

Submitted: November 11, 2013
Accepted: May 26, 2015
Advance Publication: May 29, 2015

Journal of
REPRODUCTION
ENGINEERING

JRE

カテゴリー：短報

培養液中のノルエピネフリン量測定によるヒト胚盤胞の評価方法

英文タイトル **The method for evaluating human blastocyst by norepinephrine level in blastocyst culture medium**

ページ見出し：ノルエピネフリン定量によるヒト胚評価法

中田久美子

Kumiko NAKATA

山下湘南夢クリニック高度生殖医療研究所

Reproductive medicine research center, Yamashita Shonan Yumeclinic, 1-2-10
Kugenuma Ishigami, Fujisawa, Kanagawa, 251-0025, Japan.

E-mail: k_nakata@hotmail.com, Tel: +81-466-55-5011, Fax: +81-466-55-5012

要旨

現在の高度生殖医療において主流になっている胚盤胞移植では、移植胚の選択は形態的評価に基づいて行われている。しかし、形態学的手法による胚評価が必ずしも正確でないことは知られており、多胎防止のためのSingle embryo transferの社会的要請からも、胚に対して非侵襲的で、より正確な胚評価法の確立が求められている。本研究では、Liquid Chromatography Hybrid Mass Spectrometry (LC-Hybrid-MS)法（超高速液体クロマトグラフmaXis3G（ブルガ

一・ダルトニクス社製)にて培養液中の成分を検出し、同定および定量を行った。さらに当該胚を移植した妊娠成績と比較検討することで、新たな非侵襲的化学的胚盤胞評価法の確立を試みた。その結果、ヒト胚盤胞培養液中からノルエピネフリンが初めて同定された。さらに、発育停止胚および胚盤胞移植後に妊娠非継続だった胚盤胞の培養液からは、妊娠継続した胚盤胞培養液よりも有意に高い濃度のノルエピネフリンが検出された。ノルエピネフリンの胚での発現を調べるためにマウス胚盤胞においてノルエピネフリンの合成酵素である Dopamine- β -Hydroxylase (DBH) の免疫蛍光染色を行った。マウス胚盤胞だけでなくヒト胚盤胞においても同様にDBHの発現が確認された。培養液中のヒト胚由来の代謝成分として、ノルエピネフリンが検出されたという報告はなく、なおかつ妊娠との相関性が示されたのは本研究が初めてである。以上から、胚盤胞培養後に廃棄する培養液からのノルエピネフリン量を定量することは、胚盤胞の新たな評価方法となることが示唆された。

キーワード：胚盤胞、胚評価、LC-Hybrid-MS 法、ノルエピネフリン、Dopamine- β -Hydroxylase

序論

女性の社会進出による晩婚化とそれに伴う挙児希望年齢の高齢化は不妊の要因となっている。このため、不妊治療を受けている患者総数は近年顕著に増加しており、例えば、平成 16 年の体外受精による出生児が 18168 人で総出生児数の 1.64%であったのに対し、平成 22 年は 28945 人で総出生児の 2.7%に達するまでになっている[6]。生殖医療に起因する問題点のひとつに多胎がある。多胎は排卵誘発剤を使用した Timing 治療や人工授精あるいは体外受精や顕微授精等高度生殖医療における複数胚移植によっておこるが、未熟児や低体重児の増加、妊娠性高血圧症など妊娠合併症の増加、帝王切開率の増加など様々な産科

的リスクを上昇させる。このため、高度生殖医療では多胎の防止が大きな課題となっており、単一胚移植 **Single Embryo Transfer (SET)**がこの課題の解決法として注目されてきた。しかし、移植胚数を減らすことは治療成績の低下につながることから、単一胚の移植でも妊娠率の低下を最小にする良質な移植胚選択法の開発が急務となっている。現在、移植胚の選択は **Gardner 分類**[5]や **Veck 分類**[13]など形態学基準に基づいて行われている。しかし、形態学的良好胚で妊娠せず、形態学的に劣るとされた胚の移植で妊娠することは臨床的にしばしば経験され、この事実は形態学的分類法の限界を示している。このため胚の **Viability** 妊孕性を正確に反映し、かつ胚に負担を与えない非侵襲的機能的胚評価法の開発が待望されている。最近、プロテオームやメタボローム的なアプローチにより培養胚から分泌されるタンパク質の同定を行い、良好胚の化学的機能的選択法の開発が試みられてきたが、未だ新評価法の確立には至っていない。

