

ISSN 2185-6230 (Online)

Journal of REPRODUCTION ENGINEERING

December 2010

Vol. 13: 1-26

J. Reprod. Engineer.

Japan Society for
Reproduction Engineering

SRE



Japan Society for Reproduction Engineering

<http://sre.ac.affrc.go.jp/Index.htm>

--- Honorary Member ---

Tomonori IMAMICHI

--- Special Advisory Board ---

Takayoshi INO

Shyoso OGAWA

Shuetsu SUZUKI

--- Board of the Council ---

(from April 1, 2010 to March 2012)

Chief: Naomi KASHIWAZAKI

Kiyoshi AKIYAMA

Yoshiharu MORIMOTO

Kenji FURUI

Tatsuya OSHIO

Masayuki GOTO

Junko OTSUKI

Hiroaki INUI

Akihiro TADA

Bunpei ISHIZUKA

Tsutomu TAKESHIMA

Takayuki ISHIKAWA

Naoki TAKESHITA

Junya ITO

Hitoshi USHIJIMA

Kazuhiro KIKUCHI

Hiroaki YOSHIDA

Auditors

Takuhei KIZAKI

Katsuhiko HAYASHI

Office

Azabu University

Laboratory of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine

Sagamihara 252-5201, Japan.

TEL: +81-42-769-2339 FAX: +81-42-769-1762

Journal of REPRODUCTION ENGINEERING

<http://sre.ac.affrc.go.jp/Contents.htm>

--- Editorial Board ---

Co-Editors-in-Chief

For human medicine:

Horoaki INUI, MD & Ph.D., Inui Maternity Clinic

For animal & basic study:

Kazuhiro KIKUCHI, DVM & Ph.D., National Institute of Agrobiological Sciences

Managing Editor

Michiko NAKAI, Ph.D., National Institute of Agrobiological Sciences

Editorial Board Members

Katsuhiko HAYASHI, Ph.D., Kyoto University

Takayuki ISHIKAWA, Kyono Art Clinic

Junya ITO, Ph.D., Azabu University

Jinji MIZUNO, Ph.D., Inui Maternity Clinic

Tatsuya OHSIO, MD & Ph.D., Tokyo Bay Ladies Clinic, Nihon University

Kunihiko TOMINAGA, MD & Ph.D., Loma Linda Clinic

Hitoshi USHIJIMA, Ph.D., Nippon Veterinary and Life Science University

Editorial Office

National Institute of Agrobiological Sciences

Division of Animal Sciences, Kannondai 2-1-2, Tsukuba, Ibaraki 305-8602, Japan

TEL: +81-298-838-7447 FAX: +81-29-838-7408

**J. Reprod. Engineer.
2010; Volume 13**

Contents

= ミニレビュー =

- 金子 浩之, 中井 美智子, 菊地 和弘.
ヌードマウス体内におけるブタ原始卵胞の発育と卵の発生能
1-6
- 吉田 仁秋, 阿部 宏之, 有馬 隆博.
IVM 卵・胚のクォリティー評価と IVM にて出生した児の epigenetis の検討
7-14

= 原著論文 =

- 古井 憲司.
新しい胚評価法に基づく最適な胚移植時期
15-19

= Original Paper =

- Junya ITO, Mai KURAMOCHI, Aiko INOUE, Kaori YABE,
Katsuyoshi FUJIWARA, Osamu NISHIKAWA, Kazuyoshi
ARISHIMA, Shigenori SONOKI, Toshio MASAOKA, Naomi
KASHIWAZAKI.**
Cryotop facilitates high developmental ability of re-vitrified mouse
embryos
21-26

ヌードマウス体内におけるブタ原始卵胞の発育と卵の発生能

Developmental competence of porcine primordial oocytes grafted into nude mice

金子 浩之[†], 中井 美智子, 菊地 和弘

Hiroyuki KANEKO[†], Michiko NAKAI and Kazuhiro KIKUHCHI

独立行政法人農業生物資源研究所 動物科学研究領域, 〒305-8602 茨城県つくば市

[†]責任著者: kaneko@affrc.go.jp

要旨

卵巣に多数存在する原始卵胞卵は、獣医・畜産および医学領域において胚生産のための重要な資源となりえる。しかしながら、原始卵胞卵は未成熟で胚・個体への発生能を持たないため、何らかの方法によって発生能を付与する必要がある。免疫不全マウスに異種動物の組織を移植し機能を保持する異種間移植は、原始卵胞卵を成熟させ発生能を与える有力な手法の一つと考えられている。私達は、これまで、ブタの原始卵胞卵をヌードマウスに移植し卵を発育・成熟させ、卵の発生能を解析してきた。本ミニレビューでは、ヌードマウス体内でのブタ卵の発育と卵の発生能について、ブタ体内での卵胞・卵の発育と比較しながら、紹介させて頂く。

キーワード: 異種間移植, ブタ原始卵胞卵, 卵胞発育, 発生能

序論

ブタの品種は全世界で400種以上あり、年間1億トン以上の肉が生産される主要な家畜である。一方で、ブタの生産はランドレース等の数種類の欧米の大型品種に集中し、各国の在来品種は消滅しつつある。遺伝子の多様性(遺伝的多様性)の減少は、近交退化等による種の衰退、あるいは選抜による品種改良の可能性の減少を招くため、多様性保全は農業分野においても重要な課題である。哺乳動物の遺伝的多様性の保全には雄と雌の遺伝情報(生殖細胞)の保存と個体再生が必須である。これまで凍結保存が行われてきた卵および精子は家畜体内で成熟を完了した段階にあり、それらの採取は個体が発育し性成熟に達した後の生殖活動期に限られる。しかし、最も未成熟な生殖細胞、たとえば原始卵胞に含まれる卵(原始卵胞卵)あるいは精祖細胞は、個体のライフサイクルのいかなる時期の性腺にも存在している。このような未成熟な生殖細胞から個体を再生するシステムが確立できれば、従来は子孫を残せなかった胎子・幼若家畜の生殖細胞からも個体群の再生が可能となるため、未成熟生殖細胞の潜在的な有用性は高いと考えられる。

しかしながら、原始卵胞卵は発生能を獲得していないため何らかの方法で発生能を付与する必要がある。異種の動物の卵巣を免疫不全マウスに移植しマウス体内で卵胞・卵を発育させる手法(卵巣の異種間移植)は、Gosdenら[4](1994)によって初めて報告された。それ以降、異種間移植が未成熟な卵を人為的に成熟させる有力な手法と期待され、ヒト[10, 17-20]、ウシ[18]、ブタ[6-8]および野生動物[12]等の種々の動物の卵巣が免疫不全動物に移植されてきた。しかしながら、遺伝的な距離に近いマウスからヌードラットへの卵巣の移植例において、移植卵巣由来の卵から産子が得られたのみ[19]で、その他の動物の移植例の多くは卵胞の発育の形態的な確認に止まっているのが現状である。

ブタ体内での卵胞発育と卵の発生能

卵胞発育

生後30日までのブタ卵巣に存在する卵胞の構成は、95%以上が直径30 μm前後の原始卵胞(primordial follicle)、残りの数%が一次卵胞(primary follicle)であり(図1)[2, 7]、胎生期で胞状卵胞の発育が見られるヒトおよびウシとは大きく異なる。生後60日前後で胞状卵胞(直径0.5 mm以上)が出現し[2]、生後5月齢前後(初回

投稿日: 2010年11月29日

掲載決定日: 2010年12月14日

ウェブサイト事前公開日: 2010年12月21日

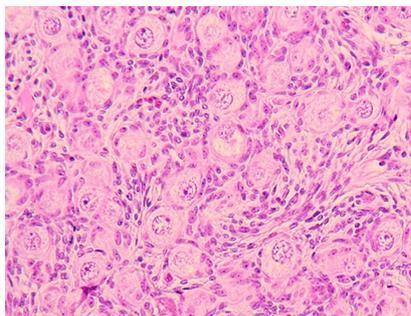


図1. 生後20日齢のブタ卵巢組織像。
多数の原始卵胞が見られる〔7〕より改変。

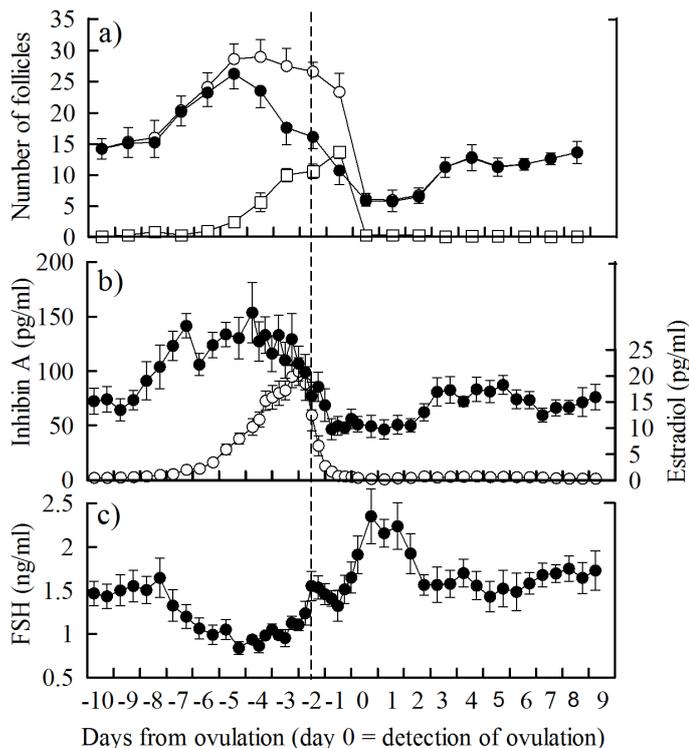


図2. ブタ発情周期中の卵胞発育と末梢血中各種ホルモン濃度の変化。
a) 卵胞数(直径 $\geq 3 < 6$ mm: ●、直径 ≥ 6 mm: □、および直径 ≥ 3 mm: ○)、b) インヒビンA(●)およびエストラジオール濃度(○)、およびc) FSH濃度(●)。データは排卵確認日を0日として配列し、卵胞期は-6から0日に相当する。点線はLHサージの開始時を示す〔16〕より改変。

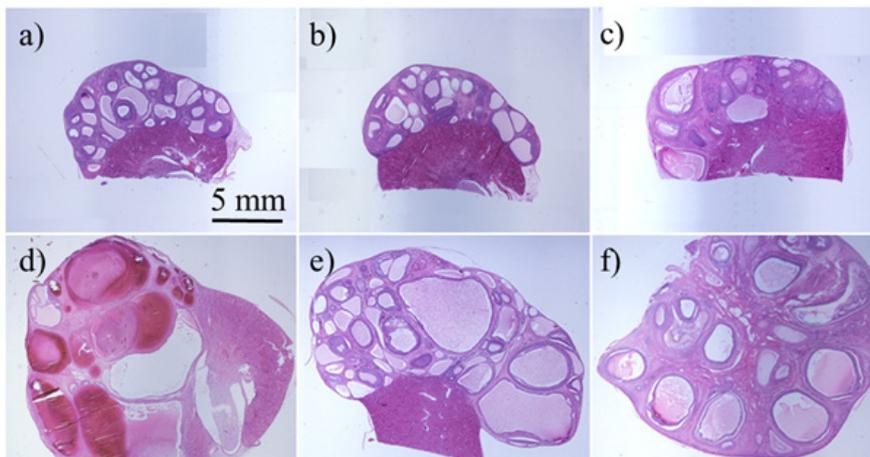


図3. 種々のホルモン処理後の移植ブタ卵巢像。
a) CONT群(ホルモン無処理群)、b) eCG-2群、c) FSH-7群、d) FSH-14群、およびe) FSH14-EA群。比較のため、f) ブタ体内で発育した卵巢像を示す。FSH-14群では卵胞が血腫化している。性腺刺激ホルモン(eCGまたはFSH)はブタ卵巢移植後120日前後でヌードマウスに投与した〔8〕より改変。

排卵前)の卵巢には既に0.5から6 mmの胞状卵胞が多数存在している [1]。卵胞の発育速度は、0.5 mmの胞状卵胞が3 mmにまで発育するのに約2週間要するとされている[13]。

ブタは生後6から7ヶ月齢で初回排卵が起こり、その後21日間隔で発情周期を繰り返す。ブタの発情周期中の胞状卵胞の発育をエコーカメラで観察すると、卵胞発育のwaveが黄体期末期から卵胞期にかけての期間と

黄体期初期に見られた(図2a)[16]。黄体期末期から卵胞期にかけてのwaveは、当初直径3から6 mmの卵胞数の増加としてエコーカメラで認められた。その後3から6 mmの卵胞数の低下と6 mm以上の卵胞数の増加が平行して起こり(卵胞の選抜)、発情開始後LHサージによって10から15個の6 mm以上の卵胞が排卵した。黄体期初期では3から6 mmの卵胞数の増加が観察された。いずれのwaveにおいても、顆粒層細胞を分泌源とするイ

ンヒビンの末梢血中濃度が胞状卵胞数(3 mm以上)の増加に一致して上昇したこと(図2b)、一方FSH濃度はwaveの出現に先立ち高値を示しwave出現後は低値で推移したこと(図2c)、FSHとインヒビンの相互の関連によって胞状卵胞の発育が調節されると考えられる。一方、エストラジオール濃度は6 mm以上の卵胞が出現する卵胞期のみ上昇したこと、インヒビンとは異なり、FSH分泌の抑制因子としての役割よりも、発情、LHサージの発現および排卵を同期化する重要性が高いものと考えられる。

卵の発生能

卵のサイズは卵胞の発育にともない増大し、卵の発生能の獲得と密接に関連している。たとえば、0.2から0.4 mmのpreantralな卵胞は直径80 μm前後の卵を含んでいるが、0.5から1.5 mmの胞状卵胞では卵は105 μm、3.0から4.0 mmの胞状卵胞では115 μm、排卵可能な5.0から6.0 mmの胞状卵胞では119 μmに、それぞれ発育する[5]。3.0から4.0 mmの卵胞に含まれる卵(直径115μm)は、体外培養によってgerminal vesicle (GV)期からmetaphase-II (MII)期に成熟する能力を獲得し、さらに5.0から6.0 mmの卵胞から採取した卵(直径119 μm)はより高い体外成熟率を示すことが報告されている[5]。この結果から、ブタ卵は直径が115から120 μmでfull sizeに達し成熟能を獲得するものと考えられる[5, 14]。また、直径3から5 mmの卵胞から採取した卵は、体外培養系で初期胚への発生能を持ち[1, 9]、さらに成雌ブタの卵管に移植することによって産子へ発生することが証明されている[9]。

