細胞膜の突然の破綻をきたす (Palermo et al., 1996; Yanagida et al., 2001)。脆弱な卵細胞膜を有する卵子が変性しやすいのは、穿刺孔の閉鎖に關与する漏斗状陥凹の保護的作用が欠如するからである。卵細胞膜の断裂はサイトゾルの皮質成分に作用して卵子の細胞骨格に影響を及ぼし、その結果、第 2 減数分裂時の染色分体の分離および極体の放出に關与する微小管構造の障害を引き起こす可能性がある (Palermo et al., 1996)。

採取された卵子の大部分が細胞膜が脆弱な卵子である患者は、結果として、ICSI 後に高確率で卵子が変性してしまう (Nagy et al., 1995; Palermo et al., 1996)。またこのような場合、細胞膜が脆弱な卵子に由来する胚を移植胚として選択せざるを得ない状況に直面する。胚を 5~6 日間培養し、胚盤胞に到達した胚をガラス化凍結保存する。そして、次周期以降にガラス化凍結保存した胚盤胞を融解し移植することが一般的な治療法である。なぜなら、凍結融解胚盤胞移植は初期新鮮胚移植より妊娠率が高いからである (Cruz et al., 2011; Zuh et al., 2011)。これらの理由から、細胞膜が脆弱な卵子から胚盤胞が得られるのか、また、得られるのであれば細胞膜が脆弱な卵子に由来する胚盤胞を凍結融解胚盤胞移植することにより妊娠に至るか検討する必要がある。

それゆえ、本章では、細胞膜が脆弱な卵子および通常の細胞膜を有する卵子から ICSI を用いて胚を作出し、体外における受精および発生能を比較した。さらに、細胞膜が脆弱な卵子



を ART 治療に用いるべきか否かを決定するために、このような卵子に由来する胚が胚盤胞移植された後に着床し得るか調査した。

## 材料および方法

### 患者背景

2014 年 3 月～2015 年 4 月の間に採卵術を施行した 133 周期を調査対象とした。患者の平均年齢は  $36.2 \pm 4.1$  歳 (27～47 歳) であった。回収された卵子は ICSI (76 周期)、ICSI と体外受精 (*in vitro* fertilization: IVF) を組み合わせたスプリット (57 周期) で、標準的な方法で受精させた (Palermo et al., 1992; Orief et al., 2004)。スプリットはランダムに IVF および ICSI を行った。

### 卵巣刺激および採卵

卵巣刺激には GnRH long 法および short 法を用いた。GnRH アゴニストとして buserelin acetate (Fuji Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を使用し、FSH および hMG (ASUKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を必要量投与した。hCG (Fuji Pharmaceutical Co., Ltd.) あるいは leuprolide は 2 個以上の卵胞径が 18mm を超えた時点で投与した。卵丘卵子複合体は経膈超音波ガイド下の経膈採卵法を用いて hCG 投与約 36 時間後に回収された。Anti-Müllerian hormone (AMH) 濃度は採卵周期前に測定し、FSH および hMG は採卵周期に使用した投与量を測定した。Estradiol ( $E_2$ ) 濃度は採卵術の 2 日前に測定され、採卵術日決定の指標とした。回収された卵子は、10%血清添加 human tubal fluid (HTF) (NAKA Medical, Tokyo, Japan) にて 3 時間前培養を行った。前培養後、卵子は 80 U/ml のヒアルロニダーゼ溶液 (NAKA Medical) 中でピペッティングすることにより裸化した。

## ICSI

精子は 7% ポリビニルピロリドン溶液 (NAKA Medical) 中で不動化処理を行った。ICSI は 20%血清添加 HEPES-HTF (NAKA Medical) のドロップ内で施行した。インジェクターは IM-11-2 (Narishige, Tokyo, Japan) を使用し、インジェクションピペットは K-MPIP-3130 (Cook Medical, Bloomington, IN, USA) を用いた。

吸引圧をかけることなくインジェクションピペットを細胞質に挿入した瞬間に細胞膜が破れた卵子を細胞膜が脆弱な卵子 (Fig. II -1a)、インジェクションピペットを細胞質に挿入後、吸引圧をかけることにより細胞膜が破れた卵子を通常の細胞膜を有する卵子 (Fig. II -1b) と定義した。133 周期中、83 周期 (62.4%) には通常の細胞膜を有する卵子のみが存在し、50 周期 (37.6%) には細胞膜が脆弱である卵子が少なくとも 1 個含まれていた。前者における通常の細胞膜を有する卵子をグループ A とした。一方、後者のうち通常の細胞膜を有する卵子をグループ B とし、細胞膜が脆弱な卵子をグループ C とした。

## 胚培養

全ての胚は、滅菌ミネラルオイルで覆った 30  $\mu$ l の One Step Medium (NAKA Medical) 中に移され、5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、および 90% N<sub>2</sub> の気相条件で 5~6 日間培養された。培養には EmbryoScope™ (VitroLife, Göteborg, Sweden) を使用し、温度は 37°C に設定した。

受精率、変性率、胚盤胞形成率および良好胚盤胞形成率をグループ A、B および C 間で比較した。受精は、ICSI 後の 2 極体および 2 前核の存在により確認した。ICSI 後数時間以内に細胞質が収縮し黒ずんだ卵子を変性卵と定義した (Fig. II -2)。内部細胞塊および栄養外胚葉のスコアが B 以上である胚盤胞を良好胚盤胞と定義した (Gardner et al., 2000)。加えて、初期胚の発育形態を観察し、良好胚選抜に用いられる因子である、第 2 極体放出時間、前核出現および消失時間、第 1 および第 2 卵割時間 (Pribenszky et al., 2010; Meseguer et al., 2011) を 3 群間で比較した。

## 胚盤胞移植

細胞膜が脆弱な卵子に由来する胚盤胞はガラス化凍結保存され、次周期以降のホルモン補充周期下で13名の患者に対する16周期の移植を対象とした。細胞膜が通常の卵子に由来する胚盤胞は細胞膜が脆弱な卵子に由来する胚盤胞を移植した同時期の78名、132周期の移植を対象とし、これらの妊娠率を比較した。ガラス化凍結保存はCryotop® (Kitazato, Shizuoka, Japan)を使用し、既に確立された方法で施行した (Kuwayama et al., 2005; Kuwayama, 2007)。融解後、単一胚盤胞移植を施行し、臨床妊娠は移植3週間後に超音波検査にて胎嚢が確認できたものと定義した。

## 統計解析

統計解析にはエクセル統計2015を用いた。Table II -1において、2群間における母集団の平均の差はスチューデントのt検定を用いた。Tables II -2 および4におけるカイ二乗検定の連続補正はボンフェローニの補正を用い、Table II- 3においては、クラスカル・ウォリス分散分析を用い、多重比較はシャリー・ウィリアムズ法を用いた。P値が5%未満の場合を有意な差とみなした。

## 結果

### 患者背景

Table II -1 に示すように、採卵数はグループBおよびC ( $12.6 \pm 5.5$ ) がグループA ( $9.8 \pm 7.5$ ) と比較して有意に多くなった ( $P < 0.05$ )。同様に、成熟卵数もグループBおよびC ( $11.0 \pm 4.9$ ) がグループA ( $8.4 \pm 6.7$ ) と比較して有意に多くなった ( $P < 0.05$ )。グループBおよびCの $E_2$  ( $7549 \pm 6310$  pg/ml) は、グループA ( $5406 \pm 4525$  pg/ml) と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。その他の項目については、グループ間で差がなかった。

### 細胞膜の形態が ICSI 後の受精、変性および体外発生に及ぼす影響

Table II -2 に示すように、グループ A および B の受精率 (84.6~86.9%) はグループ C (65.3%) と比較して有意に高くなった ( $P < 0.01$ )。変性率は、グループ A および B (0.28~0.71%) がグループ C (24.2%) と比較して有意に低くなった ( $P < 0.01$ )。しかしながら、胚盤胞形成率 (59.7~67.5%) および良好胚盤胞形成率 (58.0~64.9%) については、グループ間で差がなかった。

### 細胞膜の形態が初期発生様式に及ぼす影響

Table II -3 に示すように、グループ C の第 2 極体放出時間 (2.87 時間) はグループ A および B (3.18~3.32 時間) と比較して有意に早かった ( $P < 0.05$ )。それ以外の項目については、グループ間で差がなかった。

### 細胞膜の形態が胚移植後の妊娠に及ぼす影響

Table II -4 に示すように、妊娠率 (35.6~50.0%) および出生率 (74.1~86.6%) については、グループ間で差がなかった。

## 考察

本章の結果より、採卵数、成熟卵数および採卵術 2 日前の  $E_2$  濃度は、細胞膜が脆弱な卵子を有する患者において、そうでない患者と比較し、有意に高い値を示した ( $P < 0.05$ )。ART においては、通常、複数の卵子を採取するため COH を行う。採取卵子数は hCG 投与 (採卵術 2 日前) 時の血中  $E_2$  濃度に依存的であると Joo et al. (2010) が報告しており、 $E_2$  濃度が上昇すると回収卵子数も増加する。これは、我々の結果と一致している。一方、hCG 投与時に血中  $E_2$  濃度が高い場合、smooth endoplasmic reticulum clusters (sERCs) の発生を有意

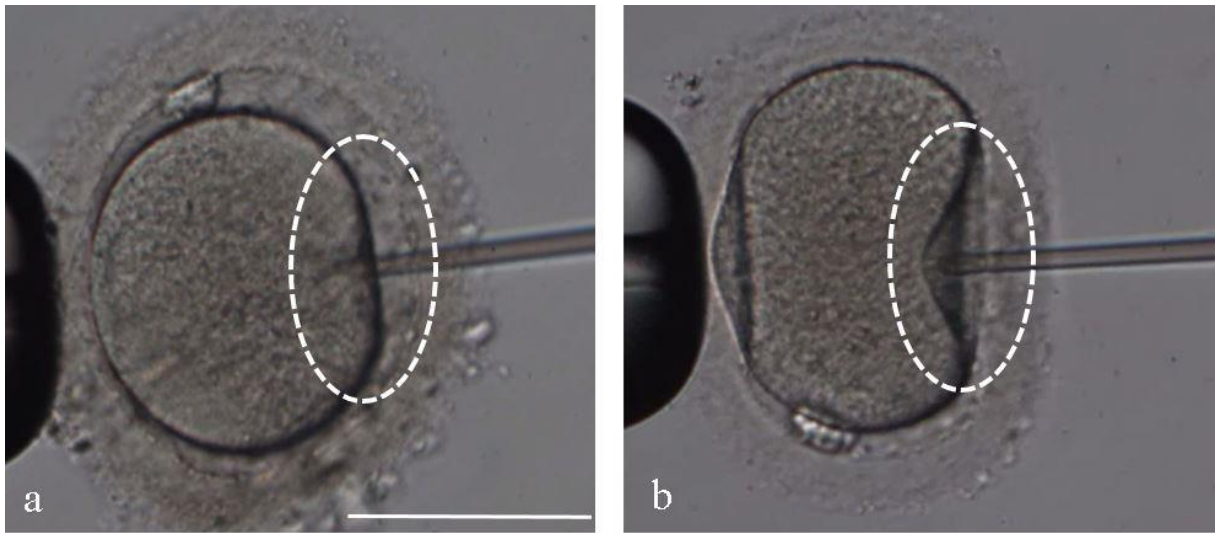
に上昇させ、sERCs が存在する卵子に ICSI を行い、移植した場合、妊娠率が低下すると報告されている (Otsuki et al., 2004)。このことから E<sub>2</sub> 濃度の高い患者はヒト卵細胞質の異常形態と関係があることが考えられる。それゆえ、患者の高濃度の E<sub>2</sub> は細胞膜が脆弱した卵子の発生を増加させたかもしれない。今後の課題は、これらの因果関係を解明することであろう。

