

2010 年
第 12 回シンポジウム
講演要旨集

*Proceedings of the 12th (2010) Annual Symposium of
Japanese Society of Reproduction Engineering*

卵・胚のクオリティ

2010 年 3 月 21 日

明治大学駿河台キャンパス

リバテチータワー (11 階) 1163 教室

東京都千代田区神田駿河台 1-1

SRE 日本生殖工学会

第 12 回シンポジウム要旨集目次

13:00	開会の挨拶	会長
	セッション I	
		座長 石塚 文平 先生(聖マリアンナ医科大学)
13:00-13:30		DHEA 内服前後の採卵に対する影響……3 頁 大塩 達弥(東京ベイレディースクリニック・日本大)
13:30-14:00		IVM 卵のクオリティー評価と IVM 児の Epigenetics の検討……5 頁 吉田 仁秋(吉田レディースクリニック)
14:00-14:30		哺乳類未受精卵および初期胚の超低温保存に影響を及ぼす諸要因……7 頁 伊藤 潤哉(麻布大)
		……………休憩……………
	セッション II	
		座長 鈴木 秋悦(東京生殖バイオロジー東京シンポジウム)
15:00-15:30		マウス体内におけるブタ卵胞の発育と卵の発生能……8 頁 金子 浩之(農業生物資源研)
15:30-16:00		胚盤胞の品質評価……………16 頁 乾 裕昭(乾マタニティクリニック)
16:00-16:30		新しい胚評価法に基づく最適な胚移植時期……………18 頁 古井 憲司(クリニックママ)
16:30-17:00	総合討論	
	総合座長	石塚 文平 鈴木 秋悦
17: 00		閉会の挨拶……………後藤 正幸(明治大学農学部)
	学術交流会	リバティタワー 23F サロン燦(さん)

加齢性女性生殖機能低下に対する DHEA 併用 ART

大塩 達弥

Tokyo Bay Ladies Clinic、日本大学医学部産婦人科

加齢にともない女性生殖機能、特に卵巣機能が低下する。過排卵誘発を行ってもゴナドトロピン感受性低下による成熟卵胞数の減少、得られた卵の質的低下など広範な現象が起こる。本講演では、我々が試みている卵巣機能評価、卵巣機能低下症例に対する誘発の試みを紹介する。

1. FSH 高値であり、排卵誘発に抵抗性を示す症例に対する DHEA 併用療法

血清 FSH 10 mIU/ml 以上、E2 25 pg/ml 未満の症例は hMG 製剤に抵抗性であり、子宮内膜非薄化、卵胞数減少、および最大卵胞径の増加遅延を認める場合が多い。これらの症例では、血清総 T も 20 ng/ml 以下に低下している場合が多い。われわれは hMG 抵抗性症例に性ステロイド前駆体である dehydro-epiandrosterone (DHEA) を併用投与し、卵胞発育に及ぼす影響を観察した。

高 FSH、低 E2、低 T 値を認める症例に DHEA を併用投与すると、hMG 反応性が改善されて最大卵胞径、子宮内膜厚、E2 値の改善、FSH の低値化、T 値の改善を認めた。その結果、17 症例に妊娠が成立した。DHEA 補充療法が hMG 感受性を改善し、卵胞発育ひいては卵の質向上に關与する可能性が示唆された。

2. hCG 組織移行率を指標とした卵巣機能の評価

これまで卵胞成熟はゴナドトロピン、ステロイド等の血中濃度を指標として評価されてきた。ゴナドトロピンは卵巣血流による組織移行を介して卵胞成熟に深く関与し、hCG 投与により顕著に卵巣血流が増加することが報告されている。hCG は採卵決定後に一定量を one shot 静注し、一定時間後に採卵が行われる。本研究は外因性 hCG 組織移行の薬動学的解析が、卵巣機能評価に有用であるかを検討した。投与直後、採卵時の血中および卵胞液中の hCG 濃度は常法に従い測定した。体重の 1/13 を患者血液量と仮定し、採卵時の卵胞液中/血中 hCG 濃度 X100 を組織移行率と定義し、解析を行った。hCG 卵胞液内移行率は加齢にともない有意に低下し、同時に採卵数も減少した。一方、取得した卵の受精率、分割率に年齢は影響しなかった。

3. 抗ミューラー管ホルモン (AMH) を指標とした卵巣予備能の評価

抗ミューラー管ホルモン (AMH) は発育卵胞、前胞状卵胞から分泌され、その血中濃度は発育卵胞数と相関すると考えられている。加齢に従い卵巣機能が低下すると FSH は上昇し、発育卵胞数が減少すると AMH は低下する。AMH は、性周期の影響を受けにくいいため、卵巣予備能の指標となると考えられている。

過排卵誘発を実施し、AMH が測定し得た 76 例 (27 - 49 歳) を年齢別に 4 群に分類し、血中

AMH を測定した。AMH 値は 35 歳未満では 23.0 ± 17.5 pmol/L であったが、年齢とともに減少し、41 歳以上では 7.2 ± 5.3 pmol/L へと顕著に減少し、加齢変化を確認できた。ART 施行例を AMH 値 20 以上、10-20、0-10 pmol/L の 3 群に分類すると、0-10 ng/ml 群の年齢は他の 2 群に比して有意に高かった。採卵率は 10 pmol/L 未満の群において、有意に低かった。また採卵数は 20 pmol/L 未満の 2 群は 20 pmol/L 以上の群に比して有意に低下した。一方、比較した 3 群間で AMH 値は得られた卵の受精率、分割率等に影響しなかった。AMH 値は、DHEA 投与前後で変化しなかった。

