

ISSN 1881-9028

# 日本IVF学会雑誌

Vol.20 No.1

2017



## 論文

### —原著—

- 受精障害に対する rescue-ICSI の培養成績及び胚移植成績について ..... 3  
古橋 孝祐, 矢田 桃子, 辻 優大, 大月 純子, 岩崎 利郎, 伊藤 宏一, 水澤 友利, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英  
英ウィメンズクリニック

### —原著—

- アンチミュリアンホルモン (AMH) 低値症例における年齢階層別 ART 継続成績 ..... 8  
國島 温志<sup>1,2</sup>, 安藤 寿夫<sup>1</sup>, 松尾 聖子<sup>1,2</sup>, 鈴木 範子<sup>1</sup>, 北見 和久<sup>1,2</sup>, 池田 芳紀<sup>1,2</sup>, 梅村 康太<sup>2</sup>, 岡田 真由美<sup>2</sup>, 河井 通泰<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> 豊橋市民病院 総合生殖医療センター  
<sup>2</sup> 同 産婦人科

### —原著—

- ICSI 後の 1PN 由来胚が妊娠に至らない原因の探索 ..... 13  
井頭 千明, 大月 純子, 古橋 孝祐, 片田 雄也, 辻 優大, 岩崎 利郎, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英  
英ウィメンズクリニック

### —原著—

- 高齢患者の少数採卵症例における紡錘体可視化と胚発育 ..... 18  
松本 由香<sup>1</sup>, 佃 笑美<sup>1</sup>, 佐藤 学<sup>1</sup>, 橋本 周<sup>1</sup>, 中岡 義晴<sup>1</sup>, 森本 義晴<sup>2</sup>  
<sup>1</sup> IVFなんばクリニック  
<sup>2</sup> HORACグランフロント大阪クリニック

### —原著—

- 2 種類の精子調整法における培養成績の比較 - 2 種類の精子調整法について ..... 21  
横田 梨恵, 古橋 孝祐, 辻 優大, 大月 純子, 伊藤 宏一, 水澤 友利, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英  
英ウィメンズクリニック

|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| <b>第20回 日本IVF学会学術集会 開催概要</b> .....       | 25 |
| <b>日本IVF学会会雑誌発行における投稿論文募集のお知らせ</b> ..... | 26 |
| <b>日本IVF学会雑誌 投稿規定</b> .....              | 27 |
| <b>一般社団法人 日本IVF学会 定款</b> .....           | 29 |
| <b>一般社団法人 日本IVF学会 役員</b> .....           | 35 |
| <b>編集委員会</b> .....                       | 36 |

# 受精障害に対する rescue-ICSI の培養成績 及び胚移植成績について

古橋 孝祐, 矢田 桃子, 辻 優大, 大月 純子, 岩崎 利郎, 伊藤 宏一, 水澤 友利,  
松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英

英ウィメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町 1-1-2 三宮セントラルビル

**要 旨：** IVF周期において受精障害を回避するため、採卵当日にrescue-ICSI(以下r-ICSI)を実施したので報告する。2012年6月から2014年12月までに回収卵数が4個以上のIVF2,547周期をr-ICSIの対象とした。r-ICSI群の受精率は81.3%と通常ICSI(c-ICSI)群の75.1%より有意に高く、r-ICSI後の3PN率は5.3%であり、c-ICSI群の2.8%より有意に高かった。

受精率0%の頻度はr-ICSI導入前0.8%であったが、r-ICSI導入後0.1%と低くなった。またr-ICSI, c-ICSI胚の凍結融解単一胚盤胞移植1,526周期の臨床妊娠率、生児獲得率はr-ICSI 43.4%, 26.4%, c-ICSI 38.8%, 28.1%で妊娠率、生児獲得率に有意差はなかった。以上の結果からr-ICSIは臨床上有用であると考えられた。

**キーワード：**rescue ICSI, ICSI, 受精障害, 低受精率

## 緒 言

IVFを施行する場合、精液所見が良好であるにもかかわらず完全受精障害が2～3%程度の割合で発生し<sup>1)</sup>、またIVF後に原因不明の低受精率が10～20%の頻度で発生する<sup>2)</sup>。これは予測する事が困難であるため、完全受精障害を回避するため採取した卵子をIVFとICSIに分けて受精させるSplit ICSIが広く臨床応用されている。しかしながらSplit ICSIでは、本来ICSIを必要としなかった患者にもICSIを実施する可能性を否定できず、また、IVFとICSIの胚発生を比較するとIVF胚の方が、胚発生が良好であるという報告も見られる<sup>3-6)</sup>。

日本産科婦人科学会の見解として、ICSIの適応は「男性不妊や受精障害など、本法以外の治療によっては妊娠の見込みが極めて低いと判断される夫婦のみを対象」<sup>7)</sup>としている。当院ではIVFでの低受精率を可及的に避け、かつIVFにて受精可能な独自の適応所見を設定することを目的に、過去に橋本<sup>8)</sup>らがIVFにて受精率が30%以上を獲得するための精液所見について、さらに北風<sup>9)</sup>らがSQA-V(Medical Electronic Systems Ltd., Israel)によるSMI(Sperm Motility Index)値も加え、IVF・ICSI・Split ICSIの適応基準を定義した(表1)。当院ではこの基準に沿って受精方法を選択しているが、それでもなお発生する完全受精障害をより効果的に回避する方法を模索した結果、2012年6月より採卵当

日に実施するrescue ICSI(以下r-ICSI)を導入した。その後、当院では後藤<sup>10)</sup>らによりr-ICSI導入後の培養成績について報告を行った。しかしながら、先の検討ではr-ICSI導入直後(n=712周期)ということもあり、r-ICSI由来胚の移植後の成績について症例数が限られていたため、胚移植成績についての評価は十分ではなかった。その後r-ICSI症例数が増加し(n=2,547周期)、移植対象胚も増えたことから、今回我々はr-ICSI由来胚の移植後の臨床妊娠率について解析を行ったのでここに報告する。

表1 当院におけるIVFの適応基準

|       |                          |
|-------|--------------------------|
| 精子濃度  | 20 × 10 <sup>6</sup> /ml |
| 精子運動率 | 20%以上                    |
| 運動精子数 | 10 × 10 <sup>6</sup> /ml |
| SMI   | 50以上                     |

## 対象と方法

### 1. 対象

2012年6月から2014年12月までにr-ICSIについて説明を行い、同意が得られた媒精卵数4個以上のIVF適応2,547周期(22,347個)を対象として後方視的に検討を行った。媒精4時間又は6時間後の第Ⅱ減数分裂中期(MⅡ)卵に対する第2極体放出卵の割合(%)を基

準にr-ICSI の適応を判断した。また、同期間における回収卵子数4個以上のconventional-ICSI（以下c-ICSI）が適応とされた1,527周期(9,959個)を比較対象として、検討期間内の計4,074周期について培養成績を検討した。そして、その後の妊娠成績の比較としてr-ICSI胚、c-ICSI胚の凍結融解単一胚盤胞を移植した1,526周期について胚移植後の転帰を解析した。

## 2. 採卵, 精子調整, 媒精, r-ICSI 及び培養方法

卵巣刺激法は、原則としてlong protocol, short protocolまたはantagonist protocolを用い、poor responderの症例やmild stimulationを希望する症例には自然周期, またはクロミフェンあるいはレトロゾールを使用した。採卵から3-5時間後、単層密度勾配法を用いて遠心分離した後にswim up法を用いて回収した運動良好精子を使用し媒精に供した。IVFにはUniversal IVF Medium (Origio, Denmark)を用いた。媒精4時間後に第2極体（以下2PB）放出により受精を予測し、2PBが確認できた卵が成熟卵数の30%以上であった場合はc-IVF群とした。2PBが成熟卵数の30%未満であった場合は、更に2時間後に観察し、その際に2PBが成熟卵数の30%以上であった場合はr-ICSIは不適応（c-IVF群に含む）とした。2PBが30%未満であった場合、2PBを放出している卵子およびその他の未熟な卵子、極体不明瞭な卵子にはr-ICSIを施行せずr-ICSI適応IVF群とし、2PBが確認できず、第1極体のみの卵子に対してICSIを施行した（r-ICSI適応ICSI群）。

c-ICSIは前培養後に顆粒膜を除去した卵子に、形態正

常な運動精子を用いて穿刺注入した(c-ICSI群) (図1)。受精判定は媒精18～20時間後に行い、global medium (Life Global, Canada) +10% HSA (Life Global, Canada) を用いて胚培養を行った。卵子、胚の培養は37℃, 5.5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 89.5%N<sub>2</sub>の気相条件下で培養を行った。

## 3. 胚盤胞凍結・融解胚移植

胚盤胞の凍結融解には当院で作成した凍結融解液を使用した。融解後、移植に用いるまで10%HSA (LifeGlobal, Canada) 添加global medium (LifeGlobal, Canada) にて回復培養を行い、その後、凍結融解単一胚盤胞移植を行った。

## 4. 分割期胚及び胚盤胞の形態学的評価

分割期胚の評価はVeeckの分類<sup>11)</sup>を用いて行い、Day2時、Grade 1, 2の4 cell及びGrade 3の5 cell以上の胚を良好分割期胚とした。また、胚盤胞の評価はGardnerの分類<sup>12)</sup>を用いて、Grade3BB以上を良好胚盤胞とした。

## 5. 評価項目

c-ICSI群、c-IVF群、r-ICSI適応IVF群および、r-ICSI適応ICSI群における受精率、3前核(3PN)率、分割率、良好分割胚率、D5胚盤胞発生率、D5良好胚盤胞率および凍結融解単一胚盤胞移植成績を比較検討した。胚盤胞発生率は採卵から5日目に胚盤胞への成長を認めた胚とした。

また、統計学的解析には $\chi^2$ 検定を用い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

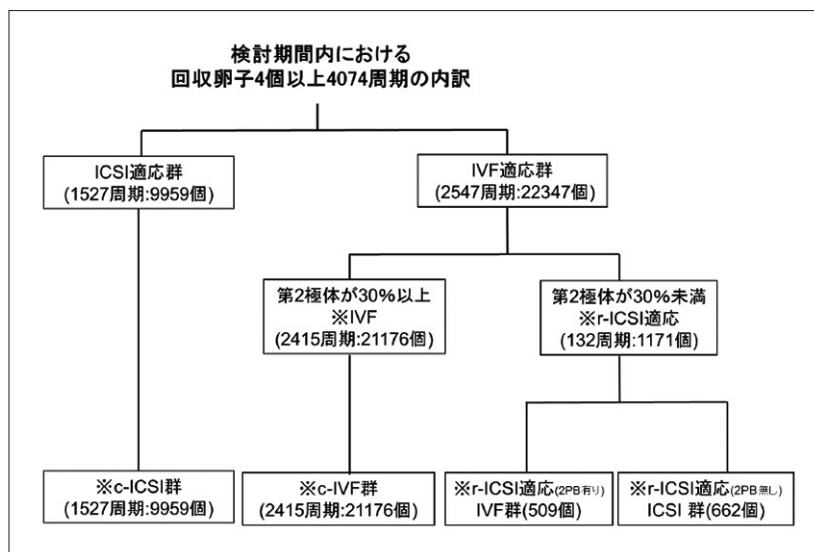


図1 検討期間内における回収卵子4個以上 4,074 周期の内訳

表2 各群における臨床成績

|                      | c-ICSI 群<br>(1527 周期)   | IVF 適応群(2547 周期)          |                            |                              |
|----------------------|-------------------------|---------------------------|----------------------------|------------------------------|
|                      |                         | 第2極体 30%以上(2415 周期)       | 第2極体 30%未満(132 周期)         |                              |
|                      |                         |                           | IVF 群<br>(r-ICSI 適応 IVF 群) | ICSI 群<br>(r-ICSI 適応 ICSI 群) |
| 受精率                  | 75.1%***<br>(7476/9959) | 76.9%***<br>(16290/21176) | 30.5%***<br>(155/509)      | 81.3%<br>(538/662)           |
| 3PN 率                | 2.8%*<br>(276/7476)     | 9.1%***<br>(14810/16290)  | 5.8%<br>(9/155)            | 5.3%<br>(35/662)             |
| 分割率                  | 91.0%<br>(6801/7476)    | 86.6%<br>(14110/16290)    | 84.5%<br>(131/155)         | 88.5%<br>(476/538)           |
| 良好分割胚率               | 48.1%***<br>(3272/6801) | 55.5%***<br>(7829/14110)  | 41.2%<br>(54/131)          | 37.0%<br>(176/476)           |
| 胚盤胞発生率<br>(D5 のみ)    | 35.4%**<br>(1859/5253)  | 50.8%***<br>(5642/11107)  | 51.9%***<br>(28/54)        | 27.2%<br>(104/382)           |
| D5 良好胚盤胞率<br>(D5 のみ) | 35.9%<br>(668/1859)     | 43.5%**<br>(2456/5642)    | 17.9%<br>(5/28)            | 28.8%<br>(30/104)            |