このような現状の中で、本研究では、ヒトならびにマウス胚を用い、胚培養液中に培養胚から代謝される微量な物質を超高速液体クロマトグラフ **maXis3G**により同定、定量し、ノルエピネフリンであることを特定することを目的とした。胚でのノルエピネフリンの局在を調べ、胚から分泌される物質であることを確認し、その結果を後方視的に臨床成績と比較した。本研究の結果は、非侵襲的でかつ胚の **Viability** 妊孕性を正確に反映する化学的機能的胚評価法になる可能性がある。

材料と方法

対象患者と胚の培養方法

2011年10月から2012年7月までに自然周期またはクロミフェン周期にて卵巣刺激し、単一胚盤胞移植を施行した33周期を対象とした。患者の平均年齢は

36±4.8歳であった。患者から採取した卵子に体外受精および顕微授精を施行し、20時間後に2前核形成の確認により正常受精と判断した。

受精卵子は、分割まで50 µlのQuinn's Advantage Protein Plus Cleavage Medium (SAGE, IVF Inc, Trumbull, CT, USA)で培養した。その後、20 µlのQuinn's Advantage Blastocyst Mediumにより3日間から5日間培養し、発育良好胚盤胞を得られた際の培養液、21サンプルを実験区（妊娠継続区、妊娠非継続区）とした。

妊娠非継続区は、判定日の血液検査でβhCGが10 mIU/ml以下とした。また、胚盤胞に到達しなかった胚を発育停止胚とし、発育停止胚を5日間培養していた培養液、7サンプルをネガティブコントロール（発育停止区）とした。培養条件は37.5°C、5%CO₂、5%O₂で行った。胚を培養していた培養液はそれぞれ、エッペンドルフチューブに移した。患者の非特定化のため、それぞれの培養液をID番号で区別した。それらは、測定までマイナス30°Cで凍結保存した。

培養液の解析方法

LC-Hybrid-MS法による測定前に、凍結保存した各区の培養液を室温で自然解凍した。また、胚を培養していない培養液を培養液測定のコントロールとした。培養液20 µlに対して、1回の測定を3 µlとし、3回測定した。測定結果からコントロールとした培養液中に含まれる成分を除き、特異的な成分を選別した[7][9]。物質の分子量からの特定には、NIST (National Institute of Standards and Technology) と ChemSpider の化学物質のデータベースを使用した。その結果、ノルエピネフリンであることが確定し、購入したノルエピネフリンと同一であることを確認した。

マウス体外受精胚の作成方法

ICR マウス(Japan SLC, Inc., Shizuoka, Japan)から採取した卵子および精子を実験に使用した。すべてのマウスは自由給水・自由給餌、明暗周期の調整された SPF 環境下で飼育された(明期は午前7時から午後9時、暗期は午後9時から午前7時)。本実験は麻布大学実験動物委員会の承認のもと、実験動物ガイドラインに則り、施行された。

ICR 雌マウスに 7.5 IU の Equine Chorionic Gonadotropin (eCG; PEAMEX, Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Fukushima, Japan)を投与し、その 48 時間後に 7.5 IU の human chorionic gonadotropin (hCG; Novartis Pharma K.K., Tokyo, Japan)を投与し、過排卵処理を行った。hCG 投与から 14 時間後に ICR マウスの卵管膨大部より採卵し、200 μ l の TYH[12]中で卵丘卵子複合体を培養した。ICR 雄マウスから精巢上体尾部を摘出し、TYH 中に精子を分散させ、採卵の 1 時間に前培養を行った。体外受精の条件は精子濃度が 3×10^6 精子/ml となるように、卵丘卵子複合体を培養している培養液に、精子を含む培養液を添加した。体外受精の培養条件は 37.5°C、5%CO₂とした。体外受精から 8 時間後、2 前核形成の確認された卵子を正常受精卵子と判断した。KSOM [4]で、マウス受精卵子を 5 日間培養し、胚盤胞を作成した。体外発生培養条件は 37.5°C、5%CO₂とした。