卵巣機能の多面的な評価および適切な卵巣機能賦活を行うことにより、加齢かつ POF 症例においても妊娠が可能であることが示された。

4. 非分割卵性状の後方視的観察

媒精による受精 (conventional-IVF) を試みたが非分割に終わった症例のうち、廃棄胚の観察に同意が得られた 38 症例 (年齢 25 - 44 歳) から提供された 134 卵を対象とした。媒精後 2 - 3 日後の非分割卵は 2%パラホルムアルデヒド固定し、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫染色し、PI を用いて核染色した。観察には共焦点レーザー顕微鏡を用い、核、紡錘体確認画面を撮影し、以下に示した基準に従って解析を行った。

まず卵側は紡錘体系異常と核系異常の 2 群に大別した後、さらに以下に挙げた項目に細分類した。1. 紡錘体形態異常 (染色体は整列しているが、紡錘系に乱れがある)、2. 染色体不整列 (紡錘系は樽の先端をすばめたきれいな形状をしているが、染色体が整列していない)、3. 多極紡錘体 (樽の先端の部分に位置する紡錘体極は通常 2ヶ所であるが、3ヶ所存在するもの、この場合は染色体も不整列)、4. 核断片化 (紡錘系は観察されず、DNA も染色体の形状を採らず、卵全体に散ってバラバラである)、5. 染色体凝集 (紡錘系は観察されず染色体が一ヶ所に凝集している)、6. 前核停止 (DNA が前核様で停止しており、実体顕微鏡下では前核が観察されない)、7. Premature Chromosome Condensation (PCC)(卵由来の紡錘体の他に、精子由来の紡錘体様核が観察される)。精子側は卵への精子の進入の有無について観察した。

女性側の年齢分布を 35 歳未満、35 - 37 歳、38 歳以上の 3 群に分けて比較した。まず卵内への精子進入を観察すると全ての群で非分割卵の 80%以上が精子不侵入で占められ、これが卵非分割の最大原因であることが示唆された。さらにその率は加齢とともに増加する傾向を認めた。

受精前の卵は第 2 減数分裂中期で停止しているが、観察した非分割卵には様々な異常が認められ、紡錘体形態異常と染色体不整列の両者を組み合わせたものが最も高頻度であった。35 歳以上の群で紡錘体系異常の発生率が増加したが、核系異常の頻度は年齢による変化は少ない傾向を認めた。

IVM 卵のクオリティー評価と IVM 児の Epigenetics の検討

吉田 仁秋

吉田レディースクリニック 生殖医療 IVF センター

IVF が初めて成功し約 30 年が経過し、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 IVM は 1991 年 Cha¹⁾らの臨床応用に始まり、1994 年 Trounson²⁾らが多嚢胞性卵巣 (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 (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と言われている。³⁾更に IVM による妊娠率は 4~38%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今だ不十分である。今回我々は IVM 卵のクオリティーに着目し、その呼吸活性やミトコンドリア機能、IVM 卵の遺伝子解析等を検討し、卵成熟に関する因子についてマウス IVM 卵のミトコンドリア機能解析等の基礎的検討を加え検討した。更に当院で出生した IVM 児の予後やエピジェネティックな検索について報告する。

山形大阿部らのグループは走査型電気化学顕微鏡 (Scanning Electrochemical Microscopy; SECM) を開発し、単一細胞や微小組織内のミトコンドリア呼吸量 (酸素消費量) を非侵襲的に検出・評価し、既に動物分野で応用されている。⁴⁾今回我々はこの技術をヒト未成熟卵、卵丘細胞及び受精卵の評価に応用し検討した。⁵⁾

PCO 症例は IVM 周期で回収したヒト未成熟卵を形態学的に分類した。各分類別のミトコンドリア呼吸量を SECM を用いて評価すると顆粒膜の豊富な G1、G2 で酸素消費量が有意に上昇した。更に受精卵では、COH による卵子の酸素呼吸量と IVM 卵子の呼吸量に差を認めなかった。更に受精卵の酸素呼吸量も COH 胚と IVM 胚との両方で相違を認めなかった。年齢別による分類でもこれは同様であった。但し胚盤胞到達率は IVM 卵で低い傾向を認めた。更にある一定の呼吸量で胚盤胞到達率の上昇を認めた。続いて PCO 症例から採取した未成熟卵子を体外培養系に供し、各過程のミトコンドリアの形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察した結果 G1 及び G2 においてミトコンドリア数が豊富で形態も良好であった。

当院で IVM により妊娠出生した児の身体的、精神的異常の検討を行ったが、特に異常所見を認めなかった。更に COBRA 装置による 8 つの *Implinting gene* の解析でも epigenetic な異常所見を認めず、その結果を今回報告する。

卵細胞や受精卵のエネルギー産生や代謝はミトコンドリア機能と密接に関連し、ATP を産生し酸素消費を促す。更にミトコンドリアは主要な細胞内オルガネラであり、その後の胚発生に大きく関与している。そこで我々はマウス IVM 卵を用いミトコンドリア機能を解析し、細胞質成熟とミトコンドリア機能との関係を検討した。

マウス GV 期卵子を 2 種 (Waymouth と HTF) の異なる培地を用い成熟培養を行な

った。MII 期への成熟率は両培地とも高率であったが、その後の胚発生率が HTF 群で有意に低下した。次に IVM で得られた MII 期卵子を共焦点レーザー顕微鏡下でミトコンドリアの分布と成熟過程における経時的動態を検討した。ミトコンドリアの分布が培地により異なり HTF 群では細胞質内に数個のスポット状の凝集塊が観察された。この凝集塊は時間の経過と共に出現率と凝集塊数が上昇し、成熟培地に添加する血清やアルブミンの影響を受ける事が判明した。ミトコンドリア膜電位の機能評価では GV 卵子に比し体内成熟卵ではミトコンドリア膜電位が高く、ミトコンドリア機能に影響を及ぼす事が示唆された。ATP 産生量はコントロール及び Weymouth 群で上昇を認め、更にマイクロアレイによる遺伝子解析において電子伝達系の遺伝子 Ucp3 に IVM 群で *in vivo* mature 群と比較し減少を認めた。