\*\*\*:p<0.001, \*\*:p<0.01, \*:p<0.05, ICSI 群(r-ICSI 適応 ICSI 群) vs. 他群

表3 各群における胚移植成績

|                | c-ICSI 胚            | rescue-ICSI 胚    |
|----------------|---------------------|------------------|
| 胚移植当たり化学妊娠率(%) | 62.0%<br>(914/1473) | 66.0%<br>(35/53) |
| 胚移植当たり臨床妊娠率(%) | 38.8%<br>(572/1473) | 43.4%<br>(23/53) |
| 臨床妊娠当たりの流産率(%) | 22.9%<br>(131/572)  | 26.1%<br>(6/23)  |
| 胚移植当たり生児獲得率(%) | 28.1<br>(414/1473)  | 26.4<br>(14/53)  |

※両群間に有意差なし

## 結 果

媒精4個以上のIVF適応群2,547周期の平均年齢は36.4±4.3歳, 平均採卵回数は2.0±2.2回であった。2,547周期のうち94.8%(2415/2547)は, 第2極体が30%以上確認できたためICSIは不必要と判断した(図1)。ICSIが不必要と判断し, c-IVFのみ実施した2,415周期の受精率は76.9%(16290/21176), 3PN率は9.1%(14810/16290), 分割率は86.6%(14110/16290), 良好分割胚率は55.5%(7829/14110), 胚盤胞発生率は50.8%(5642/11107), 良好胚盤胞率43.5%(2456/5642)であった(表2)。2,547周期のうち5.2%(132/2547)においては, 2PBの割合が媒精卵子中30%未満であったため, r-ICSIが必要な卵子があると判断した(図1)。2PBの割合が媒精卵子中30%未満でありr-ICSIの適応となるが, その中で2PBが確認されr-ICSIは不要と判断されたIVF群(r-ICSI適応IVF群)の受精率は30.5%(155/509), 3PN率は5.8%(9/155), 分割率は84.5%(131/155), 良好分割胚率は41.2%(54/131), 胚盤胞発生率は51.9%(28/54), 良好胚盤胞

率は17.9%(5/28)であった(表2)。また, 2PBが確認されずr-ICSIが必要と判断されたICSI群(r-ICSI適応ICSI群)の受精率は81.3%(538/662), r-ICSI後3PN率は5.3%(35/662), 分割率は88.5%(476/538), 良好分割胚率は37.0%(176/476), 胚盤胞発生率は27.2%(104/382), 良好胚盤胞率は28.8%(30/104)であった(表2)。2PBが媒精卵子中30%未満でありr-ICSIの適応となった, 132周期中41周期の31.1%(41/132)でr-ICSI実施卵子にのみ受精卵が得られた。この132周期の内訳として, 初回ART症例が59.1%(78/132), 2回目症例が18.2%(24/132), 3回目以降症例が22.7%(30/132)であった。また, r-ICSI導入後, 検討期間内において媒精卵数が4個以上の周期において, 受精卵が全く得られず治療キャンセルとなった周期は0.1%(3/2547)であった。

同期間におけるc-ICSI 1,527周期の平均年齢は37.3±4.4歳, 平均採卵回数は2.1±2.3回であった。c-ICSI群の受精率は75.1%(7476/9959), ICSI後3PN率は2.8%(276/7476), 分割率は91.0%(6801/7476), 良好分割胚率は48.1%(3272/6801), 胚盤胞発生率は35.4%(1859/5253), 良好胚盤胞率は35.9%(668/1859)であった(表2)。また, 凍結融解単一胚盤胞移植の妊娠成績としてr-ICSI由来胚53周期の臨床妊娠率は43.4%(23/53), 流産率は26.1%(6/23)であった。c-ICSI由来胚1473周期の臨床妊娠率は38.8%(572/1473), 臨床妊娠当たりの流産率は22.9%(131/572), 胚移植当たりの生児獲得率は28.1%(414/1473)であり臨床妊娠率, 流産率ともに両群間に有意な差は見られなかった(表3)。



## 考 察

今回、我々は先の後藤らの報告と同様に、媒精卵数が4個以上の症例で媒精6時間後に2PB放出の割合が30%未満の症例に限ってr-ICSIの対象とし、その後の胚発育並びに妊娠成績について同期間のc-ICSIと比較検討を行うことでr-ICSIの胚移植成績について解析を行うことを目的とした。本検討結果より、r-ICSIの適応になるが、2PBが確認されr-ICSI不要と判断した場合のIVF周期の受精率は30.5%であった。また、r-ICSIの適応であった31.1% (41/132) の周期でr-ICSI実施群にのみに受精卵が得られた。この132周期の中には、過去のIVF周期にて受精が確認されているIVF 2回目以降の症例も含まれており、r-ICSIを施行しなければ低受精率であったと考えられた症例も散見されたことから、事前にIVF後低受精率になる症例を見極める事は非常に困難であるという事が確認出来た。また、r-ICSIを導入して以降、検討期間内に回収卵子が4個以上のIVF周期において、受精率0%の頻度は0.1% (3/2547) であった。これはr-ICSI導入前 (2011年1月～12月) の0.8% (15/1826)<sup>13)</sup> から有意に減少する結果となった ( $p=0.0003$ )。また、芝原<sup>16)</sup> や山本<sup>17)</sup> らは全卵不受精のため起こり得る移植キャンセルを減らすためにr-ICSIは有効であったと報告をしている。今回の検討において、r-ICSI後の3PN率 (5.3%) はc-ICSI後の3PN率 (2.8%) と比較し、有意 ( $p<0.05$ ) に上昇するという先の後藤らの検討とは異なった結果となった。しかしながら、r-ICSIを実施することで完全受精障害又は低受精率であったと考えられた症例を救済することができた。また、r-ICSI後の3PN胚作出の割合について、芝原<sup>14)</sup> らは3PN率4.6%、平林<sup>15)</sup> らは5.3%と我々と同程度の割合であったという報告をしている。

Nagy<sup>18)</sup> やYuzpe<sup>19)</sup> らはr-ICSIはc-ICSIと比較し、ICSIを実施するタイミングが遅れることによる卵子のagingから生じる胚発育又は妊娠継続率の低下を報告している。一方でChen<sup>20)</sup> らは媒精6時間後のrescue ICSIの臨床妊娠率は48%であったという報告をしており、また平林<sup>15)</sup> らはr-ICSI後の妊娠率はc-ICSIと比較し、有意な低下は見られなかったと報告をしている。今回我々はr-ICSI由来胚盤胞とc-ICSI由来胚盤胞における凍結融解単一胚移植 ( $n=1,526$  周期) の検討を行った結果、臨床妊娠率及び流産率、並びに生児獲得率において両群間に有意な差は認められなかったという平林<sup>15)</sup> らと同様の結果が得られた。以上の結果より、採卵当日のr-ICSIは臨床上有効であると考えられた。

## 参 考 文 献

- 1) Mahutte NG, Arici A: Failed fertilization: is it predictable? *Curr Opin Obstet Gynecol*, 15: 211-218, 2003.
- 2) Kuczynski W, Dhont M, Grygoruk C, Pietrewicz P, Redzko S, Szamatowicz M: Rescue ICSI of unfertilized oocytes after IVF. *Hum Reprod*, 17: 2423-2427, 2002.
- 3) Schoolcraft WB, Gardner DK, Phil D, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR: Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*, 72: 604-609, 1999.
- 4) Shoukir Y, Chardonnens D, Campana A, Sakkas D: Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum Reprod*, 13: 1632-1637, 1998.
- 5) Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, Ignoul-Vanvuchelen R, Bergers-Jansen J M, Derhaag JG, Geraedts JP, Evers JL: Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15: 402-409, 2000.
- 6) 芝原隆司・深作悠・箕浦博之: split ICSIにおけるconventional IVFとICSIの胚発生と着床能の比較。日受精着床会誌, 25: 73-76, 2008.
- 7) 日本産科婦人科学会会告: 顕微授精法の臨床実施に関する見解。日産婦誌, 44: 129-130, 1992.
- 8) 橋本洋美・後藤栄・坪内美紀・泉陽子・吉村由香理・笠原優子・塩谷雅英: 精液所見における当院のsplit ICSIの適応。J Mamm Ova Res, 21: 209-213, 2004.
- 9) 北風桃子・後藤栄・橋本洋美・松永雅美・若口昭次・塩谷雅英: Sperm Motility Index (SMI) によるsplit ICSI適応基準。J Mamm Ova Res, 25: s34, 2008.
- 10) 後藤優介・緒方洋美・古橋孝祐・片田雄也・角本知世・梶原綾乃・十倉陽子・山田聡・緒方誠司・水澤友利・松本由紀子・岡本恵理・若口昭次・塩谷雅英: 受精障害に対するRescue ICSIの臨床的有効性の検討。日受精着床会誌, 31: 10-14, 2014.
- 11) Veeck LL: In: Atlas of the human oocyte and early couceptus, 2nd ed., pp 151-153, Williams & Wilkins Co, 1991.
- 12) Gardner DK and Schoolcraft WB: Towards Reproductive Certainty: Fertility & Genetics Beyond. Proceedings of the 11th World Congress on in Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics, pp 347-371, Carnforth Parthenon Press, 1999.
- 13) 古橋孝祐・緒方洋美・片田雄也・角本知世・梶原綾乃・十倉陽子・山田聡・緒方誠司・水澤友利・松本由紀子・岡本恵理・若口昭次・塩谷雅英: 当院におけるレスキューICSIについて。J Mamm Ova Res, 30: S53, 2013.
- 14) 芝原隆司・深作悠・箕浦博之: rescue ICSIでの3PN率の低減方法 -卵の成熟度とPolyscopeを用いて-。日受精着床会誌, 27: 142-146, 2010.
- 15) Hirabayashi Y, Tawara F, Ishii M, Muramatsu H, Kanayama N: Evaluation of rescue ICSI on oocytes without extrusion of the second polar body in cases of moderately Disturbed Fertilization. J Mamm Ova Res, 23, 135-140, 2006.

- 16) 芝原隆司・深作悠・箕浦博之：媒精6時間後でのrescue ICSI. 日受精着床会誌, 26: 123-130, 2009.
- 17) 山本新吾・西山和加子・有馬薫・野見山真理・小島加奈子：媒精7時間後に行うrescue ICSIの有用性. 日受精着床会誌, 31: 5-9, 2014.
- 18) Nagy ZP, Rienzi LF, Ubaldi FM, Greco E, Massey JB, Kort HI: Effect of reduced oocyte aging on the outcome of rescue intracytoplasmic sperm injection. Fertil Steril, 85: 901-906, 2006.
- 19) Yuzpe AA, Liu Z, Fluker MR: Rescue intracytoplasmic sperm injection (ICSI)-salvaging in vitro fertilization(IVF) cycles after total or near-total fertilization failure. Fertil Steril, 73: 1115-1119, 2000.
- 20) Chen C, Kattera S: Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. Hum Reprod, 18: 2118-2121, 2003.



