

ISSN 1881-9028

日本IVF学会雑誌

Vol.17 No.2

2014



論文集

論文

－ 総説 －

卵成熟における紡錘体の形成メカニズムと加齢による紡錘体への影響	2
---------------------------------------	---

星野 由美

東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野

－ 原著 －

胚盤胞のグレードと出生時体重の比較検討	8
---------------------------	---

岩佐 由紀, 菊地 裕幸, 鈴木 麻美, 山田 健市,
菅野 弘基, 村川 晴生, 松原 雄, 吉田 仁秋

吉田レディースクリニック ART センター

卵成熟における紡錘体の形成メカニズムと 加齢による紡錘体への影響

星野 由美

東北大学大学院農学研究科 動物生殖科学分野 〒 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

要 旨： 加齢などにより卵巣年齢が高まると、卵巣内で機能するホルモンにも影響が生じ、その結果として卵巣内卵子の質にも影響が現れる。一般的に卵巣年齢の高い卵巣内には成熟可能な卵子は少なく、その卵子の受精・発生能力も低く、卵子の染色体異常が主な原因であると考えられている。染色体の分配は紡錘体によってなされているため、染色体分配には紡錘体が正常に機能することが必須である。紡錘体は細胞質内に存在する最も大きな構造体であり、その有無や位置はICSIなどの顕微操作の際の一つの指標になっている。最近、我々は、紡錘体形態によって受精・発生能を評価できる可能性を報告した。本稿では、卵子の紡錘体に着目して、その制御メカニズムと成熟能評価の可能性について研究を通じて得られた最近の知見を紹介する。

キーワード： 卵子, 紡錘体, メカニズム, 受精・発生能, 加齢

はじめに

卵子が減数分裂を再開し卵成熟をはじめると、卵細胞質内では染色体の凝集・整列や紡錘体の形成などが観察される。卵子が受精・発生可能な状態まで成熟するためには、紡錘体の形成とそれに続く染色体の分配は必須の現象である。紡錘体は細胞内の大きな構造体であり、顕微鏡下でその形態を捉えやすい特徴があることから、卵成熟の指標にもなり得る。我々はこれまでに、マウスによる研究で、紡錘体の形態、特に紡錘体極の幅が受精能と相関があることを報告している。今日では、ICSI操作に関わる光学機器の進歩やPoloscopeなどの導入などにより、ARTの現場でも成熟卵子の紡錘体の有無や位置について確認されるようになってきている。このように、紡錘体は、体外操作において重要な指標であることから、紡錘体について詳しく知る必要もある。本稿では、卵成熟における紡錘体の形成メカニズムに触れながら、受精・発生能評価の可能性を紹介したい。

紡錘体形成に関わる因子

紡錘体は微小管を束ねた構造体であり、微小管はチューブリンが重合することにより構成されている。チューブリンは数十秒単位で常に重合と脱重合を繰り返しながら入れ替わっている。一見、変化がなさそうに見える紡錘体であるが、その構成成分である微小管は激

しく変化しているのである。そのような変化を繰り返しながら、紡錘体の微小管は染色体の動原体部位を接着して両極に引っ張ることで染色体を分配する。微小管の接着が未完了の場合や、不適切な接着が起きた場合には、紡錘体形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint: SAC) と呼ばれる監視機構が活性化して、すべての動原体が微小管によって正しく捕捉されるまで細胞周期を分裂中期 (metaphase) に停止させる。Mad2やBub1などのチェックポイント因子は酵母からヒトまで真核細胞生物で幅広く保存されている^{1, 2)}。

紡錘体形成に影響を与える要因

前述のとおり、紡錘体を構成する微小管は絶えず入れ替わっているが、温度変化には敏感である。ヒトの第一減数分裂中期 (metaphase I: MI) または第二減数分裂中期 (metaphase II: MII) の卵子を4℃以下の温度にさらすと、微小管の脱重合が進み、約10分で微小管の極性が消失することが報告されている³⁾。また、0℃の環境において、MII期卵子の紡錘体を継時的に観察すると、冷却開始2分で紡錘体は縮小をはじめ染色体の整列もばらばらになり、10分後には微小管が細胞内に認められなくなるとの報告もある⁴⁾。このように紡錘体は、動的でありながら温度変化に敏感な構造体であるため、体外で操作を行う際には、紡錘体の特性を念頭に置きながら、適切な環境で作業を行うよう工夫する必要がある。

受付 2014年 2月 19日 / 受理 2014年 3月 24日

責任著者：星野 由美 e-mail [hoshimi@bios.tohoku.ac.jp]

紡錘体に影響を及ぼす他の要因としては、エストロゲンレセプターに作用する環境ホルモンが挙げられる。エストロゲンレセプターに作用する環境ホルモンとしては、ポリ塩化ビフェニール(PCB)、ビスフェノールA、フタル酸エステル、ジエチルスチルベストロール(DES)などが報告されている。特に、ビスフェノールAは、ヒトの血中や卵巣内の卵泡液中にも存在するとの報告があり、その影響は比較的良好に研究がなされている^{5,6)}。卵子への影響を報告したものでは、ヒトやマウスの卵子にビスフェノールAを処理すると紡錘体形成不全や染色体分散などが高頻度で起こり、MII期への進行が抑制されると報告されている^{6,7)}。