以上の結果により、卵細胞質内ミトコンドリアの状態は体外成熟培養条件により異なり、ミトコンドリア機能や細胞質因子が影響を受ける事が判明した。核成熟と細胞質成熟を同期させ、更にミトコンドリア機能を改善させるより有効な IVM 培養液の開発が必要とされ、今後研究を重ね更に検討を要すると考えられた。

参考

- 1) Maturation in vitro of immature human oocytes for clinic use. K.Y. Cha and R.C. Chian, Hum. Reprod, Update, 4, p103, 1998.
- 2) In vitro maturation and the fertilization and development competence of oocytes recovered from untreated polycystic ovarian patients. A.O. Trounson, C. Wood. and Aa. Kausche, Fertil. & Steril. 62, p353, 1994.
- 3) Propective randomized study of human chorionic gonadotrophin priming before immature oocyte retrieval from unstimulated women with polycystic ovarian syndrome. R.C.Chian and S.L. Tan McGill Reproductive Center, dept. of OB/GYN, McGill Univ. Montreal, Canada, Human Reprod, vol5, pp165, 2000.
- 4) A Non-invasive and Sensitive Method for Measureing Cellur Respration with a Scanning Electrochemical Microscopy to Evaluate Embryo Quality. Hiroyuki Abe. Tohoku University Biomedical Research Organization(TUBERO), Sendai, Japan, J. Mamma. Ova Res, Vol24, pp70, 2007.
- 5) Morphological Evaluation and Measurement of the Respiration Activity of Cumulus-oocyte complexes to Assess oocyte Quality. H, Murakawa H. Yoshida et al, Reproductive Research Center Yoshida Ladies Clinic Sendai Japan, J. Mamm. Ova Res, Vol26, pp32, 2009.

超低温保存時の要因が哺乳類未受精卵・初期胚に及ぼす影響

伊藤 潤哉

麻布大学 獣医学部

麻布大学大学院 獣医学研究科

哺乳類の生殖細胞 (精子・卵子・胚)を長期間保存することが可能となれば、実験動物・家畜における遺伝資源を効率的保存やヒト高度生殖補助医療に大きく貢献できる。現在までに、様々な動物種において液体窒素下で生殖細胞を保存する方法(超低温保存法)が開発されてきた。その結果、精子は Polge [1]がグリセリンを、胚は Whittingham [2]が dimethyl sulfoxide (DMSO)をそれぞれ凍害保護物質として用い、凍結保存に成功した。現在、凍結精子はウシの生産、凍結胚は遺伝資源のバンキングの根幹を成す技術として用いられている。一方、卵子の凍結保存は Whittingham [3]が、マウスを用いて初めて成功したが、凍結融解後の生存性・発生率が低く、凡用的な技術となっていない。未受精卵の状態での凍結保存することが実用可能となれば、融解後、雄性配偶子(精子)の遺伝的バックグラウンドを選択することが可能であり、胚の凍結保存以上に有用な技術となりうる。さらにヒトでは、悪性腫瘍を患った未婚の女性が、放射線治療前に未受精卵を採取して凍結保存し、治療終了後に保存した卵子から体外受精・胚移植を介して妊娠・出産を可能にする。このように卵子の凍結保存は、多方面で強く望まれている技術であるにもかかわらず、難しい技術であり、特に体外受精を介して受精卵を作出することは困難である。その主な原因として未受精卵は、胚と比較して低温に対する感受性が高く、さらに凍害保護物質の添加により卵細胞質内で自然にカルシウムイオンが放出され、表層顆粒の放出や減数分裂の自発的再開といった、その後の受精を阻む現象が起きてしまうことがあげられる。現在までに我々のグループでは、カルシウム無添加の凍結保存液を用いることで、表層顆粒の放出や減数分裂の自発的再開を抑制し、凍結保存したマウス未受精卵の体外受精後の発生率を飛躍的に向上させることに成功した。また、同様のガラス化液を用い、マウスより難しいと考えられているラット未受精卵のガラス化保存も行っている [4]。本シンポジウムでは、マウスおよびラット未受精卵・胚の超低温保存に影響を与える因子として、最近の研究成果を紹介したい。

[引用文献]

[1] Polge C. Freezing capacity of bull spermatozoa after freezing at 79 degree C. **Nature** 1952; 169, 626-627.

[2] Whittingham DG. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. **Nature** 1971; 233: 125-126.

[3] Whittingham DG. Fertilization in vitro and development to term of unfertilized mouse oocytes previously stored at -196 degree C. **J. Reprod. Fertil.** 1977; 49: 89-94.

[4] Fujiwara K, Sano D, Seita Y, Inomata T, Ito J, Kashiwazaki N.

Ethylene glycol-supplemented calcium-free media improve zona penetration of vitrified rat oocytes by sperm cells. **J. Reprod. Dev.** 2010; 56:169-175.