免疫蛍光染色

マウスについては体外発生培養 5 日目の拡張期および孵化中の胚盤胞を用いた。ヒト胚盤胞は、研究用に提供することの同意を得た胚 10 個、発育良好胚盤胞および発育退行胚盤胞を用いた。マウスおよびヒト胚盤胞を PBS (Nissui, Tokyo, Japan)に 0.1% (w/v) polyvinyl alcohol (Sigma)を添加したメEDIUM (以下、PBS-PVA) で 3 回洗浄し、PBS-PVA に 2% (w/v) paraformaldehyde (Sigma), 0.2% (v/v) Triton X-100 (Sigma)をそれぞれ添加し、常温で 60 分間、固定した。再び PBS-PVA で 3 回洗浄し、PBS-PVA に 2.5% (v/v) Tween 20 (GE Healthcare, Bio

sciences, AB, USA)を添加したメEDIUMを用いて常温で2分間、静置した。その後、PBS-PVAで3回洗浄、PBS-PVAに1% (w/v) BSA (Sigma)を添加したメEDIUM (以下、PBS-BSA)を用いて4°Cで2時間静置した。その後、PBS-BSAに10% (v/v) goat serum (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada)を添加したメEDIUMを用いて常温で40分間、blockingを行った。PBS-BSAにPBS-BSA:1st antibody Dopamine-β-Hydroxirase Antibody (DBH :Cell Signaling Technology, Inc. Danvers, USA)=100:1となるように1st antibodyを添加し、4°Cで16時間以上、保存した。PBS-BSAで3回洗浄後、PBS-BSAにPBS-BSA:2ndantibody (Alexa 488 anti rabbit IgG) Life technologies, Carlsbad, CA, USA=100:1となるように2nd antibodyを添加し、常温で60分間静置した。PBS-BSAで3回洗浄、PBS-BSAにPBS-BSA: Propidium Iodide (PI: Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)=100:1となるようにPIを添加し、常温で60分間静置した。PBS-BSAで3回洗浄し、Vectashield®(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を用いてスライドグラスにホルマウントした後、レーザー顕微鏡 (Laica Co. Ltd., DMI6000B and TCS-SP5) で発現および局在を観察した[8]。

統計処理

各区の統計処理には、Welch's t-testを用いた。

結果

培養液の成分解析結果から、表1に示すように培養液成分とノルエピネフリン以外の代謝産物が42種類同定された。そのうち、代謝産物と考えられる物質は、Norepinephrine、N-Formyl-amino-aminomethyl-methylpyrimidine(FAMP)、Glucosamine、indolylacryloyl Glycine (IAG)、Panthothenic acid、Thiamin aldehydeであった。

図 1 に示したように、妊娠継続区(n=13)の培養液中のノルエピネフリン値は 1523.2 ± 1027.3 CPU (Count per unit) (平均 \pm SE) であった。移植後、妊娠非継続区(n=8)の培養液のノルエピネフリン値は、 8675.6 ± 7075.8 CPU であった。両区において、有意な差が確認された ($P < 0.05$)。また、発育停止区(n=7)のノルエピネフリン値は、 8502 ± 1769.4 CPU であった。妊娠非継続区の培養液と発育停止区の培養液とで、ノルエピネフリン値に有意な差は見られなかった。免疫蛍光染色画像から、ノルエピネフリンの合成酵素である DBH がマウスの拡張期胚盤胞、脱出中の胚盤胞およびヒトの発育良好胚盤胞と発育退行胚盤胞において内部細胞塊と栄養膜細胞の両方に確認された。

考察

胚盤胞を評価する上で最も望ましいのは、胚そのものを被検体とせず、非侵襲的に判定できることであり、培養液中に含まれる胚からの分泌物は、条件を満たす有力な検体である。実験では、胚盤胞培養後に廃棄される培養液をサンプルとして、超高速液体クロマトグラフィーを用いた解析により培養液中に特異的に含まれる成分の同定を行い、更にその定量を実施したところ、ノルエピネフリン (ノルアドレナリン) を含む 42 種類の物質を確認した。

ノルエピネフリンが実際に胚盤胞から分泌されているかどうかは、本研究で蛍光免疫組織化学的に検討した結果から明らかとなった。まず、マウスの胚盤胞について、拡張胚盤胞および孵化中胚盤胞において、DBH の発現を確認した [図 2]。さらに、ヒト良好胚盤胞および発育退行胚盤胞においても、内部細胞塊及び栄養膜細胞のどちらにも細胞内での DBH の発現を確認した [図 3]。このことから、ヒト胚特有の分泌物ではなく、他の哺乳類の胚においてもノルエピネフリンが分泌される可能性が示唆された。また、分割期で発育を停止した割球においては、DBH が強発現している他、割球と透明帯の間にも DBH の発現