# アンチミュラリアンホルモン (AMH) 低値症例における 年齢階層別 ART 継続成績

國島 温志<sup>1,2</sup>, 安藤 寿夫<sup>1</sup>, 松尾 聖子<sup>1,2</sup>, 鈴木 範子<sup>1</sup>, 北見 和久<sup>1,2</sup>, 池田 芳紀<sup>1,2</sup>,  
梅村 康太<sup>2</sup>, 岡田 真由美<sup>2</sup>, 河井 通泰<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 豊橋市民病院 総合生殖医療センター, <sup>2</sup> 同 産婦人科 〒441-8570 愛知県豊橋市青竹町字八間西 50

**要 旨：** 卵巣予備能の新たな指標としてアンチミュラリアンホルモン (anti-Müllerian hormone; 以下, AMH) が注目を集めているが, AMH 低値症例での継続治療成績に関する研究は少ない. 今回, 当院で血中 AMH 値を測定した症例を対象とし, 年齢階層別, AMH 値別に採卵数, 妊娠率, 生産率, 初回妊娠に至るまでの採卵周期数などの関連を検討した. 採卵数は年齢に関係なく AMH 低値群で少なかった. 妊娠率・生産率は高年齢群ほど低下したが, AMH の影響は限定的であった. 低 AMH 群では妊娠に至るまでより多くの周期数が必要な傾向にあったが, 周期を重ねる毎に累積妊娠率が向上した. このように AMH は卵巣予備能を反映するが, 卵の質的低下と明らかな関連は認めず, AMH 低値症例でも卵子さえ得られれば治療を継続し周期を重ねることで妊娠率を向上させられた.

**キーワード：** AMH, アンチミュラリアンホルモン, 卵巣予備能, 高年妊娠

## 緒 言

近年, ART において血中アンチミュラリアンホルモン (anti-Müllerian hormone; 以下, AMH) 測定が普及しており, 卵巣予備能の有力な指標の一つとして活用されている<sup>1-5)</sup>. 卵巣内には胎児期をピークとして多数の原始卵胞があり, 加齢に伴い減少するが, 原始卵胞からリクルートされる胞状卵胞も加齢とともに減少するとされている<sup>1)</sup>. AMH は女性において出生後から閉経に至るまでの間, 主として二次卵胞の顆粒膜細胞から分泌されており, 血中濃度は二次卵胞数を反映すると考えられている<sup>2)</sup>. 従来より卵巣予備能の指標として, 年齢, 超音波検査で確認できる胞状卵胞数, 月経期の血中 FSH, inhibin B などがあるが<sup>3)</sup>, AMH は FSH と異なり月経周期による自然変動が少ないことも利点とされている<sup>5,6)</sup>. AMH は年齢とともに低下することがよく知られており<sup>7,8)</sup>, 一般に AMH 低値では採卵数が少なくなることが ART 治療において問題となっている<sup>5)</sup>. 40 歳以上においては AMH の低下は妊娠予後不良を反映するという報告もあるが<sup>2)</sup>, AMH の低い症例でも妊娠に至る例はありその関連性についてはいまだ明らかにはなっていない<sup>1)</sup>. しかしながら, 継続的に患者をフォローアップし, 年齢も加味した AMH 低値例の ART 治療経過を示した研究は稀有である. 本研究では, 継続して治療している女性が多く含まれる当院 ART 治療の

データベースを用いて初回採卵前後に AMH を測定した患者を対象とし, AMH 1.0 ng/mL を cut off 値として AMH 低値症例での ART における年齢階層別の採卵率や妊娠率, 初回妊娠に至るまでの採卵周期数などについて検討した.

## 対象と方法

当院では 1996 年より ART を行っており, 2013 年から ART 施行前の全例に AMH 測定を行い, 6 か月毎に再検している. AMH 検査法は, 2016 年 5 月までは AMH GenII 法 (ELISA 法)<sup>4)</sup>を採用し, エスアールエル (東京) に委託して 2 回測定の平均値が報告値となっていたが, 2016 年 6 月から外注業者がビー・エム・エル (東京) に変更されたのに伴いアクセス AMH 法 (CLEIA 法)<sup>9,10)</sup>を採用している. 本研究では, 当院 ART 治療データベースを用いて 2013 年 1 月～2016 年 5 月に AMH を測定し, かつ測定前後 18 ヶ月の間に初回採卵をおこなった患者を対象とし, AMH 1.0 ng/mL 未満だった症例 (以下, 低 AMH 群) と 1.0 ng/mL 以上 4.0 ng/mL 未満の症例 (以下, 対照群) を抽出して検討に用いた. 当院では AMH 測定を月経周期の任意の時期で行っているが, 主に 30 歳代以上女性において月経周期内変動が僅かにあることや<sup>11)</sup>, 同一患者の測定でも測定毎に値が上下することを考慮し, AMH 初回測定から 3 回目まで

受付 2017 年 1 月 21 日 / 受理 2017 年 5 月 16 日

責任著者: 國島 温志 e-mail [ kunishima-atsushi@toyohashi-mh.jp ]

に1回でもAMH 1.0 ng/mL未満だった患者をAMH低値群と定義した。事前に検討した結果、AMH 4.0 ng/mL以上では高年齢の患者が極端に少なくなるなど低AMH群との比較検討に適していないと判断し、本研究においては対照群を毎回の測定においてAMH 1.0 ng/mL以上4.0 ng/mL未満だった症例とした。

低AMH群の症例は88名384周期あり、初回採卵時点での患者年齢の中央値は39歳(28歳～48歳)であった。また、対照群の症例は138名282周期あり、初回採卵時点での患者年齢の中央値は36歳(26歳～44歳)であった。なお、妊娠(分娩・流産・異所性妊娠)した患者はそれぞれ独立した患者として解析した。ここでh群：AMH high群(AMH 1.0 ng/mL以上4.0 ng/mL未満)、l群：AMH low群(AMH 1.0 ng/mL未満)と定義する。また初回採卵時点での年齢階層別にI群：36歳未満、II群：36歳以上41歳未満、III群：41歳以上、とも定義した。この定義を用いるとII群：20名63周期、I h群：65名123周期、II l群：35名140周期、II h群：58名107周期、III l群：33名181周期、III h群：15名52周期となる(表1)。各サブグループにおける平均年齢は、II群32.6歳、I h群32.3歳、II l群37.9歳、II h群37.9歳、III l群42.6歳、III h群42.3歳であった。各サブグループにおける平均AMHは、II群0.51、I h群2.63、II l群0.39、II h群2.54、III l群0.37、III h群2.23であった。以上の各群の詳細を表2に示した。

表1 AMH 値別、年齢群別のサブグループの設定

|                                   | 36歳未満 | 36歳以上41歳未満 | 41歳以上  |
|-----------------------------------|-------|------------|--------|
| 低AMH群<br>(1.0ng/mL未満)             | II l群 | II l群      | III l群 |
| 対象群<br>(1.0ng/mL以上<br>4.0ng/mL未満) | I h群  | II h群      | III h群 |

表2 サブグループの患者背景

|                  | II l        | I h           | II l          | II h         | III l         | III h       |
|------------------|-------------|---------------|---------------|--------------|---------------|-------------|
| 症例数              | 20          | 65            | 35            | 58           | 33            | 15          |
| 周期数<br>(症例あたり)   | 63<br>(1-6) | 123<br>(1-12) | 140<br>(1-19) | 107<br>(1-5) | 181<br>(1-17) | 52<br>(1-9) |
| 平均年齢<br>(歳)      | 32.6        | 32.3          | 37.9          | 37.9         | 42.6          | 42.3        |
| 平均AMH<br>(ng/mL) | 0.51        | 2.63          | 0.39          | 2.54         | 0.37          | 2.23        |

※各年齢群における有意差なし

AMH：アンチミュリアリンホルモン

採卵のための刺激法は、個別化調節卵巣刺激法(以下、iCOS)により行い、各患者各周期毎に不妊因子や種々のデータにより総合的に検討してGnRHアゴニスト法やGnRHアンタゴニスト法、FSH/HMG、クロミフェン(以下、CC)、アロマターゼ阻害薬(以下、AI)、CC+FSH/HMG、AI+FSH/HMGなどを選択した。各サブグループの周期毎の調節卵巣刺激法は、II l群でアゴニスト法13周期(long:5,short:4,ultra long:3,ultra short:1)、アンタゴニスト法28周期、その他(CC, AI, FSH/HMGなど)22周期、I h群でアゴニスト法65周期(long:35,short:13,ultra long:16,ultra short:1)、アンタゴニスト法46周期、その他12周期、II l群でアゴニスト法11周期(long:7,short:3,ultra long:1,ultra short:0)、アンタゴニスト法65周期、その他64周期、II h群でアゴニスト法57周期(long:32,short:15,ultra long:10,ultra short:0)、アンタゴニスト法39周期、その他11周期、III l群でアゴニスト法10周期(long:1,short:8,ultra long:0,ultra short:1)、アンタゴニスト法69周期、その他102周期、III h群でアゴニスト法12周期(long:6,short:5,ultra long:1,ultra short:0)、アンタゴニスト法31周期、その他9周期であった(表3)。有意差検定には以下の図1、図2にはMann-Whitney U検定、図3、図4には $\chi^2$ 検定を用いた。

表3 各サブグループにおけるiCOS 周期数

|       | Long法 | Short法 | Ultra long法 | Ultra short法 | アンタゴニスト法 | その他 |
|-------|-------|--------|-------------|--------------|----------|-----|
| II l  | 5     | 4      | 3           | 1            | 28       | 22  |
| I h   | 35    | 13     | 16          | 1            | 46       | 12  |
| II l  | 7     | 3      | 1           | 0            | 65       | 64  |
| II h  | 32    | 15     | 10          | 0            | 39       | 11  |
| III l | 1     | 8      | 0           | 1            | 69       | 102 |
| III h | 6     | 5      | 1           | 0            | 31       | 9   |

※その他：FSH/HMG、クロミフェン(以下、CC)、アロマターゼ阻害薬(以下、AI)、CC+FSH/HMG、AI+FSH/HMGなど

## 結 果

低AMH群と対照群での比較において、周期あたりの平均採卵個数(変性卵を除いた正常卵数)はII l群3.03個/周期、I h群7.77個/周期、II l群2.01個/周期、II h群8.44個/周期、III l群1.72個/周期、III h群7.67個/周期であった(図1)。

妊娠に至った胚に由来する採卵周期での平均採卵個数はII l群3.78個(34/9)、I h群9.09個(418/46)、II l

群2.91個(32/11), IIh群10.5個(408/39), IIII群2.25個(9/4), IIIh群12.0個(48/4)であった(図2)。

患者あたりの妊娠率は, I I群45.0% (9/20), I h群70.8% (46/65), II I群31.4% (11/35), II h群67.2% (39/58), III I群12.1% (4/33), III h群26.7% (4/15)であった(図3)。

患者あたりの生産率は, I I群40.0% (8/20), I h群

58.5% (38/65), II I群22.9% (8/35), II h群31.0% (18/58), III I群3.0% (1/33), III h群6.7% (1/15)であった(図4)。

初回妊娠に至るまでに要した累積周期数を図5に示した。それぞれの群における平均周期数はII I群3.2周期, I h群1.61周期, II I群3.3周期, II h群2.26周期, III I群3.75周期, III h群1.5周期であった。