本章において、細胞膜が脆弱な卵子における ICSI は、通常の細胞膜を有する卵子と比較して、変性率が増加し、受精率が低下した。本章は、卵子の変性が卵細胞膜の特徴と密接に関係しているというこれまでの報告と一致している (Palermo et al., 1996; Yanagida et al., 2001)。さらに本章では、脆弱卵子であっても変性せずに受精すれば、その胚の胚盤胞への発生能は、正常卵子から発生した胚の胚盤胞への発生能と比べても遜色ないことを示した。したがって、脆弱卵子から効率的に胚盤胞を得るためには、ICSI 後の卵子の変性を防ぐことが最も重要であることが示唆された。最初にインジェクションピペットを卵子内へ挿入する際に卵細胞膜が突然破綻する場合には、卵子の変性率が高くなる (Palermo et al., 1996; Nagy et al., 2002)。脆弱な卵細胞膜の異常破綻を克服するため、Palermo et al. (1996) は透明帯を接線方向に穿通する方法を提案した。具体的には、まずインジェクションピペットを 6 時または 12 時の位置で透明帯に押し付けて穿通させ、次にピペットの先端が 3 時の位置にくるまで卵子を回転させると、ピペットの先端は卵細胞膜に押し付けられた状態になる。さらに、ICSI 直前のレーザー照射により細胞膜が脆弱な卵子の透明帯に穴を開け ICSI を施行することでインジェクションピペットによる細胞膜の損傷を減少させる。本法により、変性率が減少し、胚発生率が向上する (Abdelmassih et al., 2002)。その他にも、通常の細胞膜を有する卵子の ICSI において、変性を避けるため様々な工夫がされている。例えば、インジェクションピペット挿入時に卵子にかかる物理的圧力を軽減するために、インジェクションピペットを透明帯に挿入する前、レーザーにより透明帯を開孔 (Nagy et al., 2002)、菲薄化 (Takahashi et al., 2013) することにより卵子の変形を減少させることができる。また、ピエゾ素子によりインジェクションピペットを超高速微動前進運動させることで卵細胞膜を

穿膜する Piezo-ICSI を使用することで ICSI 後の卵子変性率が減少することが報告されている (Katayose et al., 1999; Yanagida et al., 1999)。さらに、極薄ピペットを使用することで ICSI の成績を改善することが可能である (Hiraoka et al., 2013)。これらの技術は、細胞膜が脆弱な卵子における ICSI 後の受精率を改善し、効率的な胚盤胞産出をもたらす。

タイムラプス観察から、細胞膜が脆弱な卵子は通常の細胞膜を有する卵子と比較して、第 2 極体の放出時間が有意に短かった。胚発育においては、極体放出、前核出現および消失あるいは卵割に適した時間がそれぞれ存在する (Mio & Maeda, 2008; Mio et al., 2012)。本章では、細胞膜が脆弱な卵子は適切な時間の範囲内で第 2 極体が放出されなかった。これは、おそらく異常な卵細胞膜と関係していると考えられる。Palermo et al. (1994, 1996) は脆弱な細胞膜は第 2 極体放出能力が低下すると報告している。この現象が、細胞膜が脆弱な卵子における高い変性率と関係しているかはわからないが、その後の受精や胚発育には影響を及ぼさない。なぜなら、細胞膜が脆弱な卵子における雌雄前核融合、消失、第 1 および第 2 卵割の平均時間は通常の細胞膜を有する卵子の平均時間と相違なく、それぞれにおいてはこれまでの報告と類似している (Mio & Maeda, 2008; Mio et al., 2012)。本章の結果より、移植した胚盤胞は 16 周期と限られているが、細胞膜が脆弱な卵子に由来する胚盤胞を移植しても、通常の細胞膜を有する卵子に由来する胚盤胞を移植した場合と同等の妊娠率および出生率であることが示された。さらに、グループ A および B において、受精率、胚盤胞形成率、妊娠率に差はなかった。それゆえ、細胞膜の脆弱さは同一周期内における卵子の質に影響を及ぼさないことが示された。

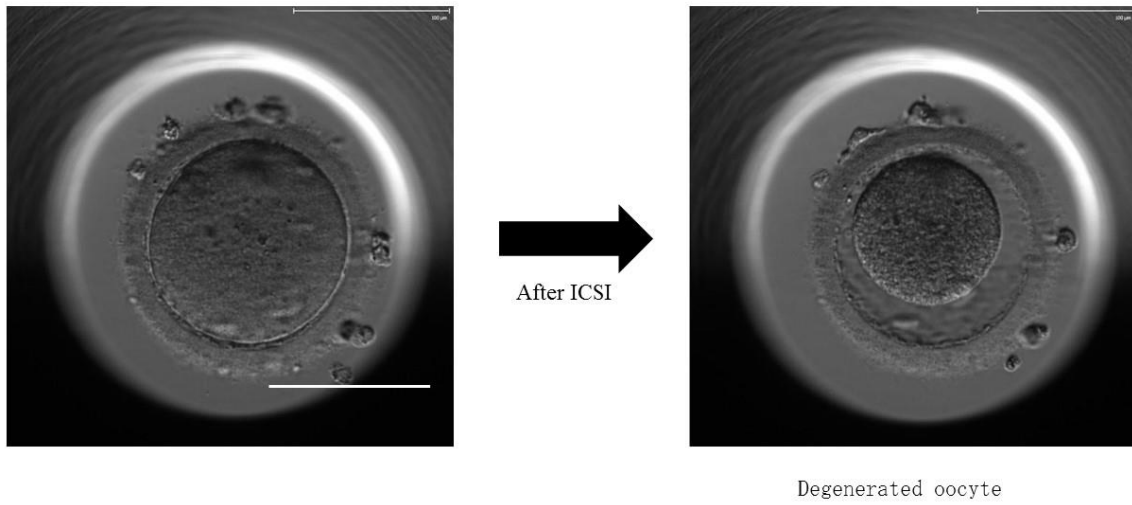
本章の結果から、卵細胞膜が脆弱な卵子は受精能は低く、変性しやすいが、受精すれば、その後の発育能力においては正常な胚と同等であり、ART の治療に用いるべきであることが示された。今後は細胞膜が脆弱な卵子の受精率を向上させる方法の確立が ART 治療において重要となるだろう。なお、本章の結果から、以下の章においては細胞膜が脆弱な卵子から作出した胚も実験に供した。



**Fig. II -1.** Fragile (a) and normal (b) oocytes

As shown in the circles, oolemma was broken by the insertion of an injection pipette in fragile oocytes.

Scale bar: 100  $\mu\text{m}$



**Fig. II -2. Degenerated oocyte**

Oocytes in which ooplasm shrank and darkened within a few hours of ICSI were determined as degenerated oocytes.

Scale bar: 100  $\mu$ m



**Table II -1. Patient background**

	Group A (83 cycles)	Groups B and C (50 cycles)
Age (years)	36.7 ± 4.0	35.3 ± 4.1
No. of oocytes retrieved	9.8 ± 7.5 <sup>d</sup>	12.6 ± 5.5 <sup>e</sup>
No. of matured oocytes	8.4 ± 6.7 <sup>d</sup>	11.0 ± 4.9 <sup>e</sup>
FSH (IU)	1198 ± 225	1188 ± 309
hMG (IU) <sup>a</sup>	1030 ± 724	843 ± 350
E <sub>2</sub> (pg/ml) <sup>b</sup>	5406 ± 4525 <sup>d</sup>	7549 ± 6310 <sup>e</sup>
AMH (ng/ml) <sup>c</sup>	4.1 ± 3.5	4.8 ± 4.0

Data are presented as the mean ± standard deviation.

<sup>a</sup>Because hMG was not measured in 2 patients, data derived from 81 patients were shown in group A.

<sup>b</sup>Because E<sub>2</sub> was not measured in 5 patients, data derived from 78 patients were shown in group A.

<sup>c</sup>Because AMH was not measured in 16 and 7 patients, data derived from 67 and 43 patients were shown in group A and groups B and C, respectively.

<sup>d,e</sup>Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

FSH, follicle-stimulating hormone; hMG, human menopausal gonadotropin; E<sub>2</sub>, estradiol; AMH, anti-Müllerian hormone

**Table II -2. Effects of oolemma properties on fertilization after ICSI and subsequent embryonic development**

	Group A	Group B	Group C
No. of oocytes injected	422	351	95
No. (%) <sup>a</sup> of oocytes fertilized	357 (84.6) <sup>e</sup>	305 (86.9) <sup>e</sup>	62 (65.3) <sup>f</sup>
No. (%) <sup>a</sup> of oocytes degenerated	3 (0.71) <sup>e</sup>	1 (0.28) <sup>e</sup>	23 (24.2) <sup>f</sup>
No. of embryos cultured	348 <sup>d</sup>	305	62
No. (%) <sup>b</sup> of blastocysts	231 (66.4)	206 (67.5)	37 (59.7)
No. (%) <sup>c</sup> of good-quality blastocysts	134 (58.0)	123 (59.7)	24(64.9)

<sup>a</sup>Percentage per oocytes injected.

<sup>b</sup>Percentage per embryos cultured.

<sup>c</sup>Percentage per blastocysts.

<sup>d</sup>Nine fertilized oocytes were cryopreserved or transferred on day 1, 2, or 3.

<sup>e,f</sup>Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.01$ ).

ICSI, intracytoplasmic sperm injection

**Table II -3. Effects of oolemma properties on the developmental process of early embryos**

	Group A	Group B	Group C
No. of embryos observed	348	305	62
No. of embryos assessed	348	294 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>
Second PB extruded $\pm$ SD (h)	3.18 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>	3.32 $\pm$ 0.99 <sup>b</sup>	2.87 $\pm$ 0.84 <sup>c</sup>
Both PN abutted $\pm$ SD (h)	7.70 $\pm$ 1.42	7.94 $\pm$ 1.59	7.81 $\pm$ 2.05
Syngamy $\pm$ SD (h)	23.52 $\pm$ 3.22	23.81 $\pm$ 3.33	23.93 $\pm$ 4.35
First cleavage commenced $\pm$ SD (h)	27.12 $\pm$ 3.77	27.21 $\pm$ 3.88	27.60 $\pm$ 4.92
Second cleavage commenced $\pm$ SD (h)	39.88 $\pm$ 4.56	38.99 $\pm$ 4.85	39.11 $\pm$ 5.12

<sup>a</sup>Eleven and 5 embryos in which at least one of the events was not clearly observed were excluded in groups B and C, respectively.

