

## 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<sup>1,†</sup>, 阿部 宏之<sup>2</sup>, 有馬 隆博<sup>3</sup>

Hiroaki YOSHIDA<sup>1,†</sup>, Hiroyuki ABE<sup>2</sup> and Takahiro ARIMA<sup>3</sup>

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>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

<sup>3</sup>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

<sup>†</sup>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  $10.4 \pm 5.3$ , whereas maturation and fertilization rates (mean  $\pm$  SD) were  $54.7 \pm 18.7$  and  $85.8 \pm 15.4$ , 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 <sub>2</sub> (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.

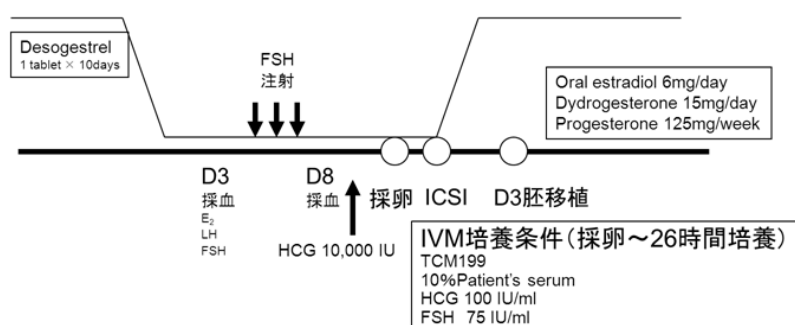


図1. 当院のIVM-IVF-ET プロトコール

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。

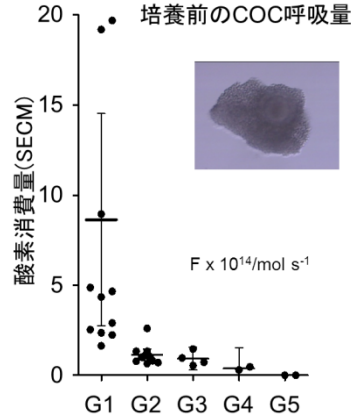
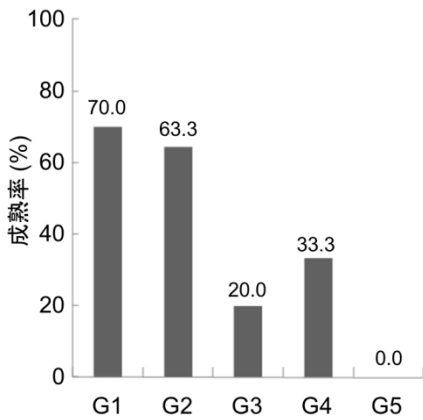


図2. ヒト未成熟卵の成熟率と酸素消費量

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。

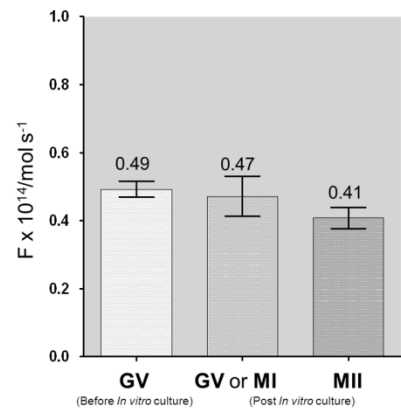


図3. ヒト未成熟卵の酸素消費量

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。

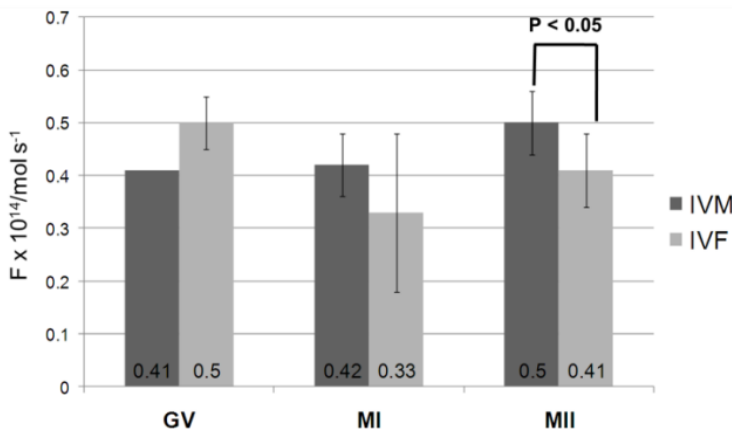


図4. 成熟過程卵の酸素消費量

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  $\pm$  SD)はGrade 1で $12.3 \pm 7.4$ 、Grade 2