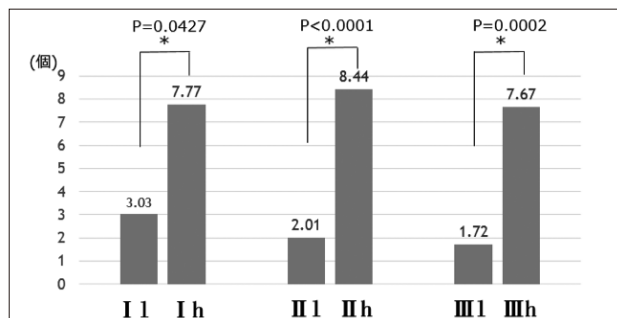


図1 周期あたりの平均採卵個数(変性卵を除いた正常卵数)のサブグループ間の比較

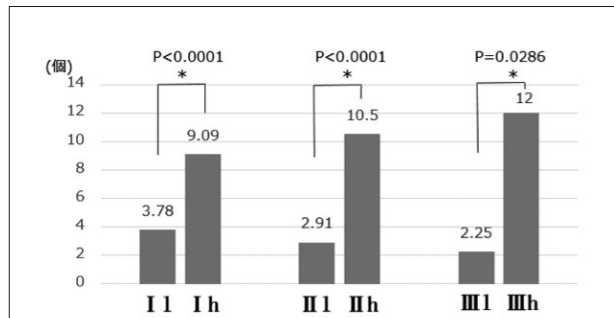


図2 妊娠に至った胚に由来する採卵周期での平均採卵個数のサブグループ間の比較

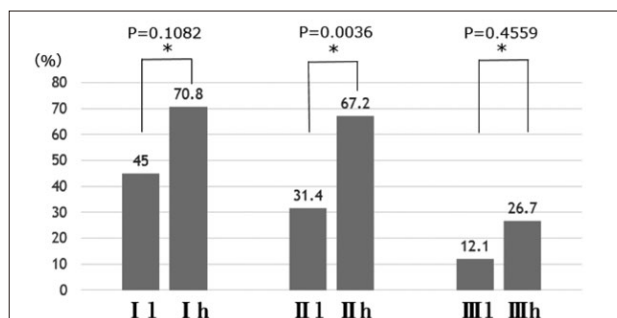


図3 患者あたりの妊娠率のサブグループ間の比較

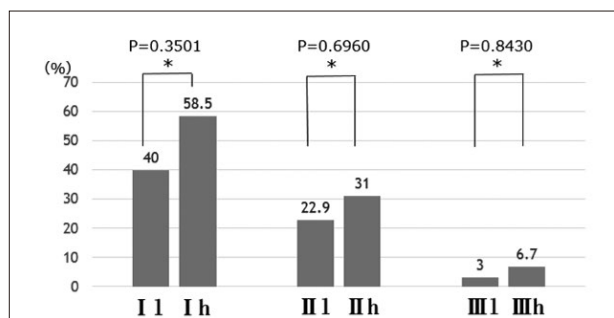


図4 患者あたりの生産率のサブグループ間の比較

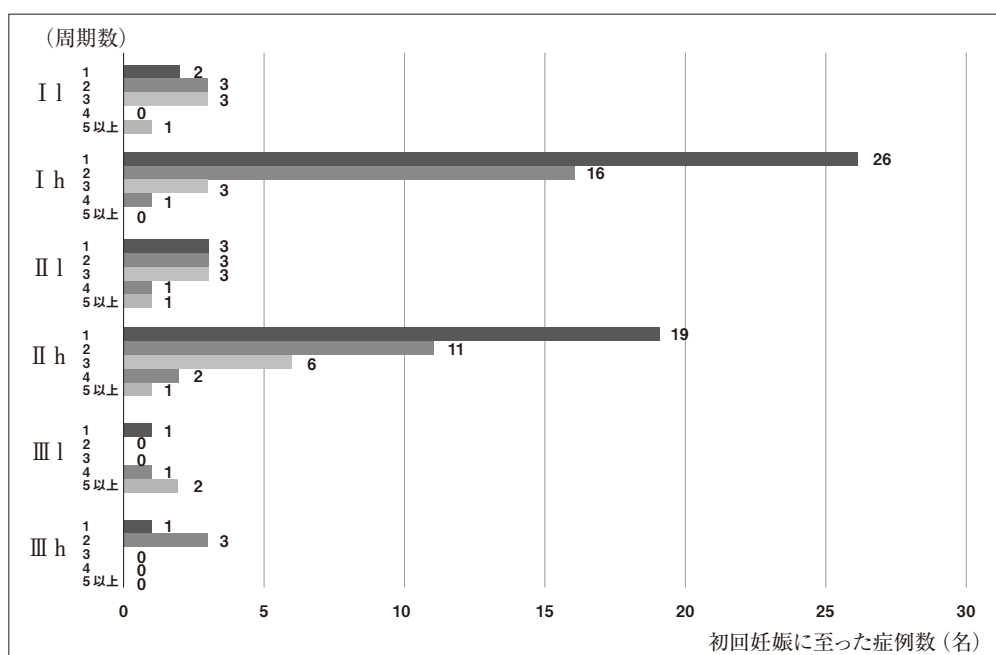


図5 初回妊娠に至るまでに要した周期数のサブグループ間の比較

## 考 察

今回の研究では、AMH低値女性で継続してARTを行った場合に低AMH群において、高年齢層で採卵個数は少なくなり、治療周期数が長くなる傾向にあった(図1・図5)。妊娠率は患者あたりでも周期あたりでも高年齢層において低下が見られた。低AMH群と対照群を比較したところ、両群とも加齢による妊娠率の低下を認めた。同一年齢群間の比較ではAMHの大小により採卵数の違いは明瞭だったが、妊娠率の違いは限定的であった(図1～図4)。初回妊娠までの周期数の比較では、低AMH群では周期を重ねるごとに徐々に妊娠率が上昇したが、対照群では1-2周期での妊娠率が高い一方、それ以上周期を重ねても妊娠率の上昇はあまりみられなかった(図5)。石井ら<sup>12)</sup>によりAMHが低い症例での調節卵巣刺激の有用性について報告があるが、当院では低AMH群ではアゴニスト法、アンタゴニスト法以外にも多様な刺激法を多く用いており、対照群ではアゴニスト法、特にlong法を多く用いていた。

Kedemらの報告<sup>13)</sup>では、AMH 0.2 ng/mL以上1.0 ng/mL未満の低値群とAMH 0.2 ng/mL未満の超低値群を比較して妊娠率に有意差は見られなかった。本研究中でAMH低値のcut off値を1.0 ng/mLとしたのは、臨床的にはAMHが1.0 ng/mLを下回った時に患者医療者双方が心理的にART継続を懸念し始める傾向があるからである。また、本研究で使用されたAMH GenII法(ELISA法)では測定下限値が0.10 ng/mLであり、低値における検査の信頼性が低いことなども考慮した。既に当院にも導入済の次世代検査法であるアクセスAMH法(CLEIA法)では測定下限値が0.02 ng/mLと向上しており低値における信頼性も高くなっているため、わが国のような高年齢女性患者が多い傾向にある母集団における、より低いcut off値での検討も今後は実施できると考えられる。

本研究では、我が国の現状を反映した30歳代後半から40歳代前半の自己卵によるARTにおいて、AMH値が低値であるというだけで挙児を諦めるといった結論ではなく、もともと年齢的に挙児の厳しい高年齢層においても適切なARTによって挙児を目指すことが可能であることを示唆する結果が得られた。AMH値が生産率と相関し妊娠予後を予測する可能性があるというLukaszukらの報告<sup>14)</sup>や、AMH値が卵巣刺激の応答不良の予測因子となるというMcIlveenらの報告<sup>15)</sup>があるが、本研究では各年齢層における低AMH群と対照群の間で生産率には有意差が認められず、低AMH群でも周期を重ねることで出産に至る症例も認められた。加齢など他のファクターを考慮する必要は勿論あるものの、

AMH低値のみを理由に妊娠を諦めるのではなく、適切なiCOSによって妊娠を期待できると思われた。

本研究の限界として、当院では地勢学的に独立して人口移動の少ない愛知県東三河圏内の患者のみにART治療を行っており転院患者が極めて少ないが、検討期間終了直前に治療を開始したためデータが不十分な患者も含まれていることや、Kaplan-Meier法等を用いて分析可能な超反復不成功例はごく一部にしか存在しないことが挙げられる。採卵刺激法がiCOSであることも継続治療を行うメリットにもなっているが、一方でデータ分析において結論を導き出す支障にもなっているとも考えられる。

今後の課題として、AMHのアッセイ法は発展途上であり、本稿でも述べた最新の測定法ではAMH低値症例の検査精度も向上してきていることから、新しいアッセイ法での研究が必要と思われる。

## 謝 辞

本論文の内容は2016年10月に神戸市で開催された第19回日本IVF学会学術集会での口演発表に内容を追加してまとめたものです。発表の機会を与えてくださった学術集会長の塩谷雅英先生ならびに理事長の森本義晴先生、座長の労をお取りいただきました浅田義正先生に深謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 土信田雅一・沢野知美・黒沢郁恵・木村恭子・藤森宏子・戸屋真由美・京野廣一：ARTによる卵巣反応性とAMH。産科と婦人科，78：941-946，2011。
- 2) 田島敏秀・後藤哲也・向田哲規・岡親弘・高橋克彦：当院の40歳以上の患者における血中AMH値とIVF妊娠予後との相関についての検討。日受精着床会誌，30：1-6，2013。
- 3) 下中麻奈美・鈴木望文・大川莉歩・榎本恵・中野成美・石井鈴奈・藤田陽子・庄田亜紀子・中尾佳月・堀川道晴・根岸広明：年齢からみた抗ミューラー管ホルモンと体外受精における臨床成績。日受精着床会誌，33：65-71，2016。
- 4) 藤本尚・神谷博文：新試薬AMH GEN II ELISAによる抗ミューラー管ホルモン測定～JISART他施設共同研究。日受精着床会誌，30：111-116，2013。
- 5) 佃笑美・井上朋子・橋本周・佐藤学・赤松芳恵・中岡義晴・森本義晴：AMHを考慮したART治療戦略。日受精着床会誌，32：98-103，2015。
- 6) La Marca A, Giulini S, Tirelli A, Bertucci E, Marsella T, Xella S, Volpe A : Anti-Müllerian hormone measurement on any day of the menstrual cycle strongly predicts ovarian response in assisted reproductive technology. Hum Reprod, 22: 766-771, 2007.
- 7) Seifer DB, Baker VL, Leader B: Age-specific serum anti-



- Müllerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril*, 95: 747-750, 2011.
- 8) Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP: Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131: 1-9, 2006.
  - 9) 柳田小百合・松本則之・森和雄：CLEIA法を用いたアンチミューリアンホルモン（AMH）測定試薬の基礎的検討. *医学と薬学*, 72: 1095-1101, 2015.
  - 10) Demirdjian G, Bord S, Lejeune C, Masica R, Riviere D, Nicouleau L, Denizot P, Marquet PY: Performance characteristics of the Access AMH assay for the quantitative determination of anti-müllerian hormone (AMH) levels on the Access family of automated immunoassay systems. *Clin Biochem*, 49: 1267-1273, 2016.
  - 11) Lambert-Messerlian G, Plante B, Eklund EE, Raker C, Moore RG: Levels of antimüllerian hormone in serum during the normal menstrual cycle. *Fertil Steril*, 105: 208-213, 2016.
  - 12) 石井鈴奈・鈴木望文・大川莉歩・榎本恵・中野成美・下中麻奈美・藤田陽子・庄田亜紀子・中尾佳月・堀川道晴・根岸広明：体外受精・胚移植における血中 Anti-Müllerian Hormone 低値症例（0.5 ng/ml 以上 1.1 ng/ml 未満）に対する調節卵巣刺激の有用性の検討. *日受精着床会誌*, 33: 6-10, 2016.
  - 13) Kedem A, Haas J, Geva LL, Yerushalmi G, Gilboa Y, Kanety H, Hanochi M, Maman E, Hourvitz A: Ongoing Pregnancy Rates in Women with Low and Extremely Low AMH Levels. A Multivariate Analysis of 769 Cycles. *PLoS One*, 8: e81629, 2013.
  - 14) Lukaszuk K, Liss J, Kunicki M, Jakiel G, Wasniewski T, Woclawek-Potocka I, Pastuszek E: Anti-Müllerian hormone (AMH) is a strong predictor of live birth in women undergoing assisted reproductive technology. *Reprod Biol*, 14: 176-181, 2014.
  - 15) McIlveen M, Skull JD, Ledger WL: Evaluation of the utility of multiple endocrine and ultrasound measures of ovarian reserve in the prediction of cycle cancellation in a high-risk IVF population. *Hum Reprod*, 22: 778-785, 2007.