マウス体内におけるブタ卵胞の発育と卵の発生能

金子 浩之

農業生物資源研究所 動物科学研究領域 生殖機構研究ユニット

1. はじめに

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大型の欧米の品種に集中し、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仔・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（異種間移植）は、Gosden ら（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（Oktay et al. 1998, Weissman et al. 1999, Kim et al. 2002）、ウシ（Senbon et al. 2005）、ブタ（Kaneko et al. 2003, 2006, Kagawa et al. 2005）および野生動物（Mattiske et al. 2002）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、遺伝的な距離が極めて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、移植卵巣由来の卵母細胞から産仔が得られたのみ（Snow et al. 2002）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。

今回の発表では、私たちのグループが実施してきた異種間移植を用いたブタの原始卵胞卵への発生能の付与について、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。

2. ブタ体内での卵胞発育と卵の発生能

1) 卵胞発育

生後 30 日までのブタ卵巢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) (Christenson et al. 1985, Kaneko et al. 2003)。胎児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 (0.5mm 以上) が出現し (Christenson et al. 1985)、生後 5 月齢前後 (初回排卵前) の卵巢には既に 0.5 から 6mm の胞状卵胞が多数存在している (Bagg et al. 2007)。卵胞の発育速度は、0.5mm の胞状卵胞が 3mm にまで発育するのに約 2 週間要するとされている (Morbeck et al. 1992)。

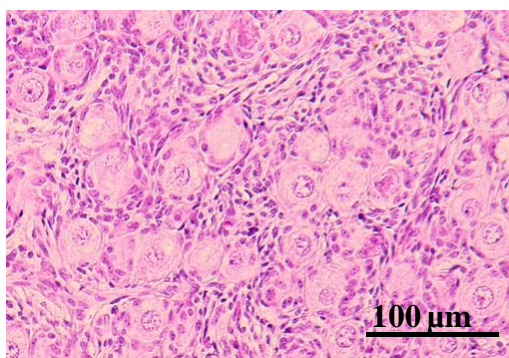


図 1 .生後 20 日齢のブタ卵巢の組織像。
多数の原始卵胞が見られる。

ブタの初回排卵は生後 6 から 7 ヶ月齢で起こり、その後 21 日間隔の発情周期を繰り返す。ブタの発情周期中において、卵胞発育の wave は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 2 a) (Noguchi et al. 2010)。黄体期末期から卵胞期にかけての wave は、当初直径 3 から 6mm の卵胞数の増加としてエコーカメラで認められる。その後 3 から 6mm の卵胞数の低下と 6mm 以上の卵胞数の増加が平行して起こり、発情開始後 LH サージによって 10 から 15 個の 6mm 以上の卵胞が排卵した。黄体期初期では 3 から 5mm の卵胞数の増加が観察される。

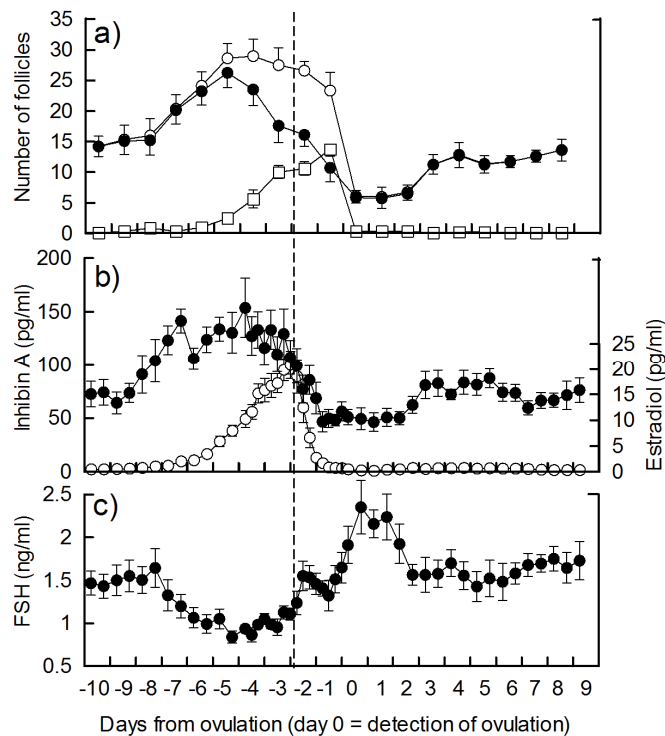


図2 . プタ発情周期中の卵胞発育と末梢血中各種ホルモン濃度 .

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 (●) . 点線は LH サー

いずれの wave においても、末梢血中のインヒビン濃度が卵胞数の増加に一致して上昇したこと (図 2 b)、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 2 c)、FSH とインヒビンの相互の関連によって wave の出現のタイミングが決定されると考えられる。一方、エストラジオール濃度は 6mm 以上の卵胞が出現する卵胞期のみにも上昇したこと、FSH 分泌の抑制因子としての役割よりも、発情と排卵を同期化する重要性が高いものと考えられる。

2) 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 0.4mm の preantral な卵胞は直径 80 μ m 前後の卵を含んでいるが、0.5 から 1.5mm の胞状卵胞では卵は 105 μ m、3.0 から 4.0mm の胞状卵胞では 115 μ m、5.0 から 6.0mm の胞状卵胞では 119 μ m に、それぞれ発育する (Hirao et al. 1995)。3.0 から 4.0mm の卵胞に含まれる卵 (直径 115 μ m) 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有しており、さらに 5.0 から 6.0mm の卵胞より採取した卵 (直径 119 μ m) はより高い体外成熟率を示したと報告されている。この結果から、ブタ卵は直径が 115 から 120 μ m で体外成熟能を獲得するものと考えられる (Motlik et al. 1984, Hirao et al. 1995)。また、直径 3 から 5mm の卵胞から採取した卵は、初期胚への発生能を持ち (Kikuchi et al. 2002, Bagg et al. 2007)、さらに成雌ブタの卵管に移植することによって産仔へ発生することが証明されている (Kikuchi et al. 2002)。