<sup>b,c</sup>Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

PB, polar body; PN, pronucleus; SD, standard deviation

**Table II -4. Clinical pregnancy after the transfer of blastocysts derived from normal or fragile oocytes**

Group	No. of embryos transferred	No. (%) <sup>a</sup> of pregnancies	No. (%) <sup>b</sup> of deliveries
A	73	26 (35.6)	22 (86.6)
B	59	27 (45.8)	20 (74.1)
C	16	8 (50.0)	6 (75.0)

<sup>a</sup>Percentage per embryos transferred.

<sup>b</sup>Percentage per pregnancies.

## 第Ⅲ章

ヒト胚の初期卵割様式がその後の  
体外発生および着床に及ぼす影響

## 緒言

近年、タイムラプスインキュベーターEmbryoScope™ (VitroLife, Göteborg, Sweden)を使用した研究(Cruz et al., 2011; Kirkegaard et al., 2012a, 2012b)が複数報告されている。EmbryoScope™は24時間モニタリングできるカメラを搭載した無加湿型インキュベーターである。このシステムを用いることで、インキュベーターから胚を取り出すことなくいつでも胚の発育状況を非侵襲的に観察することができる。EmbryoScope™の利点として、温度変化、光暴露、高酸素暴露および培養液のpHの変化を除去することができる。胚観察においては、ある一時点の形態観察よりも胚の発育過程を様々なタイムポイントで分析し、多くの情報を得ることができる。また、single step mediumを組み合わせることで、直接の観察や胚発育向上のための培養液交換を行わずに、胚盤胞までの連続培養することが可能となった。

胚が十分量採取できる場合は、培養期間を延長し胚盤胞まで発育させることで、ARTにおける妊娠率は上昇する (Gardner et al., 1998)。しかしながら、胚盤胞期までの長期培養を危惧し、初期胚での移植を推奨する報告も存在する (Mio & Maeda, 2008)。培養している胚が胚盤胞に到達しないリスクを避けるため、少数の卵子しか採取できなかった場合、胚盤胞期まで培養せず、初期胚移植を施行することもある。移植胚の選抜は、単に細胞数に基づくべきではないが、移植日の形態評価に依存しているのが現状である (Van Montfoort et al., 2004)。EmbryoScope™の使用は、胚の発育を動的にたどることにより、胚選抜における様々な情報を提供可能とする。つまり、特異的に観察される発育上の現象を胚の発育能力や潜在的な着床能力と直接関連づけることができる。

初期卵割は胚発育能力を予測する指標となる (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998)。タイムラプスインキュベーターによる観察の利点として、卵割時間に焦点を合わせられることが挙げられる (Hashimoto et al., 2012; Kirkegaard et al., 2013)。EmbryoScope™を使用することで、胚発育の詳細な分析および発育能力の予測が可能となり、良好胚を選抜することができる。胚盤胞まで培養せずに新鮮胚移植を行う場合は、通常培養2あるいは3日

目に移植を行う。この時期、胚は2~4細胞の卵割期の状態である。このように、少なくとも培養2日目には胚の発育能力を予測する必要がある。

本章では、移植前に高い着床能力を持つヒト胚を非侵襲的に選抜する方法を確立するために、第1および第2卵割様式とその後の *in vitro* および *in vivo* における胚発育能力の関係について評価を行った。

## 材料および方法

### 胚培養および胚移植

卵巣刺激は第II章、材料および方法の卵巣刺激および採卵に準じて行った。回収された卵子も同様の方法を用いて処理した。2014年4月~12月までに採卵術を施行した164周期を調査対象とした。採卵周期における患者の平均年齢は $37.6 \pm 4.1$ 歳(25~47歳)であった。回収された卵子は、IVF(33周期)、ICSI(88周期)、スプリット(43周期)、それぞれ標準的な方法で受精させた。スプリットはランダムにIVFおよびICSIを行った。IVFを行った胚は、媒精4~5時間後にEmbryoScope™に移し、ICSIを行った胚はICSI終了後、直ちにEmbryoScope™で培養を開始した。移植に供した胚を除き、第II章と同じ条件で最大6日間培養し、初期卵割様式および胚盤胞形成について解析した。良好胚盤胞についても第II章の材料および方法に準じて定義した。採卵周期における単一胚移植は培養2日目での移植が21周期、培養3日目が12周期、5日目は14周期であった。形態学的評価により、最も発育が良好な胚を移植に用い、残りをガラス化凍結保存した。胚のガラス化凍結保存は第II章に準じた方法を用いた。ガラス化凍結保存後、凍結融解単一胚盤胞移植はホルモン補充周期にて60周期、行った。培養2または3日目に卵割期にてガラス化凍結保存し、移植を行った周期は3周期であった。臨床妊娠においても第II章での定義を用いた。

### 胚の分類

791個の胚を調査に用いた。培養初期に観察される第1および第2卵割間の細胞数や不均等

分割の程度および大きさに応じて9群に分類した (Fig. III -1)。第1卵割の形態で3群に分類した。すなわち、第1卵割で2細胞を形成し、不均等分割が10%未満の胚をグループA、不均等分割が10~50%の胚をグループBとした。それ以外の2細胞を形成しなかった胚をグループCとした。グループAの胚は第2卵割の形態で4群に分類した。すなわち、第2卵割時に4細胞を形成し、不均等分割が10%未満の胚をグループD (Fig. III -2. a-c)、10~50%の胚をグループEとした。4細胞を形成せず、不均等分割が10%未満である胚をグループF、10~50%の胚をグループGとした。グループBの胚は第2卵割の形態で2群に分類した。4細胞を形成し、不均等分割が10~50%の胚をグループHとし (Fig. III -2. d-f)、4細胞を形成しなかった胚をグループIとした。2細胞のうちどちらか一方の細胞が分裂した時点で、第2卵割とみなした。2細胞がほぼ同時(1時間以内)に卵割した場合のみ4細胞を形成したとみなした。例えば、2細胞のどちらか一方の細胞が分裂し3細胞となり、数時間後に最初の2細胞のうちのもう片方の細胞が分裂し4細胞となった場合などは除外した。

## 実験計画

実験Ⅰでは第1卵割様式がその後の体外発生に及ぼす影響について検討した。グループA、BおよびCにおいて胚盤胞および良好胚盤胞の形成率を比較した。

実験Ⅱでは第1および第2卵割様式がその後の体外発生に及ぼす影響について検討した。グループD、E、F、G、HおよびIにおいて胚盤胞および良好胚盤胞形成率を比較した。

実験Ⅲでは第1および第2卵割様式がその後の妊娠率に及ぼす影響について検討した。グループDあるいはグループEおよびHに分類された胚を培養2~3あるいは5日後に移植した。

実験Ⅳでは卵割時間がその後の体外発生に及ぼす影響について検討した。グループD、EおよびHにおいて、良好胚盤胞およびその他の胚盤胞に発生した胚の第1および第2卵割時間を測定し、胚盤胞に発生しなかった胚の卵割時間と比較した。なお、測定開始時間はICSIにおいてはICSI終了直後、IVFにおいては媒精開始直後とした。



実験Vでは卵割時間がその後の妊娠に及ぼす影響について検討した。グループD、EおよびHの胚を第1および第2卵割がそれぞれ25.90および37.88時間以内に完了した胚とそれ以外の胚に分類し、培養2~3あるいは5日後に移植した。

## 統計解析

統計解析は第II章の材料および方法の統計解析に準じて行った。すなわち、実験I、II、IIIおよびVではカイ二乗検定、実験IVではクラスカル・ウォリス分散分析を用いた。P値が5%未満の場合を有意な差とみなした。

## 結果

### 第1卵割様式がその後の体外発生に及ぼす影響（実験I）

Table III-1 に示すように、胚盤胞形成率におけるグループA (84.6%) およびグループB (80.5%) はグループC (27.9%) と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。良好胚盤胞形成率においてもグループA (49.5%) およびグループB (46.9%) はグループC (3.8%) と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。

### 第1および第2卵割様式がその後の体外発生に及ぼす影響（実験II）

Table III-2 に示すように、胚盤胞形成率におけるグループD (91.1%)、グループE (79.3%) およびグループH (90.5%) はグループF、G およびI (29.7~45.9%) と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。良好胚盤胞形成率においてはグループD (57.7%)、グループE (34.5%) およびグループH (54.0%) はグループF およびI (2.7~10.8%) と比較して有意に高い値を示した ( $P < 0.01$ )。胚盤胞形成率および良好胚盤胞形成率ともにグループD、E、H間に差はなかった。

### 第1および第2卵割様式がその後の妊娠率に及ぼす影響（実験Ⅲ）

Table III -3 に示すように、培養2あるいは3日目の移植において、グループDとEおよびH間に妊娠率（13.0% vs. 23.1%）および出生率（100.0% vs. 66.7%）の差はなかった。同様に、培養5日目の移植においてもグループDとEおよびH間に妊娠率（37.8% vs. 58.6%）および出生率（94.1% vs. 88.2%）の差はなかった。しかしながら、培養2あるいは3日目の移植は培養5日目の移植と比較して妊娠率が有意に低下した（グループD: 13.0% vs. 37.8%；グループEおよびH: 23.1% vs. 58.6%）（ $P < 0.01$  あるいは  $P < 0.05$ ）。

### 卵割時間がその後の体外発生に及ぼす影響（実験Ⅳ）

Table III -4 に示すように、第1および第2卵割時間において良好胚盤胞（25.90 および 37.88 時間）はその他の胚盤胞（27.10 および 39.78 時間）および胚盤胞に発生しなかった胚（27.58 および 40.08 時間）と比較して有意に早い値を示した（ $P < 0.01$ ）。

### 卵割時間がその後の妊娠に及ぼす影響（実験Ⅴ）

Table III -5 に示すように、培養2あるいは3日目に移植した場合、第1および第2卵割時間を基準に移植胚を選抜しても妊娠率（18.8% vs. 15.0%）は改善されないことが示された。対照的に、培養5日目の移植においては、第1および第2卵割時間を基準に移植胚を選抜することで、それ以外の胚よりも有意に高い妊娠率（55.8% vs. 32.3%）が得られた（ $P < 0.05$ ）。出生率においては培養2あるいは3日目に移植した場合（100.0% vs. 66.7%）および培養5日目に移植した場合（95.8% vs. 80.0%）ともに差はなかった。

## 考察

本章により、不均等分割の有無に関係なく第1卵割で2細胞および第2卵割で4細胞を形成し、それぞれの卵割が25.90 および 37.88 時間以内に完了した胚を胚盤胞まで体外培養した後に移植することにより、高い妊娠率が得られることが示された。