# ICSI 後の 1PN 由来胚が妊娠に至らない原因の探索

井頭 千明, 大月 純子, 古橋 孝祐, 片田 雄也, 辻 優大, 岩崎 利郎,  
松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英

英ウィメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町 1-1-2 三宮セントラルビル

**要旨:** ICSI-1PN胚は、ほとんどの胚に染色体異常があり妊娠に至らないことが報告されている。本研究ではIVF-1PNおよびICSI-1PNの臨床成績の解析と、ICSI-1PNにおいて染色体異常率が高くなる原因模索のため、1PNの大きさに着目検討した。2011年1月～2015年12月に移植を行った9,733周期の臨床成績を解析し、2013年1月～2015年2月にタイムラプス観察を行った79個について1PN核面積をIVF、ICSI別に算出し比較検討を行った。臨床成績は、IVF胚において1PNと2PN間に有意差を認めなかった一方、ICSI-1PN胚からの妊娠は得られなかった。ICSI-1PNの平均核面積はIVF-1PNに比べ有意に小さかった ( $P=0.028$ )。本研究から、ICSI-1PN胚が妊娠に至らない原因は、ICSI時の紡錘体穿刺(吸引)による紡錘体の損傷と関連する可能性が考えられた。

**キーワード:** ICSI-1PN, IVF-1PN, 凍結胚盤胞移植, 核面積

## 緒言

生殖補助医療 (ART) を行うと、IVFおよびICSI後の受精判定時に前核を1個のみ認める胚 (以下1PN胚) を確認することがある。1PN胚の発生機序は一般的に、雌雄前核形成の非同期性<sup>1)</sup>、雌雄2前核の融合 (syngamy)<sup>2)</sup>、もしくは単為発生であると考えられている。1PN胚であっても、前二者が発生原因の場合は2倍体である可能性がある一方で、単為発生が原因の場合は1倍体である。IVFおよびICSI由来の1PN胚 (以下IVF-1PN及びICSI-1PN) の染色体解析を行った報告では、分割期胚および胚盤胞ともに2倍体の胚が存在することが明らかとなっている<sup>1,3,4)</sup>。1PN胚の2倍体の割合は、ICSI-1PN胚に比べIVF-1PN胚で高いこと<sup>5)</sup>、また、分割期胚で発生を停止した胚より胚盤胞まで発生した胚で高いこと<sup>3)</sup>が報告されている。さらに、胚盤胞まで発生した胚には1倍体の胚は存在しなかったとの報告がある<sup>3,6)</sup>。当院ではIVF学会 (第13回) にて、1PN胚であっても胚盤胞まで発生した胚であれば2倍体の胚が存在すること、IVF-1PN胚はICSI-1PN胚に比べ2倍体の割合が高いことを報告した<sup>7)</sup>。現在、当院での1PN胚の取り扱い方法は、基本的に胚盤胞まで培養し、胚盤胞まで発生した胚であれば移植可能な胚としている。施設により1PN胚を移植の対象としない場合もあるが、移植により児を得たという報告もある<sup>8-10)</sup>。しかしながら、IVF-1PN胚からの出産は多くの施設で経験するも、ICSI-1PN胚からの出産報告は少ない。

一方我々は、雌雄前核は核膜消失直前まで大きくなること、および出産に至った胚の雌雄前核消失直前の面積差が出産に至らなかった胚に比べ有意に小さいことを報告した<sup>11)</sup>。このことから、核面積と染色体量には相関がある可能性を考え、この仮説を基にICSI-1PNの染色体量異常と1PNの面積異常が関連するかを検討すると同時に、IVFおよびICSI由来1PN胚の妊娠成績解析を行うことで、ICSI-1PN胚において妊娠が得られない原因を模索することを目的とした。

## 対象と方法

### 1. 対象

#### 【1PN由来胚における臨床成績の解析】

2011年1月～2015年12月に凍結融解単一胚盤胞移植をした9,733周期の後方視的解析を行った。IVF-2PN由来胚盤胞を移植した6,852周期、ICSI-2PN由来胚盤胞を移植した2,760周期を対照とし、IVF-1PN由来の胚盤胞移植97周期、ICSI-1PN由来の胚盤胞移植24周期の臨床妊娠率、流産率、生児獲得率、先天異常率の比較検討を行った。1PN胚の移植は、2PN胚を優先し、移植可能な胚が1PN胚のみの場合に限り、移植を行うか患者と相談の上実施した。

#### 【1PNの面積比較】

2013年1月～2015年2月にタイムラプスにて培養を行った胚のうち、受精判定時に1PNが認められたIVF由来胚: 39個、ICSI由来胚: 40個の計79個を比較

対象とした。タイムラプスにて培養を行った症例は、年齢40歳未満および採卵回数3回以下のIVFおよびICSI施行卵数4個以上の患者を対象とした。

## 2. 採卵、精子調整、媒精、ICSIおよび培養方法

卵巣刺激法は、原則としてlong protocol, short protocolまたはantagonist protocolを用い、poor responderの症例やmild stimulationを希望する症例には自然周期やクロミフェン・フェマールを使用し、必要に応じてHMGを投与する等個別に対応した。卵胞発育とエストラジオール値をモニターしながら管理し、第二主席卵胞径が18mmを越えた時点でhCG 5,000単位またはgonadotropin releasing hormone agonist: GnRHa 300 $\mu$ gの点鼻を行い、36時間後に経膈超音波ガイド下にて採卵を行った。回収した卵子はUniversal IVF Medium (Origio a/s, Jyllinge, Denmark) 中で採卵から3～5時間の前培養を行った。精子は単層密度勾配法での遠心分離の後にswim up法を用いて運動良好精子を回収した。IVFは精子濃度を10万/mlに調整し媒精に供した。ICSIは前培養後に顆粒膜細胞を除去した卵子に、形態が正常な運動精子を不動化しマイクロマニピレータを装着した倒立顕微鏡 (OLYMPUS, IX-73) を用いて穿刺注入した。受精判定は媒精後18～20時間後に行い、global medium (Life Global, Canada) +10% HSA (Life Global, Canada) を用いて胚培養を行った。卵子、胚の培養は37 $^{\circ}$ C, 5.5% CO<sub>2</sub>, 5.0% O<sub>2</sub>, 89.5% N<sub>2</sub>の気相条件下で行った。

## 3. 胚盤胞凍結・融解胚移植

胚盤胞の凍結融解には当院で作成した凍結融解液を用いた。7.5% ethylene glycol (v/v, Sigma Aldrich, Germany: EG)+7.5% Dimethyl sulfoxide (v/v, Sigma Aldrich, Germany: DMSO) +20% Serum Substitute Supplement (v/v, Irvine Scientific, USA: SSS) 添加modified HTF (Irvine Scientific, USA: mHTF) を平衡化液とし、胚を10分間浸漬した。ガラス化液には15%EG+15% DMSO+20% SSS添加mHTFを用いた。平衡化した胚をガラス化液に投入し、Fストロー管0.25ml (FUJIIHRA Industry co., Ltd, Japan) の先端を斜めに切除した胚凍結用ストローの先端に少量のガラス化液とともに乗せ、直ちに液体窒素に投入した。ガラス化液に浸漬してから液体窒素投入までの時間を90秒以内とした。

胚の融解は、胚凍結用ストローを液体窒素から取り出し、直ちにストローの先端部を37 $^{\circ}$ Cに加温した1M Sucrose (Sigma Aldrich, Germany: Suc) +20% SSS

添加mHTFに1分間浸漬した。その後、室温の0.75M, 0.5M, 0.25M, 0.125M+20% SSS添加mHTFに、1.5分間、1.5分間、2.5分間、2.5分間と段階的に平衡化させ胚を移動した。その後、20% SSS添加mHTF中に5分間浸漬し融解を行い、移植に用いるまでglobal medium+10% HSAにて胚培養を行った。

黄体補充は、月経2日目よりエストラジオール添付剤の使用を開始し、15日目よりプロゲステロン膈座薬、16日目よりジドロゲステロン15mgを連日投与したホルモン補充周期と、排卵日に排卵後2, 5, 8日目よりhCG 3,000単位を筋肉内投与し、排卵後2日目よりプロゲステロン膈座薬投与、排卵後5日目よりエストラジオール添付剤を併用した自然周期にて行った。

胚移植は経膈超音波ガイド下にてファイコンIVFカテーテルI型 (Fuji Systems, Japan) 等のソフトカテーテルを用いて行った。

## 4. 胚盤胞の形態学的評価

胚盤胞の評価は、Gardnerの分類を用いて胚の発生段階をGrade1～6、内細胞塊 (inner cell mass: ICM) 形態をA～C、栄養外胚葉細胞 (trophectoderm: TE) 形態をA～Cに分類し、Grade3BB以上を良好胚盤胞、Grade3BB未満を不良胚盤胞とした。

## 5. 評価項目

超音波検査により子宮内に胎嚢が確認できたものを臨床妊娠とし、また、経過観察にて胎児に心拍が認められなかった症例、および心拍が認められるもその後心拍が消失した症例を流産とした。胎嚢が確認されるも、その後患者と連絡が付かず経過が不明の症例は、流産率、生児獲得率および先天異常率から除外し解析を行った。統計学的解析には $\chi^2$ 検定を用い、有意水準5%で有意差検定を行った。

## 6. タイムラプス観察システム

タイムラプス観察システムにはEmbryoScope<sup>®</sup> Time-lapse System (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) (以下、EmbryoScope) を使用した。内蔵カメラの設定は15分間隔、focal plane7の設定とした。IVF胚は採卵当日の媒精後4時間後に顆粒膜細胞を除去した後に培養を開始し、ICSI胚はICSI施行後に培養を開始した。受精判定までUniversal IVF Medium (Origio a/s, Jyllinge, Denmark) で培養を行い、受精判定後はglobal medium (Life Global, Canada) +10% HSA (Life Global, Canada) を用いて胚培養を行った。胚の培養は、無加湿、37 $^{\circ}$ C 6.0% CO<sub>2</sub>, 5.0% O<sub>2</sub>, 89.0% N<sub>2</sub>の気相条件下で行った。

## 7. 1PNの面積測定

EmbryoScopeの画像を用いて1PNの核直径の長辺と短辺を測定した(図1)。前核の大きさは前核消失直前まで増大することから、測定は前核消失の直前に行った。1PN面積( $\mu\text{m}^2$ )は楕円の公式より、長辺( $\mu\text{m}$ )/2×短辺( $\mu\text{m}$ )/2× $\pi$ を用いて算出した。

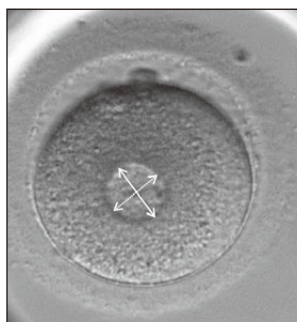


図1  
1PNの核直径  
矢印(実線, 点線)部分を測定

## 結 果

### 【1PN由来胚における臨床成績の解析】

胚移植あたりの臨床妊娠率は、IVF-1PN群: 40.2%、

IVF-2PN群: 43.0%, ICSI-1PN群: 0.0%, ICSI-2PN群: 38.2%であった。IVFにおける流産率はIVF-1PN群: 26.3%, IVF-2PN群: 23.4%, 生児獲得率はIVF-1PN群: 29.2%, IVF-2PN群: 32.7%, 先天異常率はIVF-1PN群: 4.2%, IVF-2PN群: 2.5%であり、いずれもIVF-1PN群とIVF-2PN群間に有意差を認めなかった(表1)。一方、ICSI-1PN群からの妊娠は得られず、臨床妊娠率はICSI-2PN群と比べ有意に低い結果となった( $P<0.001$ ) (表2)。IVFにおける良好胚盤胞に限定した臨床妊娠率は、IVF-1PN群: 60.0%, IVF-2PN群: 53.4%, 流産率はIVF-1PN群: 18.5%, IVF-2PN群: 21.8%, 生児獲得率はIVF-1PN群: 48.9%, IVF-2PN群: 41.6%, 先天異常率はIVF-1PN群: 5.3%, IVF-2PN群: 2.1%であった。IVFにおける不良胚盤胞に限定した臨床妊娠率は、IVF-1PN群: 23.1%, IVF-2PN群: 29.1%, 流産率はIVF-1PN群: 45.5%, IVF-2PN群: 27.3%, 生児獲得率はIVF-1PN群: 11.8%, IVF-2PN群: 21.0%, 先天異常率はIVF-1PN群: 0.0%, IVF-2PN群: 3.6%であり、良好胚盤胞と不良胚盤胞とに限定した臨床成績において、いずれもIVF-1PN群とIVF-2PN群間に有意差を認めなかった(表1)。