紡錘体形成の分子メカニズム

紡錘体が形成され、適切に機能するためには、非常に複雑な分子メカニズムによってその動的变化は調節されている^{8,9)}。卵子の紡錘体形成メカニズムは、体細胞(有糸分裂)のそれと異なる。すなわち、哺乳動物の卵子には中心体が存在せず、中心体非依存的に紡錘体形成がなされる(図1)¹⁰⁾。そのメカニズムの概要は次の通りである。まず、卵成熟の開始準備が整った卵子では、細胞質内に多数の微小管形成中心(microtubule organizing center: MTOC)が形成される。そのMTOCは、細胞質中のdyneinなどのモータータンパク質の作用を受けて核膜崩壊に寄与する(図2)。その後、dyneinの作用によりMTOCは2つのまとまりになる。このまとまりが、紡錘体の極となり、Eg5により微小管が束ねられて、紡錘体が形成される(図3)。

紡錘体形成・維持に関わる分子

紡錘体の形成維持に関わるものとして、MosやMAPキナーゼ経路が知られている。Mos遺伝子の欠損マウス由来の成熟卵子を観察すると、自発的成熟培養で得られるような大きな紡錘体が形成される¹¹⁾。MAPキナーゼは、Mosの下流でリン酸化され活性化される分子であり、受精能をもつ卵子では高い活性レベルを維持しているが、体外成熟培養(IVM)で長時間培養させた過成熟卵子ではその活性レベルは低い。また、MAPキナーゼは中心小体の構成分子に影響を与えとの報告がある¹²⁾。このように、MosやMAPキナーゼを介したシグナル伝達経路は紡錘体形成・維持やその後の受精において重要な役割を果たしている。

著者らは、卵成熟に関わる分子を解析する中でAkt/Protein kinase B(PKB)が減数分裂特異的に発現し、分裂中期では紡錘体上に局在することを明らかにした¹³⁾。一般的にAktの活性化には、308番目のスレオニン(Thr308)と473番目のセリン(Ser473)の2ヶ所のリン酸化が必須であると考えられているが、著者らは、マウスの卵子においては2つのリン酸型Aktが異なる局在を示し、特に分裂中期においてはThr308リン酸型Aktが紡錘体極及び微小管形成中心に、Ser473リン酸型Aktが紡錘体上に局在することを明らかにしている¹⁴⁾。

Aktの役割を調べるため、リン酸化特異的阻害剤(SH-6)を培地に添加してIVMを行ったところ、SH-6は濃度依存的に卵核胞崩壊後の核膜消失と減数分裂後期の紡錘体形成・維持、さらに受精後の第2極体の放出を抑制した¹⁴⁾。一方、別の阻害剤(Akt inhibitor X)を用いてAkt