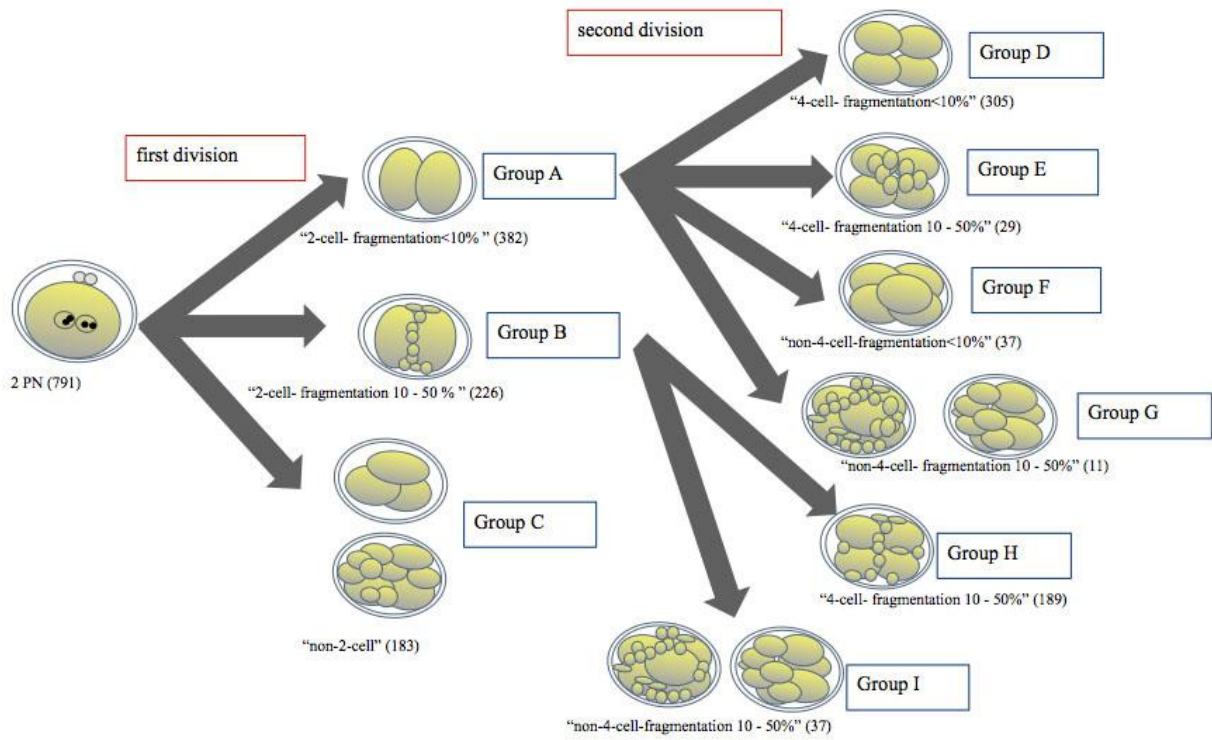
初期胚における細胞分裂の様式は、その後の胚発育の指標となることがこれまでに報告されている。第1卵割時に2つ以上の細胞に分裂する、あるいは第1卵割後の娘細胞が第2卵割時に2つ以上の細胞に分裂した場合、通常の細胞分裂した胚と比較して胚盤胞形成率が低下する (Wirka et al., 2014)。さらに、細胞の空間的配置 (Ebner et al., 2012; Paternot et al., 2014)、細胞接着点の数 (Cauffman et al., 2014; Liu et al., 2015) を評価することで、4細胞時点での良好な発育能を有する胚を効率的に選抜できる。本章においても、不均等分割の有無に関係なく、第1卵割で2細胞を形成すれば、胚盤胞および良好胚盤胞形成率は向上することが示されている。さらに、不均等分割の有無に関係なく、第2卵割で4細胞を形成すれば、胚盤胞および良好胚盤胞への体外発育能力は向上する。これらの結果から、第1卵割で2細胞、第2卵割で4細胞を形成することは、高い発育能力を有する胚を選抜する指標となり、卵割時に発生する不均等分割は有効な指標とならないことが分かる。不均等分割の原因として、pH、温度、酸素圧の異常など、いくつか報告されている (Begg & Rebhun, 1979; Yang et al., 1998)。従来の評価方法では、少量の不均等分割が存在し、割球の大きさが均一であれば、高い発生能力があると考えられており (Veeck, 1991)、不均等分割が増加すると胚盤胞形成率は低下すると考えられていた (Alikani et al., 2000)。なぜなら、不均等分割が発生することで、細胞小器官を含む細胞質 (例えばミトコンドリアや細胞質タンパク質など) が失われるからである (Sathananthan et al., 1990; Antczak & Van Blerkom, 1999)。対照的に、不均等分割が10~50%であるグループEおよびHと不均等分割が10%未満であるグループDにおける胚盤胞形成率に差はなかった。近年の培養液 (Youssef et al., 2015) および培養環境 (Waldenstrom et al., 2009; Cruz et al., 2011) の改善により、不均等分割の有無に関係なく、胚盤胞に発育できるようになった。これらの改善は、本章においても不均等分割が存在する胚の胚盤胞形成率を向上させたのかもしれない。本章において、2あるいは3日目の胚移植においては、少数の臨床妊娠および出生しか観察できなかったが、グループDとグループEおよびH間に差はない。5日間培養し、胚盤胞移植した場合も同様の結果が得られている。それゆえ、不均等分割の有無は妊娠率に影響を及ぼさないと考えられ

る。しかしながら、グループ D あるいはグループ E および H のどちらにおいても、培養 2 あるいは 3 日目の移植は培養 5 日目の胚盤胞移植と比較して有意に妊娠率が低下した。本章においては、最も良好な胚を新鮮胚移植に供し、残りの胚をガラス化凍結保存したが、新鮮胚移植は多くの場合、培養 2 あるいは 3 日目の胚を用い、培養 5 日目の移植でガラス化凍結保存した胚を移植した。よって、培養 2 あるいは 3 日目の移植に供した胚の質が培養 5 日目の移植に供した胚より低いとは仮定できないため、形態評価のみでの胚選抜は、高い妊娠率を得るには不十分であることが示唆された。さらに、移植したグループ D、E および H において、卵割時間を基に着床能が高い胚を選別しようと試み、良好胚盤胞に発育する能力を有する胚は、第 1 および第 2 卵割時間を基に選抜できることを示した。これらの結果は、早期卵割胚は発育能力が高いとされるこれまでの報告と一致しており (Fenwick et al., 2002; Hashimoto et al., 2012) 早期卵割胚は厳密にプログラムされたタイムコースに一致して卵割すると考えられる。本章においては、第 1 および第 2 卵割がそれぞれ 25.90 および 37.88 時間以内に完了した胚を早期卵割胚とみなした。第 1 卵割時間の基準は、培養 25~27 時間後に早期卵割した IVF あるいは ICSI 胚を選んでいるこれまでの多くの報告 (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998; Fenwick et al., 2002; Salumets et al., 2003; Van Montfoort et al., 2004; Giorgetti et al., 2007; Lee et al., 2012) と一致している。一方、第 2 卵割時間の基準についてはこれまでに報告がなかったが、本章の結果より、第 2 卵割時間も早期卵割胚の選抜に有効であることが示された。

これまでに、早期卵割胚はそれ以外の胚と比較すると着床率が高いことが報告されている (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998; Salumets et al., 2003; Van Montfoort et al., 2004; Giorgetti et al., 2007; Lee et al., 2012)。本章では、早期卵割胚を胚盤胞移植することで妊娠率が向上した。対照的に、早期卵割胚を培養 2 あるいは 3 日目に移植しても妊娠率に影響を及ぼさなかった。これは、移植胚の空間非同期性が原因かもしれない。具体的には、ART において、培養 2 あるいは 3 日目の胚と培養 5 日目の胚盤胞は、どちらも子宮に移植を行う。自然妊娠の場合、2 あるいは 3 日目の初期胚は卵管に留まっており、子

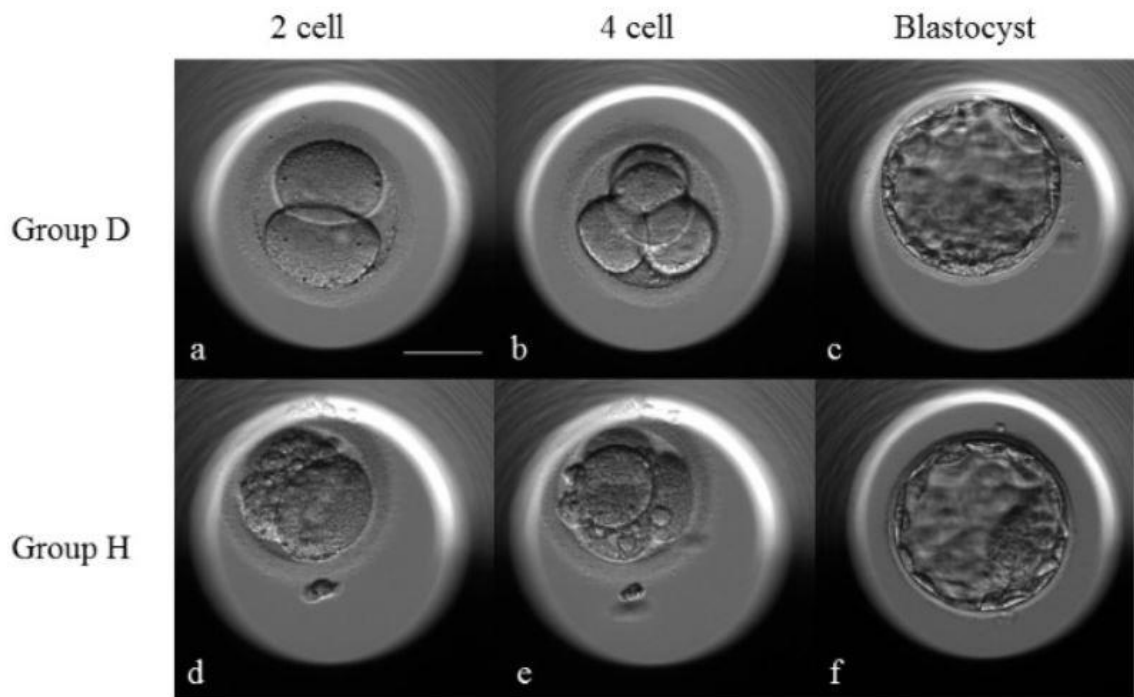
宮には到達していない。それゆえ、子宮の環境が2あるいは3日目の胚に適切でなかった可能性が考えられる。一方で、高い発育能力を持つ胚の選抜において、早期卵割を基準とした多くの研究が、2あるいは3日目での移植を目標としている (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998; Salumets et al., 2003; Dennis et al., 2006; Giorgetti et al., 2007; Meseguer et al., 2011; Lee et al., 2012)。しかしながら、本章において、選抜された胚を体外培養し、培養5日目の胚盤胞を移植することは、高い妊娠率を得るために必要であることが示された。

本章により、初期卵割様式を基に、移植前に高い着床能力を持つヒト胚を非侵襲的に選抜し得る方法が確立された。この方法はART治療において産子獲得に有効であると考えられる。



**Fig. III-1**

Classification of divisions.



**Fig. III-2**

*In vitro* development of human embryos in groups D (a–c) and H (d–f). Scale bar: 50  $\mu$ m.