### 【1PNの面積比較】

1PNの平均核面積は、IVF-1PN群:  $720.8\mu\text{m}^2(\pm 114.4)$ 、

表1 IVF 胚における臨床成績

|       |       | IVF-2PN<br>(6852 周期) |                 | IVF-1PN<br>(97 周期) |             | 有意差 |
|-------|-------|----------------------|-----------------|--------------------|-------------|-----|
| 胚盤胞   | 臨床妊娠率 | 43.0 %               | ( 2944 / 6852 ) | 40.2 %             | ( 39 / 97 ) | NS  |
|       | 流産率   | 23.4 %               | ( 682 / 2914 )  | 26.3 %             | ( 10 / 38 ) | NS  |
|       | 生児獲得率 | 32.7 %               | ( 2232 / 6822 ) | 29.2 %             | ( 28 / 96 ) | NS  |
|       | 先天異常率 | 2.5 %                | ( 39 / 1542 )   | 4.2 %              | ( 1 / 24 )  | NS  |
| 良好胚盤胞 | 臨床妊娠率 | 53.4 %               | ( 2086 / 3906 ) | 60.0 %             | ( 27 / 45 ) | NS  |
|       | 流産率   | 21.8 %               | ( 450 / 2065 )  | 18.5 %             | ( 5 / 27 )  | NS  |
|       | 生児獲得率 | 41.6 %               | ( 1615 / 3885 ) | 48.9 %             | ( 22 / 45 ) | NS  |
|       | 先天異常率 | 2.1 %                | ( 24 / 1129 )   | 5.3 %              | ( 1 / 19 )  | NS  |
| 不良胚盤胞 | 臨床妊娠率 | 29.1 %               | ( 858 / 2946 )  | 23.1 %             | ( 12 / 52 ) | NS  |
|       | 流産率   | 27.3 %               | ( 232 / 849 )   | 45.5 %             | ( 5 / 11 )  | NS  |
|       | 生児獲得率 | 21.0 %               | ( 617 / 2937 )  | 11.8 %             | ( 6 / 51 )  | NS  |
|       | 先天異常率 | 3.6 %                | ( 15 / 413 )    | 0.0 %              | ( 0 / 5 )   | NS  |

表2 ICSI 胚における臨床成績

|       |      | ICSI-2PN<br>(2760 周期) |     | ICSI-1PN<br>(24 周期) |           | 有意差 |
|-------|------|-----------------------|-----|---------------------|-----------|-----|
| 臨床妊娠率 | 38.2 | % ( 1054 / 2760 )     | 0.0 | % ( 0 / 24 )        | $P<0.001$ |     |
| 流産率   | 24.1 | % ( 251 / 1043 )      | 0.0 | % ( 0 / 0 )         | -         |     |
| 生児獲得率 | 28.8 | % ( 792 / 2749 )      | 0.0 | % ( 0 / 24 )        | $P<0.01$  |     |
| 先天異常率 | 3.6  | % ( 20 / 552 )        | 0.0 | % ( 0 / 0 )         | -         |     |

ICSI-1PN群:  $666.4\mu\text{m}^2$  ( $\pm 105.2$ )であり, ICSI-1PN群の平均面積はIVF-1PN群に比べ有意に小さかった ( $P=0.028$ ) (表3).

## 考 察

本研究からIVF-1PN胚97個の移植により28人の児が得られた. IVF胚において, 臨床妊娠率, 流産率, 生児獲得率, 先天異常率は, 1PNと2PN間に有意差を認めなかった. さらに良好胚盤胞と不良胚盤胞別での臨床成績の比較検討においても, 全ての項目で有意差を認めなかった. 我々の研究結果は, IVF-1PN胚から児が得られたという報告<sup>8-10)</sup>と一致し, さらに1PN胚であっても胚盤胞まで発生した胚であれば, 形態に関わらず2PN胚と同等の生児獲得率が期待できることを示したが, ICSI-1PN胚からの妊娠例は得られなかった. この結果はItoiらの報告<sup>10)</sup>と一致したが, 一方でTsujiらによれば, ICSI-1PN胚の臨床妊娠率は21.4% (9/42)であり, さらに5人の児を得たことが報告されている<sup>12)</sup>. 本研究のICSI-1PN胚の移植数は24周期であり, Tsujiらの移植数と比較し少なく, さらにトリガーからICSIまでの時間の差が異なる為, Tsujiらの報告と異なったのではな

いかと推察した.

一方, 1PNの平均核面積の検討により, 1PNの核面積はIVF-1PN胚よりICSI-1PN胚で有意に小さいことが明らかとなった. Otsuらによれば, 1PN核直径 $29\mu\text{m}$ 以下の胚では胚盤胞へ発生しないこと, さらに, IVF胚において1PN核直径 $29\mu\text{m}$ 以上であった胚盤胞は, 染色体解析の結果全て2倍体であったことを報告している<sup>6)</sup>. また, MateoらはICSI-1PN胚の染色体解析と核面積の比較検討により, 平均核直径と平均核面積が, 2倍体胚では $30.5\mu\text{m}$ ,  $732.8\mu\text{m}^2$ , 1倍体胚では $27.9\mu\text{m}$ ,  $616\mu\text{m}^2$ と報告し, 染色体異常と核面積には有意差は認められなかったものの, 2倍体胚が1倍体胚に比べ核直径, 核面積が大きい傾向にあることを述べた<sup>13)</sup>. これらの報告では1PNの核面積が染色体異常に関与している可能性を示唆しており, さらに本研究の結果であるICSI-1PN胚から妊娠例が得られなかったことと, ICSI-1PN胚の核面積がIVF-1PN胚のものより有意に小さかったことから, 我々はICSI-1PN胚が妊娠に至らなかった原因が, 染色体配列の異常, あるいは紡錘体形成の異常に関与しているのではないかと推察した.

ICSIを施行する際, 第一極体を12時に固定した場合,

表3 1PNにおける核面積

|                        | IVF-1PN              | ICSI-1PN             | 有意差       |
|------------------------|----------------------|----------------------|-----------|
| 核面積( $\mu\text{m}^2$ ) | 720.8( $\pm 114.4$ ) | 666.4( $\pm 105.2$ ) | $P=0.028$ |

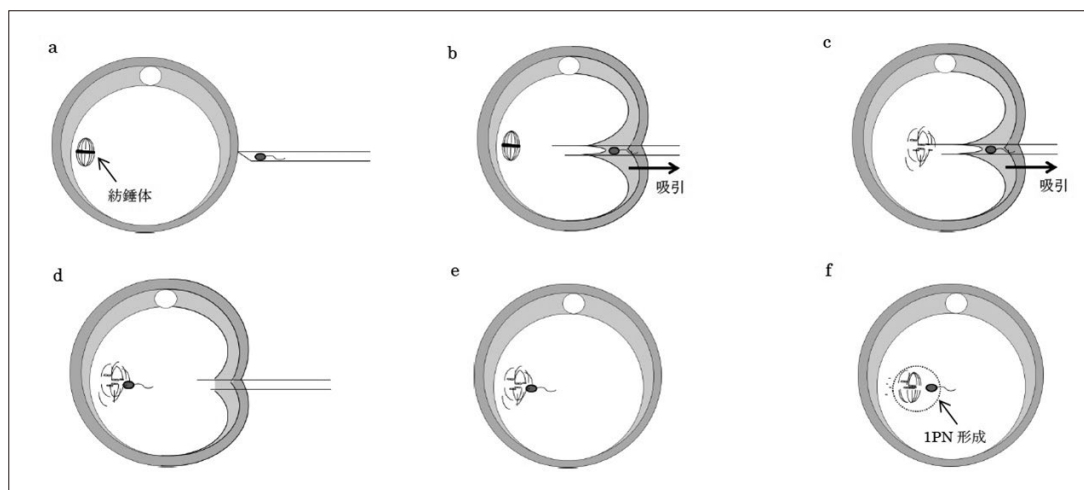


図2 紡錘体が第一極体付近にない卵子におけるICSIの模式図

- a: 第一極体を12時とした場合, 紡錘体が9時の位置に存在する卵子.
- b: 卵細胞質膜の穿破の為の吸引.
- c: 卵細胞質膜の穿破の為の吸引による, 紡錘体の損傷.
- d: 精子の注入.
- e: 損傷を受けた紡錘体付近での受精.
- f: 紡錘体の損傷による異数性異常のある1PNの形成.



通常3時の位置から穿刺を行う。これは紡錘体が第一極体付近に存在することから、紡錘体の損傷を避けるためである。しかし紡錘体を可視化した報告では、19%の卵子で穿刺位置に紡錘体が確認されたと述べられている<sup>14)</sup>。さらにICSIは、精子を卵子に注入するにあたりインジェクションニードルによって卵細胞質膜を穿破しなければならない。通常のICSIでは、卵細胞質膜を穿破するためにはインジェクションニードルによる卵細胞質膜の吸引が必須である。以上のことから、我々は、ICSI-1PN胚の発生原因として、紡錘体が第一極体付近にない卵子（第一極体を12時に固定した場合、9時の位置に紡錘体が存在する卵子：図2a）にICSIを施行した際の受精が関与しているのではないかと考えた。紡錘体が9時の位置に存在する卵子に精子を注入する場合、穿破の為に卵細胞質膜の吸引により、近傍に位置する紡錘体を含めて吸引し、これが原因で紡錘体を損傷する可能性がある。さらに精子を注入することで、損傷を受けた紡錘体の付近での受精が起こり、精子側の核膜と卵子側の核膜が一緒に形成され、異数性異常のある1PNが発生したのではないかと考えた（図2）。

本研究から、1PN胚であってもIVF由来かつ胚盤胞まで発生した胚であれば2PN胚と同等の生児獲得率を期待できることが示唆された。一方で、ICSI由来の1PN胚は出産例が報告されているものの、当院では胚盤胞へ発生しても妊娠例は得られなかった。今後ICSI-1PN胚を移植の対象に出来るかどうかさらに検討する必要がある。また、ICSI-1PN胚が妊娠に至らなかった原因の一つとして、紡錘体穿刺による紡錘体染色体複合体の損傷が関連するのではないかと示唆された。それゆえ、ICSIを行う際に紡錘体の位置を確認し、紡錘体の損傷を防ぐことで、1PNの発生を減らすことができるのではないかと推測した。

## 参考文献

- 1) Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, Van Steirteghem AC: Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocytes after in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 8: 221-223, 1993.
- 2) Levron J, Munne S, Willadsen S, Rosenwaks Z, Cohen J: Male and Female Genomes Associated in a Single Pronucleus in Human Zygotes. *Biol Reprod*, 52: 653-657, 1995.
- 3) Liao H, Zhang S, Cheng D, Yang Q, Lin G, Gu Y, Lu C, Gong F, Lu G: Cytogenetic analysis of human embryos and embryonic stem cells derived from monopronuclear zygotes. *J Assist Reprod Genet*, 26: 583-589, 2009.
- 4) Sultan KM, Munne S, Palermo GD, Alikani M, Cohen J: Chromosomal status of uni-pronuclear human zygotes following in-vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 10: 132-136, 1995.
- 5) Staessen C, Steirteghem V: The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 12: 321-327, 1997.
- 6) Otsu E, Sato A, Nagaki M, Araki Y, Utsunomiya T: Developmental potential and chromosomal constitution of embryos derived from larger single pronuclei of human zygotes used in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 81: 723-724, 2004.
- 7) 水田真平, 後藤栄, 橋本洋美, 黒田泰史, 松本由紀子, 水澤友利, 緒方誠司, 山田聡, 苔口昭次, 塩谷雅英: IVF および ICSI 後 1 前核が見られた胚の発生と胚盤胞における染色体解析. *日 IVF 会誌*, 2010.
- 8) Gras L, Trounson A: Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one pronucleus at the time of examination for fertilization. *Hum Reprod*, 14: 1869-1871, 1999.
- 9) Dasig D, Lyon J, Behr B, Milki A: Monozygotic Twin Birth After the Transfer of a Cleavage Stage Embryo Resulting from a Single Pronucleated Oocyte. *J Assist Reprod Genet*, 21: 427-429, 2004.
- 10) Itoi F, Asano Y, Shimizu M, Honma H, Murata Y: Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes. *J Assist Reprod Genet*, 32: 1401-1407, 2015.
- 11) Otsuki J, Iwasaki T, Tsuji Y, Katada Y, Sato H, Tsutsumi Y, Hatano K, Furuhashi K, Matsumoto Y, Kokeyuchi S, Shiotani M: Potential of zygotes to produce live births can be identified by the size of the male and female pronuclei just before their membranes break down. *Reprod Med Boiol*, 16: 200-205, 2017.
- 12) Tsuji H, Tokoro M, Fukunaga N, Asano E, Kounogi S, Asada Y: Clinical utility of monopronuclear zygotes obtained after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *ASRM*, 359-360, 2016.
- 13) Mateo S, Parriego M, Boada M, Vidal F, Coroleu B, Veiga A: In vitro development and chromosome constitution of embryos derived from monopronucleated zygotes after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, 99: 897-902, 2013.
- 14) 内山一男・菊池理仁・家田祥子・山下直樹・竹原祐志・貝嶋弘恒・加藤修: LC-Polscope による卵子紡錘体観察の有用性. *J Mamm Ova Res*, 25: 105-110, 2008.