で $3.6 \pm 1.4$ 、Grade 3で $0.25 \pm 0.11$ 、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

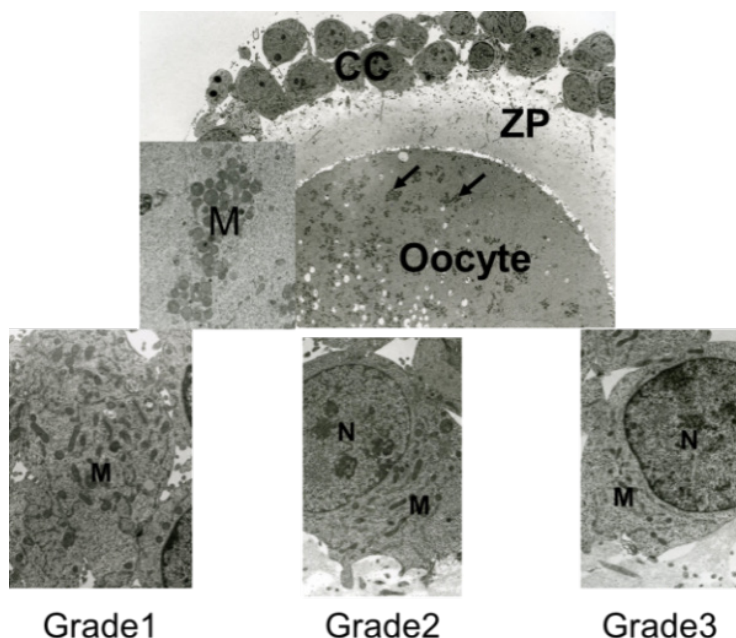


図5. ヒト卵子-卵丘細胞複合体の微細構造  
 上段はGrade 1の電顕像で卵細胞質内に矢印で示した様にミトコンドリアが観察され、数も豊富で円形の丸い像が観察される。CC: 卵丘細胞、ZP: 透明帯。下段はgrade別の卵丘細胞の微細構造で、Grade 1はミトコンドリアの発達が著明で数も豊富でcristae形成も一部散見される。gradeが下がるに従ってミトコンドリアの数も減少し、疎になり、ミトコンドリアの形状も縮小傾向を示した。この結果卵丘細胞の豊富な卵子ほどミトコンドリアの発達が著明であった。

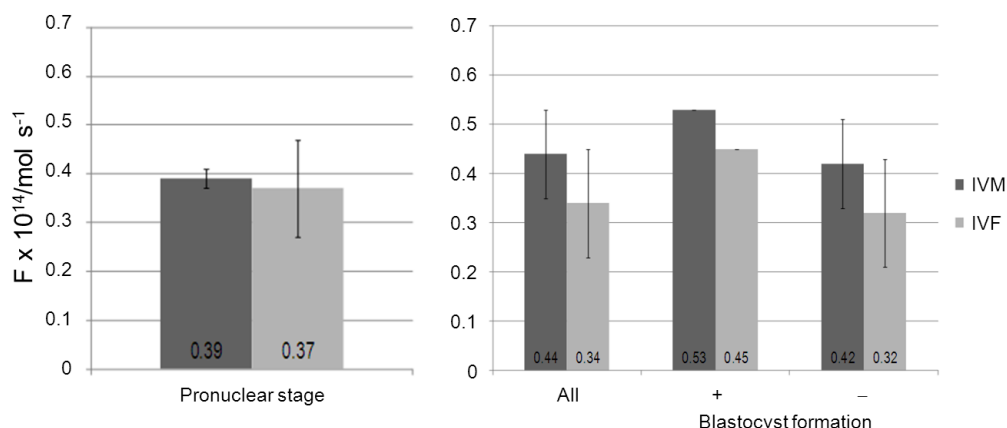


図6. 受精卵(前核期・Day 3)の酸素消費量の比較

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  $0.34 \pm 0.1$ ,  $0.37 \pm 0.1$ ,  $0.4 \pm 0.2$ ,  $0.50 \pm 0.2 F \times 10^{14} / \text{mol S}^{-1}$ 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