**Table III-1**

**Effects of first division patterns on blastocyst formation of human embryos**

Group	No. of embryos cultured	No. (%) of blastocysts	
		Total	Good-quality <sup>a</sup>
A	382	323 (84.6) <sup>b</sup>	189 (49.5) <sup>b</sup>
B	226	182 (80.5) <sup>b</sup>	106 (46.9) <sup>b</sup>
C	183	51 (27.9) <sup>c</sup>	7 (3.8) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Blastocysts in which both the inner cell mass and trophectoderm grades were scored B or higher.

<sup>b-c</sup> Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.01$ ).



**Table III-2****Effects of first and second division patterns on blastocyst formation of human embryos**

Group	No. of embryos cultured	No. (%) of blastocysts	
		Total	Good-quality <sup>a</sup>
D	305	278 (91.1) <sup>b</sup>	176 (57.7) <sup>b</sup>
E	29	23 (79.3) <sup>b</sup>	10 (34.5) <sup>b</sup>
F	37	17 (45.9) <sup>c</sup>	1 (2.7) <sup>c</sup>
G	11	5 (45.5) <sup>c</sup>	2 (18.2) <sup>bc</sup>
H	189	171 (90.5) <sup>b</sup>	102 (54.0) <sup>b</sup>
I	37	11 (29.7) <sup>c</sup>	4 (10.8) <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Blastocysts in which both the inner cell mass and trophectoderm grades were scored B or higher.

<sup>b-c</sup> Values with different superscripts within each column are significantly different (at least  $P<0.05$ ).

**Table III-3****Effects of first and second division patterns on clinical pregnancy after embryo transfer**

Group	Day 2 or Day 3 embryo transfer			Day 5 blastocyst transfer		
	No. of embryos transferred <sup>b</sup>	No. (%) of pregnancies	No. (%) <sup>a</sup> of deliveries	No. of embryos transferred <sup>b</sup>	No. (%) of pregnancies	No. (%) <sup>a</sup> of deliveries
D	23 (21+2)	3 (13.0) <sup>c</sup>	3 (100.0)	45 (8+37)	17 (37.8) <sup>d</sup>	16 (94.1)
E and H	13 (12+1)	3 (23.1) <sup>c</sup>	2 (66.7)	29 (6+23)	17 (58.6) <sup>d</sup>	15 (88.2)

<sup>a</sup>Percentage per pregnancy.

<sup>b</sup>The number of fresh (first) or cryopreserved (second) embryos are indicated in parentheses.

<sup>c-d</sup> Values with different superscripts within each row are significantly different (at least  $P<0.05$ ).

**Table III-4**

**Effects of cell division times on blastocyst formation patterns of human embryos in groups**

**D, E and H**

Endpoint of embryonic development	Time (mean $\pm$ S.D. hours)	
	First division	Second division
Blastocysts (good-quality) <sup>a</sup>	25.90 $\pm$ 2.97 <sup>b</sup>	37.88 $\pm$ 3.65 <sup>b</sup>
Blastocysts (others)	27.10 $\pm$ 3.89 <sup>c</sup>	39.78 $\pm$ 4.80 <sup>c</sup>
< Blastocysts	27.58 $\pm$ 3.60 <sup>c</sup>	40.08 $\pm$ 3.73 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Blastocysts in which both the inner cell mass and trophectoderm grades were scored B or higher.

<sup>b-c</sup> Values with different superscripts within each column are significantly different ( $P < 0.01$ ).

**Table III-5**

**Effects of embryo selection based on first and second division times on clinical pregnancy after embryo transfer**

Criterion <sup>a</sup>	Day 2 or Day 3 embryo transfer			Day 5 blastocyst transfer		
	No. of embryos transferred <sup>b</sup>	No. (%) of pregnancies	No. (%) <sup>c</sup> of deliveries	No. of embryos transferred <sup>b</sup>	No. (%) of pregnancies	No. (%) <sup>c</sup> of deliveries
Satisfied	16 (15+1)	3 (18.8)	3 (100.0)	43 (7+36)	24 (55.8) <sup>d</sup>	23 (95.8)
Not satisfied	20 (18+2)	3 (15.0)	2 (66.7)	31 (7+24)	10 (32.3) <sup>e</sup>	8 (80.0)

<sup>a</sup> Embryos that completed first and second divisions within 25.90 and 37.88 h after culture, respectively, were regarded as satisfied embryos.

<sup>b</sup> The number of fresh (first) or cryopreserved (second) embryos are indicated in parentheses.

<sup>c</sup> Percentage per pregnancy.

<sup>d-e</sup> Values with different superscripts are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 第IV章

適切なコンパクション時間に基づいた高い着床能を有するヒト胚盤胞の  
選抜

## 緒言

ARTにおいて多胎妊娠は深刻な問題となっている (Pinborg et al., 2003, 2004)。この問題は、移植胚数と関連がある。それゆえ、胎児と母体へのリスクを減らすため、日本産科婦人科学会は2008年単一胚移植を推奨した。妊娠率を減少させることなく、多胎妊娠を避けることは重要であり、単一胚盤胞移植はこの問題を解決する手法である。移植する胚盤胞を得るためには、胚を体外で5~6日間培養する必要がある。胚盤胞への培養の利点として、胚盤胞に到達できない胚を除くことで、体外培養の間に高品質の胚を選抜できることが挙げられる。しかし、培養したほとんどの胚が胚盤胞に発育しない場合には、胚盤胞移植は効果的ではない。初期胚移植(培養2または3日目の移植)する場合は、胚盤胞へ発育させることなく、良好な胚を選抜しなければならない。それゆえ、多くの研究が初期胚の卵割速度、形態に焦点を合わせ、良好胚を選抜する方法を確立しようと試みている (Milki et al., 2000; Dennis et al., 2006; Lee et al., 2012)。タイムラプスインキュベーターは胚発育の詳細な観察において重要な役割を果たし、初期卵割様式と胚発育能力との関係を明らかにしてきた。これまでに、受精から第1卵割までの時間と受精後2日目の割球数あるいは着床能との関係 (Lemmen et al., 2008)、第1および第2卵割時間と3日目の胚の着床能との関係 (Meseguer et al., 2011)、第2および第3卵割の同期化と良好胚盤胞形成率との関係 (Hashimoto et al., 2012)、第2卵割の同期化と胚盤胞形成率との関係 (Cruz et al., 2012) について相関関係が明らかにされている。加えて、多くの研究が、胚の第1卵割時間は移植後の妊娠率に影響を及ぼすと報告している (Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998; Fenwick et al., 2002; Salumets et al., 2003; Giorgetti et al., 2007)。一方で、いくつかの報告は影響を及ぼさないとしている (Emiliani et al., 2006; Desai et al., 2014; Goldman et al., 2016)。

第Ⅲ章では、不均等分割の有無に関係なく、第1卵割で2細胞および第2卵割で4細胞を形成し、それぞれの卵割が培養25.90および37.88時間以内に完了したものを質の高い胚として選抜した。興味深いことに、これらの胚を培養2あるいは3日目に移植しても妊娠率に

影響を及ぼさないが、胚盤胞まで培養した後に移植した場合には妊娠率が改善した。初期卵割様式を基準に高い発生能を有する胚を選抜することを目的とした研究の多くが、培養2あるいは3日目での移植を目指していた(Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998; Salumets et al., 2003; Dennis et al., 2006; Giorgetti et al., 2007; Meseguer et al., 2011; Lee et al., 2012)が、本研究の結果は選抜された胚を5日間体外培養した後、得られた胚盤胞を移植することが妊娠率を高めるために必要であることを明白に示している。しかしながら、良好な胚を胚盤胞期に移植した場合でも妊娠率は55.8%に留まったことから、高い着床能を有する胚を選抜するためのさらなる基準が必要である。

それゆえ、本章においては第Ⅲ章で確立した移植前に高い着床能を有するヒト胚の非侵襲的な選抜方法のさらなる改良のため、第1および第2卵割、コンパクトン、胚盤胞形成時間に着目し、移植後に高い妊娠率が得られる胚の選抜を行った。

## 材料および方法

### 患者背景

2014年3月～2016年6月に採卵術を施行した胚を用いた。具体的には、第Ⅲ章で確立した不均等分割の有無に関係なく、第1卵割で2細胞、第2卵割で4細胞を形成し、胚盤胞に到達した胚を用いた。ガラス化凍結保存後、次周期以降に移植した243名、299周期(299個)の胚盤胞を本章の実験に用いた。患者年齢は $37.0 \pm 4.0$ 歳(26～45歳)であった。

### 胚培養および胚移植

卵巣刺激は第Ⅱ章、材料および方法の卵巣刺激および採卵術に準じて行なった。受精、胚培養および胚移植は第Ⅲ章の材料および方法の胚培養および胚移植に準じて行った。ガラス化凍結保存においても、第Ⅱ章の材料および方法の胚盤胞移植に準じて行った。融解後の単一胚盤胞移植299周期はホルモン補充周期で行われた。臨床妊娠においても第Ⅱ章での定義

を用いた。

## 実験計画

実験Ⅰでは、第Ⅲ章で確立した、不均等分割の有無に関係なく、第1卵割で2細胞、第2卵割で4細胞を形成し、それぞれが25.90および37.88時間以内に完了した胚を選抜する方法の有用性を再検討した。299個の胚盤胞は第Ⅲ章で確立した条件を満たす胚と、満たさない胚の2群に分類し、臨床妊娠率および出生率を比較した。

実験Ⅱでは、第Ⅲ章で確立した条件を満たす182個の胚を妊娠に至った胚とそうでない胚の2群に分類した。第1、第2卵割、コンパクション開始、完了および胚盤胞形成時間を2群間で比較した。何度かの細胞分裂後 (Fig. IV-1. a および e)、割球はそれぞれ独立し、境界が明瞭である。一部の細胞が接着を始め、境界が不明瞭になった時点 (割球はしっかりと配置され、いくつかまたはすべての割球は融合を開始するが、個々の細胞は容易に識別できる; Fig. IV-1. b および f) をコンパクション開始と定義した。割球が1つの塊を形成した時点 (割球は融合を完了し、個々の細胞の境界は容易に見分けがつかないが、核ははっきりしており、細胞間隙は見えなくなる) をコンパクション完了と定義した (Fig. IV-1. c および g)。ガードナー分類 (Gardner et al., 2000) におけるスコア3に発育した時点 (胚盤胞腔を形成し、腔容積を増加させ、胚盤胞腔が完全に胚を満たした状態) を胚盤胞形成 (Fig. IV-1. d および h) と定義した。

実験Ⅲでは、コンパクション完了および胚盤胞形成またはその両方の時間がその後の妊娠および出生に及ぼす影響について検討した。コンパクション完了および胚盤胞形成時間は実験Ⅱにおいて妊娠に至った群の平均である79.93および97.47時間をそれぞれ基準にした。始めに、コンパクション完了が79.93時間以内に完了した胚とそれ以外の胚、次に、胚盤胞形成が97.47時間以内に完了した胚とそれ以外の胚、最後に、コンパクション完了および胚盤胞形成時間がそれぞれ79.93および97.47時間以内に完了した胚とそれ以外の胚について



妊娠率を比較した。

## 統計解析

統計解析は第Ⅱ章の材料および方法の統計解析に準じて行った。すなわち、実験ⅠおよびⅢではカイ二乗検定、実験Ⅱではクラスカル・ウォリス分散分析を用いた。P値が5%未満の場合を有意な差とした。