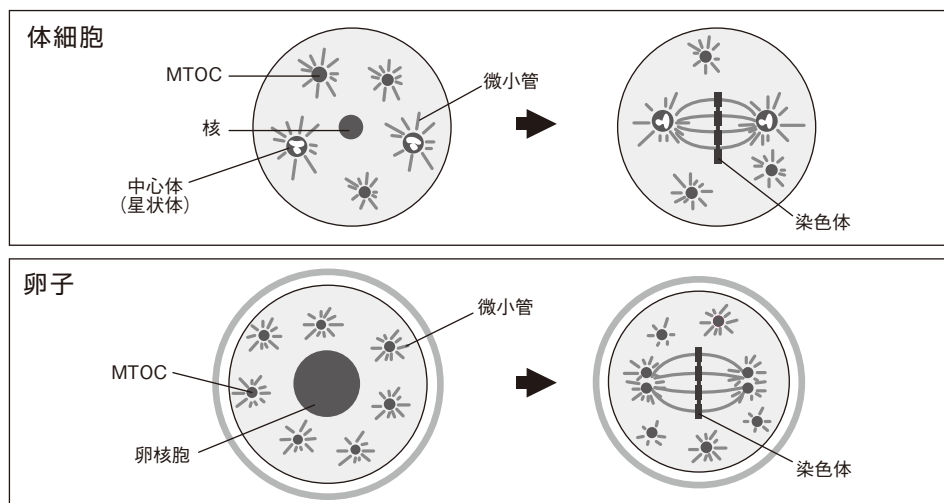


図1 体細胞と卵子における紡錘体形成の比較

体細胞では、細胞質中に存在する1対の中心体(星状体)が紡錘体の極になる。一方、卵子では、細胞質中に散在するMTOCが寄り集まることで紡錘体の極を形成する。

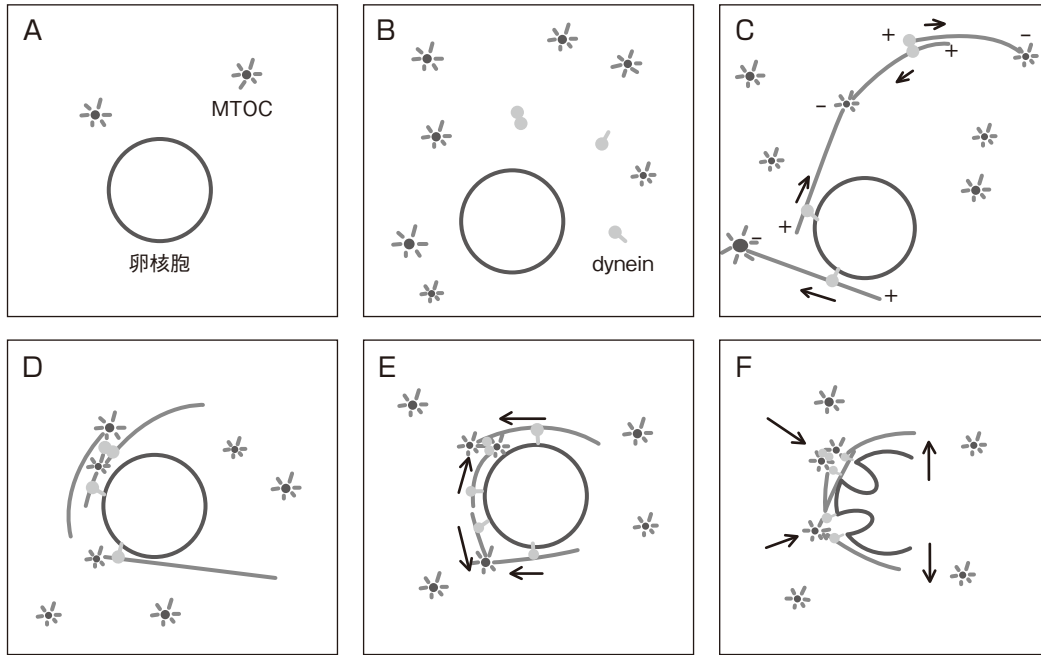


図2 核膜崩壊のメカニズム

GV 期で減数分裂を停止している卵細胞質中にはほとんど MTOC は見られないが (A), やがて細胞質中に多数の MTOC が形成され (B), dynein 等の微小管をプラス方向に移動するモータータンパク質が核膜や微小管に結合する (C). モータータンパク質の作用により MTOC は互いに集合し, さらに核に向けて移動する (D). モータータンパク質が微小管を引き, 微小管に生じた張力が核膜に伝わり (E), 核膜が裂ける (F).

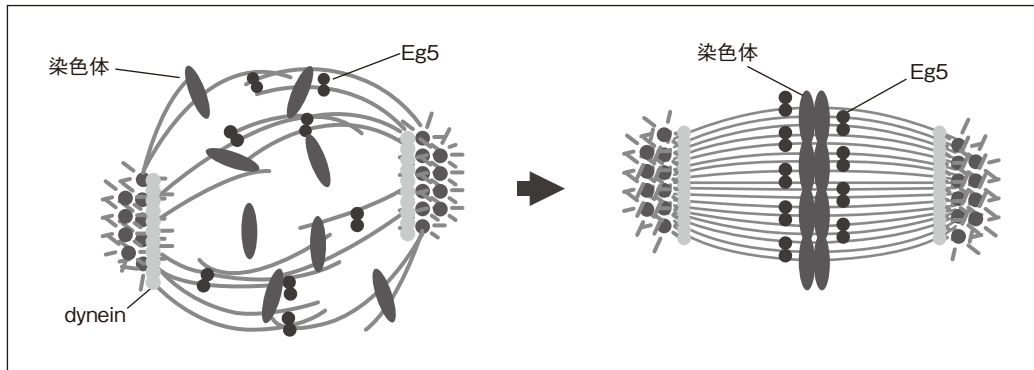


図3 卵子の紡錘体形成メカニズム

Dynein 等のモータータンパク質の作用により MTOC は2つのまとまりになる. さらに, 2本の微小管に結合しマイナス方向に向かって移動するモータータンパク質 (Eg5) によって微小管は束ねられ紡錘体が形成される.

のリン酸化および下流標的 (mTOR, p70S6 キナーゼ) のリン酸化を阻害すると MTOC の形成が誘起され, 卵核膜崩壊が早期に観察された. さらに, 微小管を束ねるモータータンパク質 (Eg5) が早期に発現することにより, 紡錘体の形成が早まった. このことから, Akt のキナーゼ活性のレベルが紡錘体形成・維持に影響することが明らかとなった.

前述の通り, Akt の2つのリン酸化は卵子では異なる

局在を示す. 特異的ペプチドを用いて, それぞれのリン酸化を個別に阻害すると, Thr308 リン酸型 Akt の阻害は, 分裂中期の紡錘体形態が維持されず, 受精後の第2極体の放出が不完全となった. 一方, Ser473 リン酸型 Akt の阻害は, 受精後の第2極体の放出を抑制した¹⁴⁾. このことから, 2つのリン酸型 Akt は独立して機能し, 分裂中期における紡錘体維持と受精後の第2極体放出に関与することを明らかにした.