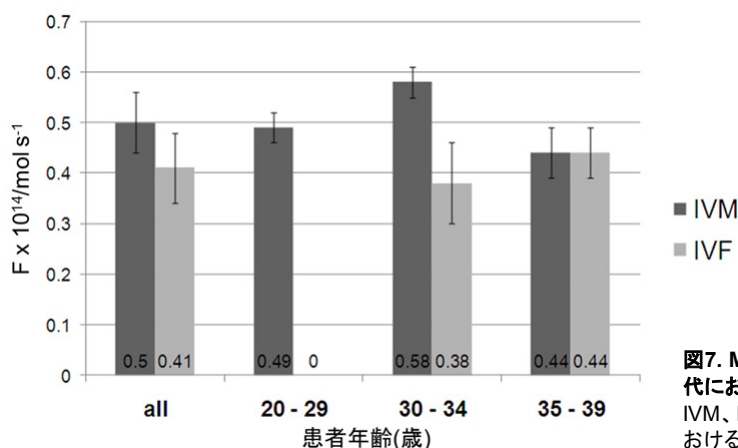


図7. MII (metaphase-II)期卵子の各年代における酸素消費量の比較  
IVM、IVF両者のMII期卵子の各年代における酸素消費量に有意差を認めなか

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)	-	-	-	-	-	-	-

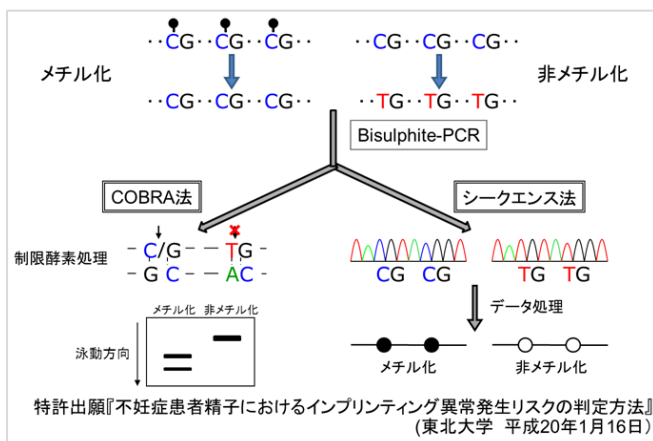
して同様の結果を得ている。即ちヒト受精卵において卵の質は個々の個体差が大きい、その後の胚発生に最適な酸素消費量の範囲がある事が判明した。また、初期分割胚、桑実胚、胚盤胞と酸素呼吸量は次第に上昇し、胚盤胞で最も上昇していた。これらの結果はウシやブタなどの他の動物種と同様な結果 [4]。更に形態学的評価と呼吸量を組み合わせると妊娠率が上昇することが示されている[23]。

### 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。

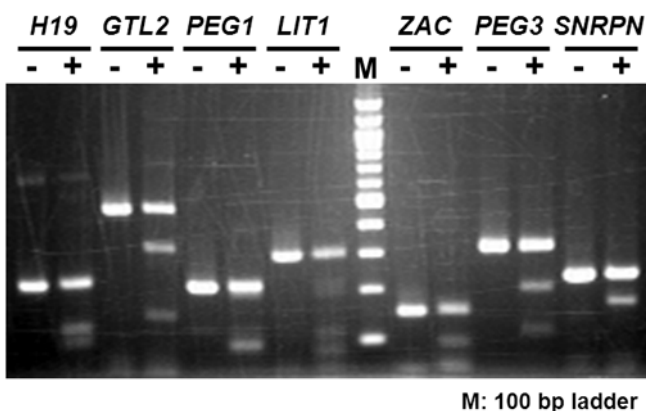
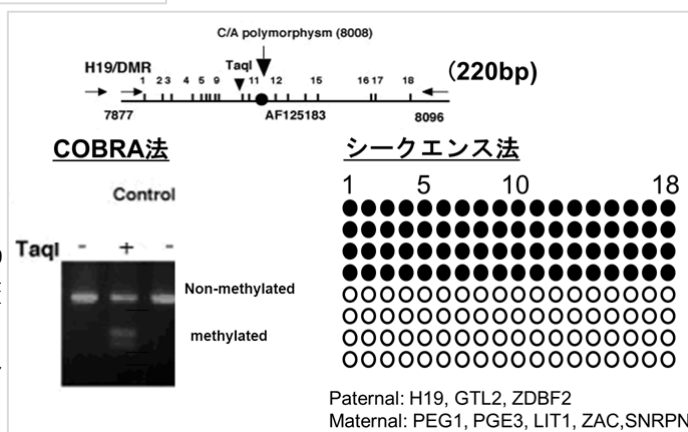
当院でIVMにより妊娠した症例の成熟率、受精率、新鮮移植、移植胚数、胚盤胞移植或いは分割期胚移植かを検討した結果を表2に示す。平均成熟率54.3%、受精率85.8%、妊娠した症例は全て2個胚移植であった。表3は出生した児の分娩形態、出生体重、身長、apgarscore等身体的、精神的異常の検討を出生後も含





**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acombined 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、特定の遺伝子に関して、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「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.