## 結果

### 第1および第2卵割時間を基準とした胚選抜が移植後の妊娠に及ぼす影響（実験Ⅰ）

Table IV-1 に示すように、第Ⅲ章で確立した条件を満たす胚の妊娠率（53.3%）はそれ以外の胚（39.3%）と比較して、有意に高い値を示した（ $P < 0.05$ ）。出生率に差はなかった（76.3% vs. 69.6%）。

### 妊娠群および非妊娠群における胚発生速度の違い（実験Ⅱ）

Table IV-2 に示すように、第1卵割（23.62 vs. 23.53 時間）、第2卵割（35.15 vs. 35.07 時間）、コンパクション開始（73.36 vs. 74.10 時間）時間において、2群間に差はなかった。しかしながら、コンパクション完了および胚盤胞形成時間においては、妊娠に至った群（79.93 および 97.47 時間）が、妊娠に至らなかった群（86.46 および 100.34 時間）と比較して、有意に早い値を示した（ $P < 0.01$ ）。

### コンパクション完了および胚盤胞到達時間を基準とした胚選抜が移植後の妊娠に及ぼす影響（実験Ⅲ）

Table IV-3 に示すように、コンパクション完了が79.93時間以内であった胚における妊娠率（74.6%）は、それ以外の胚（40.9%）と比較して、有意に高い値を示した（ $P < 0.01$ ）。同様に、コンパクション完了および胚盤胞形成が79.93時間以内および97.47時間以内であ

った胚における妊娠率（73.5%）はそれ以外の胚（45.9%）と比較して、有意に高い値を示した（ $P < 0.01$ ）。これに対して、胚盤胞形成時間が、97.47時間以内であった胚における妊娠率（60.2%）は、それ以外の胚（47.5%）と差がなかった。コンパクション完了および胚盤胞形成時間に基づいた胚選抜は、出生率に影響を及ぼさなかった（それぞれにおいて、74.0% vs. 78.7%、74.5% vs. 78.0%および 75.0% vs. 77.0%）。

## 考察

本章では、第1卵割で2細胞および第2卵割で4細胞を形成し、それぞれの卵割が25.90および37.88時間以内に完了した胚を選抜した。これらの胚が、胚盤胞に到達した後、ガラス化凍結保存し、ホルモン補充周期にて融解した単一胚盤胞移植を行っている。本章により、早期に卵割した胚で、コンパクション完了が79.93時間である胚を胚盤胞移植することにより、さらに高い妊娠率が得られることが示された。

第Ⅲ章の結果より、早期に卵割し、2および4細胞を形成した胚は高い着床能力があることが示されたが、これらの条件を満たす胚を移植しても、臨床妊娠率は約50%である。当初は、これらの条件を満たす胚の中でさらに早期に卵割する胚を選抜することにより妊娠率が改善すると予想したが、第1および第2卵割時間において妊娠に至った胚は妊娠に至らなかった胚と相違なく（Table IV-2）、胚選抜において、妊娠率を向上させるためには、それ以外の基準が必要である。

胚発育の段階では、何回かの分裂の後、細胞間の境界が不明瞭になる。この過程をコンパクションと呼び、細胞質間接着を最大にし、桑実胚を形成する。細胞間結合をより高めるため、細胞接着因子であるE-カドヘリンがコンパクションの過程で最初に発現する（Larue et al., 1994; Nikas et al., 1996; Fleming et al., 2001; Alikani, 2005; Bell et al., 2008）。ARTにおいて、胚のコンパクションはあまり注目されていないが、いくつかの研究はコンパクション様式とその発育能力の関係について報告している。8細胞形成以前にコンパクションが

起きた場合、体外発育に異常を示す (Iwata et al., 2014)。反対に、5日目にコンパクションが完了した胚は4日目に完了した胚よりも良好胚盤胞に発育する能力が低い (Ivec et al., 2011) と報告されている。さらに、コンパクション様式は移植後の妊娠率に影響する (Tao et al., 2002; Skiadas et al., 2006)。これらの研究は、コンパクション様式が *in vitro* および *in vivo*において胚発育能の予測を容易にすることを示している。それゆえ、コンパクション時間は高い着床能を有する胚を選抜する基準に有効であると仮定した。本章の結果より、コンパクション開始時間は、妊娠の有無にかかわらず差はなかった。よって、コンパクション開始時間は高い着床能を有する胚を選抜する基準にならないことが示された。対照的に、妊娠に至った胚のコンパクション完了時間は妊娠に至らなかった胚のそれよりも短く、コンパクション完了が79.93時間である胚を選抜し、胚盤胞移植することで妊娠率は向上した。これらの結果は、コンパクション開始から完了までの時間と着床能との間に相関関係があることを示しており、胚のコンパクション様式が良好胚盤胞形成率および臨床妊娠率に影響を与えるというこれまでの報告と一致している (Iwata et al., 2014; Tao et al., 2002; Skiadas et al., 2006)。一方で、いくつかの研究は胚のコンパクション時間は臨床妊娠率に影響しないと報告している (Chamayou et al., 2013; Kirkegaard et al., 2013)。

Skiadas et al. (2006) はIVFまたはICSI胚でコンパクション完了が68~72時間で、不均等分割が10%以下であれば培養3日目の移植において高い妊娠率 (47%) が得られると報告していたが、移植した胚のわずか4.5%しか条件を満たしていなかった。しかしながら、本章においては移植した胚の36.8%が本実験の基準を満たしており、基準を満たした胚の妊娠率 (74.6%) も著しく高くなった。この改善は、3つの要因に起因していると考えられる。1つ目の要因として、79.93時間以内にコンパクションが完了した胚を選抜したことが挙げられる。受精から68~72時間後、53.5~60.1%の移植胚は、細胞数は数えられるものの、いくつかの膜融合が明らかであり、部分的にコンパクションが起きている (Skiadas et al., 2006)。これらの胚のいくつかは、培養79.93時間でコンパクションを完了していると考えられる。2つ目の要因

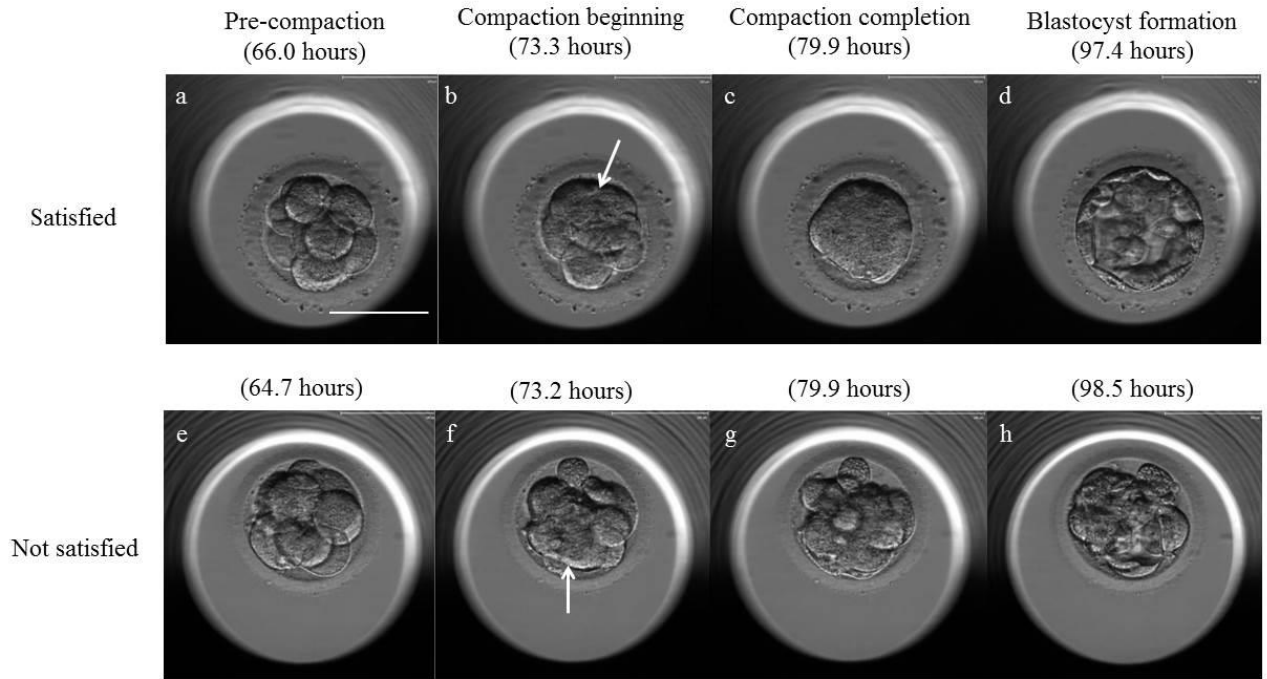
として、早期コンパクション完了だけでなく、早期に2および4細胞に卵割する胚を選抜したことが挙げられる。Skiadas et al. (2006)によると、受精から68～72時間後の、部分的にコンパクションが起きている胚を移植すると20～33%の妊娠率であると報告している。この付加的な基準による胚選抜は、コンパクションが遅延している胚における高い着床能を有する胚の選別を容易にするかもしれない。最後の要因として、培養5または6日目の胚盤胞を移植胚として選抜したことが挙げられる。この方法は、第Ⅲ章で確立したように、早期卵割様式を基準に胚を選抜した場合、培養2あるいは3日目の移植と比較すると培養5日目の移植は妊娠率が向上する。この胚選抜システムはICSIおよびIVF胚に由来する妊娠数を増加させるだろう。

早期にコンパクションが完了した胚を移植するとなぜ高い妊娠率が得られるのか、明確ではない。コンパクションは母性ゲノムから胚性ゲノムへ遺伝子転写が機能的に移行するのと同時期に起こる。これらの機能的な変化は、細胞の分化、すなわち内部細胞塊および栄養外胚葉への分化を導き、これらの変化は胚盤胞形成には不可欠である (Iwata et al., 2014)。これまでに、コンパクション遅延と発育した胚盤胞における内部細胞塊量の小ささとの間に関連があると報告されている (Ivec et al., 2011)。この結果は、コンパクション完了の遅延は胚のクオリティを低下させ、その結果として妊娠率が低下する。よって、早期にコンパクションが完了した胚を選抜することで、低クオリティ胚の移植を防げるかもしれない。コンパクション過程が遅延する理由は明確ではないが、正常な細胞周期は正常な胚発育に重要な役割を果たす (Hashimoto et al., 2012) と報告されている。外的要因が原因で細胞周期が変化し、結果として胚発育が遅延したかもしれない。また、4～7細胞の間でコンパクションが起きたほとんどの胚の割球は多核であり、細胞質分裂に失敗している (Iwata et al., 2014)。これらの胚からは良好胚盤胞を得られていない。それゆえ、異常な細胞周期、割球の多核、細胞質分裂の不成功はコンパクション完了の遅延と関係しているかもしれない。