紡錘体形態と受精能との関係

IVMで得られた成熟卵子の紡錘体形態は、体内成熟卵子のものとは異なる。また、IVMの培養条件によっても紡錘体形態は異なる。すなわち、ゴナドトロピン成熟培養では紡錘体が小さく体内成熟卵子に近い形態であるのに対し、自発的成熟培養では大きな紡錘体が形成される。また、基礎培地の違いによる影響を調べてみると、HTF培地よりもWaymouth's培地で体内成熟に近い形態が観察される¹⁵⁾。一般的に、IVMで得られた成熟卵子の受精・発生率は、体内成熟卵子と比べて低い傾向にある。そこで、成熟卵子の紡錘体形態と受精・発生能について解析したところ、紡錘体の形態が受精・発生に影響を与えることが明らかとなった¹⁵⁾。また、紡錘体形態を経時的に観察すると中心小体周辺物質（pericentriolar materials: PCM）の2点の局在に特徴的な変化が見られた。すなわち、第1極体放出直後の第二減数分裂中期（MII期）卵子のPCMは離れているが、時間の経過に伴いその2点は近接し、再び離れるという変化が観察された。それぞれのタイミングで体外受精を実施したところ、PCMが一時的に寄るタイミングが受精能の最も高いポイントであることが明らかになった（図4）¹⁵⁾。さらに、卵成熟促進因子（maturation promoting factor: MPF）の活性を調べたところ、PCMの2点が寄り、受精・発生能が高まるポイントで最も高くなることが明らかとなった。

この過程の微小管形成促進因子（微小管安定化因子；

CLIP-170）および微小管抑制因子（微小管不安定化因子；MCAK）の発現と局在を調べたところ、受精能の高い卵子では、CLIP-170が紡錘体上に強く発現し、微小管の重合が促進されているのに対し、第1極体放出直後や過成熟の卵子ではMCAKの発現が強く、脱重合が促進されていることが明らかとなった（未発表データ）。これらの結果は、紡錘体の形態、特にPCMの動態観察により、卵子の受精能を評価できる可能性を示している。

加齢（過成熟） 卵子の特徴

過成熟によるエイジング卵子では、MII期の染色体の散在や早期染色体分離（premature chromatin separation: PCS）が高頻度で観察される。また紡錘体は伸長し、タル型の大きな形態を示す（図5）。これは前述の通り、紡錘体極に存在する2点のPCMが離れ、微小管の脱重合が進行した結果、生じるものと考えられている。さらにエイジングが進むと中心小体の機能が低下し、紡錘体極が複数形成されるため、受精により精子が卵細胞質に侵入しても、第2極体を放出できなくなる。

卵子の質の評価

本稿で述べたとおり、紡錘体の形態は卵子の受精・発生能と相関があり、卵子の質を評価するひとつの指標となり得る。紡錘体形成・維持に関わる分子メカニズムの詳細が明らかになれば、科学的な知見に基づき紡錘体形

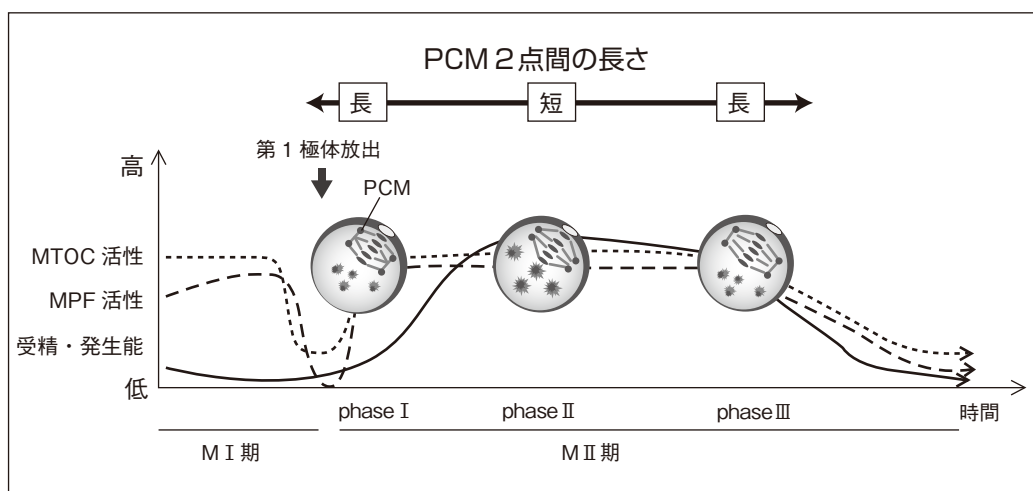


図4 MII期卵子の形態的变化と受精・発生能との関係

第1極体放出直後（phase I）のMII期卵子では、紡錘体の両極に2点ずつ形成されているPCMは離れているが、時間の経過とともにその2点は近接し（phase II）、再び離れる（phase III）。受精・発生能は、PCMが一時的に寄るタイミングで最も高く、MTOC活性とMPF活性が高まるポイントと一致する。