このようなブタ生体内で観察される卵胞発育と卵の発生能の関係がヌードマウスに移植したブタ卵巣組織内においても再現されるか、さらには移植卵巣内の卵胞の人為的な発育促進は可能か、について以下の項において紹介する。

ヌードマウス体内での ブタ卵胞の発育と卵の発生能

移植卵巣内の卵胞発育と卵の発生能

前項で述べたように卵胞のほとんどが原始卵胞で占められる生後20歳前後のブタ卵巣(図1)を細切して、卵巣を摘出したヌードマウスの腎皮膜下に移植すると、約60日後に直径が1 mm程度の胞状卵胞が少数出現し、マウスの血中エストラジオール濃度が上昇する結果、マウスの膣が開く。この時期の卵巣移植片から卵の回収を試みても、ブタ体内の卵胞と卵の発育の関係から予想されるように、直径が115 μmを越えるfull sizeの卵

はほとんど回収できなかった[7]。さらに60日間(移植後120日)ブタ卵巣をマウス体内に留置しておく、移植組織内に3 mmを越える胞状卵胞はほとんど存在しないが、直径1-2 mmの卵胞が多数出現することが明らかとなった(図3a)[7, 8]。この結果は、ブタ胞状卵胞の発育はマウスの内因性のFSHによって支持されるものの、卵胞数の増加にともないブタ卵胞から分泌されるインヒビンが増加すると、マウスのFSH分泌が抑制され卵胞がさらなる発育を達成できないものと考えられる。このような移植卵巣(移植後120日)からのfull size卵の回収数は、移植後60日後に比較して増加を示し、少数の卵は体外成熟能を有していた[8]。しかしながら、マウス体内のブタ胞状卵胞の発育状況はブタ体内のものに比較すると著しく不十分であり、またそれらの胞状卵胞から回収した卵の発生能は極めて低いものであった。そこで、ブタ卵巣移植後120日のマウスに外生的に性腺刺激ホルモンを投与し卵胞の発育を促進することで卵の発育・発生能の改善を試みた。

卵胞発育促進処理と卵の発生能

ブタ卵巣を移植したヌードマウスに、膣開口後60日前後(卵巣移植後120日前後)で、eCGの腹腔内投与、またはブタFSHを充填した浸透圧ポンプの皮下留置を行った。移植卵巣を、eCG投与2日後(eCG-2群、図3b)、FSHポンプ留置7日(FSH-7群、図3c)または14日後(FSH-14群、図3d)に採取した。また卵胞の排卵様の血腫化を抑制する目的で、FSH処理開始7日後に抗エストラジオール血清を投与し、その7日後に移植卵巣を採取した(FSH-14EA群、図3e)。その結果、FSH処理群、特にFSH-14EA群(図3e)では、性腺刺激ホルモン無処理群(CONT群、図3a)に比較して胞状卵胞の発育が顕著で、ブタ体内で発育した卵胞(図3f)とほぼ同等の大きさに達した[8]。

ホルモン処理後の回収可能なfull sizeの卵、および体外培養系で成熟能を持った卵の数は、FSH-7およびFSH-14EA群において、性腺刺激ホルモンを投与しなかった対照群に比較して明らかな増加を示した(図4および5)。次いで、各群100個前後の成熟卵を体外受精し7日間体外培養した結果、FSH-7およびFSH-14EA群においてそれぞれ1卵ずつ胚盤胞への発生が観察された(胚盤胞の細胞数: 16および30)(図6)。

以上の結果から、マウスにFSH処理を施し移植ブタ卵巣内の卵胞発育を長期にわたり促進することによって、ブタ原始卵胞卵に体外成熟能、さらには低率ながらも胚発生能を付与することが可能となった[8]。

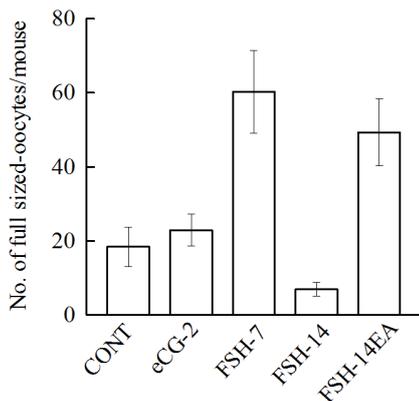


図4. 種々のホルモン処理後にマウスから回収されたfull size(直径 $\geq 115 \mu\text{m}$)に達したブタ卵の数
 数値はマウス一匹あたりの回収卵数で表示 ([8]より改変)。

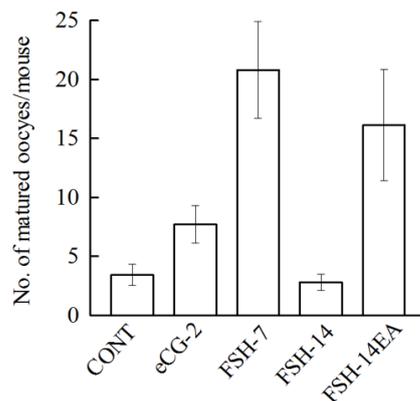


図5. 種々のホルモン処理後にマウスから回収されたブタ卵(直径 $\geq 115 \mu\text{m}$)の成熟能
 数値はマウス一匹あたりの回収卵数で表示 ([8]より改変)。



図6. FSH-14EA処理によって得られたブタ初期胚
 細胞数: 30 ([8]より改変)。

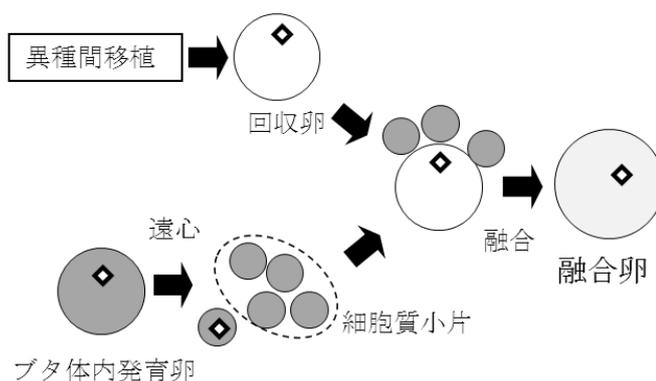


図7. 融合卵作製の方法

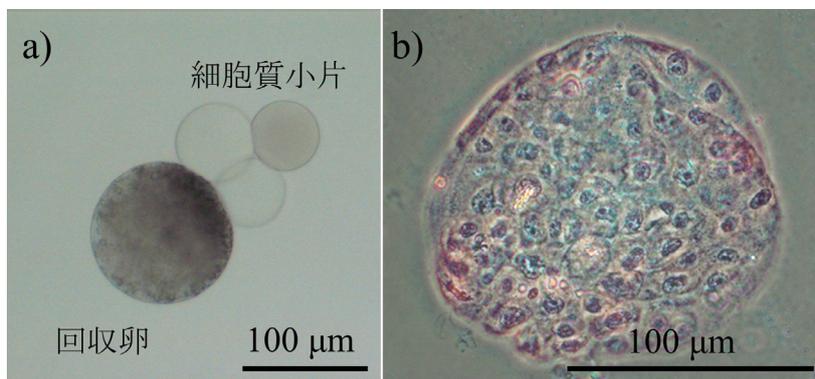


図8. 融合卵の作製と発生能。
 a) ノードマウスから回収した原始卵胞由来のブタ卵とブタ体内で発育した卵から作製した細胞質小片、およびb) 融合卵からの胚発生(細胞数: 120)

融合卵の作製

ブタ卵巣を移植したマウスにFSH処理を加えることによって、移植卵巣内の卵胞の発育および卵の成熟能は改善された。しかしながら、依然としてノードマウス体内で発育させたブタ卵の胚発生率は1%と低く、おそらく卵

の細胞質成熟が完全でないため、受精に成功しても胚発生率が低いと考えられる。そこでFSH処理を施したマウスから回収したブタ原始卵胞由来の成熟卵に、ブタ体内で発育した卵(屠場卵巣から採取し細胞質の成熟度が高く個体発生能を有する)から遠心操作によって調整した細胞質小片[3, 11]を融合させること(融合卵の作

製)で、回収卵の胚発生能の改善を試みた(図7および図8a)。

作製した融合卵を体外受精した後、体外発生系において初期胚への発生率および胚の質(細胞数)を解析した結果、142個の融合卵のうち21個が胚盤胞へと発生した(胚発生率: 14.8%)。また胚盤胞の細胞数は10から128であった(平均細胞数: 29.7 ± 6.0 個)(図8b)。無操作のブタ原始卵胞由来の卵が体外受精・発生系では1%しか胚盤胞に到達し得なかった結果[8]に比べて、屠場由来の成熟卵の細胞質を付与することによって、ブタ原始卵胞卵からの胚の発生率および細胞数は、著しく改善された。細胞質の融合は、原始卵胞卵の発生能、すなわちそこに含まれる核の情報の利用性を格段に向上させうるものと期待される。

終わりに

私たちの研究グループでは異種間移植、顕微操作および体外培養を組み合わせたシステムによって、ブタの原始卵胞卵から初期胚を作り出すことが可能になった。しかしながら、卵管あるいは子宮内移植によって産子を得るためには、いまだ胚の発生率および細胞数ともに不十分である。一方、幼若ブタ精巢をヌードマウスに移植しマウス体内でブタ精祖細胞を精子にまで成熟させ、さらに精子を用いた顕微授精によって産子を得ることには成功している[15]。精子とは異なり、卵では細胞質の成熟状況がその後の発生を左右していると考えられ、融合卵の作製等何らかの方法によって卵の細胞質の成熟度を改善することが産子発生へのキーとなると考えられる。

謝辞

本研究は、麻布大学、柏崎直己教授および伊藤潤哉准教授との共同研究によるものである。本研究は科学研究費補助金No. 17380170(金子)およびNo. 21380175(金子)の補助を受けた。

参考文献

1. **Bagg MA, Nottle MB, Armstrong DT, Gruppen CG.** Relationship between follicular size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult gilts. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19: 797–803.
2. **Christenson RK, Ford JJ, Redmer DA.** Maturation of ovarian follicles in the prepubertal gilts. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1985; 33: 21–36.
3. **Fahrudin M, Kikuchi K, Kurniani Karja NW, Ozawa M, Maedomari N, Somfai T, Ohnuma, Noguchi J, Kaneko H, Nagai T.** Development to the blastocyst stage of porcine somatic cell nuclear transfer embryos reconstructed by the fusion of cumulus cells and cytoplasm

- prepared by gradient centrifugation. *Cloning Stem Cells.* 2007; 9: 216–228.
4. **Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R.** Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 101: 619–623.
5. **Hirao Y, Tsuji Y, Miyano T, Okano A, Miyake M, Kato S, Moor RM.** Association between p34cdc2 levels and meiotic arrest in pig oocytes during early growth. *Zygote* 1995; 3: 325–332.
6. **Kagawa N, Sakurai Y, Miyano T, Manabe N.** Effects of long-term grafting on follicular growth in porcine ovarian cortical grafts xenoplated to severe combined immunodeficient (SCID) mice. *J. Reprod. Dev.* 2005; 51: 77–85.
7. **Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Hosoe M, Akita T.** Maturation and fertilization of porcine oocytes from primordial follicles by a combination of xenografting and *in vitro* culture. *Biol. Reprod.* 2003; 69: 1488–1493.
8. **Kaneko H, Kikuchi K, Noguchi J, Ozawa M, Ohnuma K, Maedomari N, Kashiwazaki N.** Effects of gonadotrophin treatments on meiotic and developmental competence of oocytes in porcine primordial follicles following xenografting to nude mice. *Reproduction* 2006; 131: 279–288.
9. **Kikuchi K, Onishi A, Kashiwazaki N, Iwamoto M, Noguchi J, Kaneko H, Akita T, Nagai T.** Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified *in vitro* system. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 1033–1041.
10. **Kim SS, Soules MR, Battaglia DE.** Follicular development, ovulation, and corpus luteum formation in cryopreserved human ovarian tissue after xenotransplantation. *Fertil. Steril.* 2002; 78: 77–82.
11. **Maedomari N, Kikuchi K, Nagai T, Fahrudin M, Kaneko H, Noguchi J, Nakai M, Ozawa M, Somfai T, Nguyen LV, Ito J, Kashiwazaki N.** Nuclear replacement of *in vitro*-matured porcine oocytes by a serial centrifugation and fusion method. *Reprod. Domest. Anim.* 2010; 45: 659–665.
12. **Mattiske D, Shaw G, Shaw JM.** Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tamar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction* 2002; 123: 143–153.
13. **Morbeck DE, Esbenshade KL, Flowers WL, Britt JH.** Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilts. *Biol. Reprod.* 1992; 47: 485–491.
14. **Motlik J, Crozet N, Fulka J.** Meiotic competence *in vitro* of pig oocytes isolated from early antral follicles. *J. Reprod. Fertil.* 1984; 72: 323–328.
15. **Nakai M, Kaneko H, Somfai T, Maedomari N, Ozawa M, Noguchi J, Ito J, Kashiwazaki N, Kikuchi K.** Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction* 2010; 139: 331–335.
16. **Noguchi M, Yoshioka K, Itoh S, Suzuki C, Arai S, Wada Y, Hasegawa Y, Kaneko H.** Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. *Reproduction* 2010; 139: 153–161.
17. **Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG.** Development of human primordial follicles to antral stages

- in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. Hum. Reprod. 1998; 13: 1133–1138.
18. **Senbon S, Ishii K, Fukumi Y, Miyano T.** Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. Zygote 2005; 13: 309–315.
19. **Snow M, Cox S-L, Jenkin G, Trounson A, Shaw J.** Generation of live young from xenografted mouse ovaries. Science 2002; 297: 2227.
20. **Weissman A, Gotlieb L, Colgan T, Jurisicova A, Greenblatt EM, Casper RF.** Preliminary experience with subcutaneous human ovarian cortex transplantation in the NOD-SCID mouse. Biol. Reprod. 1999; 60: 1462–1467.