本章により、妊娠に至った胚は、妊娠に至らなかった胚より早期に胚盤胞を形成している。

しかし、胚盤胞形成時間を基準に胚を選抜しても妊娠率は向上しなかった。コンパクト完了時間において、妊娠に至った胚は妊娠に至らなかった胚より6.53時間早期にコンパクトが完了しているが、胚盤胞形成時間は2.87時間の違いしかない。これは、早期にコンパクトが完了している胚の胚盤胞形成が遅延する、あるいは、コンパクト完了が遅延した胚の胚盤胞形成が早期に起きることを示している。このことから、胚盤胞形成時間を基準に胚を選抜しても、不良胚を移植しているかもしれない。

本章の結果から、早期卵割およびコンパクトの様式を基準に、良好な着床能を有する胚盤胞を非侵襲的に選抜する方法を確立した。



**Fig. IV-1.** In vitro-development of (a-d) “Satisfied” and (e-h) “Not satisfied” embryos. (a and e) Pre-compaction, (b and f) compaction beginning, (c) compaction completion, (d) blastocyst, (g) incomplete compaction, and (h) incomplete blastocyst. Culture times are shown in each picture. The arrows show the obscured intercellular boundaries by the merging of blastomeres. Scale bar: 100  $\mu$ m

**Table IV-1.** Effects of embryo selection based on first and second division times on clinical pregnancy after single blastocyst transfer

Criterion <sup>a</sup>	Embryos transferred	Pregnancies	Deliveries <sup>b</sup> (%) <sup>c</sup>
	n	n (%)	
Satisfied	182	97 (53.3) <sup>d</sup>	74 (76.3)
Not satisfied	117	46 (39.3) <sup>e</sup>	32 (69.6)

<sup>a</sup> Embryos that formed two cells during the first division within 25.90 hours and four cells during the second division within 37.88 hours were regarded as satisfied embryos.

<sup>b</sup> The numbers of deliveries.

<sup>c</sup> Percentage per pregnancy.

<sup>d,e</sup> Values with different superscript letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

**Table IV-2.** Effects of cell division, compaction, and blastocyst formation times on clinical pregnancy after single blastocyst transfer

Pregnancy	Embryos transferred <sup>a</sup> n	Time (h), mean $\pm$ SD				
		First division	Second division	Compaction beginning	Compaction completion	Blastocyst formation
+	97	23.62 $\pm$ 1.59	35.15 $\pm$ 2.24	73.36 $\pm$ 6.83	79.93 $\pm$ 7.19 <sup>b</sup>	97.47 $\pm$ 6.02 <sup>b</sup>
-	85	23.53 $\pm$ 1.67	35.07 $\pm$ 1.95	74.10 $\pm$ 6.44	86.46 $\pm$ 7.30 <sup>c</sup>	100.34 $\pm$ 7.94 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Embryos that formed two cells during the first division within 25.90 hour and four cells during the second division within 37.88 hour were selected.

<sup>b,c</sup> Values with different superscript letters within each column are significantly different ( $P < 0.01$ ).



**Table IV-3.** Effects of embryo selection based on compaction completion and/or blastocyst formation times on clinical pregnancy after single blastocyst transfer

Criterion	Outcome	Satisfied	Not satisfied
Compaction completed within 79.93 hours	Embryos transferred, n	67	115
	Pregnancies, n (%)	50 (74.6) <sup>c</sup>	47 (40.9) <sup>d</sup>
	Deliveries <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	37 (74.0)	37 (78.7)
Blastocyst formed within 97.47 hours	Embryos transferred, n	83	99
	Pregnancies, n (%)	50 (60.2)	47 (47.5)
	Deliveries <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	39 (78.0)	35 (74.5)
Compaction completed and blastocyst formed within 79.93 and 97.47 hours, respectively	Embryos transferred, n	49	133
	Pregnancies, n (%)	36 (73.5) <sup>c</sup>	61 (45.9) <sup>d</sup>
	Deliveries <sup>a</sup> (%) <sup>b</sup>	27 (75.0)	47 (77.0)

<sup>a</sup> The numbers of deliveries.

<sup>b</sup> Percentage per pregnancy.

<sup>c,d</sup> Values with different superscript letters within each row are significantly different ( $P < 0.01$ ).

# 総括

本研究では、ART における妊娠率を改善するために、胚の初期発生様式と移植後の着床状況との関連について調べた。

第Ⅱ章では、採卵された卵子を有効活用するため、細胞膜が脆弱な卵子の受精能、発生能および妊孕能について検討した。その結果、細胞膜が脆弱な卵子は受精能が低くて変性しやすいが、受精後の体外発生率および妊娠率は正常な細胞膜を有する卵子に由来する胚と同等であることが明らかになった。このことから、細胞膜が脆弱な卵子も ART に使用できることが示された。

第Ⅲ章では、質の高い胚の選抜を目的として、発生初期における卵割様式および不均等分割の有無が胚盤胞への体外発生および移植後の妊娠に及ぼす影響について調べた。また、高い妊娠率を得るためには選抜した胚をどの発生段階で移植すれば良いか検討した。その結果、不均等分割の有無にかかわらず第 1 卵割で 2 細胞および第 2 卵割で 4 細胞を形成し、それぞれの卵割が培養 25.90 および 37.88 時間以内に完了した胚を胚盤胞まで体外培養した後に移植することにより、高い妊娠率が得られることが明らかになった。

第Ⅳ章では、第Ⅲ章において確立された基準をもとに選抜した胚の妊娠率を改善するために、コンパクションおよび胚盤胞形成時間によってさらなる胚の選抜を試みた。その結果、上記の基準をもとに選抜した胚の中から培養 79.93 時間以内にコンパクションを完了した胚を選んで胚盤胞期に移植することにより、さらに高い妊娠率を得ることに成功した。

本研究の結果から、高い着床能を有するヒト胚を非侵襲的に選抜して移植し得る方法が確立された。この移植胚選抜法は、ART における妊娠率の改善に大きく貢献すると考えられる。

# 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご助言を賜った鹿児島大学農学部の上野和陸教授に深く感謝いたします。

また、本論文の審査にあたり御助言、御校閲を賜った鹿児島大学農学部の大久津昌治准教授、琉球大学農学部の上野秀樹教授、鹿児島大学農学部の上野猛准教授ならびに佐賀大学農学部の上野賢一准教授に深謝の意を表します。

そして、社会人ドクター進学に際し、進学を許可していただいただけでなく、研究への援助、協力を頂いた医療法人愛育会レディースクリニックあいいく、榎園祐治医師に感謝の意を表します。さらに、レディースクリニックあいいくスタッフの皆様にも大変お世話になりました。心より感謝いたします。

## 参考文献

- Abdalla HI, Ah-Moye M, Brinsden P, Howe DL, Okonofua F, Craft I. The effect of the dose of human chorionic gonadotropin and the type of gonadotropin stimulation on oocyte recovery rates in an in vitro fertilization program. *Fertil Steril.* 1987;48: 958-63.
- Abdelmassih S, Cardoso J, Abdelmassih V, Dias JA, Abdelmassih R, Nagy ZP. Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum Reprod.* 2002;17: 2694-9
- Alikani M. Epithelial cadherin distribution in abnormal human pre-implantation embryos. *Hum Reprod.* 2005;20: 3369-75.
- Alikani M, Calderone G, Tomkin G, Garrisi J, Kokot M, Cohen J. Cleavage anomalies in early human embryos and survival after prolonged culture *in vitro*. *Hum Reprod.* 2000;15: 2634-43.
- Antczak M, Van Blerkom J. Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulation proteins from polarized domains. *Hum Reprod.* 1999;14: 429-47.
- Begg DA, Rebhun LI. pH regulation the polymerization of actin in the sea urchin egg cortex. *J Cell Biol.* 1979;83: 241-8.
- Bell CE, Calder MD, Watson AJ. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. *Mol Hum Reprod.* 2008;14: 691-701.
- Cauffman G, Verheyen G, Tournaye H, Van de Velde H. Developmental capacity and pregnancy rate of tetrahedral- versus non-tetrahedral-shaped 4-cell stage human embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2014;31: 427-34.

- Chamayou S, Patrizio P, Storaci G, Tomaselli V, Alecci C, Ragolia C, Crescenzo C, Guqlielmino A.** The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:703-10.
- Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, & Massey J.** Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *The Lancet.* 1988;332: 162.
- Cruz M, Gadea B, Garrido N, Pedersen KS, Martínez M, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M.** Embryo quality, blastocyst and ongoing pregnancy rates in oocyte donation patients whose embryos were monitored by time-lapse imaging. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28: 569-73.
- Cruz M, Garrido N, Herrero J, Pérez-Cano I, Muñoz M, Meseguer M.** Timing of cell division in human cleavage-stage embryos is linked with blastocyst formation and quality. *Reprod Biomed Online.* 2012;25: 371-81.
- Dellenbach P, Nisand I, Moreau L, Feger B, Plumere C, Gerlinger P.** Transvaginal sonographically controlled follicle puncture for oocyte retrieval. *Fertil steril.* 1985;44: 656-62.
- Delvigne A, Rozenberg S.** Review of clinical course and treatment of ovarian hyperstimulation syndrome (OHSS). *Hum Reprod update.* 2003;9: 77-96.
- Dennis SJ, Thomas MA, Williams DB, Robins JC.** Embryo morphology score on day3 is predictive of implantation and live birth rates. *J Assist Reprod Genet.* 2006;23: 171-5.
- Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T.** Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol.* 2014;12:54.

- Dumoulin JM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RC, van Wissen LC, Geraedts LP, Evers JL.** Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. *Hum Reprod.* 2001;16:306-12.
- Ebner T, Maurer M, Shebl O, Moser M, Mayer RB, Duba HC, Tews G.** Planar embryos have poor prognosis in terms of blastocyst formation and implantation. *Reprod Biomed Online.* 2012;25: 267-72.
- Emiliani S, Fasano G, Vandamme B, Vannin AS, Verdoodt M, Biramane J, Delbaere A, Englert Y, Devreker F.** Impact of the assessment of early cleavage in a single embryo transfer policy. *Reprod Biomed Online.* 2006;13:255-60.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M.** Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod.* 2002;17: 407-12.
- Fleming R, Jamieson ME, Hamilton MP, Black WP, Macnaughton MC, Coutts JR.** The use of GnRH analogues in combination with exogenous gonadotropins in infertile women. *Acta Endocrinol Suppl (Copenh).* 1988;288: 77-84.
- Fleming TP, Sheth B, Fesenko I.** Cell adhesion in the preimplantation mammalian embryo and its role in trophectoderm differentiation and blastocyst morphogenesis. *Front Biosci.* 2001;6: D1000-7.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB.** Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000;73: 1155-8.
- Gardner DK, Schoolcraft WB, Eagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod.* 1998;13: 3434-40.

Giorgetti C, Hans E, Terriou P, Salzmann J, Barry B, Chabert-Orsini V, Chinchole JM, Franquebalme JP, Glowaczower E, Sitri MC, Thibault MC, Roulier R. Early cleavage: an additional predictor of high implantation rate following elective single embryo transfer. *Reprod BioMed Online*. 2007;14: 85-91.