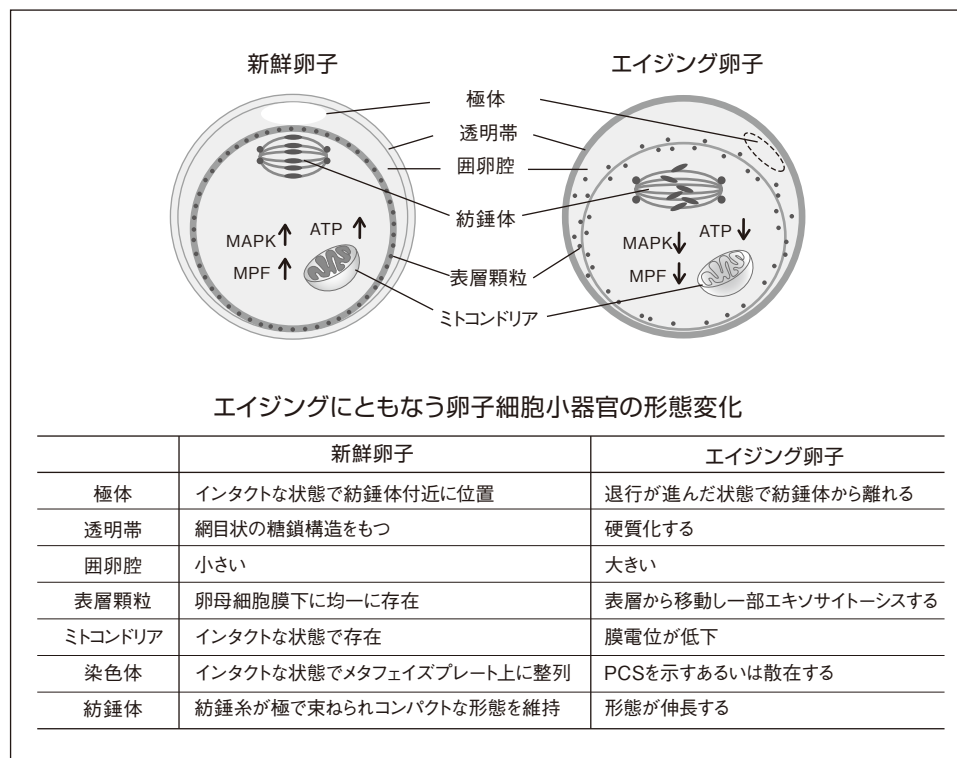


図5 哺乳動物卵子における新鮮卵子とエイジング卵子の形態的変化の比較

受精能の高い卵子では、MAP キナーゼ (MAPK) や卵成熟促進因子 (MPF) の活性が高く維持されているのに対し、エイジングが進むとこれらの活性は急激に低下し、それと同時に形態的变化も生じる。

態で卵子の受精・発生能を評価できる可能性がある。これが実現されれば、多数の卵子から受精・発生能の高い(質の高い)卵子を選別することが可能となる。体細胞における研究では、紡錘体形成チェックポイントの破綻が、染色体の異数性を誘発させる直接的な原因であると報告されている¹⁶⁾。染色体や紡錘体の動的变化をもたらす分子メカニズムを解明できれば、受精能の高い成熟卵子の獲得に繋がると考えられる。

参考文献

- 1) Sun, S. C., Kim, N. H.: Spindle assembly checkpoint and its regulators in meiosis. Hum. Reprod. Update, 18: 60-72, 2012.
- 2) Suijkerbuijk, S. J., Kops, G. J.: Preventing aneuploidy: the contribution of mitotic checkpoint proteins. Biochim. Biophys. Acta., 1786: 24-31, 2008.
- 3) Gomes, C., Merlini, M., Konheim, J., Serafini, P., Motta, E. L., Barakat, E. C., Smith, G. D.: Oocyte meiotic-stage-specific differences in spindle depolymerization in response to temperature changes monitored with polarized field microscopy and immunocytochemistry. Fertil. Steril., 97: 714-719, 2012.
- 4) Zenzes, M. T., Bielecki, R., Casper, R. F., Leibo, S. P.: Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. Fertil. Steril., 75: 769-777, 2001.
- 5) Peretz, J., Craig, Z. R., Flaws, J. A.: Bisphenol A inhibits follicle growth and induces atresia in cultured mouse antral follicles independently of the genomic estrogenic pathway. Biol. Reprod., 87: 63, 2012.
- 6) Machtinger, R., Combelles, C. M., Missmer, S. A., Correia, K. F., Williams, P., Hauser, R., Racowsky, C.: Bisphenol-A and human oocyte maturation in vitro. Hum. Reprod., 28: 2735-2745, 2013.
- 7) Lenie, S., Cortvrindt, R., Eichenlaub-Ritter, U., Smits, J.: Continuous exposure to bisphenol A during in vitro follicular development induces meiotic abnormalities. Mutat. Res., 651: 71-81, 2008.
- 8) Helmke, K. J., Heald, R., Wilbur, J. D.: Interplay Between Spindle Architecture and Function. Int. Rev. Cell. Mol. Biol., 306: 83-125, 2013.
- 9) Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G., Taylor, S. S.: The spindle assembly checkpoint. Curr. Biol., 22: R966-980, 2012.
- 10) Manandhar, G., Schatten, H., Sutovsky, P.: Centrosome reduction during gametogenesis and its significance. Biol. Reprod., 72: 2-13, 2005.
- 11) Coticchio, G., Sereni, E., Serrao, L., Mazzone, S., Iadarola, I., Borini, A.: What criteria for the definition of oocyte quality? Ann. N. Y. Acad. Sci., 1034: 132-144, 2004.