Japan Society for Reproduction Engineering

= ミニレビュー =

IVM卵・胚のクオリティー評価とIVMにて出生した児のepigenetisの検討

Quality evaluation of Human IVM oocytes and embryos, and epigenetic evaluation of IVM babies

吉田 仁秋^{1,†}, 阿部 宏之², 有馬 隆博³

Hiroaki YOSHIDA^{1,†}, Hiroyuki ABE² and Takahiro ARIMA³

¹吉田レディースクリニック 生殖医療IVFセンター, 〒981-1105 仙台市太白区

²山形大学 大学院理工学研究科 バイオ化学工学専攻, 〒992-8510 山形県米沢市

³東北大学 医学系研究科 環境遺伝医学総合研究センター 情報遺伝学分野,
〒980-0872 仙台市青葉区

[†]責任著者: hiroaki@yoshida-lc.jp

ABSTRACT

IVM oocytes exhibit lower viability and developmental potential after fertilization. We compared the oxygen consumption rates of human *in vitro* matured (IVM) and controlled ovarian hyperstimulation (COH) embryos with a scanning electrochemical microscopy (SECM) non-invasively. Recently, there raises a report describing imprinting disorder with assisted reproductive technology patients; we checked the epigenetic disorders for born IVM babies in our clinic. **Material and method:** The oxygen consumption rate was calculated with the SECM system for human oocytes, IVM and COH embryos. We evaluated the number of oocytes, maturation rate and fertilization rate in human IVM cases. And we also evaluated the imprinting genes from umbilical cord of IVM babies. **Results:** The oxygen consumption rate ($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$) for a single oocyte was as follows: 0.49 (for the germinal vesicle stage), 0.47 (for the metaphase-I stage), and 0.41 (for the metaphase-II stage) $F \times 10^{14}/\text{mol S}^{-1}$. There was no significant difference in the mean of oxygen consumption at each cleavage in both IVM & COH embryos ($0.26\text{--}0.56 \times 10^{14}/\text{mol S}^{-1}$). In delivered cases, mean number \pm SD of oocyte was 10.4 ± 5.3 , whereas maturation and fertilization rates (mean \pm SD) were 54.7 ± 18.7 and 85.8 ± 15.4 , respectively. There found no abnormality in epigenetic orders in all IVM babies until now. There was no significant difference in IVM and COH embryo oxygen consumption rates. This means IVM embryo has the same function and mitochondrial activity as COH embryo after fertilization. **Conclusion:** A SECM can be applicable for measurements of oxygen consumption by a sniggle human oocyte or embryo at various stages. Further study of cytoplasmic maturation and mitochondrial function from IVM oocyte is required

Key words: IVM, embryo quality, epigenetics

はじめに

体外受精 (*in vitro* fertilization-embryo transfer, IVF-ET)がEdwardら[19]により初めて成功し約30年が経過し、assisted reproductive technology (ART)の分野も様々な進歩を遂げている。通常のIVFでは良質な卵を獲得するため様々な排卵誘発法が開発され、妊娠率向上のため良好胚の作出が重要なポイントである。一方*in*

vitro maturation (IVM)は1991年Chaら[5]の臨床応用に始まり、1994年Trounsonら[22]が多嚢胞性卵巣(poly cystic ovary, PCO)の不妊症例で初めて妊娠・出産を報告し、ここ数年、培養液や技術の進歩により妊娠率が向上し、最近注目を集めている。IVMは未受精卵を採取し、体外で成熟させ受精させる方法である。IVMの利点はhMG注射を避け卵巣過剰刺激症候群(ovarian

投稿日: 2010年11月2日

掲載決定日: 2010年12月6日

ウェブサイト事前公開日: 2010年12月30日

表1. IVM-IVF成績 (2007年4月-2009年10月)

パラメーター	結果	範囲	妊娠
年齢 (y)	30.0 ± 4.9*	25 - 34	32.0 ± 3.2
ΣFSH (IU)	354 ± 265*	0 - 750	330 ± 265
ピーク E ₂ (pg/ml)	216 ± 315*	64 - 783	220 ± 185
採卵日	11**	8 - 12	11
hCG投与例 (%)	93.7		95%
採卵数	6**	1 - 17	10.4 ± 5.3
成熟率 (%)	62.8	0 - 100	54.7
受精率 (%)	63.8	0 - 100	85.8
移植胚数	1.3 ± 0.7*	1 - 2	2
キャンセル率 (%)	18.7		
臨床的妊娠率/胚移植 (%)	27.3		
融解周期	11.6		
流産率	22.2%		

Values are expressed as mean ± SD(*) or medians(**). Mann-whitney's U-test.

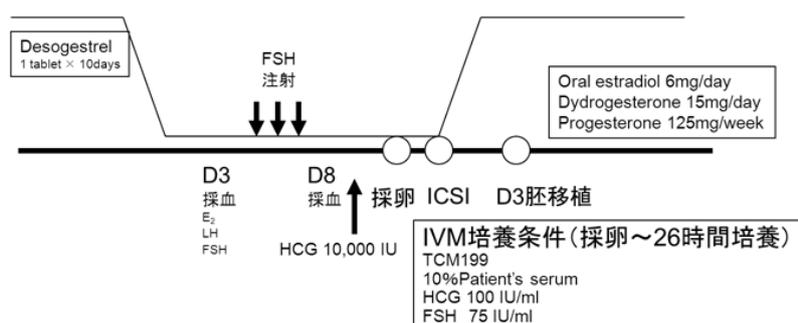


図1. 当院のIVM-IVF-ET プロトコール

多嚢胞性卵巣(poly cystic ovary, PCO)の患者に消退出血を起こし3日目よりHormone検査、卵胞が10 mm前後となるまで(8日目まで)FSH投与後、hCG 10,000 IUを注射し採卵する。顕微授精(ICSI)を行い、3日目に胚を移植(ET)する。黄体の補充は坐薬と投薬を併用し、採卵より2週間後に妊娠判定を施行する。

hyperstimulation syndrome, OHSS)を回避でき、患者の身体的経済的負担を軽減できる点である。しかしIVM卵は受精後の胚発生率が低く、この発育不良は核と細胞質成熟との解離が生じているためと言われている[6]。更にIVMによる妊娠率は38%と報告者によりばらつきがあり、IVMの根本的命題である採取した未成熟卵の客観的評価は未だ不十分である。客観的な卵子、胚の評価と胚への影響の少ないより精度の高い評価法が必要となる。そのため、非侵襲的に卵子や胚を評価するためためさまざまなアプローチがなされてきた[4,17]。ミトコンドリアは呼吸により細胞活動に必要なATPを産生する重要な細胞小器官であり、酸素消費と密接な関係が有る事をAbeらや我々も報告してきた[1,15]。その報告によると様々な動物種の胚を用いた研究においてミトコンドリアが正常に発達している胚は高い品質の良好胚であることを明らかにしている[1,2]。これらの良好胚を判断する有効な装置として、操作型電気化学顕微鏡(scanning electrochemical microscopy, SECM)をベースとする「受精卵呼吸測定装置」が開発されている。この呼吸測定装置は安全で、簡便かつ精度の高い客観的評価を可能とする装置である。

今回、我々はヒト未成熟卵と卵子卵丘細胞複合体

(cumulus oocyte complex, COC)の呼吸量をこのSECMを改良した「受精卵呼吸測定装置」を用いて測定し、電子顕微鏡によりミトコンドリアの超微形態を観察し、胚評価における呼吸測定法の有用性を検討した。更にその後発生した胚の呼吸量について通常のcontrolled ovarian hyperstimulation (COH)における受精卵とIVM受精卵の酸素呼吸量を比較したので報告する。

更に当院でIVMにて出生した児の身体的、精神的発達及びepigeneticの異常を解析し検討したので報告する。

尚、これらの研究は当院の倫理委員会の承認のもと患者さんにインフォームドコンセントを得て施行された。

吉田レディースクリニックにおける治療成績

当院での2009年までの治療成績(表1)及び当院でのプロトコールを(図1)に示す。2004年の妊娠率と比較し約2倍の29%と上昇している。これは成熟培養液の開発や技術の進歩等のためと考えられる。しかしながら成熟率や受精率はCOH卵と比較し未だ低値で更なる改善が必要であり、今後妊娠率の向上を目指し、さらなる排卵誘発法の検討、培養液や技術の改良、着床率の改善を検討する必要がある。

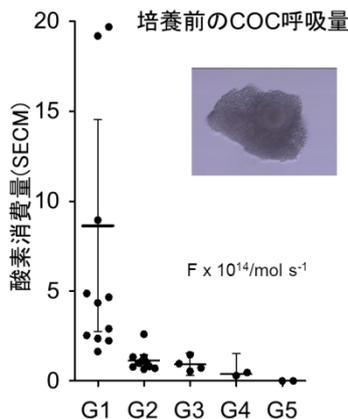
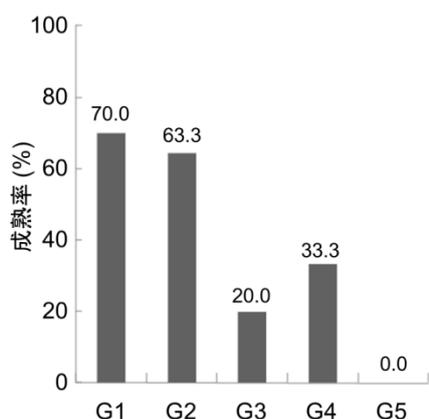


図2. ヒト未成熟卵の成熟率と酸素消費量

IVM卵のgrade別成熟率(左側)と培養前の酸素消費量(右側): 顆粒膜細胞が4層以上では酸素消費量も増大する。GradeはVeeckの法[24]により5段階に分類した。

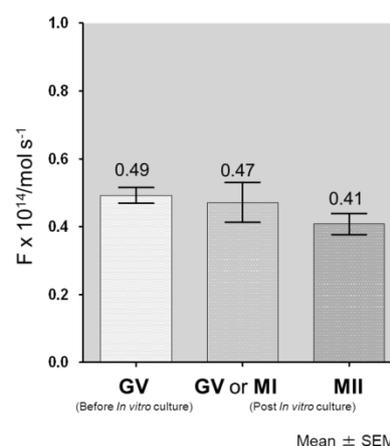


図3. ヒト未成熟卵の酸素消費量

採卵後の未成熟卵の卵丘細胞を取り除いた卵子のみの酸素消費量を示す。GV (germinal vesicle)期、MI (metaphase-I)期、MII (metaphase-II)期に酸素消費量に有意差を認めなかった。

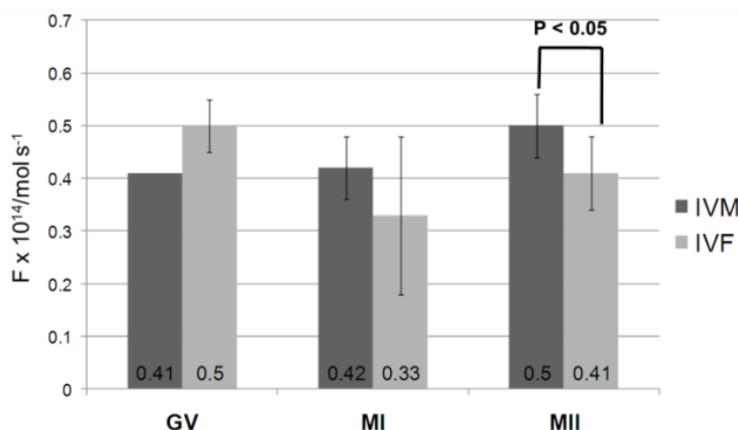


図4. 成熟過程卵の酸素消費量

IVMおよび調節卵巣刺激後の通常IVFの成熟過程での卵子酸素消費量の比較を示す。GV (germinal vesicle)期、MI (metaphase-I)期では有意差を認めず、MII (metaphase-II)期ではIVF卵子の呼吸量はわずかに低下を認めた。

卵子卵丘細胞複合体(COC)及び未成熟卵の呼吸量

IVM-IVFにて採取されたCOCを形態学的に分類し、Grade 1は4層以上の卵丘細胞Grade 2は3層の卵丘細胞Grade 3は卵丘細胞に覆われる領域が半分以下Grade 4は完全裸化卵子Grade 5は裸化卵子が小さく変形したものとした。これらの形態学的分類によるヒト卵子成熟率はGrade 1で70.0%、Grade 2で63.3%、Grade 3で20.0%、Grade 4で33.3%、ならびにGrade 5で0%、とgradeの下降に伴って成熟率も減少した(図2、左側)。

「受精卵呼吸測定装置」はマイクロ電極をセンサープローブとして用い、酸素の還元電流値から球面拡散理論により酸素消費量(呼吸量)を解析する。この方法は非侵襲的・高感度での細胞呼吸計測が可能であり、呼吸活性を指標に卵子や胚の品質を迅速・安全に評価判定することが可能である。IVM培養前のgrade分類による酸素消費量($F \times 10^{14}/\text{mol s}^{-1}$)の比較では、平均酸素呼吸量(mean ± SD)はGrade 1で 12.3 ± 7.4 、Grade 2

で 3.6 ± 1.4 、Grade 3で 0.25 ± 0.11 、Grade 4で0、ならびにGrade 5で $0 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ とgradeの下降と共にその酸素消費量は減少した。(図2、右側)はヒト卵子の呼吸量を示す。更に顆粒膜細胞を取り除いた裸化卵子のgerminal vesicle (GV)期の平均値は $0.49 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ 、GV期もしくはmetaphase-I (MI)期で $0.47 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ 、metaphase-II (MII)期で $0.41 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ となり統計学的に有意差を認めなかった。更にCOHによる卵子とIVM卵子の呼吸量に差を認めなかった(図4)。

透過型電子顕微鏡(TEM)を用いたヒトCOC及び未成熟卵の微細構造観察

ヒト未成熟卵を採取し、胚の発生と呼吸量測定において形態学的分類別に卵丘細胞、未成熟卵の微細構造を透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察評価した(図5)。Grade 1のヒト卵子—卵丘細胞複合体の微細構造を示す。卵細胞質内に矢印で示した様にミトコンドリアが観察され、数も豊富で円形の丸いミトコンドリアの拡