3. マウス体内でのブタ卵胞の発育と卵の発生能

1) ノードマウス体内での卵胞発育と卵の発生能

前項で述べたような生後 20 歳前後のブタ卵巢を細切して、卵巢を摘出したノードマウスの皮下に移植すると、約 60 日後に直径が 1mm 程度の胞状卵胞が少数出現し、マウスの膣が開口する。この時期の卵巢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 (Kaneko et al. 2003)。さらに 60 日間ブタ卵巢をマウス体内に留置しておく、移植組織内に 3mm を越える胞状卵胞はほとんど存在しなかったが、直径 1-2mm の卵胞が多数出現した。この結果は、ブタ胞状卵胞の発育は内因性のマウス 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ピンが増加すると、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。このような移植卵巢 (移植後 120 日) からの full size な卵の回収数は、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 (Kaneko et al. 2006)。しかしながら、マウス体内のブタ卵胞の発育状況はブタ体内のものに比較すると不十分であったことから、ブタ卵巢移植後 120 日のマウスに外生的に性腺刺激ホルモンを投与して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。

ブタ卵巢を移植したノードマウスに、膣開口後 60 日前後 (卵巢移植後 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。移植卵巢を、eCG 投与 2 日後 (eCG-2 群)、FSH ポンプ留置 7 日 (FSH-7 群) または 14 日後 (FSH-14 群) 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 日後に移植卵巢を採取した (FSH-14EA 群)。その結果、ホルモン処理群、特に FSH-14EA 群では胞状卵胞の発育が顕著であった (図 3)。この結果は、外生的なブタ FSH の投与によって、マウスの内因性の FSH 分泌が低下しているにもかかわらず、移植した卵胞の発育が維持されたものと解釈される。

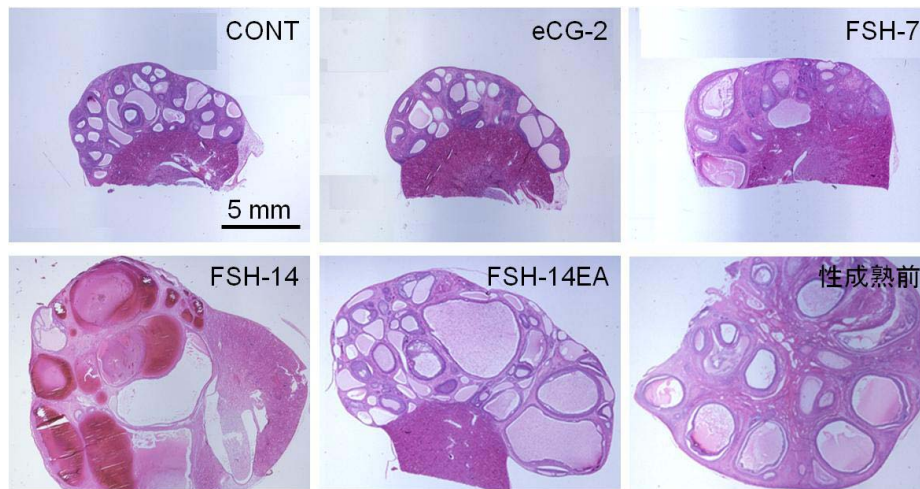


図3．種々のホルモン処理後の移植ブタ卵巣像．

性腺刺激ホルモン（eCG または FSH）はブタ卵巣移植後 120 日前後でヌードマウスに投与した。比較のため性成熟前のブタ体内で発育した卵巣像を示した。CONT；性腺刺激ホルモン無投与群（対照群） eCG-2；eCG 2 日間投与群、FSH-7；FSH 7 日間投与群、FSH-14；FSH14 日間投与群、および FSH-14EA 群；FSH14 日間投与 + 抗エストロジオール血清投与群。FSH-14 群では卵胞が血腫化している

full size に達した卵および体外成熟卵の数は、マウス 1 匹あたりに換算すると、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）。

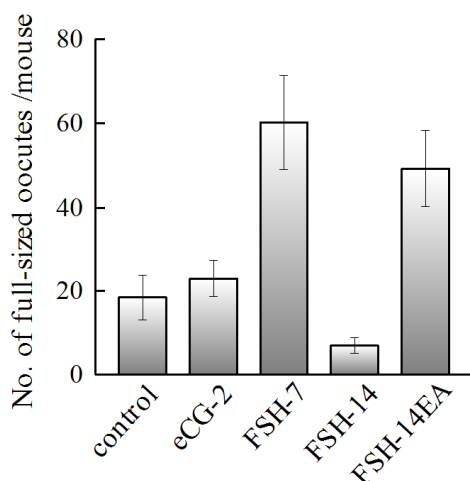


図4．種々のホルモン処理後にマウスから回収されたブタ卵

次いで直接 10 日前後の成熟卵を体外受精し 7 日間体外培養した結果、の成熟卵および

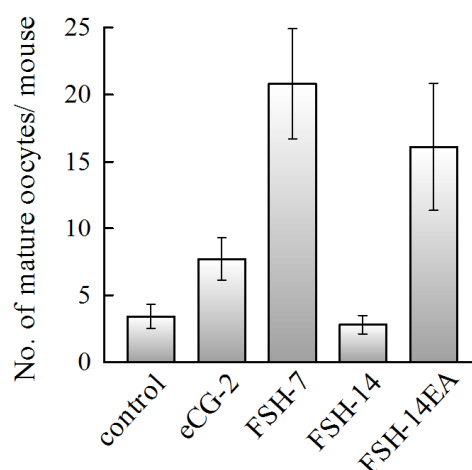


図5．種々のホルモン処理後にマウスから回収されたブタ卵

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 20-30) (図 6)。



図 6 . FSH-14EA 処理によって
得られたブタ初期胚 .
細胞数 : 30

以上の結果から、マウスにホルモン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 (Kaneko et al. 2006)。