- 12) Sun, Q. Y., Schatten, H.: Regulation of dynamic events by microfilaments during oocyte maturation and fertilization. *Reproduction*, 131: 193-205, 2006.
- 13) Hoshino, Y., Yokoo, M., Yoshida, N., Sasada, H., Matsumoto, H., Sato, E.: Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 69: 77-86, 2004.
- 14) Hoshino, Y., Sato, E.: Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev. Biol.*, 314: 215-223, 2008.
- 15) Sakai, C., Hoshino, Y., Sato, Y., Sato, E.: Evaluation of maturation competence of metaphase II oocytes in mice based on the distance between pericentriolar materials of meiotic spindle: distance of PCM during oocyte maturation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 28: 157-166, 2011.
- 16) Dobles, M., Liberal, V., Scott, M. L., Benezra, R., Sorger, P. K.: Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell*, 101: 635-645, 2000.

胚盤胞のグレードと出生時体重の比較検討

岩佐 由紀, 菊地 裕幸, 鈴木 麻美, 山田 健市,
菅野 弘基, 村川 晴生, 松原 雄, 吉田 仁秋

吉田レディースクリニック ART センター 〒981-1105 宮城県仙台市太白区西中田2丁目23-5

要旨: 近年, 生殖補助医療により出生した児の体重について, 後方視的に検討した文献が散見される. 今回我々は, 単一胚盤胞移植にて, 妊娠, 出産に至った症例を対象とし, 内部細胞塊, 栄養外胚葉それぞれのグレードと出生時体重, 胎盤重量に関連が認められるか検討を行った. 内部細胞塊のグレードによる比較では, 出生時体重, 胎盤重量ともに差は認められなかったが, 栄養外胚葉のグレードで比較すると, グレードが良好な胚由来の方が出生時体重, 胎盤重量とも増加していた. 新鮮胚と凍結融解胚に分けて行った検討でも同様に, 栄養外胚葉のグレードの良好な胚で出生時体重, 胎盤重量が増加する傾向が認められた. 着床まではもちろんのこと, その後の胎児の発育にも栄養外胚葉の評価が深く関わっている可能性が示唆された.

キーワード: 栄養外胚葉, 内部細胞塊, 凍結融解胚, 出生時体重, 胎盤重量

緒言

生殖補助医療 (assisted reproductive technology : ART) において, 良好胚を選択するための手段として胚盤胞培養は広く普及し, vitrification法による凍結保存も確立しているが, 安全性については未知の部分も多い.

近年, ARTにより出生した児を後方視的に検討した文献が散見される¹⁻³⁾. 特に出生児の平均体重に関しては, 移植胚の発育時期での比較では, 初期胚と胚盤胞で差はないという報告がある¹⁾一方, 初期胚よりも胚盤胞で増加するとの報告もある²⁾. また, 新鮮胚と凍結融解胚の比較では, 凍結融解胚で出生児の体重が増加するとの報告が多くなされている²⁻⁴⁾. しかし, 胚盤胞のグレードについては, グレードの良好な胚ほど高い妊娠率が得られ, 流産率は低下することが知られているものの, 出生児の体重との関連を検討した報告はほとんどない. 今回我々は, 胚移植時の胚盤胞のグレードと出生時体重, 胎盤重量について, 内部細胞塊 (inner cell mass : ICM) と栄養外胚葉 (trophectoderm : TE) それぞれのグレードと関連が認められるか検討を行った.

対象・方法

当院は産科を併設していることから, ART後の分娩のフォローを行っている. 当院にて2007年4月~2012年4月の間に, 新鮮胚移植周期または凍結融解胚移植周期にて単一胚盤胞移植を施行し, 妊娠・分娩まで経過を追跡できた症例のうち, Gardner分類3以上で移植胚のICM,

TEのグレードの評価が可能であった143例を対象とした.
〈検討①〉

Gardner分類にてICM評価がAの群 (ICM-A群) とBまたはCの群 (ICM-BC群) に分け, 出生時平均体重と平均胎盤重量を比較した. また, TEについても同様にTE評価がAの群 (TE-A群) とBまたはCの群 (TE-BC群) に分け, 比較を行った.

〈検討②〉

新鮮胚移植群 (新鮮群) と凍結融解胚移植群 (融解群) のそれぞれにおいて, 検討①同様の比較を行った. 統計学的有意差検定はStudent's t検定を用いた.

結果

〈検討①〉

ICMの比較では, ICM-A群83例, ICM-BC群60例であり, 母体の妊娠時年齢, 平均在胎日数に差は認められなかった (表1-1). ICM-A群の出生時平均体重, 平均胎盤重量はそれぞれ 3169.5 ± 388.3 g, 586.4 ± 96.3 g, ICM-BC群ではそれぞれ 3124.8 ± 369.4 g, 596.8 ± 102.4 gで両群間に差は認められなかった (表1-1). TEの比較では, TE-A群73例, TE-BC群70例であり, 母体の妊娠時年齢, 平均在胎日数に差は認められなかった (表1-2). TE-A群の出生時平均体重, 平均胎盤重量はそれぞれ 3224.5 ± 349.2 g, 609.4 ± 92.2 g, TE-BC群では 3073.7 ± 397.3 g, 571.4 ± 102.1 gであり, 出生時体重, 胎盤重量ともTE-A群がTE-BC群より有意に重かった ($P < 0.05$) (表1-2).