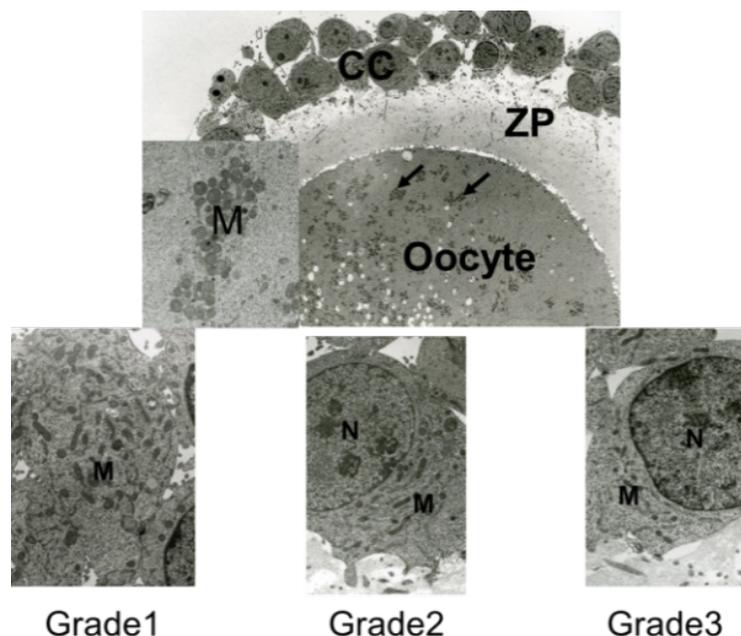


図5. ヒト卵子-卵丘細胞複合体の微細構造
 上段はGrade 1の電顕像で卵細胞質内に矢印で示した様にミトコンドリアが観察され、数も豊富で円形の丸い像が観察される。CC: 卵丘細胞、ZP: 透明帯。下段はgrade別の卵丘細胞の微細構造で、Grade 1はミトコンドリアの発達が著明で数も豊富でcristae形成も一部散見される。gradeが下がるに従ってミトコンドリアの数も減少し、疎になり、ミトコンドリアの形状も縮小傾向を示した。この結果卵丘細胞の豊富な卵子ほどミトコンドリアの発達が著明であった。

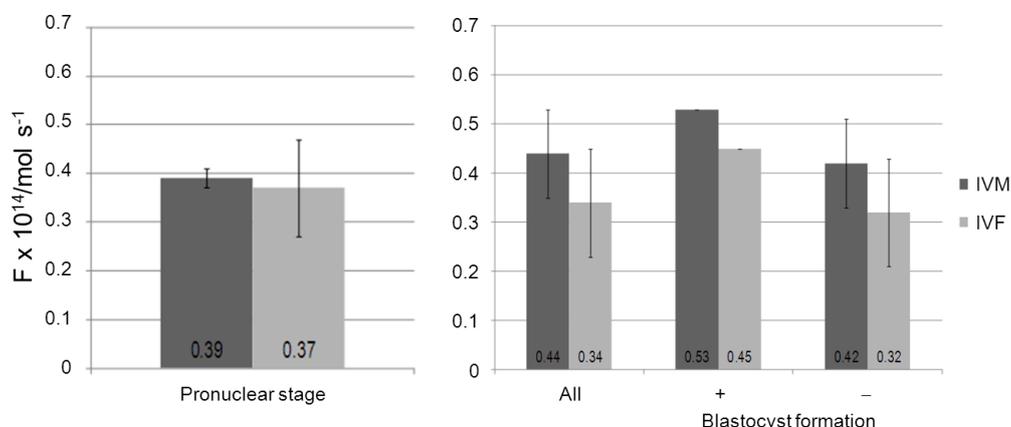


図6. 受精卵(前核期・Day 3)の酸素消費量の比較

左側は前核期のIVMとIVF受精卵の酸素消費量を比較し、両者に有意差を認めなかった。右側はDay 3受精卵の酸素消費量の比較である。IVMとIVF受精卵の両者に有意差を認めず、胚盤胞へ発達した群において両者とも酸素消費量の増加傾向を認めたが、有意差は認められなかった。

大像が左側である。grade別のヒト卵丘細胞の微細構造でGrade 1はミトコンドリアの発達が著明で数も豊富でcristae形成も一部散見される。gradeが下がるに従ってミトコンドリアの数も減少し、疎になり、ミトコンドリアの形状も縮小傾向を示した。この研究により卵丘細胞の豊富な卵子ほどミトコンドリアの発達が顕著であり、かつ酸素呼吸量もgradeの良いものほど高くなり、細胞内のミトコンドリア量と酸素呼吸量が正の相関を示すことが判明した。

ヒトIVM及びCOH分割胚の酸素消費量

ヒト受精卵の酸素消費量の測定により、IVM-IVFにより発生した分割卵の酸素呼吸量は個体差により異なるが、平均0.40, 0.50 $F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ とCOHの受精卵と同様の結果を得た。更に受精卵の酸素消費量($F \times$

$10^{14} / \text{mol s}^{-1}$) は、それぞれ初期分割胚の平均酸素呼吸量は4細胞期、6細胞期、8細胞期および10細胞期でそれぞれ 0.34 ± 0.1 , 0.37 ± 0.1 , 0.4 ± 0.2 , $0.50 \pm 0.2 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ である。Day 3 (Day 0を受精日とする)の分割胚では同じVeeck分類[24]のGradeの胚でも個々の分割胚によって酸素消費量が異なった[1]。COH胚とIVM胚との両者で相違を認めなかった。即ちDay 3の分割胚での比較ではIVM: $0.44 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ 、IVF: $0.34 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ で胚盤胞へ発生したものは、有意差を認めなかったものの呼吸量が高い傾向があった(図6)。年齢別による分類でもこれは同様であった(図7)。この結果は、ヒト分割胚はある一定の最適な酸素消費量の範囲があり、その後の胚発生は予測可能である事が示唆された。我々の研究でもIVM卵とCOH卵の分割胚を比較

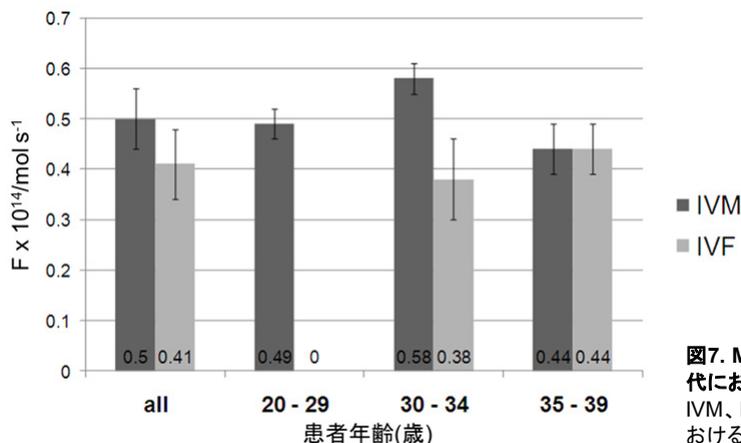


図7. MII (metaphase-II)期卵子の各年代における酸素消費量の比較
IVM、IVF両者のMII期卵子の各年代における酸素消費量に有意差を認めなか

表2. IVM妊娠例の成熟率・受精率等

患者	患者年齢	採卵数	MII期成熟率	受精率	胚移植周期	移植胚
M.I	30	14	35.7%	60.0%	凍結融解	7細胞期, 6細胞期
M.S	34	6	50.0%	66.7%	新鮮	桑実胚 × 2
H.K	31	9	77.8%	85.7%	新鮮	8細胞期, 7細胞期
K.S	27	10	30.0%	100%	新鮮	7細胞期, 6細胞期
E.S	30	6	66.7%	100%	新鮮	8細胞期, 8細胞期
M.S	33	16	37.5%	100%	凍結融解	桑実胚, 7細胞期, 5細胞期
J.Y	36	9	55.6%	100%	凍結融解	胚盤胞 × 2
M.K	30	18	55.6%	80.0%	新鮮	胚盤胞 × 2
Y.K	37	6	83.3%	80.0%	新鮮	6細胞期, 5細胞期
平均値	32.0 ± 3.2	10.4 ± 5.3	54.7 ± 18.7	85.8 ± 15.4		(平均 ± SD)

表3. IVMより出生した児の出生時所見と予後

患者	妊娠後の転帰	分娩様式	性別	出生体重	身長	Apgarスコア	臍帯血 pH	予後・異常の有無
M.I	分娩 (40週-6日)	経産	男	3102g	49.5cm	9 / 9	-	1.8歳異常なし
M.S	分娩 (双胎) (36週-1日)	帝王切開	男/女	2678g / 2320g	46.2cm / 44.5cm	9 / 9	-	2歳異常なし
H.K	分娩 (38週-4日)	経産	男	2810g	47cm	9 / 9	7.438	4.7歳異常なし
K.S	流産 (7週)	-	-	-	-	-	-	-
E.S	分娩 (38週-5日)	経産	男	3070g	48cm	8 / 9	7.114	1.6歳異常なし
M.S	分娩 (41週-6日)	帝王切開	男	3966g	51cm	9 / 10	7.29	1.4歳異常なし
J.Y	分娩 (39週-4日)	帝王切開	男	2964g	48.6cm	9 / 9	7.23	-
M.K	分娩 (40週-2日)	経産	男	3056g	47.8cm	8 / 8	7.032	11ヵ月
Y.K	流産 (8週)	-	-	-	-	-	-	-

して同様の結果を得ている。即ちヒト受精卵において卵の質は個々の個体差が大きい、その後の胚発生に最適な酸素消費量の範囲がある事が判明した。また、初期分割胚、桑実胚、胚盤胞と酸素呼吸量は次第に上昇し、胚盤胞で最も上昇していた。これらの結果はウシやブタなどの他の動物種と同様な結果 [4]。更に形態学的評価と呼吸量を組み合わせると妊娠率が上昇することが示されている[23]。

IVM卵より出生児のART背景と出生後の身体的精神的発達とepigenetis

これまでIVMに関しては受精率、妊娠率培養方法などの技術や発生までの報告は多数散見されるが、その後の出生した児の評価についての報告は非常に少なく、更にepigeneticな検討は殆どなされていないのが現状である。

当院でIVMにより妊娠した症例の成熟率、受精率、新鮮移植、移植胚数、胚盤胞移植或いは分割期胚移植かを検討した結果を表2に示す。平均成熟率54.3%、受精率85.8%、妊娠した症例は全て2個胚移植であった。表3は出生した児の分娩形態、出生体重、身長、apgarscore等身体的、精神的異常の検討を出生後も含

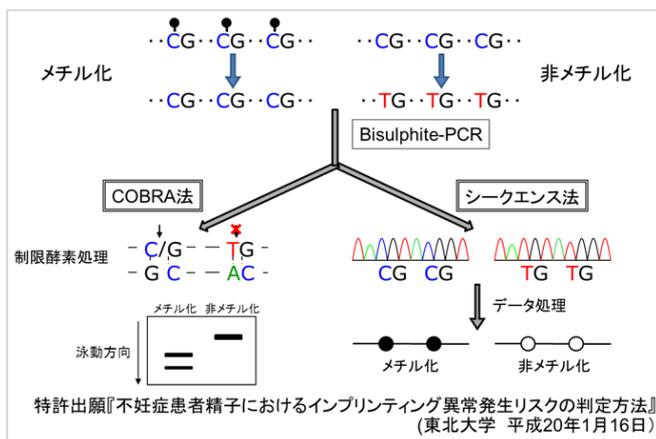


図8A. インプリント遺伝子のDNAメチル化解析法
少量のDNAを用いたメチル化の定量法として、Bisulphite剤を用いて、メチル化されたDNAとメチル化されないDNAを識別後、PCRで増幅。Bisulphite-PCR産物をメチル化感受性制限酵素(restriction enzyme)処理するcombined bisulphite PCR restriction analysis (COBRA)法は定量性に優れ、またBisulphite-PCR-Sequence法は全塩基配列を決定する。今回の解析では、COBRA法とBisulphite-PCR-Sequence法を融合させ、正確にインプリンティングを評価する。([3]より改変)

図8B. COBRA法とシークエンス法によるH19解析
IVM児の臍帯血DNAを用い、インプリント遺伝子H19についてDNAメチル化の解析を行なった。COBRA法では、メチル化されたバンドとメチル化されないバンドがおよそ50%の割合で示され、Sequence法でも、PCR領域内の全てのCpG部位で同様の結果が得られた。その他の7領域についても同様な結果を示した。([3]より改変)

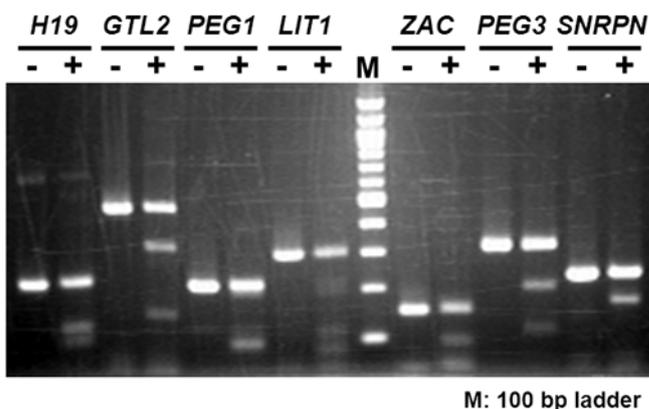
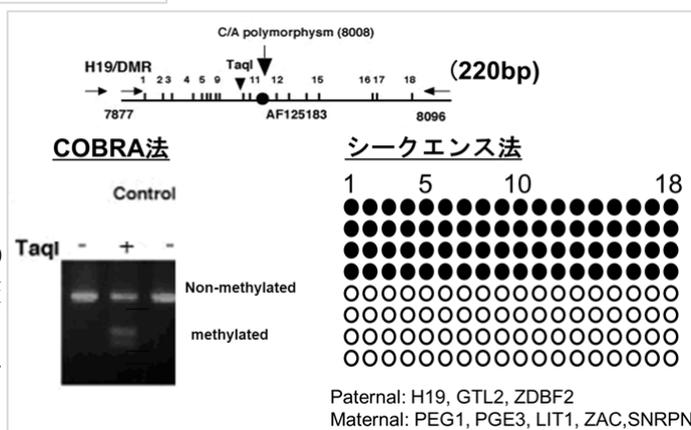


図9. 臍帯血のインプリント遺伝子メチル化解析
凍結胚移植 (Blasto 3AB) により出生した女児 (2964g)。+は出生児臍帯血のメチル化解析：症例は、ガードナー分類における3AB胚を移植した児で、メチル化、非メチル化両方のバンドが確認され、これらのインプリント遺伝子には異常が無い事を確認した。