が確認できた。

本研究から、妊娠継続区と非継続区において、培養液中の胚から分泌されるノルエピネフリン分泌量に有意な差があることがわかった。しかしながら、ノルエピネフリン値が 1343CPU という検体が存在し、妊娠継続区と同等の数値であったにも関わらず、妊娠は継続しなかった。その理由として、この胚に由来する卵子は 48 歳の患者から採取されたものであったことから、胚そのものに加えて患者母体側の何らかの要因により、妊娠の継続が困難であったと考える。

ノルエピネフリンやドーパミン、セロトニンなどは卵巣神経叢から卵胞へと分泌されているカテコールアミンである。カテコールアミンの卵巣および卵子、胚への作用についてはいくつが報告ある。まず、ドーパミンが卵胞内の顆粒膜細胞の β アドレナリンレセプターに作用すると、cAMP が産生される。cAMP は卵子内に取り込まれ、卵子の成熟を促進する。また、ドーパミンを添加した培養液で顆粒膜細胞を除去した卵子を培養すると、卵子内でノルエピネフリンが産生されることが報告されている[10]。さらに、胚については、ノルエピネフリンのトランスポーター[11] や受容体が確認されている。マウスにおいては、 $\alpha 2C$ -アドレノセプターをブロックすると胚の発生率の低下や胚の細胞数の減少が確認されていること[3]、胚の細胞分裂の制御にノルエピネフリンが作用していることが報告されている[2]。これらの報告から、卵子の成熟および胚の発育過程でノルエピネフリンが関与していると考えられる。

本研究からも、ドーパミン等のカテコールアミンを添加していない培養液で培養した胚の細胞内でも、ノルエピネフリンが合成されていることが確認された。トランスポーターやレセプターが正常に働かない胚、細胞内部のノルエピネフリンが代謝あるいは排出されずに蓄積した胚の場合は発育が停止するのではないかと考える。

胚のノルエピネフリントランスポーターの正常な機能は、着床と子宮内膜の

形成に関与していることが報告されている[1]。つまり、マウスのような多胎妊娠、ヒトのような単胎妊娠であっても、一つの胚自身が分泌するノルエピネフリン量、胚のノルエピネフリントランスポーターやレセプターの機能が正常であることが妊娠継続において重要であると考ええる。

以上のことから、ヒトの胚盤胞を評価する新規バイオマーカーとしてのノルエピネフリンの定量は、優先的に移植する胚の選択を可能にする、新たなヒト胚盤胞評価法の確立に成功したと考えられる。しかしながら、着床から妊娠の間の胚と母体との相互関係はノルエピネフリンという一要素で、すべて評価できるものではない。今後も、ノルエピネフリン以外にも指標となる成分、条件などを解析し、検討していきたいと考える。

謝辞

胚盤胞培養液の収集に協力いただいた、山下湘南夢クリニック培養室の中山順樹、池上加代子、中西彩、阿部睦、渡邊ひとみ、培養液の成分解析にご指導いただいた慈恵医科大学の岩本武夫先生、マウス胚での実験に協力いただいた麻布大学の柏崎直巳先生、伊藤潤哉先生、広瀬匡彦、ヒト胚盤胞の免疫蛍光染色に協力いただいた金沢大学の大井章史先生、徳田良子、皆様に感謝致します。最後に終始熱心にご指導いただいた山下湘南夢クリニック院長の山下直樹先生に心より感謝致します。

参考文献

1. Bottalico B, Pilka R, Larsson I, Casslen B, Marsal K, Hansson SR. Plasma membrane and vesicular monoamine transporters in normal endometrium and early pregnancy decidua. *Mol. Hum. Reprod.* 2003; 9: 389–394.