表 1-1 ICM のグレード別での出生児平均体重, 平均胎盤重量の比較

ICM による比較	ICM-A 群	ICM-BC 群	P 値
出生児数	83	60	
(経膣：帝王切開)	(54：29)	(40：20)	
妊娠時年齢 (歳)*	32.9 ± 3.3	33.8 ± 3.3	NS
在胎日数*	277.1 ± 8.4	279.1 ± 8.7	NS
出生時体重 (g)*	3169.5 ± 388.3	3124.8 ± 369.4	NS
胎盤重量 (g)*	586.4 ± 96.3	596.8 ± 102.4	NS

* : mean ± S.D. NS : not significant

表 1-2 TE のグレード別での出生児平均体重, 平均胎盤重量の比較

TE による比較	TE-A 群	TE-BC 群	P 値
出生児数	73	70	
(経膣：帝王切開)	(50：23)	(44：26)	
妊娠時年齢 (歳)*	33.3 ± 3.5	33.2 ± 3.2	NS
在胎日数*	277.4 ± 8.4	278.5 ± 8.8	NS
出生時体重 (g)*	3224.5 ± 349.2	3073.7 ± 397.3	P < 0.05
胎盤重量 (g)*	609.4 ± 92.2	571.4 ± 102.1	P < 0.05

* : mean ± S.D. NS : not significant

〈検討②〉

新鮮群48例と融解群95例の比較を表2に示す。出生時体重, 平均胎盤重量は新鮮群でそれぞれ3025.2 ± 316.2g, 571.3 ± 90.3g, 融解群では3214.2 ± 394.7g, 600.6 ± 101.7gと, 新鮮群より融解群で児の体重は有意に増加しており (P<0.05), 胎盤重量も増加する傾向が認められた。さらに, 分娩時出血量も新鮮群485.0 ± 306.6g, 融解群620.2 ± 375.5gと融解群で有意に増加していた (P<0.05) (表2)。新鮮群と融解群のそれぞれで検討①と同様の比較を行った結果を表3-1, 3-2に示す。ICMのグレードによる比較では新鮮群, 融解群とも出生時平均体重, 平均胎盤重量に差は認められなかったが, TEの比較では新鮮群で出生時平均体重がTE-A群3121.2 ± 224.9g, TE-BC群2943.9 ± 361.2gとTE-A群で有意に増加した (P<0.05)。融解群の出生時体重, 胎盤重量についても有意差は認められなかったものの, いずれもTE-A群で増加する傾向が認められた (表3-2)。分娩時出血量については, グレードによる差はいずれにも認められなかった (表3-1, 3-2)。

考 察

近年, 体外受精児の予後調査において, 特に出生時体重に着目した報告¹⁻⁵⁾が散見される。俵ら⁵⁾は移植時の胚盤胞のグレードをICMとTEで分け, それぞれで出生時体重との関連を調査し, ICM・TEともに評価が下がるにつれ, 出生児の体重が減少したと報告している。今回我々の検討では, ICMのグレードによる児の体重, 胎盤重量に差は認められなかったが, TEの比較では俵らの報告と同様にグレードの良好な胚由来で児の体重, 胎盤重量は増加していた。新鮮胚と凍結融解胚のそれぞれで検討を行った結果でも, ICMのグレードによる差はいずれにも認められなかったが, TEのグレードで比較すると, 新鮮胚のグレードの良好な胚由来でより出生時体重が増加することが認められた。

TEは胎盤へ分化していく細胞であるが, Ahlströmら⁶⁾はGardnerの分類に用いられる胞胚腔の拡がりやhatchingの程度, ICMの細胞数, TEの細胞数という3つの形態学的評価のうち, 特に生産率の重要な予測因子はTEであり, 着床後のICMの発育にもTEの機能が重

表 2 新鮮群と融解群における出生時平均体重, 平均胎盤重量の比較

	新鮮群	融解群	P 値
出生児数	48	95	
妊娠時年齢 (歳)*	32.9 ± 3.3	33.4 ± 3.4	NS
在胎日数*	276.9 ± 7.7	278.4 ± 9.0	NS
(経膣: 帝王切開)	(34 : 14)	(60 : 35)	
出生時体重 (g)*	3025.2 ± 316.2	3214.2 ± 394.7	P < 0.05
胎盤重量 (g)*	571.3 ± 90.3	600.6 ± 101.7	NS (P=0.09)
分娩時出血量 (g)*	485.0 ± 306.6	620.2 ± 375.5	P < 0.05

* : mean ± S.D. NS : not significant

表 3-1 新鮮群における, ICM, TE それぞれのグレード別での出生児平均体重, 平均胎盤重量の比較

ICM	ICM-A 群	ICM-BC 群	P 値
出生児数	26	22	
出生児体重 (g)*	3019.7 ± 291.5	3031.6 ± 350.0	NS
胎盤重量 (g)*	556.3 ± 82.0	589.1 ± 98.1	NS
分娩時出血量 (g)*	441.8 ± 296.6	534.0 ± 317.1	NS
TE	TE-A 群 (n)	TE-BC 群 (n)	P 値
出生児数	22	26	
出生児体重 (g)*	3121.2 ± 224.9	2943.9 ± 361.2	P < 0.05
胎盤重量 (g)*	589.2 ± 73.2	556.2 ± 101.4	NS (P=0.21)
分娩時出血量 (g)*	502.1 ± 280.6	471.2 ± 330.9	NS