めて行った結果であるが、児は11カ月から4.7歳までで特に異常所見を認めなかった。

genome imprintingとは、特定な遺伝子に関して、定められた片親(父あるいは母)から受け継いだ遺伝子(アレル)のみが選択的に発現し、他方の遺伝子は発現しないというアレル特異的に遺伝子発現を制御する現象である。最近ARTにてimprinting 異常が増加している事が報告され[12]、成熟培養を必要とするIVM-IVFはimprinting 異常をきたす可能性が通常のIVFより高くなる可能性がある。imprintの確立には配偶子成長過程におけるepigeneticな修飾としてDNAメチル化が最重要と考えられている。有馬らはヒトインプリント遺伝子のアレ

ル特異的メチル化領域を同定し、DNAメチル化について解析した[3,9](図8A, B)。8つのimprinted geneのうち、父性インプリント遺伝子はH19, GTL2, ZDBF2であり、母性インプリント遺伝子はPEG1, PEG3, LIT1, ZAC, SNRPNであり、当院で出生した全ての児の解析を行った8つのimprint遺伝子の制御領域でメチル化パターンに異常は、認められなかった(図9)。

考察

卵子や胚の品質の評価として形態学的手法が長く用いられてきた。しかし形態学的手法のみではその後の胚発生や妊娠率を上昇させる事が困難な場合も

経験する。そこで卵子や分割胚の品質評価のため胚の代謝に注目した評価法が開発された[9]。胚の代謝活性をグルコース、ピルビン酸、アミノ酸等の栄養素の消費に着目した研究もなされた[8,18]。細胞の呼吸(酸素消費)は酸化的リン酸化の過程でATPを産生し、酸素消費を起こし、これも胚の代謝活性の評価基準の1つとされる[21]。

年、胚の新しい評価法として培養24時間後の前核の核小体の配列により胚盤胞への発生率と着床率の改善例がTesarikらにより報告されたが[20]、最近のMioらのtime-lapse cinematographyを用いた報告では、核小体の配列も個々の分割卵で様々に移動し、動態的観察では核小体の配列はある一時点での評価の一部に過ぎない事が判明した[14]。即ち核小体は発育の過程で配列をドラマチックに変えている。

最初の酸素呼吸量の測定はウサギ卵とマウス胚において行われた [13]。これらの研究では、マウス胚盤胞とヒト卵、胚盤胞の測定[13]を酸素ヘモグロビンからヘモグロビンへの変換による酸素消費量を間接的に計測した。その後、哺乳類胚の酸素呼吸量は様々な代謝過程の情報をパラメーターとして、Magnussonの様にdiverを用いたり[16]、spectrophotometricsの使用[7]、蛍光色素を用いた方法[10]、電気化学的方法など[11]により計測された。さらに、より正確で簡便な酸素呼吸量の測定が求められ、単一胚の酸素呼吸量の測定が可能なる「受精卵呼吸測定装置」が開発された[1]。この呼吸測定システムでは底辺に円錐状単一胚の測定可能なシステムは底辺を円錐状microwellを施した測定プレートを使用する事により、呼吸測定の操作性の向上と測定時間の大幅な短縮を可能にした。また、このシステムは単一細胞の呼吸量測定を可能にする高感度化を実現した結果、呼吸量測定により個々の胚の品質を高精度で判定できるようになった[1]。

Abeらの報告[1,2]によると、多くの動物胚では桑実期から胚盤胞に期にかけて呼吸量の増加とミトコンドリアの発達が一致しておこり、呼吸量の高い胚は発生能や耐凍能が良好である。更に呼吸量測定後の移植実験では基準値以上の呼吸量を示す胚は妊娠率が高いことが判明した。よって呼吸量測定は胚の品質評価に有効であることが示された[1]。ヒト胚では同じVeck分類において同じgradeの胚でも呼吸量に差があることや、胚発生には一定以上の酸素呼吸量を必要とすることが明らかにされている。また凍結融解胚の我々の最近の知見では呼吸量の上昇している群では融解後の胚盤胞到達率が有意に上昇し、呼吸量の高い胚は耐凍能の高い事がヒト胚でも確かめられた。

更にSECM装置を用いて単一動物卵子の呼吸量を

測定する検討を加えると卵子成熟過程における呼吸代謝能を詳細に検討が可能となった。成熟前後において卵子及び卵丘細胞の呼吸能、卵子におけるATP含量およびミトコンドリアの分布様式が顕著に変化し、この呼吸活性は培養条件(培地の種類)によって影響を受けるとAbeらは報告した[1]。更に卵丘細胞の付着状態によって卵子の呼吸能が異なり、高い呼吸活性を有するCOCは卵子成熟培養後の成熟率が高い事が判明した。ヒト卵子の呼吸量も同様に卵丘細胞の付着3層以上のGrade 1、ならびに2では有意に呼吸量は高く、その後の成熟率にも反映され、受精率や胚発生率に影響を与える事が判明した。これらの研究により、SECMはヒト卵子の品質評価にも有効である事が示唆された。その後の受精卵の酸素呼吸量はCOHとIVMに有意差を認めず、受精卵として確立されたIVM胚はCOH受精卵と同様の機能を示す事が明らかとなった。更にこれらは年齢においても有意差を認めなかった。

近年、ART技術の発達と共に本来非常に稀であったimprint異常症が増加しているという報告が見られている。米国では、Beckwith-Wiedemann症候群の発生頻度は一般集団では0.76%であるのに対し、ART後は4.1%とおよそ6倍増加するという報告もある[12]。更に不妊治療中の男性精子のおよそ25%にimprint異常を示すという報告も認められる[9]。成熟培養を要するIVMはIVFより培養期間がより長期化し、epigeneticな変化を来し易いと考えられるが、少数ではあるが今回我々の施設でのIVM児にepigeneticな異常は認められなかった。但し今後ARTの安全性を検証するため症例を重ねて検討する必要があると考える。

まとめ

SECMを改良した「受精卵呼吸測定装置」は単一のヒト卵子やCOCの呼吸量測定、更に胚の様々な分割過程での呼吸量測定に使用可能である。胚発育過程においてミトコンドリアの成熟は酸素消費の上昇と一致した。ミトコンドリアの発達は胚品質の重要な因子であり、それはミトコンドリアが胚発育のためにエネルギー源としてATPを供給し、卵細胞質内の栄養の代謝の発育を司るためである。「受精卵呼吸測定装置」はミトコンドリア機能とヒト卵子、胚のクオリティー機能の関係を評価する有益な装置となる。ヒト卵子はMII期卵に成熟する事によりその呼吸量を維持し、受精後その活性は更に上昇し、桑実胚から胚盤胞で最大となる。ヒト初期分割卵では胚の形態学的評価と酸素呼吸活性は一致しなかった。形態学的評価と酸素呼吸量を組み合わせる事により、妊娠率の上昇が得られ、胚選択の有効な指標となる事が示唆された。更にIVM受精卵とCOH受精卵では酸素呼

吸量に差を認めず、受精卵となったIVM胚はCOH胚と同様の機能を有する事が判明した。我々の施設で出生したIVM児の検討では身体的精神的な異常を認めず、長期培養を要するIVM児の代表的なepigenetic遺伝子群の異常も認めなかった。今後、更に症例を重ねた検討を要する。

参考文献

1. **Abe H.** A non-invasive and sensitive method for measuring cellular respiration with a scanning electrochemical microscopy to evaluate embryo quality. *J. Mamm. Ova. Res.* 2007; 24: 70–78.
2. **Abe H, Shiku H, Aoyagi S, Matsue T, Hoshi H.** Respiration activity of bovine embryos cultured in serum-free and serum-containing media (Abstract). *Reprod. Fert. Dev.* 2005; 17: 215.
3. **有馬 隆博, 小林 久人.** 不妊症患者精子におけるインプリント異常発生リスクの判定方法. 特許公開 2009-165409. 2009
4. **Boiso I, Veiga A, Edwards RG.** Fundamentals of human embryonic for growth *in vitro* and the selection of high-quality embryos for transfer. *Reprod. Biomed. Online* 2002; 5: 328–350.
5. **Cha KY, Chian RC.** Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinic use. *Hum. Reprod. Update* 1991; 4: 103.
6. **Chian RC, Chian RC, Buckett WM, Tulandi T, Tan SL.** Prospective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 165–170.
7. **Donnay I, Leese HJ.** Embryo metabolism during the expansion of the bovine blastocyst. *Mol. Reprod. Dev.* 1999; 53: 171–178.
8. **Gopichandran N, Leese HJ.** Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophoblast and blastocoel fluid. *Reproduction* 2003; 126: 299–308.
9. **Kobayashi H, Sato A, Otsu E, Hiura H, Tomatsu C, Utsunomiya T, Sasaki H, Yaegashi N, Arima T.** Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16: 2542–2551.
10. **Land SC, Porterfield DM, Sanger RH, Smith PJ.** The self-referencing oxygen-selective microelectrode detection of transmembrane oxygen flux from single cells. *J. Exp. Biol.* 1999; 202: 211–218.
11. **Lopes AS, Larsen LH, Rmsing N, Løvendahl P, Råty M, Peippo J, Greve T, Callesen H.** Respiration rates of individual bovine *in vitro*-produced embryos measured with a novel, non-invasive and highly sensitive microsensor system. *Reproduction* 2005; 130 :669–679.
12. **Manipalviratn S, DeCherney S, Segars J.** Imprinting disorders and reproductive technology. *Fert. Steril.* 2009; 91: 305–315.
13. **Magnusson C, Hillensjö T, Hamberger L, Nilsson L.** Oxygen consumption by human oocytes and blastocysts grown *in vitro*. *Hum. Reprod.* 1986; 1: 183–184.
14. **Mio Y.** Morphological analysis of human embryonic development using time lapse cinematography. *J. Mamm. Ova. Res.* 2006; 23: 27–35.
15. **Murakawa H, Aono N, Tanaka T, Kikuchi H, Yoshida H, Yoshida H, Yokoo M, Abe H.** Morphological Evaluation and Measurement of the Respiration Activity of Cumulus-oocyte complexes to Assess oocyte quality. *J. Mamm. Ova Res.* 2009; 26: 32–41.
16. **Nilsson BO, Magnusson C, Widéhn S, Hillensjö T.** Correlation between blastocyst oxygen consumption and trophoblast cytochrome oxidase reaction at initiation of implantation of delayed mouse blastocysts. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1982; 71: 75–82.
17. **Overstorm EW, DUBY RT, Dobrinsky J, Roche JF, Boland MP.** Viability and oxidative metabolism of the bovine blastocyst (Abstract). *Theriogenology* 1992; 37: 269.
18. **Rieger D, Loskutoff NM.** Changes in the metabolism of glucose, pyruvate, glutamine and glycine and glycine during maturation of cattle oocyte *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 1994; 100: 257–262.
19. **Steptoe P.C, Edwards RG.** Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 312: 366.
20. **Tesalik J, Junca A M, Hazout A, Aubriot F X, Nathan C, Cohen-Bacrie P, and Dumont-Hassan M.** Embryos with high implantation potential after intracytoplasmic sperm injection can be recognized by a simple, non-invasive examination of pronuclear morphology. *Hum. Reprod.* 2000; 6: 1396–1399.
21. **Thompson JG, McNaughton C, Gasparrini B, McGowan LT, and Tervit HR.** Effect of inhibitors and uncouplers of oxidative phosphorylation during compaction and blastulation of bovine embryos cultured *in vitro*. *J. Reprod. Fertil.* 2000; 118: 47–55.
22. **Trounson AO, Wood C, Kaussche A.** *In vitro* maturation and the fertilization and development competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. *Fertil. Steril.* 1994; 62: 353–362.
23. **Utsunomiya T, Goto K, Nasu M, Kumasako Y, Araki Y, Yokoo T, Sasaki T, Abe H.** Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J. Mamm. Ova. Res.* 2008 ; 25: 2-7.
24. **Veeck LL.** Oocyte Assessment and Biological Performance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1988; 541: 259–295.



= 原著論文 =

新しい胚評価法に基づく最適な胚移植時期

The ideal timing for embryo transfer with a novel embryo scoring system

古井 憲司

Kenji FURUI

医療法人愛育会 クリニックママ 〒503-0807 岐阜県大垣市

furui@clinicmama.jp

要旨

本研究は、当院独自のDay 3胚(採卵当日をDay 0とする)のscore (F Score)に基づいたDay 3における移植胚の選択が、その後の良好胚盤胞到達率ならびに胚盤胞移植率を正確に反映しているかどうか、また妊娠率の向上に寄与できるか否かを明らかにすることを目的に検討した。F Score により、Day 3胚の評価を行ない各症例の中で最良好胚(F1)を選択した。単一胚盤胞移植を施行した症例に対する検討では、F1のscoreが良好な程F1が実際に胚盤胞移植される率が高率であり、F Scoreが胚盤胞への発育を予見しうる胚評価法であることが確認された。一方、F1のscoreが不良な程、F ScoreによるDay 3での胚評価が誤っている可能性が高いことが判明した。年齢別の検討では、胚盤胞移植のキャンセル率は40歳以上になると有意に上昇しており、40歳以上の症例については、胚盤胞移植が必ずしも有利ではないことが示唆された。

キーワード: 胚評価法, 割球数, フラグメンテーション, 割球の大小不同, 胚盤胞到達率

序論

不妊症患者に対する体外受精-胚移植では、近年、多胎防止の観点から単一胚移植が推奨されている。このように少ない移植胚数で妊娠率を向上させるためには、胚移植に際し正確な胚評価方法を構築することが望まれより良好な胚を選別することが不可欠である。

胚評価方法として従来我々の施設ではVeck分類[9]で分割期胚(Day 2-3) (採卵当日をDay 0とする)の評価を行ってきたが、胚盤胞移植を行うようになるにつれVeck分類と胚盤胞到達率とが必ずしも関連しないことを経験した。そこで我々はより正確な胚評価を行うために、Day 3での割球数、フラグメンテーションの割合、割球の均一性の三因子による新しくかつ簡明な分割期胚の評価法を考案した[6]。割球数については、 ≤ 3 cellを0 point、4 cellを1 point、5もしくは、6 cellを2 point、 ≥ 7 cellを3 pointと評価した。また、フラグメンテーションについては、 $\geq 50\%$ を0 point、 $< 50\%$ を1 pointと評価した。さらに、割球の大小不同については、大小不同(+)を0 point、大小不同(-)を1 pointとした。さらに、これら三因子について各々のpointの合計をスコア化(F Score)した。このF Scoreと胚盤胞到達率およびVeck分類と胚盤胞