# 高齢患者の少数採卵症例における紡錘体可視化と胚発育

松本 由香<sup>1</sup>, 佃 笑美<sup>1</sup>, 佐藤 学<sup>1</sup>, 橋本 周<sup>1</sup>, 中岡 義晴<sup>1</sup>, 森本 義晴<sup>2</sup>

<sup>1</sup>IVFなんばクリニック 〒550-0015 大阪府大阪市西区南堀江 1-17-28

<sup>2</sup>HORACグランフロント大阪クリニック 〒530-0011 大阪府大阪市北区大深町 3-1 グランフロント大阪タワー B 15F

**要旨:** Oosight™ Imaging Systemを用いて成熟卵子1,133個の紡錘体観察を行い、加齢による受精・胚発育の影響を検討した。紡錘体可視群では不可視群に比べ受精率が高く(80.2 vs. 54.8), 39歳以下:A群に比べて40歳以上:B群で紡錘体レターダンス(nm)が低く(1.64 vs. 1.54), 長径(μm)が長かった(12.2 vs. 13.3)。また、体内成熟卵の可視群ではB群でレターダンスが低く(1.63 vs. 1.54), 長径が長かった(12.2 vs. 13.3)が、受精率、移植可能胚率、胚盤胞到達率及び妊娠率に差は認めなかった。体内成熟卵の不可視群及び体外成熟卵の可視群・不可視群では年齢による差を認めなかった。採卵数が少ない高齢患者において貴重な卵子の利用率を上げるため、紡錘体観察による成熟判定を一つの指標とすることは有用と考えられた。

**キーワード:** Oosight™ Imaging System, 紡錘体, 成熟, 加齢

## 緒言

形態的な卵子の成熟判定は、第一極体の放出をもって判断している。しかし、第一極体の放出は第一減数分裂終期に起こり、第一極体の確認だけでその卵子が第二減数分裂中期であるかは不明である。卵子が受精可能な状態まで成熟するためには紡錘体の再形成が必要であり、第一極体放出直後は第一減数分裂終期であることに留意する必要がある。紡錘体可視化システムを用いて非侵襲的に紡錘体を観察することで、正確な成熟判定を行うことが可能となり、紡錘体可視と受精・胚発育との関連や加齢による紡錘体の伸長、面積増加などの形態変化が報告されている<sup>1,2)</sup>。特に高齢患者は得られる卵子が少なく、正確な成熟判定をすることで貴重な卵子の利用率を上げることができると期待される。そこで、本研究では、紡錘体可視と受精・胚発育への加齢の影響を調べるため、少数採卵症例において紡錘体観察と臨床成績を年齢別に比較検討した。

## 対象と方法

2013年2月から2016年6月にICSI施行前に紡錘体観察を行った446症例632周期の1,133個の成熟卵子を対象とした。採卵した卵子は37℃, 6% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>環境下で培養を行い、卵丘細胞除去は、80 IU/mL リコンビナントヒアルロニダーゼ(ICSI Cumulase®, Origio社)を用いて行った。第一極体放出が確認できた

卵子を、Oosight™ Imaging Systemを用いて紡錘体観察を行い、紡錘体の有無、紡錘体レターダンスおよび長径について解析を行った。紡錘体レターダンスとは、紡錘体を透過する光が微小管の複屈折性によって遅延して生じる光の差の距離を計測したもので、高度な分子配列を持つ紡錘体ではレターダンスが高くなる。

**検討1:** 年齢39歳以下と40歳以上に分け、紡錘体可視率、紡錘体レターダンス、長径、正常受精率、異常受精率、移植可能胚率(Day3にて5細胞以上、フラグメント25%未満)、胚盤胞到達率、臨床妊娠率を比較検討した。

**検討2:** 裸化処理時に成熟卵子であった体内成熟卵と、裸化処理時にMI卵子でICSI施行までに極体放出した体外成熟卵とに分け、39歳以下と40歳以上で紡錘体可視率、紡錘体レターダンス、長径、正常受精率、異常受精率、移植可能胚率、胚盤胞到達率、臨床妊娠率を比較検討した。

## 結果

紡錘体観察を行った成熟卵子1,133個のうち、可視群839個(74.1%), 不可視群294個(25.9%)であり、平均年齢はそれぞれ40.6歳と41.0歳で差はなかった。正常受精率は可視群で有意に高く(80.2 vs. 54.8, P<0.01), 異常受精率は可視群で有意に低かった(4.5 vs. 12.2, P<0.01)。

**検討1:** 紡錘体観察を行った卵子のうち39歳以下で成熟卵子は345個、40歳以上で788個であった。紡錘体

可視率は39歳以下で75.3%，40歳以上で73.6%と差はなかった。しかし，40歳以上で紡錘体レターダンスが有意に低下し（1.64 nm vs. 1.54 nm,  $P<0.01$ ），紡錘体長径が有意に伸長した（12.2  $\mu\text{m}$  vs. 13.3  $\mu\text{m}$ ,  $P<0.01$ ）。可視群，不可視群ともに，39歳以下と40歳以上で正常受精率，異常受精率，移植可能胚率，胚盤胞到達率，臨床妊娠率に差はなかった（表1）。

**検討2：**紡錘体観察を行った成熟卵子のうち体内成熟卵は1,027個，体外成熟卵は106個であった。体内成熟卵，体外成熟卵それぞれで，可視群と不可視群に分け，39歳以下と40歳以上で比較した結果を表2に示した。体内成熟卵の可視群では，40歳以上で紡錘体レターダンスが有意に低下し（1.63 nm vs. 1.54 nm,  $P<0.01$ ），紡錘体長径が有意に伸長した（12.2  $\mu\text{m}$  vs. 13.3  $\mu\text{m}$ ,  $P<0.01$ ）。体外成熟卵の可視群では，紡錘体レターダン

ス及び長径に年齢による差はなく，正常受精率，異常受精率，移植可能胚率，胚盤胞到達率および臨床妊娠率にも差はなかった。不可視群では体内成熟卵，体外成熟卵ともに年齢による差はなかった。

## 考 察

近年，Oosight<sup>TM</sup> Imaging Systemによって非侵襲的かつ短時間に卵子紡錘体観察を行うことで，より正確な成熟判定が可能になった。藤田らは紡錘体可視群では不可視群に比べて受精率が22.8%高くなると報告しており<sup>1)</sup>，本検討でも紡錘体可視群で不可視群に比べ受精率が25.4%高く同様の結果となった。また，加齢により紡錘体の形態は伸長するとの報告があり<sup>2)</sup>，本検討では，39歳以下と40歳以上の比較で紡錘体可視率

表1 紡錘体可視群・不可視群の年齢による比較

|        | 紡錘体可視群      |             | 紡錘体不可視群    |            |
|--------|-------------|-------------|------------|------------|
|        | 39歳以下       | 40歳以上       | 39歳以下      | 40歳以上      |
| 成熟卵数   | 259         | 580         | 86         | 208        |
| 正常受精率  | 82.2        | 79.3        | 48.8       | 57.2       |
| 異常受精率  | 3.9         | 4.8         | 9.3        | 13.5       |
| 移植可能胚率 | 74.9        | 76.8        | 70.0       | 72.5       |
| 胚盤胞到達率 | 62.5(30/48) | 54.4(31/57) | 33.3(1/3)  | 40.0(6/15) |
| 臨床妊娠率  | 20.3(16/79) | 9.4(5/53)   | 30.8(4/13) | 6.7(1/15)  |

n.s.

表2 体内成熟卵と体外成熟卵の年齢による比較

|                        | 体内成熟卵             |                   |            |            | 体外成熟卵      |          |          |          |
|------------------------|-------------------|-------------------|------------|------------|------------|----------|----------|----------|
|                        | 可視群               |                   | 不可視群       |            | 可視群        |          | 不可視群     |          |
|                        | 39歳以下             | 40歳以上             | 39歳以下      | 40歳以上      | 39歳以下      | 40歳以上    | 39歳以下    | 40歳以上    |
| 成熟卵数                   | 251               | 553               | 58         | 165        | 8          | 27       | 28       | 43       |
| 紡錘体レターダンス(nm)          | 1.63 <sup>a</sup> | 1.54 <sup>b</sup> | —          | —          | 1.77       | 1.54     | —        | —        |
| 紡錘体長径( $\mu\text{m}$ ) | 12.2 <sup>a</sup> | 13.3 <sup>b</sup> | —          | —          | 11.6       | 11.7     | —        | —        |
| 正常受精率                  | 82.9              | 80.5              | 55.2       | 62.4       | 62.5       | 55.6     | 35.7     | 37.2     |
| 異常受精率                  | 4.0               | 4.5               | 13.8       | 14.5       | 0.0        | 11.1     | 0.0      | 9.3      |
| 移植可能胚率                 | 75.7              | 77.4              | 67.7       | 72.8       | 40.0       | 60.0     | 77.8     | 70.6     |
| 胚盤胞到達率                 | 63.8(30/47)       | 54.4(31/57)       | 33.3(1/3)  | 46.2(6/13) | —          | —        | —        | 0.0(0/2) |
| 臨床妊娠率                  | 19.2(15/78)       | 10.0(5/50)        | 36.4(4/11) | 7.7(1/13)  | 100.0(1/1) | 0.0(0/3) | 0.0(0/2) | 0.0(0/2) |

<sup>a-b</sup>  $P<0.01$

に差はなく、40歳以上で紡錘体レターダンスが低下し、長径が長い結果となった。

年齢に関係なく紡錘体不可視群では可視群に比べ正常受精率が低く、異常受精率が高かったが、その後の正常受精胚の発育に影響は認められなかった。

紡錘体可視群と不可視群に分けて39歳以下と40歳以上で比較すると、どちらの群でも年齢による成績の差は認められなかったが、妊娠率は40歳以上で低い傾向が見られた。紡錘体不可視の原因が第二減数分裂中期に至っていない為か、紡錘体の変形や形成不全なのかは経時的に観察していない為判断できないが、紡錘体不可視卵のICSIでは可視卵に比べて紡錘体損傷によって異常受精率が高くなる可能性や、加齢による紡錘体の形態変化は正常な染色体分離や極体放出に影響がでる可能性がある。

今回対象としたような採卵数が少ない症例において、裸化処理時MI卵子であってもICSI実施までに成熟した卵子は貴重な卵子の一個であるが、体外成熟卵は体内成熟卵よりも紡錘体が大きく、受精・発生率が低くなるとの報告もある<sup>3)</sup>。Otsukiらは第一極体放出直後に染色体が凝集して紡錘体が観察できない期間 (gere-phase) があると報告しており<sup>4)</sup>、gere-phaseと予測される卵子を救済する方法として経時的な紡錘体観察を行ってICSIを実施するという報告もある<sup>5)</sup>。そこで、裸化処理時に成熟卵子であった体内成熟卵と、裸化処理時MI卵子でありICSI実施までに成熟した体外成熟卵に分けて検討を行った。体内成熟卵では、40歳以上で紡錘体レターダンスが低下し、長径が長くなったが、体外成熟卵では差は認められなかった。採卵時第一極体を認めた卵子において紡錘体レターダンスの高低は卵子の質と関連するとの報告<sup>6)</sup>があり、体内成熟卵では成熟からより時間が経過しているため紡錘体の加齢による形態変化が卵子の質に影響している可能性があり、体外成熟卵では年齢に関係なく成熟からの時間経過が短く、紡錘体の形態変化前に観察している可能性がある。極体放出後の成熟卵子は経時的変化によって受精・発生能が変化するとの報告や<sup>2)</sup>、紡錘体不可視卵は1時間程度追加培養を行って紡錘体が可視化できる状態でICSIを行うことで成績が向上するとの報告もあるが<sup>7)</sup>、今回の検討では、体外成熟卵において第一極体放出から紡錘体観察までの時間を考慮していない為、第一極体放出からの時間との関連についても検討が必要と考えられる。