* : mean ± S.D. NS : not significant

表 3-2 融解群における, ICM, TE それぞれのグレード別での出生児平均体重, 平均胎盤重量の比較

ICM	ICM-A 群	ICM-BC 群	P 値
出生児数	57	38	
出生児体重 (g)*	3237.8 ± 409.4	3178.8 ± 374.1	NS
胎盤重量 (g)*	600.1 ± 99.8	601.3 ± 105.9	NS
分娩時出血量 (g)*	601.1 ± 395.9	649.7 ± 344.8	NS
TE	TE-A 群	TE-BC 群	P 値
出生児数	51	44	
出生児体重 (g)*	3269.1 ± 384.2	3150.5 ± 401.5	NS(P=0.14)
胎盤重量 (g)*	618.0 ± 98.7	580.3 ± 102.5	NS(P=0.07)
分娩時出血量 (g)*	641.3 ± 402.1	595.1 ± 344.3	NS

* : mean ± S.D. NS : not significant

要であると報告している。さらに、TEの評価が下がるにつれ、妊娠高血圧症候群の頻度が増加する傾向があるとの報告もあり⁵⁾、着床まではもちろんのこと、その後の妊娠、胎児の発育、分娩経過にもTEのグレードが深く関わっている可能性がある。

今回の我々の検討からもICMよりTEのグレードが出生児の体重に影響を及ぼしていることが示唆された。また、凍結融解胚由来の児で新鮮胚由来の児より出生体重が増加することから、凍結・融解の過程を経ることが出生児の体重増加の一因となることが推察される。新鮮胚由来の児においてはTEのグレードが良好な胚由来でより出生時体重が増加したが、凍結融解胚由来の児においてTEのグレードによる出生時体重の差が認められなかったことから、凍結・融解による影響を受ける程度が胚により異なっている可能性も推察される。

出生児の体重については、新鮮胚と比較して凍結融解胚で増加することが近年多く報告されている²⁻⁴⁾。凍結融解胚由来の児の発育調査によると、6歳までの身体的、運動的発育には新鮮胚由来の児と差がないと報告されており⁷⁾、このことから、凍結融解操作が出生後の児の発育へ及ぼす影響は少ないと考えられる。しかし、凍結融解胚盤胞由来の妊娠では分娩時の出血量が多くなるとの報告もあり⁸⁾、今回我々の検討においても同様の結果が得られた。

凍結、融解といった体外操作の過程で、胚にいつ、どのような影響を与えられているのかは不明であるが、分娩時の出血傾向、胎児の体重に関してみると、胎盤へと分化していくTEの細胞により強い影響を与えられている可能性がある。

今回の検討は、当院での分娩症例かつ正常産のみを対象としており、基本的にはリスクの低い症例での検討となっている。移植胚のグレード別、妊娠週数を加味したデータなど、細かく検討していくためには対象を拡大し、データを増やしていくことが不可欠となる。ARTにおける安全性を確立するためにも、胚の評価と分娩予後までの関連を検討し、更にエピジェネティックな問題も含めて今後データの蓄積をしていくことが重要と考える。

参考文献

- 1) 沖津 摂・高橋沙織・森脇良夢・小橋未和・清川麻知子・小田隆司・三宅 馨：初期胚の体外培養期間の延長がART出生児の体重および性比に及ぼす影響。日受精着床会誌，27：281-285，2010。
- 2) 角本知世・片岡信彦・緒方洋美・十倉陽子・山田 聡・緒方誠司・水澤友利・松本由紀子・岡本恵理・苔口昭次・塩谷雅英：凍結融解胚移植と新鮮胚移植により妊娠し出生した児の比較

検討。日IVF会誌，15：7-9，2012。

- 3) 溝部大和・福嶋倫子・秋吉俊明・南 志穂・松尾 完・山口敦巳・岡本純英：新鮮胚移植および保存胚移植により妊娠し出生した児の比較検討。日受精着床会誌，30：265-267，2013。
- 4) Pelkonen, S., Koivunen, R., Gissler, M., Nuojua-Huttunen, S., Suikkari, A.-M., Hyden-Granskog, C., Martikainen, H., Tiitinen, A., Hartikainen, A.-L.: Perinatal outcome of children born after frozen and fresh embryo transfer : the Finish cohort study 1995-2006. Hum. Reprod., 25: 914-923, 2010.
- 5) 俵 史子・石井美都・平林由佳・金山尚裕：胚盤胞の評価と妊娠合併症、出生児との関係。日受精着床会誌，25：199-203，2008。
- 6) Ahlström, A., Westin, C., Reimer, E., Wikland, M., Hardarson, T.: Trophoctoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. Hum. Reprod., 26: 3289-3296, 2011.
- 7) 澁谷ゆり・西中千佳子・中條友紀子・京野廣一：アンケートによる凍結胚移植児の発育調査。日受精着床会誌，27：297-303，2010。
- 8) Wikland, M., Hardarson, T., Hillensjö, T., Westin C., Westlander G., Wood M., Wennerholm U.B: Obstetric outcomes after transfer of vitrified blastocysts. Hum. Reprod., 25: 1699-1707, 2010.