到達率との関係を比較検討したところ、F ScoreによるDay 5-6における胚盤胞到達率は、score 5(最良好胚)では77.5%であり(表1)[2]、Veck分類によるG1(最良好胚)では50.5%であった(表2)[3]。

これらの結果を受けて、本研究では、この当院独自のDay 3胚スコア(F Score)に基づいた移植胚の選択が本当に適切なものか否かを明らかにすることを目的に後方視的な検討をデザインした。このF Scoreと胚盤胞到達率との関係およびVeck分類と胚盤胞到達率との関係を比較検討した。また単一胚移植症例でのF1のDay 5-6における転帰を検討した(検討1)。さらに、単一分割期胚移植ならびに単一胚盤胞移植における妊娠率と流産率の比較および年齢別の胚盤胞移植キャンセル率を検討した(検討2)。

対象(材料)と方法

対象

検討1では、2006年7月から2008年12月までにlong protocolまたはアンタゴニスト法にて卵巣刺激し単一分割期胚移植を施行した39周期、単一胚盤胞移植を施行した176周期を対象とした。そしてそれらの症例について後方視的に当院独自のF scoreを用いてDay 3での

投稿日: 2010年9月30日

掲載決定日: 2010年11月15日

ウェブサイト事前公開日: 2010年12月30日

表1. F Scoreと胚盤胞到達率との関係

F Score	5	4	3	2	1	0
胚盤胞到達率(%)	77.5%*	56.0%*	39.9%*	24.0%	11.0%	4.5%

*P < 0.001. vs 他のすべての値。

「割球数によるスコア」、「フラグメンテーションによるスコア」、「割球の大小不同の有無によるスコア」の各項目の合計pointにより、5 point = score 5、4 point = score 4、3 point = score 3、2 point = score 2、1 point = score 1、0 point = score 0とした。文献[2]より改変。

表2. Veeck分類と胚盤胞到達率との関係

Veeck分類	G1	G2	G3	G4	G5
胚盤胞到達率(%)	50.5%	59.5%	36.7%*	48.3%	25.7%*

*P < 0.001. vs他のすべての値。

Veeck分類に従い、最良好胚をG1とし、以下順にG2、G3、G4、G5とした。文献[2]より改変。

表3. 単一胚移植症例(n=176)でのF1のDay 5-6における転帰

	F1 = score5 (n = 117)	F1 = score4 (n = 37)	F1 ≤ score3 (n = 22)
胚盤胞移植率	48.7% (57/117)	45.9% (17/37)	40.9% (9/22)
良好胚盤胞到達凍結保存可能率	25.6% (30/117)	5.4% (2/37)	0% (0/22)
不良胚盤胞到達凍結保存可能率	10.3% (12/117)	5.4% (2/37)	0% (0/22)
不良胚盤胞到達凍結保存不可率	0.9% (1/117)	5.4% (2/37)	4.5% (1/22)
胚盤胞非到達率	14.5% (17/117)	37.8% (14/37)	54.5% (12/22)

胚評価を行ない、各症例の中で最も良好と思われる胚(F1)を選択した。このF1がDay 5-6で実際に胚移植されたか否かを明確にする目的で単一胚盤胞移植症例でのF1のDay 5-6における転帰およびF1が移植されなかった場合のDay 5-6での転帰を検討した。同様にVeeck分類での最良好胚(V1)についても後方視的に検討した。

検討2では、2006年7月から2008年12月に施行した単一分割期胚移植症例(39周期)、単一胚盤胞移植症例(176周期)について、それぞれの妊娠率ならびに流産率について検討した。さらに、2002年4月から2008年12月に胚盤胞移植を試みた630周期について、年齢別キャンセル率を検討した。

方法

卵巣刺激方法は、long protocolまたはアンタゴニスト法を施行したものを対象とした。Long protocolでは、前周期の黄体中期よりGnRHアゴニストを開始し月経周期3-5日目からヒト下垂体性腺刺激ホルモン[hMG: HMGコーワ(興和テバ)あるいはHMG筋注用(富士製薬工業)]を投与し、主席卵胞の平均径が18 mmに到達したところでヒト絨毛性性腺刺激ホルモン[hCG: ゲストロン(興和テバ)]5,000単位を投与し35.5時間後に静脈麻酔下、経膈超音波ガイド下にて採卵を行った。GnRHアンタゴニスト法では、月経周期3-5日目からhMGを投与し、主席卵胞の平均径が14 mmから16 mmに到達したところで、GnRHアンタゴニスト(セトロタイド、塩野義製薬)0.25 mgをhCG 5,000単位投与日まで連日投与した。

その後、主席卵胞の平均径が18 mmに到達したところでhCG 5,000単位を投与し、35.5時間後に静脈麻酔薬3種[ペンタジン(第一三共)、セルシン(武田薬品工業)ならびにケタラルール(三共)]を使用した麻酔下に、経膈超音波ガイド下にて採卵を行った。

精子の調整は、Sperm Preparation Medium (Medi-Cult, Denmark)にて行った。体外受精または顕微授精後の受精確認までの胚の培養は、Universal IVF Medium (Medi-Cult)、Day 1からDay 3までをBlastAssist System 1 (Medi-Cult)、Day 3以降をBlastAssist System 2 (Medi-Cult)を用いて培養した。そして、37°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の気相条件下で培養した。Day 5またはDay 6での胚盤胞移植は、胚移植用培養液としてUTM (Medi-Cult)を使用し、北里ET Catheter Guide (北里メディカル、東京)を用いて経膈超音波ガイド下にて施行した。

胚評価方法は、Day 3ではF Score [2]とVeeck分類[9]の両方によりそれぞれを評価した。またDay 5-6での胚盤胞評価はGardner分類[4]に従い、3BB以上を良好胚盤胞とした。なお、各症例でF Scoreにより最も良好なDay 3胚をF1とし、F1にはF Score 0-5のすべてを含み、同様にVeeck分類により各症例で最も良好なDay 3胚をV1とし、Veeck分類G1-5のすべてを含むものとした。

余剰胚は、ガラス化法[5]を用いて凍結保存した。

臨床的妊娠は、超音波断層法にて胎嚢確認により判定した。

統計学的処理は、t-検定、Mann-Whitney U-検定、あるいは χ^2 -検定にて適宜行った。

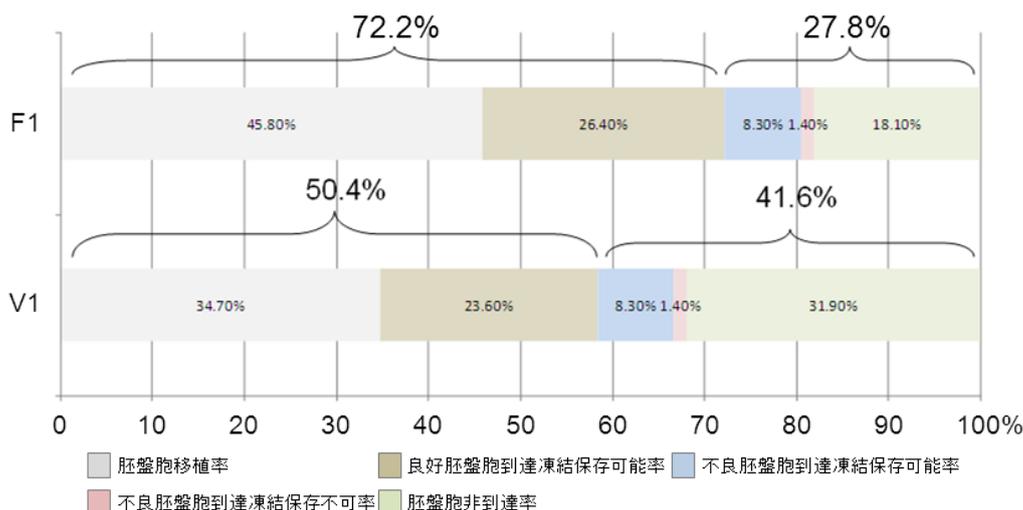


図1. 単一胚盤胞移植にて妊娠した症例 (n=72) でのF1, V1のDay 5-6における転帰
同一症例においてDay 3でのF scoreによる最良好胚をF1とし、Veeck分類での最良好胚をV1とした。

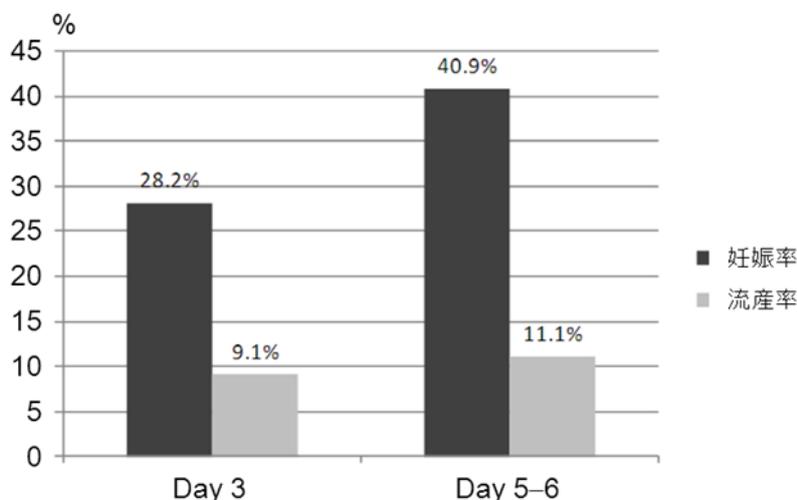


図2. 単一胚盤胞移植症例の移植日別妊娠率と流産率
単一分割期胚移植症例 (39周期) ならびに単一胚盤胞移植症例 (176周期) における妊娠率と流産率を示す。

結果

単一胚盤胞移植症例でのF1のDay 5-6における転帰 (表3) を検討した結果、実際の胚盤胞移植率については、F1 = score 5 (48.7%) は、F1 = score 4 (45.9%) および F1 ≤ score 3 (40.9%) と比較して最も高率に胚盤胞移植が施行されていた。また、良好胚盤胞に発育し凍結保存された率 (良好胚盤胞到達凍結保存可能率) も、F1 = score 5 (25.6%) が、F1 = score 4 (5.4%) および F1 ≤ score 3 (0%) と比較して有意に高率であった。また、Day 5-6 において胚盤胞に到達しなかった率 (胚盤胞非到達率) では、F1 = score 5 (14.5%) は F1 = score 4 (37.8%) および F1 ≤ score 3 (54.5%) と比較し有意に低率であった。

単一胚盤胞移植にて妊娠に至った症例におけるF1およびV1のDay 5-6での転帰 (図1) を検討したところ、F Scoreにより評価した最良好胚F1のうち27.8%は、不良胚盤胞あるいは胚の成長が途中で停止 (胚盤胞非到達) した。一方、Veeck分類により胚を評価した場合は、最良好胚V1のうち41.6%が不良胚盤胞あるいは胚の成長が途中で停止しており、Day 3での胚評価に誤りが生ずる可能性はF Scoreと比較し高率であった。

次に単一胚移植症例の移植日別妊娠率と流産率 (図2) を示した。妊娠率は、胚移植あたりDay 3移植では28.2%、Day 5-6移植では40.9%でありDay 5-6移植の方がDay 3移植よりも有意差は認められなかったが高率であった。また流産率については、分割期胚移植では9.1%、胚盤胞移植では11.1%でほぼ同等であった。

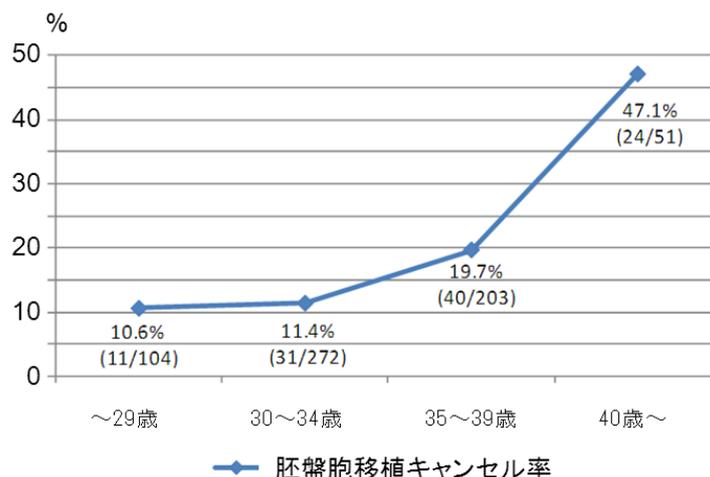


図3. 年齢別胚盤胞移植キャンセル率
胚盤胞移植を試みた630周期の年齢別キャンセル率を示す。

年齢別胚盤胞移植キャンセル率(図3)についての検討では、29歳以下では10.6%、30–34歳では11.4%、35–39歳では19.7%、40歳以上になると有意に上昇し47.1%であった。

考察

表1および表2より、当院独自のDay 3における胚評価方法(F Score)はVeck分類と比較して、Day 5–6における胚盤胞到達率をより正確に予見できる結果であった。

単一胚盤胞移植症例でのF1のDay 5–6における転帰(表3)より、F1のscoreが不良な程Day 3での評価に誤りが起こる可能性が高いことが判明した。さらにF1がDay 5に胚移植されなかった周期を検討してみると、F Scoreが0、1および2とlow scoreである程、F1がDay 5–6において胚盤胞まで到達していないことも判明した。

単一胚盤胞移植にて妊娠に至った症例でのF1およびV1のDay 5–6における転帰(図1)を検討してみると、F Scoreにより評価した最良好胚F1のうち27.8%は胚の成長が途中で停止したかもしくは胚盤胞まで発育したが不良であったため凍結保存することができなかった。つまり、この27.8%のF1をもしDay 3で胚移植していたら妊娠しなかった可能性が高いと考えられた。一方、Day 3においてVeck分類により胚を評価した場合はその可能性が41.6%とさらに高くなることが判明した。これよりDay 3における胚評価法であるF Scoreは、胚盤胞への発育をある程度予見することはできるといえるが、そしてVeck分類よりは優れているといえるが、完全なものではなくDay 3での胚評価の限界を感じる場所である。