2) 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、依然としてヌ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た。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発育卵に、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) から調整した細胞質小片を融合させること (融合卵の作製) によって、胚発生率の改善を試みた (図 7)。

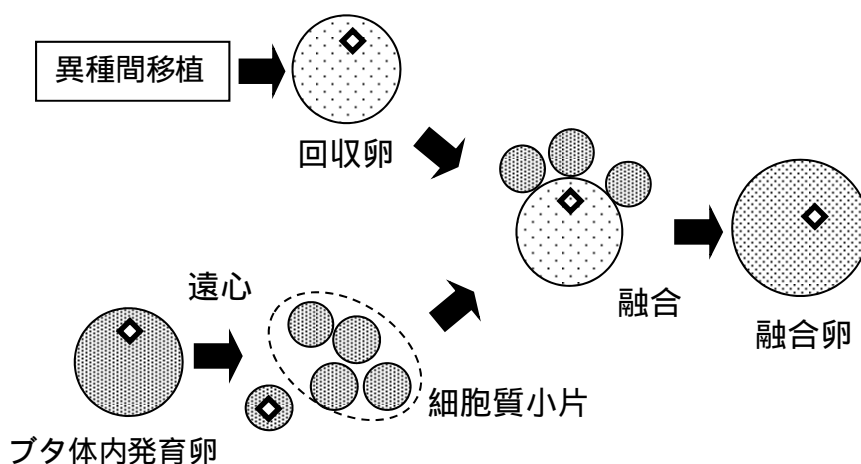


図 7 . 融合卵の作製

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8）。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、格段に改善された。

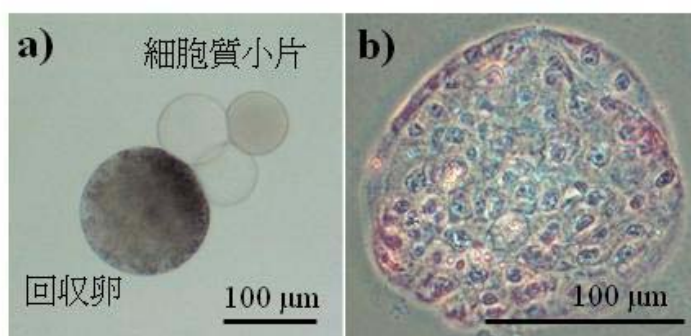


図6 . 融合卵の作成

a) ノードマウスから回収した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）。

4 . 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仔を得るためには、いまだ胚の発生率および細胞数とも不十分である。一方、幼若ブタ精巢をノ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仔を得ることは成功している（Nakai et al. 2010）。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必要がある（本研究は、生物研、菊地和弘上級研究員、中井美智子非常勤研究員、および麻布大学、柏崎直巳教授、伊藤淳哉准教授との共同研究によるものである）。

5 . 参考文献

- 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.
- Christenson RK, Ford JJ, Redmer DA. Maturation of ovarian follicles in the prepubertal gilts. *J Reprod Fertil Suppl* 1985; 33:21-36.
- Gosden RG, Boulton MI, Grant K, Webb R. Follicular development from ovarian xenografts in SCID mice. *J Reprod Fertil* 1994; 101:619-623.
- 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.
- Kagawa N, Sakurai Y, Miyano T, Manabe N. Effects of long-term grafting on follicular growth in porcine ovarian cortical grafts xenopanted to severe combined

- immunodeficient (SCID) mice. *J Reprod Dev* 2005; 51:77-85.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Mattiske D, Shaw G, Shaw JM. Influence of donor age on development of gonadal tissue from pouch young of the tammar wallaby, *Macropus eugenii*, after cryopreservation and xenografting into mice. *Reproduction* 2002; 123:143-153.
- 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.
- Morbeck DE, Esbenschade KL, Flowers WL, Britt JH. Kinetics of follicle growth in the prepubertal gilts. *Biol Reprod* 1992; 47:485-491.
- 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.
- 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; 139:153-61.
- 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.
- Senbon S, Ishii K, Fukumi Y, Miyano T. Fertilization and development of bovine oocytes grown in female SCID mice. *Zygote* 2005; 13:309-315.
- Snow M, Cox S-L, Jenkin G, Trounson A, Shaw J. Generation of live young from xenografted mouse ovaries. *Science* 2002; 297:2227.
- 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.

胚盤胞の品質評価

乾 裕昭

乾マタニティクリニック

近年、体外受精は顕微授精を代表とする手技的な進歩があり、特に乏精子症例で以前に比べ妊娠率の上昇を認める。しかし、Take home baby 率は 20%前後¹⁾とさほど向上していない。これらの事実は患者背景も大きな要因であるが、胚の品質評価法は従来から形態評価法²⁻⁵⁾にとどまっており、加うるに機能的評価が急務である。

我々は、2004 年よりマウスでの基礎実験及び臨床ヒト卵子を中心に工学的手法をもちい研究を重ねてきた。尾股らのハプティック理論より導かれる MTS⁶⁻⁹⁾は、微小超音波を発生し、卵子に侵襲を加えず副作用もなく評価が可能¹⁰⁾である。

すなわち微小超音波を卵子にあて硬度をヤング率に換算し、これを受精卵の持つ生物活性圧として表現し卵子の品質を評価する^{11,12)}ものである。

結果 Zona hardening を世界で初めて工学的手法で証明し、また胚盤胞の品質を従来のガードナー分類⁵⁾と併用することにより、高い精度で判定可能であった。しかし、操作をインキュベーター外で行うため胚メタボリズムに対する悪影響も考えられ、検討の余地がある。