Goldman RH, Kaser DJ, Missmer SA, Srouji SS, Farland LV, Racowsky C. Building a model to increase live birth rate through patient-specific optimization of embryo transfer day. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33:1525-32.

Hashimoto S, Kato N, Saeki K, Morimoto Y. Selection of high-potential embryos by culture in poly (dimethylsiloxane) microwells and time-lapse imaging. *Fertil Steril*. 2012;97: 332-7.

Hiraoka K, Hiraoka K, Tamaki T, Nada Y, Kiriake C, Yoshie M, Uto H, Yoshida H, Kitamura S, Kuwayama M. Clinical efficiency of an improved Piezo-ICSI method using an ultra-thin micropipette. *J Mamm Ova Res*. 2013;30: 53-8.

Hughes EG, Fedorkow DM, Daya S, Sagle MA, Van de Koppel P, Collins JA. The routine use of gonadotropin-releasing hormone agonists prior to in vitro fertilization and gamete intrafallopian transfer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Fertil Steril*. 1992;58: 888-96.

Ivec M, Kovacic B, Vlasisavljevic V. Prediction of human blastocyst development from morulas with delayed and/or incomplete compaction. *Fertil Steril*. 2011;96: 1473-8.

Iwata K, Yumoto K, Sugishima M, Mizoguchi C, Kai Y, Iba Y, Mio Y. Analysis of compaction initiation in human embryos by using time-lapse cinematography. *J Assist Reprod Genet*. 2014;31: 421-6.

Jones HW, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G. The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril*. 1982;38: 14-21.

- Joo BS, Park SH, An BM, Kim KS, Moon SE, Moon HS.** Serum estradiol levels during controlled ovarian hyperstimulation influence the pregnancy outcome of in vitro fertilization in a concentration-dependent manner. *Fertil Steril.* 2010;93: 442-6.
- Katayose H, Yanagida K, Shinoki T, Kawahara T, Horiguchi T, Sato A.** Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a Piezo-driven pipette. *Theriogenology.* 1999;52: 1215-24.
- Kirkegaard K, Agerholm IE, Ingerslev HJ.** Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. *Hum Reprod.* 2012a;27: 1277-85.
- Kirkegaard K, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ.** Human embryonic development after blastomere removal: a time-lapse analysis. *Hum Reprod.* 2012b;27: 97-105.
- Kirkegaard K, Kesmodel US, Hindkjaer JJ, Ingerslev HJ.** Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Hum Reprod.* 2013;28: 2643-51.
- Kuwayama M.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology.* 2007;67: 73-80.
- Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod BioMed Online.* 2005;11: 300-8.
- Larue L, Ohsugi M, Hirchenhain J, Kemler R.** E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91: 8263-7.
- Lee MJ, Lee RK, Lin MH, Hwu YM.** Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2012;29: 745-50.
- Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S.** Kinetic markers of human embryo quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online.* 2008;17: 385-91.



- Liu Y, Chapple V, Feenan K, Roberts P, Matson P.** Clinical significance of intercellular contact at the four-cell stage of human embryos, and the use of abnormal cleavage patterns to identify embryos with low implantation potential: a time-lapse study. *Fertil Steril.* 2015;103: 1485-91.
- Lopata A.** Successes and failures in human in vitro fertilization. *Nature.* 1980;25: 642-643.
- Ludwig M, Doody KJ, Doody KM.** Use of recombinant human chorionic gonadotropin in ovulation induction. *Fertil Steril.* 2003;79:1051-9.
- Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hilligsøe KM, Ramsing NB, Remohi J.** The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2011;26: 2658-71.
- Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, Dasig D, Behr B.** Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril.* 2000;73: 126-9.
- Mio Y.** Morphological Analysis of Human Embryonic Development Using Time-Lapse Cinematography: Mini Review. *J Mamm Ova Res.* 2006;23: 27-35.
- Mio Y, Iwata K, Yumoto K, Kai Y, Sargant HC, Mizoguchi C, Ueda M, Tsuchie Y, Imajo A, Iba Y, Nishikori K.** Possible mechanism of polyspermy block in human oocytes observed by time-lapse cinematography. *J Assis Reprod Genet.* 2012;29: 951-6.
- Mio Y, Maeda K.** Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* 2008;199: 660.e1-5.
- Nagy ZP, Liu J, Joris H, Bocken G, Desmet B, Van Ranst H, Vankelecom A, Devroey P, Van Steirteghem A.** The influence of the site of sperm deposition and mode of oolemma breakage at intracytoplasmic sperm injection of fertilization and embryo developmental rates. *Hum Reprod.* 1995;10: 3171-7.

- Nagy ZP, Oliveira SA, Abdelmassih V, Abdelmassih R.** Novel use of laser to assist ICSI for patients with fragile oocytes: a case report. *Reprod BioMed Online.* 2002;4: 27-31.
- Nikas G, Ao A, Winston RM, Handyside AH.** Compaction and surface polarity in the human embryo in vitro. *Biol Reprod.* 1996;55: 32-7.
- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CLK, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC, Goh VHH.** Pregnancy after transfer of sperm under zona. *The Lancet.* 1988;332: 790.
- Olivennes F, Fanchin R, Bouchard P, de Ziegler D, Taieb J, Selva J, Frydman R.** The single or dual administration of the gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertil Steril.* 1994;62: 468-76.
- Olivennes F, Belaisch-Allart J, Emperaire JC, Dechaud H, Alvarez S, Moreau L, Nicollet B, Zorn JR, Bouchard P, Frydman R.** Prospective, randomized, controlled study of in vitro fertilization-embryo transfer with a single dose of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) antagonist (cetrorelix) or a depot formula of an LH-RH agonist (triptorelin). *Fertil Steril.* 2000;73: 314-20.
- Otsuki J, Okada A, Morimoto K, Nagai Y, Kubo H.** The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum Reprod.* 2004;19: 1591-7.
- Orief Y, Dafopoulos K, Al-Hassani S.** Should ICSI be used in non-male factor infertility? *Reprod BioMed Online.* 2004;9:348-56.
- Palermo G, Alikani M, Bertoli M, Colombero LT, Moy F, Cohen J, Rosenwaks Z.** Oolemma characteristics in relation to survival and fertilization patterns of oocytes treated by introplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1996;11: 172-6.

- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC.** Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340: 17-18.
- Palermo G, Munne S, Cohen J.** The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod*. 1994;9: 1220-5.
- Paternot G, Debrock S, De Neubourg D, D'Hooghe TM, Spiessens C.** The spatial arrangement of blastomeres at the 4-cell stage and IVF outcome. *Reprod Biomed Online*. 2014;28: 198-203.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD.** Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod*. 1997;12: 532-541.
- Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Andersen AN.** Morbidity in a Danish national cohort of 472 IVF/ICSI twins, 1132 non-IVF/ICSI twins and 634 IVF/ICSI singletons: health-related and social implications for the children and their families. *Hum Reprod*. 2003;18: 1234-43.
- Pinborg A, Loft A, Rasmussen S, Schmidt L, Langhoff-Roos J, Greisen G, Andersen AN.** Neonatal outcome in a Danish national cohort of 3438 IVF/ICSI and 10,362 non-IVF/ICSI twins born between 1995 and 2000. *Hum Reprod*. 2004;19: 435-41.
- Pribenszky C, Matyas S, Kovacs P, Losonczy E, Zadori J, Vajta G.** Pregnancy achieved by transfer of a single blastocyst selected by time-lapse monitoring. *Reprod BioMed Online*. 2010;21: 533-6.
- Rosen MP, Shen S, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI.** Oocyte degeneration after intracytoplasmic sperm injection: a multivariate analysis to assess its importance as a laboratory or clinical marker. *Fertil Steril*. 2006;85: 1736-43.

- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG, Campana A.** Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod.* 1998;13: 182-7.
- Salumets A, Hyden-Granskog C, Makinen S, Suikkari AM, Tiitinen A, Tuuri T.** Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum Reprod.* 2003;18: 821-5.
- Sathananthan H, Bongso A, Ng SC, Ho J, Mok H, Ratnam S.** Ultrastructure of preimplantation human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod.* 1990;5: 309-18.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D.** Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997;12: 1531-6.
- Skiadas CC, Jackson KV, Racowsky C.** Early compaction on day 3 may be associated with increased implantation potential. *Fertil Steril.* 2006;86: 1386-91.
- Stephoe PC, Edwards RG.** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978;2: 366.
- Suzuki M, Hoshi K, Hoshiai H, Saito A, Momono K, Mori R, Kyono K, Tsuiki A, Imaizumi H, Nagaike H, Uehara S, Naganuma T, Hirose Y.** Pregnancy achieved through in vitro fertilization and embryo transfer. *Jpn J Fertil Steril.* 1983; 28:439-443.
- Takahahi I, Hatori A, Nakano H.** The usefulness of partial thinning of zona pellucida using a laser-assisted hatching system in ICSI. *J Mamm Ova Res.* 2013;30: 49-52.
- Tao J, Tamis R, Fink K, Williams B, Nelson-White T, Craig R.** The neglected morula/compact stage embryo transfer. *Hum Reprod.* 2002;17: 1513-8.
- Trounson A, Peura A, Kirby C.** Ultrarapid freezing: a new low-cost and effective method of embryo cryopreservation. *Fertile Steril.* 1987;48: 843-850.

- Vanderzwalmen P, Bertin G, Lejeune B, Nijs M, Vandamme B, Schoysman R.** Two essential steps for a successful intracytoplasmic sperm injection: injection of immobilized spermatozoa after rupture of the oolemma. *Hum Reprod.* 1996;11: 540-7.
- Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kesters AD, Evers JL.** Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod.* 2004;19: 2103-8.
- Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smitz J, Wisanto A, Devroey P.** High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1993;8: 1061-1066.
- Veeck, LL.** Atlas of the Human Oocyte and Early Conceptus. Vol. 2. Baltimore: Willams & Wilkins, 1991.
- Yanagida K, Katayose H, Suzuki K, Suganuma A, Sato A.** Flexibility of oolemma is an important factor for oocyte survival after ICSI. *J Mamm Ova Res.* 2001;18: 93-8.
- Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K, Sato A.** The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod.* 1999;14: 448-53.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW Oh KS.** Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum Reprod.* 1998;13: 998-1002.
- Youssef MM, Mantikou E, van Wely M, Van der Veen F, Al-Inany HG, Repping S, Mastenbroek S.** Culture media for human pre-implantation embryos in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;11.
- Waldenstrom U, Engstrom A.B, Hellberg D, Nilsson S.** Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study. *Fertil Steril.* 2009;91: 2461-5.

**Wikland M, Borg J, Forsberg AS, Jakobsson AH, Svalander P, Waldenström U.**

Human chorionic gonadotrophin self-administered by the subcutaneous route to induce oocyte maturation in an in-vitro fertilization and embryo transfer programme. Hum Reprod. 1995;10:1667-70.

**Wirka KA, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S.**

Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. Fertil Steril. 2014;101: 1637-48.

**Zuh D, Zhanq J, Cao S, Zhang J, Heng BC, Huang M, Ling X, Duan T, Tonq GQ.**

Vitrified-warmed blastocyst cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles-time for a new embryo transfer strategy? Fertil Steril. 2011;95: 1691-5.