単一胚移植症例の移植日別妊娠率と流産率(図2)の検討では、単一胚移植における妊娠率は有意差がないものの胚盤胞移植症例の方が分割期胚移植症例と比

較し高率であった。一方、流産率は分割期胚移植と胚盤胞移植との差は認められなかった。つまり、Day 3での分割期胚移植よりもDay 5での胚盤胞移植の方が妊娠率が高率であったことより、胚盤胞移植を目指すことが妊娠率向上の観点から重要であると示唆された。しかし、有意差が認められなかったことより、再三に渡り胚盤胞に到達できずに胚移植をキャンセルせざるを得ない症例に対しては、Day 3での分割期胚移植の必要性があることも示唆された。

また、年齢別胚盤胞移植キャンセル率(図3)の検討では、胚盤胞移植のキャンセル率は40歳以上になると有意に上昇しており40歳以上の症例については胚盤胞移植が必ずしも有利であるとはいえないことを示唆していた。度重なる採卵にも関わらず胚盤胞が得られない症例を度々経験する。このように体外培養では胚盤胞への発育が見込めない症例に対しては、F ScoreによりDay 3での胚評価を行い患者との十分なインフォームドコンセントのもとに患者の精神的なストレスの軽減にも配慮し、Day 3での胚移植に踏み切ることも必要であると思われる。

我々のDay 3胚スコア(F Score)は、Day 3における胚評価をVeck分類より正確に反映し妊娠率の改善に寄与できると考えられたが、Day 3での形態学的な胚評価の限界を考えさせられる結果でもあった。しかし、Day 3における胚の質が良好であればキャンセル率が低く胚盤胞移植における妊娠率が有意に高いという報告もある[1]。このことより、Day 3での正確な胚評価方法の意義は大きく、F Scoreのさらなる改善に期待が寄せられる。

今後は、周産期医療におけるリスクを考えると多胎妊娠は絶対に予防すべきである。そのためには単一胚移

植に移行することが必須であり、その観点からも胚盤胞までの培養が胚の選別には有利であると考えられた。しかし、40歳以上の症例では、胚盤胞まで到達せずに胚移植がキャンセルとなる症例についての対策も必要である。また、少数の胚しか得られなかった症例については、Day 2で胚移植をした方が良いという報告もあり[8]、症例毎に患者年齢、胚の数およびその質について配慮すべきであると考えられる。さらに胚の長期培養による影響についても考慮する必要がある。受精から分割期胚、そして胚盤胞への成長の過程でエピジェネティックな遺伝子発現制御機構に混乱が生じる可能性があると言われており、動物実験で同一の個体にもかかわらず異なる培養環境のもとで発育させると胚盤胞での遺伝子の発現が異なっていたという報告もある[7]。これらの問題点に関しては今後の検討課題であると思われる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、診療にご協力頂いた当院の北川武司先生、野村昌男先生、ならびに当院の看護スタッフ、また胚評価およびデータ整理を担当したラボスタッフ(エンブリオロジスト)に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. **Blake D, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M.** Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007; CD002118.
2. **Furui K, Nomura M, Kitagawa T, Matsui Y, Yoshikawa M, Sano T.** Day 3分割期胚の新しい評価方法の検討. *日本受精着床学会雑誌* 2007; 24: 114-119.
3. **Furui K.** 胚移植の時期. *卵子学*. 医歯薬出版. 2010; 180-183.
4. **Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in-vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 3434-3440.
5. **Kuwayama M, Kato O.** All round vitrification of human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genetic.* 2000; 17: 477.
6. **Nomura M, Iwaser A, Furui K, Kitagawa T, Matsui Y, Yoshikawa M, Kikkawa F.** Preferable correlation to blastocyst development and pregnancy rates with a new embryo grading system specific for day 3 embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007; 24: 23-28.
7. **Rizos D, Lonergan P, Boland M.P, Arroyo-Garcia R, Pintand B, Fuente J.** Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems : Implication for Blastocyst Quality. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 589-595.
8. **Shen S, Rosen MP, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI.** Day 2 transfer improves pregnancy outcome in *in vitro* fertilization cycles with few available embryos. *Fertil. Steril.* 2006; 86: 44-50.
9. **Veeck LL.** Oocyte Assessment and Biological Performance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1988; 541: 259-295.



Japan Society for Reproduction Engineering

= Original Article =

Cryotop facilitates high developmental ability of re-vitrified mouse embryos

Junya ITO^{1,2,†}, Mai KURAMOCHI^{1,3}, Aiko INOUE^{1,3}, Kaori YABE^{1,3},
Katsuyoshi FUJIWARA², Osamu NISHIKAWA⁴, Kazuyoshi ARISHIMA^{2,4},
Shigenori SONOKI³, Toshio MASAOKA² and Naomi KASHIWAZAKI^{1,2}

¹Laboratory of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara 252-5201, Japan.

²Graduate School of Veterinary Science, Azabu University, Sagamihara 252-5201, Japan.

³College of Environmental Health, Azabu University, Sagamihara 252-5201, Japan.

⁴Department of Anatomy II, School of Veterinary Medicine, Azabu University, Sagamihara 252-5201, Japan.

† Correspondence: itoj@azabu-u.ac.jp

ABSTRACT

Vitrification is well known as an effective means of preserving not only germ cells but also reproductive organs. Although various devices are used to vitrify mammalian embryos, it has been reported in other mammalian species that the Cryotop method develops vitrified-warmed embryos better than other devices. However, information about multiple rounds of vitrification (re-vitrification) of embryos is very limited even in mice. In this study, we examined the effect of repetitively vitrified mouse embryos (2-cell stage, 4-cell stage, morula and blastocyst) at the same stage on the embryos' developmental ability. Cumulus-oocyte complexes were collected from the oviducts and fertilized with frozen-thawed epididymal spermatozoa. After *in vitro* fertilization, the embryos were cultured up to 120 h. Embryos at the 2-cell stage (24 h), 4-cell stage (47 h), morular stage (72 h), and blastocyst stage (96 h) were collected and vitrified by Cryotop. After warming, embryos were cultured for 2 h and then re-vitrified. Vitrification-warming was repeated up to three times. Our results showed that re-vitrification up to three times did not affect the developmental ability of embryos vitrified at 2-cell, 4-cell, morular, or blastocysts. Taken together, the results show that re-vitrification of mouse embryos by Cryotop did not have a detrimental effect on embryonic development of the embryos.

Key words: Cryotop, vitrification, mouse, embryo

INTRODUCTION

Cryopreservation of germ cells is a useful and important technology for the efficient production of transgenic, mutant, and gene-targeted (knockout and knockin) animals. Especially, embryo cryopreservation is routinely used for not only efficient production of experimental animals but also clinical medicine. Many assisted reproductive technologies, including embryo cryopreservation, have been applied to address human

infertility. Whittingham and his colleagues [38] first succeeded in the cryopreservation of mammalian embryos at -196°C . In their method, the mouse embryos are eventually cooled at a controlled rate to temperatures below -80°C and then plunged into liquid nitrogen at -196°C for long-term storage (reviewed by Leibo [20]). Later, Willadsen [39] modified the original method by Whittingham et al. [38] and succeeded in embryo cryopreservation using an intermediate subzero

Submitted: December 14, 2010

Accepted: December 28, 2010

Advance Publication in Website: December 30, 2010

temperature of -36°C , instead of -80°C , before plunging the embryos directly into liquid nitrogen. The method has been improved by some modifications and has been called the 'slow-freezing method' or the 'standard method'. This slow-freezing method is widely and routinely applied for embryo cryopreservation in many species [10,19,25,29].

Rall and Fahy [27] also succeeded in preserving mammalian embryos at -196°C by an alternative called the 'vitrification method' or the 'ultra-rapid freezing method'. Although Rall and Fahy [27] reported that vitrified mouse embryos yielded a survival rate as high as that of cryopreserved ones by slow-freezing, specific studies clearly showed that the vitrification method was superior to the slow-freezing method in embryo preservation [13,32]. Contrary to the slow-freezing method, the major advantage of the vitrification method is that it eliminates physiological damage caused by intracellular or extracellular ice crystal formations, and reduces damage from chilling by shortening the exposure to a suboptimal temperature [15]. In addition, the vitrification method does not require a programmable freezer, which is generally expensive. The vitrification method is also simpler and quicker than the slow-freezing method because embryos are out of the incubator for less than 5 min in the vitrification method, whereas with slow-freezing equilibration alone takes more than 20 min [14]. Thus, vitrification can supplant slow-freezing as a method of preserving mammalian oocytes and embryos.

In general, the use of high concentrations of cryo-protective agents (CPAs) potentially increases toxicity to the vitrified embryos. Increasing the volume of vitrification solution also interferes with the survival of vitrified-warmed embryos because a large volume of solution decreases the cooling rate [14]. Therefore, a smaller volume of vitrification solution in a container is a key to obtaining a higher vitrification rate. Indeed, many devices or methods have been developed to produce a small volume of vitrification solution. An electron microscope grid [7], a gel-loading tip [9], the open pulled straws (OPS) [37], CryoLoop [18], solid surface vitrification [4,31], microdrops [26], nylon mesh [1], and metal mesh [6] were developed to minimize the volume of vitrification solution.

A Cryotop is an alternative device that consists of a thin strip of plastic film [15]. In the protocol using Cryotop, embryos are loaded with the use of a glass

capillary under the control of a stereomicroscope [14]. Since almost all of the medium is removed before cooling, the embryos (or oocytes) are covered with only a very thin solution layer, and then capped Cryotop is plunged directly into liquid nitrogen [14]. In rabbits, it has been shown that the vitrification with Cryotop yielded a higher rate of post-warming survival of pronuclear-stage (PN) embryos than either the gel-loading tip or CryoLoop [10]. In the pig, it was reported that the Cryotop method was superior to the OPS technique for vitrification of matured porcine oocytes [22]. Furthermore, we also found that the Cryotop method is effective for the vitrification of PN embryos in rats [28]. Thus far, the Cryotop method has been used for oocytes and/or embryos of vitrification in other species, including the rabbit [10], the human [7, 16], the cattle [3, 23], the minke whale [11], the pig [5], the buffalo [24], the cat [36], the horse [2], and the sheep [12,33]. These results strongly suggest that Cryotop is a superior device, and one of the most powerful, for vitrification of mammalian oocytes and embryos. However, only two papers have been found in which the Cryotop method is applied to the vitrification of mouse embryos [21,40].

Although many papers have focused on vitrification using various devices or protocols, the efficacy of repeated vitrification is not well understood. Recently, it was reported that mouse embryos at the 1-cell stage were vitrified using the CryoLoop and then were re-vitrified at the successive stages (2-cell, 8-cell, and blastocyst stages) [30]. From the results, those authors concluded that re-vitrification did not affect development in either the 8-cell stage or the blastocyst stage [30]. Thus, re-vitrification of embryos at successive stages seems to maintain a high developmental ability of the vitrified/warmed embryos. However, no one has reported the effect of re-vitrification at the same stages on embryonic development *in vitro*. Such information will be useful for many researchers in not only basic biology but also clinical medicine, because spare embryos may be re-vitrifiable at the same stage after embryo transfer. The objective of the present study was to clarify the effects of re-vitrification by Cryotop up to three times at the same stages (2-cell stage, 4-cell stage, morular stage, or blastocyst stage) on the development into blastocysts and/or hatched blastocysts.

MATERIALS AND METHODS

All chemicals and reagents were purchased from the Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated. All procedures for the handling and treatment of the animals were conducted according to the guidelines established by the Animal Research Committee of Azabu University.

Animals

MII oocytes were collected from the oviducts of ICR female mice (4–8 weeks) that were superovulated by i.p. injection of 5 IU equine chorionic gonadotropin (eCG; Nippon Zenyaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) followed by 5 IU human chorionic gonadotropin (hCG; Asuka Pharmaceutical Co., Tokyo, Japan) 48 h later. Fourteen hours after the hCG injection, the females were killed and their oviductal ampullae were removed. The oviductal ampullae were placed in oil and cumulus-oocyte complexes (COCs) were collected from the oviductal ampullae. COCs were transferred in paraffin-oil-covered 100 μ l drops of TYH medium [35] equilibrated at 37°C under 5% CO₂ in air.

In this study, cryopreserved sperm was used for *in vitro* fertilization. The sperm was collected from cauda epididymides of BDF1 male mice (10–15 weeks). After dissections, the epididymides were removed and placed in a 35-mm sterile plastic dish containing 400 μ l R18S3 medium [34]. The epididymal sperm was counted by a hemacytometer, and sperm motility and viability were evaluated according to a previous report [28]. Namely, sperm motility was assessed visually and determined by direct observation at 37°C under light microscopy at 100 x. For cryopreservation, sperm was loaded into 0.25 ml plastic straws (Fujihira Industry, Tokyo, Japan). The straws were exposed to liquid nitrogen (LN₂) vapor for 10 min (about –150°C) and then plunged into LN₂ and stored for at least 1 week. For thawing, the straws were plunged in water at 37°C for 10 sec and the contents were then expelled into a 35-mm sterile plastic dish. Post-thaw sperm motility was evaluated as described above. The frozen-thawed sperm was resuspended in TYH medium for 1 h. The frozen-thawed sperm was then added to the TYH drops containing COCs (final sperm concentration was 2×10^6 sperm/ml) and co-cultured for 6 h. After culture, COCs were transferred into a 100 μ l drop of KSOMaa [8] supplemented with 0.1% hyaluronidase, and cumulus cells were removed by

being drawn up repeatedly into a fine pipette. The denuded oocytes were washed three times in KSOMaa and then evaluated using an inverted phase-contrast microscope (Olympus, Yokohama, Japan). Oocytes having two pronuclei were determined to be fertilized. Only fertilized oocytes were transferred into 50 μ l of the same medium and cultured at 37°C under 5% CO₂ in air. The embryos were collected at the PN stage (0 h from the end of co-culture), 2-cell stage (24 h), 4-cell stage (47 h), morular stage (72 h) or blastocyst stage (96 h) and used for the following experiments.