- 1) 日本産科婦人科平成 20 年度倫理委員会・登録・調査小委員会報告(2007 年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および 2009 年 7 月における登録施設名)。日本産科婦人科学会誌, 61(9):1853-1880,2009.
- 2) Scott, L., Alvero, R., Leondires, M., Miller, B.:The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. Hum Reprod. 15(11):2394-2403,2000.
- 3) Tesarik, J., Greco, E.: The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology: Hum Reprod.14(5):1318-1323,1999.
- 4) Veeck, LL.: Atlas of the human oocyte and early conceptus,vol2.Williams&Wilkins Co,Baltimore,1991.
- 5) Gardner, DK., Scoolcraft, WB., Jansen, R,et. al(eds):Towards reproductive certainty ;infertility and genetics beyond. In vitro culture of

- human blastocysts;pp378-388,Canforth,Parthenon Press,1999.
- 6) Y. Murayama, et al. *Journal of Biomechanics*, vol. 37, pp. 67-72, 2004.
 - 7) Y. Murayama and S Omata, "Fabrication of micro tactile sensor for the measurement of micro-scale local elasticity," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 109: 202-207, 2004.
 - 8) Y. Murayama and S Omata, *IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics, and Frequency Control*, in press, 2005.
 - 9) 村山嘉延・笛田洋一・中村寛子・水野仁二・赤石一幸・乾裕昭・尾股定夫：
ヒト生殖補助医療技術（ART）のための卵子評価システムの開発- -受精前後におけるマウス卵子透明帯の工学的弾性評価-.*Journal of Mammalian Ova Research*, 22(2):113, 2005.
 - 10) Murayama, Y., Mizuno, J., Kamakura, H., Fueta, Y., Nakamura, H., Akaishi, K., Anzai, K., Watanabe, A., Inui, H., Omata, S. :Mouse zona pellucida dynamically changes its elasticity during oocyte maturation, fertilization and early embryo development.*hum.cell*,19(4):119-125,2006.
 - 11) Nakamura, H., Mizuno, J., Fueta, Y., Murayama, Y., Omata, S., Inui, H. :Development of ovum estimation system for human ART: elasticity evaluation of mouse ICM(EPB) by micro tactile sensor.*fertil.steril.*,84(1):331-332,2005.
 - 12) 乾裕昭・赤石一幸・中村寛子・水野仁二・村山嘉延・渡辺奈津美・吉田涼・渡辺明彦・安齋憲・尾股定夫:マイクロタクトイルセンサを用いたヒト卵の品質評価システム.受精着床誌,25(1):116-119,2008

新しい胚評価法に基づく最適な胚移植時期

古井 憲司
(クリニックママ)

【はじめに】

1978年、イギリスにて Steptoe と Edwards が、ヒトで世界初の体外受精・胚移植を成功させた。この時、胚移植の時期は day3 で、8細胞期胚を移植したという¹⁾。日本では1982年に東北大学の鈴木らが報告したが、この時には day2 に4細胞期胚を移植した²⁾。現在、不妊治療として体外受精・胚移植は広く行われ、定着した感がある。しかし胚移植の時期に関しては、day1 から day6 まで、時には day7 での胚移植についての報告があるが³⁻⁷⁾、明確な指標があるとは言い難く、各々の施設が、各々の考えに基づいて判断しているのが現状であろう。今回、当院での成績をもとに最適な胚移植の時期について検討した。

【当院での胚移植時期の推移について】

当院では、2001年までは day2 胚移植が主体であったが、2002年に入ると day3 胚移植が中心となり、2002年後半以降は胚盤胞移植が主体となっている。当院での day2 胚移植、day3 胚移植、胚盤胞移植における胚移植あたりの妊娠率は、胚盤胞移植が有意に高率であった。採卵あたりでも、有意差はないが、胚盤胞移植の妊娠率が高い傾向にあった。胚盤胞移植の問題点として、一絨毛膜性多胎の発生が報告されているが⁸⁾、当院では一絨毛膜性双胎の発生率は、day3 分割期胚移植で 0.56%、胚盤胞移植で 0.66% と有意差はなかった。またもう一つの問題点として胚盤胞に到達せず胚移植がキャンセルとなることがあるが、day3 における胚の質が良質であれば、キャンセル率も低く胚盤胞移植における妊娠率が有意に高いと報告されている⁹⁾。day3 での正確な胚評価も重要であると考えられる。

【分割期胚の評価法について】

我々の施設では、以前はフラグメンテーションの割合、割球の均一性をもとにした Veeck 分類¹⁰⁾にて分割期胚 (day 2-3) の評価を行ってきた。胚盤胞移植を積極的に行なうようになると、Veeck 分類と胚盤胞到達率が必ずしも相関しないことを経験した。従来より卵割の速度が重要な因子であることは報告されてきたが、我々は割球数、フラグメンテーションの割合、割球の均一性の3つの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¹¹⁾、スコア化 (F Score) した¹²⁾。スコア5からスコア0まで6段階評価とした。このスコアと胚盤胞到達率はきれいな相関を認めた。また過去の day3 胚移植症例の妊娠率もスコア4以上の良好胚を移植した群とスコア3以下の不良胚のみ移植した群を比較すると、スコア4以上の良好胚を移植した群が、有意に妊娠率が高率であり、このスコアの有効性が示された。