2. Buznikov GA, Kost AN, Kucherova NF, Mndzhoyan AL, Suvorov NN, Berdysheva LV. The role of neurohumours in early embryogenesis. 3. Pharmacological analysis of the role of neurohumours in cleavage divisions. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1970; 23: 549–569.
3. Cikos S, Reháč P, Czikková S, Veselá J, Koppel J. Expression of adrenergic receptors in mouse preimplantation embryos and ovulated oocytes. *Reproduction* 2007; 133: 1139–1147.
4. Erbach GT, Lawitts JA, Papaioannou VE, Biggers JD. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol. Reprod.* 1994; 50: 1027–1033.
5. Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocyst. In: Jansen R, Mortimer D, eds. *Towards reproductive certainty: infertility and genetics beyond 1999*. Carnforth: Parthenon Press, 1999; 378–388.
6. 平成25年度倫理委員会. 登録・調査小委員会報告 (2012年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2014年7月における登録施設名). *日産婦誌* 2014; 66: 2450–2453.
7. Iriyama K, Yoshiura M, Iwamoto T, Ozaki Y. [Electrochemical detection method]. *Seikagaku.* 1985; 57: 607–609. Japanese.
8. Ito J, Yoon SY, Lee B, Vanderheyden V, Vermassen E, Wojcikiewicz R, Alfandari D, De Smedt H, Parys JB, Fissore RA. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor 1, a widespread Ca²⁺ channel, is a novel substrate of polo-like kinase 1 in eggs. *Dev. Biol.* 2008; 320: 402–413.
9. Iwamoto T, Yoshiura M, Iriyama K. A simple, rapid and sensitive method for the determination of rat serum uric acid by reversed-phase high-performance liquid

- chromatography with electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 1983; 278: 156–159.
10. Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR. Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1998; 95: 10990–10995.
 11. Sieber-Blum M, Ren Z. Norepinephrine transporter expression and function in noradrenergic cell differentiation. *Mol. Cell Biochem.* 2000; 212: 61–70.
 12. Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on fertilization of mouse eggs in vitro. I. In vitro fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 1971; 16: 147–151.
 13. Veeck LL. Oocyte Assessment and Biological Performance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1988; 541: 259–295.

表 1 ヒト胚盤胞の発生培養液から LC-Hybrid-MS 法により検出された成分結果

No.	検出時間 m/z	化学式	物質名
1	233.0926	C ₁₂ H ₁₃ N ₂ O ₃	? (fragment of ?1)
2	251.0304	C ₁₀ H ₇ N ₂ O ₆	?
3	136.0762	C ₈ H ₁₀ NO	Acetoanilide?
4	175.0243	C ₆ H ₉ O ₇	aconitic acid
5	205.0977	C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂	N-Acetyl-Tryptophan fragment
6	175.1195	C ₆ H ₁₅ N ₄ O ₂	Arginine
7	197.1014	C ₆ H ₁₄ N ₄ NaO ₂	Arginine Na salt
8	133.0613	C ₄ H ₉ N ₂ O ₃	Asparagine
9	134.0453	C ₄ H ₈ NO ₄	Aspartic acid
10	162.1130	C ₇ H ₁₆ NO ₃	carnitine
11	149.0603	C ₉ H ₉ O ₂	Cinnamic acid
12	193.0348	C ₆ H ₉ O ₇	citric acid
13	215.0162	C ₆ H ₈ NaO ₇	citric acid Na salt
14	210.0611	C ₆ H ₁₂ NO ₇	citric acid NH ₄ salt
15	241.0317	C ₆ H ₁₃ N ₂ O ₄ S ₂	Cystine
16	167.0933	C ₇ H ₁₁ N ₄ O	FAMP (N-Formyl-amino-aminomethyl-methylpyrimidine)
17	180.0872	C ₆ H ₁₄ NO ₅	Glucosamin
18	147.0770	C ₅ H ₁₁ N ₂ O ₃	Glutamine
19	203.0532	C ₆ H ₁₂ NaO ₆	Hexose Na salt
20	156.0773	C ₆ H ₁₀ N ₃ O ₂	Histidine
21	188.0706	C ₁₁ H ₁₀ NO ₂	indoleacrylic acid