Vitrification of mouse embryos by Cryotop

The Cryotop method was carried out according to a report by Kuwayama and Kato [14] with some modifications. In brief, five embryos were placed in a small volume (5 ml) of equilibrium solution composed of 7.5% ethylene glycol (EG) + 7.5% dimethylsulfoxide (DMSO) + 20% FCS in PB1 for 3 min at 20–22°C. The embryos were then transferred into a small volume (5 ml) of vitrification solution composed of 15% EG + 15% DMSO + 0.5 M sucrose + 20% FCS in PB1 for 1 min. The embryos were placed on a sheet of Cryotop (Kitazato BioPharma, Shizuoka, Japan) in a small volume of vitrification solution. The Cryotop was plunged into liquid nitrogen when the embryos were exposed to the vitrification solution for 1 min and stored for at least 1 week. The embryos were warmed by immersing the Cryotop into warming solution composed of 0.5 M sucrose + 20% FCS in PB1 at 37°C for 3 min, and then placed with 20% FCS in PB1 at 37°C for 5 min. After washing three times with KSOMaa, these embryos were cultured in paraffin-oil-covered 100 μ l drop of KSOMaa. After culture, development to the blastocyst stage and their hatching were evaluated. Re-vitrification was carried out as follows: in our preliminary study, vitrified-warmed embryos cultured for 2 h before re-vitrification showed a higher survival rate than embryos cultured less than 2 h. Therefore, the vitrified-warmed embryos were cultured for 2 h and then re-vitrified [second-time vitrification (2V)]. Some of the vitrified-warmed embryos were cultured for 2 h and then vitrified a third time (3V). After warming, the ability of embryonic development was evaluated as described above.

Statistical Analyses

Each experiment had at least three replicates. All

Re-vitrification of mouse embryos

Table 1. The effect of repetitive vitrification on the development of 2-cell mouse embryos

Vitrification times	No. examined	Development to blastocysts (%) ^a
1V	114	99 (86.8)
2V	114	92 (80.7)
3V	117	99 (84.6)

^aPercentage of survived embryos

Table 2. The effect of repetitive vitrification on the development of 4-cell mouse embryos

Vitrification times	No. examined	Development to blastocysts (%) ^a	Hatched blastocysts (%) ^a
1V	106	99 (93.4)	96 (97.0)
2V	114	104 (91.2)	98 (94.2)
3V	101	90 (89.1)	82 (91.1)

^aPercentage of survived embryos

Table 3. The effect of repetitive vitrification on the development of mouse morulae

Vitrification times	No. examined	Development to blastocysts (%) ^a
1V	123	116 (94.3)
2V	124	114 (91.9)
3V	170	60 (85.7)

^aPercentage of survived embryos

Table 4. The effect of repetitive vitrification on hatching of mouse blastocysts

Vitrification times	No. examined	Hatched blastocysts (%) ^a
1V	80	74 (92.5)
2V	80	71 (88.8)
3V	70	61 (98.1)

^aPercentage of survived embryos

percentage data were subjected to arcsine transformation before statistical analysis. Data for *in vitro* development of vitrified/warmed embryos were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test. The numbers of offspring were compared using Student's *t* test. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

In Tables 1-4, the numbers of repeated vitrifications are shown as 1V, 2V, and 3V. Regardless of the rounds of repeated vitrification, the percentages of vitrified-warmed embryos at the 2-cell stage were 86.8% (1V), 80.7% (2V), and 84.6% (3V), respectively (Table 1). There were no significant differences among the treatments. The effect of repetitive vitrification on embryonic development of 4-cell mouse embryos is shown in Table 2. In the 1V, 2V, and 3V groups, most of the vitrified embryos developed to the blastocyst stage (93.4%, 91.2%, and 89.1%, respectively). Most of the blastocysts were hatched [97.0% (1V), 94.2% (2V), and 91.1% (3V)]. There were no significant differences

among the treatments in the percentages of embryos that developed to blastocysts and hatched blastocysts. Table 3 shows the effect of repetitive vitrification on embryonic development of mouse morulae. Most of the morulae developed to blastocysts [94.3% (1V), 91.9% (2V), and 85.7% (3V)]. There were no significant differences among treatment groups. The effect of repetitive vitrification on blastocyst development is shown in Table 4. The percentages of hatched blastocysts were 92.5% (1V), 88.8% (2V), and 98.1% (3V). There were no significant differences among the treatments.

DISCUSSION

In our present study, there were no significant differences among the treatment groups for repetitive vitrification at any embryonic stages. Although no studies have determined the effect of multiple rounds of vitrification using Cryotop, one paper showed Cryoloop (another vitrification device) facilitated re-vitrification of embryos at successive stages of development (the pronuclear stage, the 2-cell stage, the 8-cell stage, and

the blastocyst stages) [30]. However, they reported better hatching rates in the non-vitrified group than in the vitrified group [30]. In the present study, we did not compare hatching rates between the non-vitrified group and vitrified or re-vitrified groups, but most of the vitrified and re-vitrified embryos were hatched (88.8%–98.1% in Table 4). Therefore, Cryotop can be applicable for vitrification including repetitive vitrification of mouse embryos. Indeed, Hochi *et al.* [9] compared three vitrification methods (a gel-loading tip, Cryoloop, and Cryotop) for the vitrification of rabbit pronuclear embryos. Cryotop yielded higher post-warming survival of rabbit embryos than either the gel-loading tip or Cryoloop. They concluded that one of the reasons for the difference might be the total concentration of cryoprotective agents (CPAs) in vitrification solution. Indeed, the CPA concentration of the Cryotop method [30% (v/v)] was lower than those of the gel-loading tip and Cryoloop methods [40% (v/v)] in the study. Since a low concentration of CPAs is involved in reducing cytotoxic effects, Cryotop seems to be a more suitable device for re-vitrification of mouse embryos.

Another possible reason for the high developmental ability of re-vitrified mouse embryos by Cryotop is the total volume of vitrification solution during the vitrification. The Cryotop method is probably the latest minimum-volume vitrification approach [17]. Cryotop consists of a narrow, thin film strip (0.4 mm wide, 20 mm long, 0.1 mm thick) attached to a hard plastic holder [17]. In the Cryotop method, CPAs are loaded with a narrow glass capillary onto the top of the film strip in a volume of less than 0.1 μ l. After loading, almost all of the solution is removed, leaving only a thin layer covering the embryos [17]. The minimal volume approach of the Cryotop method increases the cooling and especially the warming rates, which may contribute to maintain the high developmental ability of re-vitrified embryos after warming.

Taken together, the results show that re-vitrification by Cryotop did not have a detrimental effect on the development of mouse embryos. Our present results will be useful in the development of assisted reproductive technologies in humans.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the member of the Laboratory of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine,

Azabu University. This work was supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research from JSPS (KAKENHI, 21789253 to J.I and 22658085 to N.K.). This work was also supported in part by the Promotion and Mutual Aid Corporation for Private Schools of Japan, Grant-in-Aid for Matching Fund Subsidy for Private Universities to J.I. and N.K.

REFERENCES

1. Abe Y, Hara K, Matsumoto H, Kobayashi J, Sasada H, Ekwall H, Rodriguez-Martinez H, Sato E. Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol. Reprod.* 2005; 72: 1416–1420.
2. Bogliolo L, Ariu F, Rosati I, Zedda MT, Pau S, Naitana S, Leoni G, Kuwayama M, Ledda S. Vitrification of immature and *in vitro*-matured horse oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* 2005; 18: 149–150.
3. Chian RC, Kuwayama M, Tan L, Tan J, Kato O, Nagai T. High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *J. Reprod. Dev.* 2004; 50: 685–696.
4. Dinnyés A, Dai Y, Jiang S, Yang X. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 2000; 63: 513–518.
5. Fujihira T, Nagai H, Fukui Y. Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of taxol treatment for vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Cryobiology.* 2005; 51: 339–343.
6. Fujino Y, Kojima T, Nakamura Y, Kobayashi H, Kikuchi K, Funahashi H. Metal mesh vitrification (MMV) method for cryopreservation of porcine embryos. *Theriogenology.* 2008; 70: 809–817.
7. Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M, Kinutani K. Case report: successful pregnancy after vitrification of a human blastocyst that had completely escaped from the zona pellucida on day 6. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 988–990.
8. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig JJ, Schultz RM. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol. Reprod. Dev.* 1995; 41: 232–238.
9. Hochi S, Terao T, Kamei M, Kato M, Hirabayashi M, Hirao M. Successful vitrification of pronuclear-stage rabbit zygotes by minimum volume cooling procedure. *Theriogenology.* 2004; 61: 267–275.
10. Hunter JE. Cryopreservation of mammalian embryos. Slow cooling. *Methods Mol. Biol.* 1995; 38: 199–209.
11. Iwayama H, Hochi S, Kato M, Hirabayashi M, Kuwayama M, Ishikawa H, Ohsumi S, Fukui Y. Effects of cryodevice type and donors' sexual maturity on vitrification of minke whale (*Balaenoptera bonaerensis*) oocytes at germinal vesicle stage. *Zygote.* 2004; 12: 333–338.
12. Kelly J, Kleemann D, Kuwayama M, Walker S. Pregnancy rates for *in vitro* and *in vivo* produced ovine embryos vitrified using the minimum volume cooling cryotop method. *Reprod. Fertil. Dev.* 2005; 17: 194–194.
13. Kuleshova LL, Lopata A. Vitrification can be more favorable than slow cooling. *Fertil. Steril.* 2002; 78: 449–

- 454.
14. **Kuwayama M, Kato O.** All round vitrification of human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2000; 17: 477.
 15. **Kuwayama M, Leibo SP.** Efficiency of the cryotop method to cryopreserve human oocytes; analysis of *in vitro* and *in vivo* results at eleven IVF clinics. *Fertil. Steril.* 2008; 90: 281–282.
 16. **Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo SP.** Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online.* 2005; 11: 300–308.
 17. **Kuwayama M.** Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology.* 2007; 67: 73–80.
 18. **Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK.** Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.* 1999; 72: 1073–1078.
 19. **Leibo SP, Songsasen N.** Cryopreservation of gametes and embryos of non-domestic species. *Theriogenology.* 2002; 57: 303–326.
 20. **Leibo SP.** Cryopreservation of oocytes and embryos: optimization by theoretical versus empirical analysis. *Theriogenology.* 2008; 69: 37–47.
 21. **Ling XF, Zhang JQ, Cao SR, Chen J, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ, Wang X.** Effect of cryotop vitrification on preimplantation developmental competence of murine morula and blastocyst stage embryos. *Reprod. Biomed. Online.* 2009; 19: 708–713.
 22. **Liu Y, Du Y, Lin L, Li J, Kragh PM, Kuwayama M, Bolund L, Yang H, Vajta G.** Comparison of efficiency of open pulled straw (OPS) and Cryotop vitrification for cryopreservation of *in vitro* matured pig oocytes. *Cryo. Letters.* 2008; 29: 315–320.
 23. **Martino A, Songsasen N, Leibo SP.** Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.* 1996; 54: 1059–1069.
 24. **Muenthaisong S, Laowtammathron C, Ketudat-Cairns M, Parnpai R, Hochi S.** Quality analysis of buffalo blastocysts derived from oocytes vitrified before or after enucleation and reconstructed with somatic cell nuclei. *Theriogenology.* 2007; 67: 893–900.
 25. **Nakagata N.** Studies on cryopreservation of embryos and gametes in mice. *Exp. Anim.* 1995; 44: 1–8.
 26. **Papis K, Shimizu M, Izaike Y.** Factors affecting the survivability of bovine oocytes vitrified in droplets. *Theriogenology.* 2000; 54: 651–658.
 27. **Rall WF, Fahy GM.** Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature.* 1985; 313: 573–575.
 28. **Seita Y, Okuda Y, Kato M, Kawakami Y, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N.** Successful cryopreservation of rat pronuclear-stage embryos by rapid cooling. *Cryobiology.* 2009; 59: 226–228.
 29. **Shaw JM, Kasai M.** Embryo cryopreservation for transgenic mouse lines. *Methods Mol. Biol.* 2001; 158: 397–419.
 30. **Sheehan CB, Lane M, Gardner DK.** The CryoLoop facilitates re-vitrification of embryos at four successive stages of development without impairing embryo growth. *Hum. Reprod.* 2006; 21: 2978–2984.
 31. **Somfai T, Ozawa M, Noguchi J, Kaneko H, Nakai M, Maedomari N, Ito J, Kashiwazaki N, Nagai T, Kikuchi K.** Live piglets derived from *in vitro*-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. *Biol. Reprod.* 2009; 80: 42–49.
 32. **Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R, Kato O.** Vitrification demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod. Biomed. Online.* 2005; 11: 53–57.
 33. **Succu S, Leoni GG, Berlinguer F, Madeddu M, Bebbere D, Mossa F, Bogliolo L, Ledda S, Naitana S.** Effect of vitrification solutions and cooling upon *in vitro* matured prepubertal ovine oocytes. *Theriogenology.* 2007; 68: 107–114.
 34. **Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S.** Cryopreservation of mouse spermatozoa. *Jikken Dobutsu.* 1991; 40: 493–467.
 35. **Toyoda Y, Yokoyama M, Hosi T.** Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. *Jpn. J. Anim. Reprod.* 1972; 16: 147–151.
 36. **Tsujioka T, Otdorff C, Braun J, Hochi S.** Effect of post-IVF developmental kinetics on *in vitro* survival of vitrified-warmed domestic cat blastocysts. *Reprod. Domest. Anim.* 2008; 43: 323–327.
 37. **Vajta G, Holm P, Greve T, Callesen H.** Vitrification of porcine embryos using the Open Pulled Straw (OPS) method. *Acta. Vet. Scand.* 1997; 38: 349–352.
 38. **Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P.** Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. *Science.* 1972; 178: 411–414.
 39. **Willadsen SM.** Factors affecting the survival of sheep embryos during-freezing and thawing. *Ciba. found Symp.* 1977; 52: 175–201.
 40. **Zhang J, Cui J, Ling X, Li X, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ.** Vitrification of mouse embryos at 2-cell, 4-cell and 8-cell stages by cryotop method. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2009; 26: 621–628.



**Journal of
REPRODUCTION
ENGINEERING**



Journal of REPRODUCTION ENGINEERING 生殖工学会誌

2010年12月発行

発行者：日本生殖工学会 (SRE)

代表：柏崎 直巳

発行所：日本生殖工学会 (SRE)

〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71

麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

TEL: 042-769-2339 FAX: 042-769-1762

J R E