【分割期胚移植の限界について】

この我々のスコアは胚盤胞到達率、妊娠率をより良く反映していたが、それでも時とし

て day3 での評価と day5 での評価に差異を感じることもあった。そこでさらに我々は最近の症例で、どの程度の差異が生じるのかを比較検討した。2006 年から 2008 年に施行した単一胚盤胞移植症例（176 症例）を対象とした。day3 において、F Score で胚の評価を行ない、最も良好と思われる胚（F1）を選択した。そして、この F1 が day5 で実際に胚移植されたか否かを検討した。F1 がスコア 5 の最高点であった 117 例についての結果を示すと、胚盤胞に発育し胚移植されたものは 117 例中 57 例（A 群：48.7%）、F1 以外の胚が胚移植されたが F1 も良好な胚盤胞になり凍結保存されたものが 117 例中 30 例（B 群：25.6%）であった。しかしながら F1 が良好な胚盤胞に発育せず、F1 以外の胚がより良好な胚盤胞に発育し移植されたものが 117 例中 30 例（C 群：25.6%）存在した。A 群は day3 での評価と day5 での評価が一致したものと考えられる。B 群は F1 が移植胚として選択されなかったが、凍結に足る良好胚盤胞に発育しており、day3 での選択が誤りではなかったと判断される。しかし C 群は明らかに、day3 での選択が誤りであったと考えられた。さらに F1 がスコア 4 の場合は C 群が 48.6%、F1 がスコア 3 以下の場合は C 群が 59.1%と F1 のスコアが不良な程 Day3 での胚評価に誤りが起こる可能性が高くなることが判明した。さらに妊娠に至った単一胚盤胞移植症例の検討では、Day3 に F Score で評価した最良好胚 F1 のうち 19.5%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なため凍結保存することができなかった。つまりこの 19.5%の F1 をもし Day3 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る。

【胚盤胞移植のキャンセルについて】

以上より、分割期での胚評価よりも胚盤胞での胚評価の方が有利であると考えられた。しかしながら、すべての症例で胚盤胞移植が妊娠率の向上に寄与するとは限らない。よく言われることであるが胚盤胞に到達せずに胚移植がキャンセルとなる症例の存在も考慮しなければならない。2000 年から 2008 年に施行した胚盤胞移植症例（630 例）のキャンセル率について年令別検討を行ったところ移植キャンセル率は 40 才以上になると有意に上昇し、40 才以上の症例では採卵あたりの妊娠率は逆に分割期胚移植症例の方が高率であった。これは、40 才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る。

【まとめ】

我々の考案した day3 胚スコア（F Score）は、Veeck 分類と比較して day3 での胚評価をより良く反映し妊娠率の改善に寄与できると考えられたが、day3 での評価と day5 での評価が一致しない症例が少なからず存在した。day3 での胚評価法については今後さらなる改善が必要であると考えられるとともに、day3 での評価の限界を考えさせられる結果であった。今後は多胎妊娠予防のため単一胚移植に移行すべきであり、その観点からも胚盤胞までの培養が胚の選別に有利であると考えられた。しかし、胚盤胞に到達せずに胚移植がキャンセルとなる症例、特に高齢者についての対策も必要である。少数の胚しか得られなかった症例については、day2 で胚移植をした方が良いという報告もあり¹³⁾、症例毎に胚の数、その質および年令について配慮すべきであると考えられる。また、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¹⁴⁾。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。

【参考文献】

- 1) Steptoe PC, Edwards RG : BIRTH AFTER THE REIMPLANTATION OF A HUMAN EMBRYO. The Lancet, Volume 312, Issue 8085, 12 : 366, 1978.
- 2) 鈴木雅州、星和彦 他 : 体外受精・胚移植により受精・着床に成功した卵管性不妊症の一例. 日本不妊学会雑誌, 28 : 439-443, 1983.
- 3) Jaroudi K, Al-Hassan S, et al : Zygote transfer on day 1 versus cleavage stage embryo transfer on day 3 : a prospective randomized trial. Hum Reprod, 19 : 645-648, 2004.
- 4) Martikainen H, Orava M, et al : Day 2 elective single embryo transfer in clinical practice : better outcome in ICSI cycles. Hum Reprod, 19 : 1364-1366, 2004.
- 5) Tao J, Tamis R, et al : The neglected morula/compact stage embryo transfer. Hum Reprod, 17 : 1513-1518, 2002.
- 6) Shapiro BS, Richter KS, et al : A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. Fertil Steril, 75 : 1126-1130, 2001.
- 7) Sagoskin AW, Han T, et al : Healthy twin delivery after day 7 blastocyst transfer coupled with assisted hatching. Fertil Steril, 77 : 615-617, 2002.
- 8) Unger S, Hoopmann M, et al : Monozygotic triplets and monozygotic twins after ICSI and transfer of two blastocysts: case report. Hum Reprod, 19 : 110-113, 2004.
- 9) Blake D, Farquhar C, et al : Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. Cochrane Database Syst Rev, CD002118, 2007.
- 10) Veeck LL : Oocyte assessment and biological performance. Ann NY Acad Sci, 541: 259-274, 1988.
- 11) Nomura M, Iwase A, et al : Preferable correlation to blastocyst development and pregnancy rates with a new embryo grading system specific for day 3 embryos. J Assist Reprod Genet, 24 : 23-28, 2007.
- 12) 古井憲司、野村昌男 他 : Day 3 分割期胚の新しい評価法の検討. 日本受精着床学会雑誌, 24 : 114-119, 2007.
- 13) Shen S, Rosen MP, et al : Day 2 transfer improves pregnancy outcome in in vitro fertilization cycles with few available embryos. Fertil Steril, 86 : 44 - 50, 2006.
- 14) Rizos D, Lonergan P, et al : Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems : Implication for Blastocyst Quality. Biol Reprod, 66 : 589-595, 2002.

SRE

**第 12 回 SSRE 記念シンポジウム
講演要旨集**

編集・発行 SRE[日本生殖工学会]

発行代表者 柏崎 直巳

〒229-8501

神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71

麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

電話 : 042-769-2339

FAX : 042-769-1762

発行 平成 22 年 3 月 21 日