22	245.0921	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O ₃	indolylacryloyl Glycine (IAG)
23	132.1025	C ₆ H ₁₄ NO ₂	Leucine/Isoleucine
24	154.0844	C ₆ H ₁₃ NNaO ₂	Leucine/Isoleucine Na salt
25	147.1134	C ₆ H ₁₅ N ₂ O ₂	Lysine
26	169.0953	C ₆ H ₁₄ N ₂ NaO ₂	Lysine Na salt
27	150.0589	C ₅ H ₁₂ NO ₂ S	Methionine
28	218.1141	C ₈ H ₁₆ N ₃ O ₄	N-Acetyl Citrulline
29	240.0956	C ₈ H ₁₅ N ₄ NaO ₂	N-acetyl citrulline Na salt
30	247.1083	C ₁₃ H ₁₅ N ₂ O ₃	N-Acetyl Tryptophan
31	269.0902	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ NaO ₃	N-Acetyl Tryptophan Na salt
32	170.0818	C ₈ H ₁₂ NO ₃	Norepinephrine
33	220.1179	C ₉ H ₁₈ NO ₅	Panthenic acid
34	166.0868	C ₉ H ₁₂ NO ₂	Phenylalanine
35	188.0682	C ₉ H ₁₁ NNaO ₂	Phenylalanine Na salt
36	116.0712	C ₅ H ₁₀ NO ₂	Proline
37	138.0531	C ₅ H ₉ NNaO ₂	Proline Na salt
38	263.0967	C ₁₂ H ₁₅ N ₄ OS	Thiamin aldehyde
39	120.0661	C ₄ H ₁₀ NO ₃	Threonine
40	182.0817	C ₉ H ₁₂ NO ₃	Tyrosine
41	204.0637	C ₉ H ₁₁ NNaO ₃	Tyrosine Na salt
42	118.0869	C ₅ H ₁₂ NO ₂	Valine

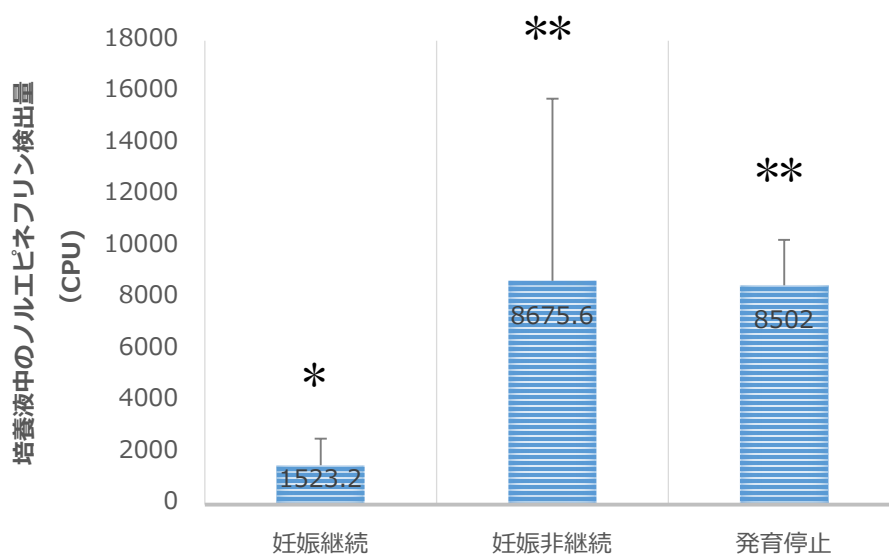
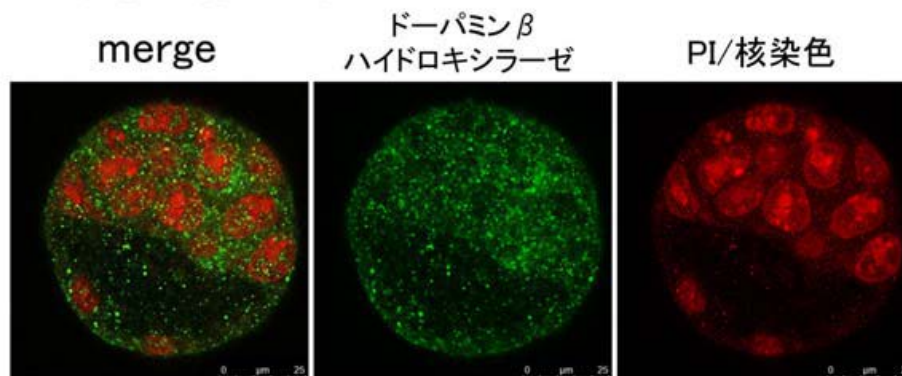


図1 ヒト胚盤胞培養液からのノルエピネフリンの検出量の比較

胚盤胞移植後の培養液から分泌されたノルエピネフリン検出量 (CPU) について、妊娠継続区、非継続区、発育停止区のそれぞれの量を示した。妊娠継続区 (n=13)の培養液中のノルエピネフリン値は 1523.2 ± 1027.3 CPU (Count per unit) (平均 \pm SE)。移植後、妊娠非継続区 (n=8)の培養液のノルエピネフリン値は、 8675.6 ± 7075.8 CPU。発育停止区 (n=7) のノルエピネフリン値は、 8502 ± 1769.4 CPUであった。*、** P<0.05

A 拡張期胚盤胞



B 孵化中胚盤胞

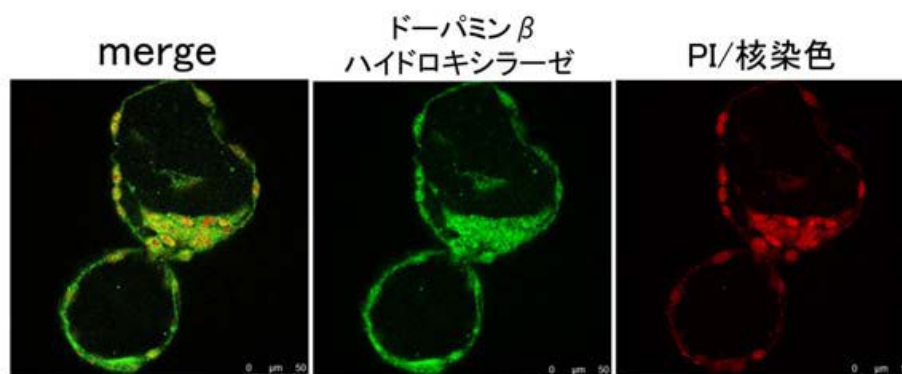


図2 マウス胚盤胞の免疫蛍光写真

免疫蛍光染色法を用いて、マウス胚盤胞のドーパミン β ハイドロキシラーゼ（緑色）および核（赤色）の発現を示した。

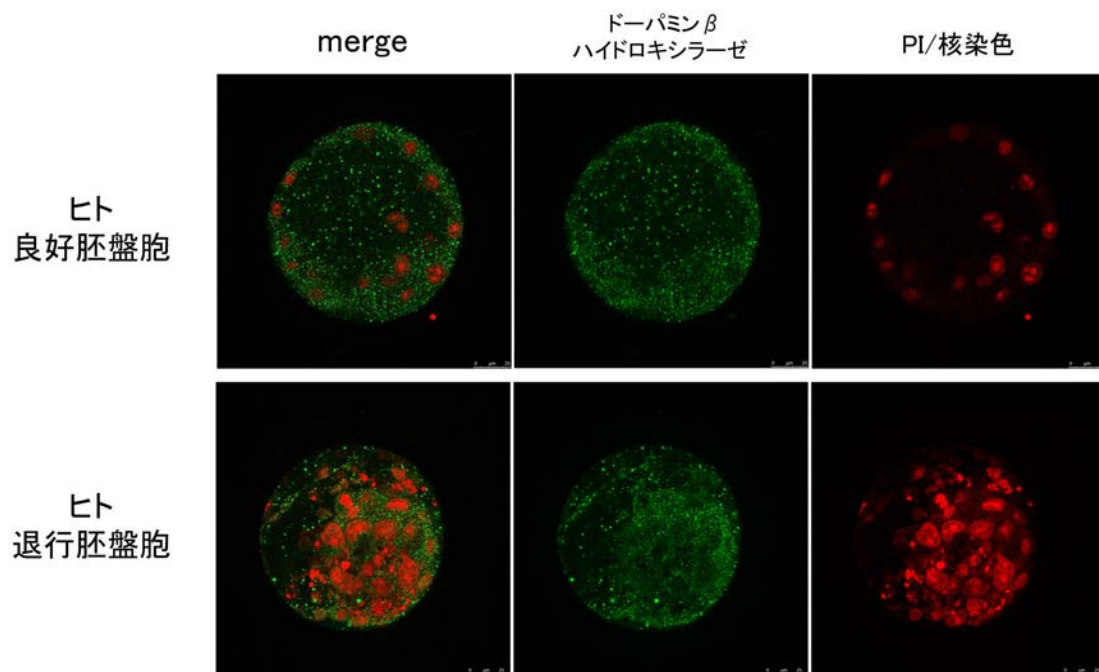


図3 ヒト胚盤胞の免疫蛍光写真

免疫蛍光染色法を用いて、ヒト発育良好胚盤胞（受精から5日目）及び退行胚盤胞（受精から7日目）におけるドーパミン β ヒドロキシラーゼ（緑色）および核（赤色）の発現を示した。