今回の検討から、紡錘体可視卵は不可視卵に比べて正常受精率が高く、加齢によって紡錘体の形態変化は見られるが、胚発育への影響は認められなかった。40

歳以上で裸化処理時にMI卵子であった場合、その後体外成熟しても極体放出からの時間が短く卵子成熟が十分ではない可能性があり、ICSI実施までの時間を考慮することや紡錘体観察による成熟判定の必要性が示唆された。高齢患者では採卵数が少なく移植や凍結がキャンセルになる可能性が高いため、卵子の利用率を上げるために紡錘体観察による成熟判定を一つの指標として用いることは有用であると考えられる。

## 参考文献

- 1) 藤田陽子・池田玲奈・下中麻奈美・櫛野鈴奈・池田千秋・堀川道晴・根岸広明：卵子紡錘体の視覚化と、ICSI後の胚発生能についての検討。日受精着床会誌，30(1)：55-59, 2013.
- 2) 星野由美：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。日IVF会誌，Vol.17, No.2: 2-7, 2014.
- 3) 星野由美・佐藤優介・坂井知津香・佐藤英明：卵成熟における紡錘体形成と染色体分配の分子メカニズム。日臨エンブリオロジスト会誌，第12号：1-7, 2010.
- 4) Otsuki J, Nagai Y: A phase of chromosome aggregation during meiosis in human oocytes. Reprod Biomed, 15: 191-197, 2007.
- 5) Otsuki J, Momma Y, Takahashi K, Miyakura S, Nagai Y: Timed IVM followed by ICSI in a patient with immature ovarian oocytes. Reprod Biomed, 13: 101-103, 2006.
- 6) 林奈穂子・芝原隆司・深作悠・箕浦博之・川戸浩明：卵子の成熟度と紡錘体の retardance の関係から得られた良質な卵子の条件。日受精着床会誌，32(1)：32-35, 2015.
- 7) 北坂浩也・福永憲隆・永井利佳・服部久美子・桑原真弓・佐々木美緒・吉村友邦・糸井史陽・田村聡子・園原めぐみ・立木都・塩沢直美・佐野美保・羽柴良樹・浅田義正：紡錘体はICSIのタイミングの指標となるか？。日受精着床会誌，26(1)：24-27, 2009.

## 2種類の精子調整法における培養成績の比較 — 2種類の精子調整法について

横田 梨恵, 古橋 孝祐, 辻 優大, 大月 純子, 伊藤 宏一, 水澤 友利,  
松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英

英ウィメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町 1-1-2 三宮セントラルビル

**要 旨：** ARTの精子調整過程において単層パーコール法の後にswim up法を行うという組み合わせが採用されることがあるが、工程が増えることで取り違いなどのミスが起きる恐れがあり、遠心によるストレスを増やす可能性がある。そこで、作業を簡便かつ効率化する可能性を検討するために、2層パーコール法単独による方法を試み、単層パーコール-swim up法と精子調整結果、胚培養結果を比較した。その結果、2層パーコール法は単層パーコール-swim up法に比べ平均運動精子濃度が高かったが、受精率、胚盤胞発生率などの胚培養成績には差はなかった。以上、2層パーコール法を用いると単層パーコール-swim up法に比べ、多くの運動性を得られ、精子調整時間が短縮可能で、工程が減少するために取り違いの可能性が減少する優れた精子調整法であると考えられた。

**キーワード：** 精子調整, swim up法, パーコール

### 緒 言

体外受精では形態良好かつ運動性の高い精子を用いることが重要であるため、精子調整過程によって精漿成分、死滅精子や奇形精子などの受精を妨げる不要物を除去し、良好運動精子を選別する必要がある。精子調整は培養液による洗浄や遠心分離が一般的であるが、それによって精子が受ける影響について考慮する事は不可欠と言える。

精子調整方法については、密度勾配遠心法やswim up法など施設により様々な検討が行われている。密度勾配遠心法は運動精子をより多く回収するという目的から多くの施設が実施しており、パーコール法として汎用されてきた。パーコールはpolyvinylpyrrolidone(PVP) でコーティングされたコロイドシリカゲルであることから精子選別に適しており<sup>1)</sup>、非運動精子や異常なDNAを持つ精子を除去することが可能である<sup>2)</sup>。

また、swim up法は精子の運動性を利用した精子回収法であり、密度勾配遠心法の後にswim up法を行うことで奇形精子やDNAフラグメンテーションを除去できるという報告<sup>2)</sup>がある。当院でも体外受精の精子調整において良好運動精子獲得のため、単層におけるパーコール法(600g)の後にswim up法を採用している。しかし、swim up法はパーコール処理に比べて精子の回収率が低く<sup>3)</sup>、精子処理後に十分な精子を回収できないという問題点がある。また、swim up法を行うことで精子調整の工程が

増えて業務が煩雑となり、取り違いなどのミスが起こる恐れも考えられる。

一方、不連続多層法である2層法は単層法よりも良好精子を回収でき<sup>4,5)</sup>、ウィルス除去において他の方法よりも効果的であるという報告がある<sup>6)</sup>。また、2層パーコール法は、単層パーコール法とswim up法を行うよりも調整時間の短縮が望める。そこで、良質な精子を効率よく獲得し、作業を簡便にすることでよりシンプルなワークフローを目指すため、swim up法を行わず2層パーコール法(300g)単独処理による精子調整法の条件確立を行い、単層パーコール法の後にswim up法を行う従来法との比較検討を行ったのでここに報告する。

### 対象と方法

#### 1. 対象

2015年11月から2016年2月の期間で採卵を行い、採精後30分以内の新鮮射出精液で運動精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上かつ回収卵数が4個以上のIVF48症例(495個)を対象として検討を行った。2層パーコール法と単層パーコール-swim up法でそれぞれ精子調整を行い、調整後の精液所見を比較した。また、同一症例で得られた卵子を均等になるよう無作為に2群に分け、2層パーコール法群の236個と単層パーコール-swim up法群の259個においてIVFを施行し培養成績を比較した。また、この研究



は、施設内倫理委員会の承認の下、患者の同意のもとに行った。

## 2. 精子調整

### 〈単層パーコール-swim up法の手順〉(図1)

単層パーコールは、原液パーコール(Sigma社)と10×ハanks液(Sigma社)で90%パーコールを作成し、Universal IVF Medium (Origio 社) と等量ずつで調整した45%パーコールを使用した。採卵の前日に45%パーコールを作成し、5mlチューブに1mlずつ分注してインキュベーターにて37℃、5.5%CO<sub>2</sub>、5.0%O<sub>2</sub>、89.5%N<sub>2</sub>の気相条件下で一晩平衡化した。採卵当日、インキュベーターから取り出した45%パーコールに、10分間液化した精液を重層した。600g 20分遠心して上清除去後、インキュベーターにて37℃、5.5%CO<sub>2</sub>、5.0%O<sub>2</sub>、89.5%N<sub>2</sub>の気相条件下で平衡化を行ったUniversal IVF medium (Origio 社) 1mlを加えてよく懸濁してから600g 5分遠心し、さらに上清除去後Universal IVF Mediumを0.3～0.5ml加えて37℃、5.5%CO<sub>2</sub>、5.0%O<sub>2</sub>、89.5%N<sub>2</sub>設定のインキュベーター内でswim up法を行った。液表面近くの浮遊液をマイクロピペットで100μl回収し体外受精に使用した。

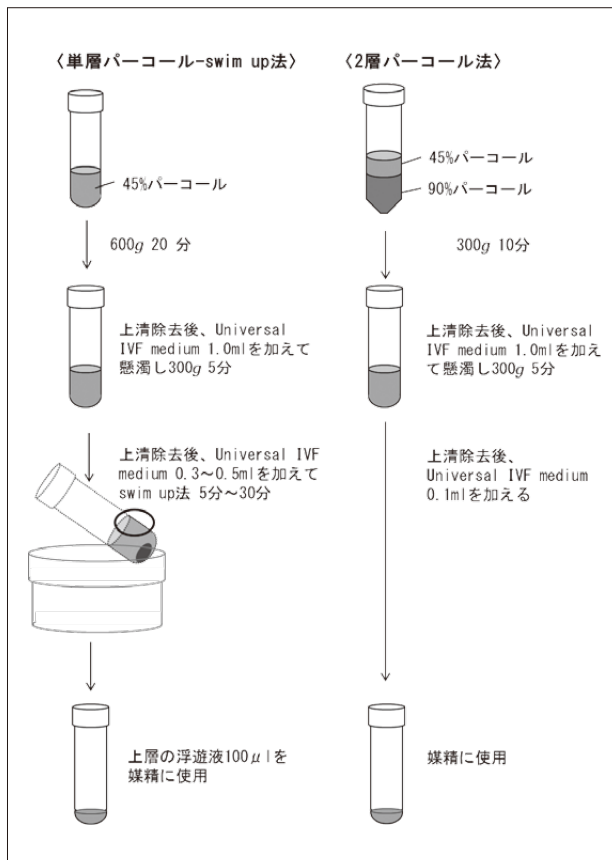


図1 単層パーコール-swim up法と2層パーコール法の手順

### 〈2層パーコール法の手順〉(図1)

2層パーコール法は、下層に90%パーコール、上層に45%パーコールを使用し、下層の90%パーコールは原液パーコール(Sigma社)と10×ハanks液(Sigma社)を9:1の割合で作成して、45%パーコールは90%パーコールと1×ハanks液(Sigma社)を1:1の割合で作成した。採卵の前日に90%パーコールと45%パーコールを作成し、それぞれを15mlチューブと5mlチューブに2mlずつ分注してインキュベーターにて37℃の条件下で一晩加温した。採卵当日、15mlチューブの90%パーコールに45%パーコール1ml、精液の順に重層し、300g 10分遠心して上清を除去した。インキュベーターにて37℃、5.5%CO<sub>2</sub>、5.0%O<sub>2</sub>、89.5%N<sub>2</sub>の気相条件下で平衡化を行ったUniversal IVF Medium(Origio 社)1mlを15mlチューブに加えてよく懸濁し、5mlチューブに移し替えてから300g 5分遠心して上清除去後、Universal IVF Medium 100μlを加えて体外受精に使用した。

## 3. 媒精、培養方法

前培養終了後、同一症例で得られた卵子をIVF施行卵数が均等になるよう無作為に2群に分け、それぞれ2層パーコール法群と単層パーコール-swim up法群として、精子調整後の運動精子濃度を $10 \times 10^6$ /mlに調整して実体顕微鏡 (SZX12 OLYMPUS, Japan) 下にて媒精に供した。IVFにはUniversal IVF Mediumを1ml分注したセンターウェルディッシュ (FALCON 353037, BD Biosciences, USA)を用い、供した卵の数は1ディッシュに対し最大5個までとした。

受精判定は媒精後18～20時間後に行い、global medium (Life Global, Canada) +10% HSA (Life Global, Canada)を用いて胚培養を行った。卵子、胚の培養は37℃、5.5%CO<sub>2</sub>、5.0%O<sub>2</sub>、89.5%N<sub>2</sub>の気相条件下で培養を行った。

分割期胚の胚観察はDay2の午後に培養液交換と同時に行い、その後Day6まで培養を行った。胚盤胞での凍結はDay5で行い、その時点で胚盤胞への発生を認めなかった胚についてはDay6まで培養し、胚盤胞への発生を認めたら凍結した。

## 4. 分割期胚及び胚盤胞の形態学的評価

分割期胚の評価はVeeckの分類<sup>7)</sup>を用いて行い、Day2時、Grade 1、2の4 cell及びGrade 3以上の5 cell以上の胚を良好分割期胚とした。また、胚盤胞の評価はGardnerの分類<sup>8)</sup>を用いて、胚の発生段階をGrade1-6、内細胞塊 (inner cell mass : ICM) 形態をA-C、栄養外胚葉細胞 (trophectoderm: TE) 形態をA-Cに分類し、

Grade 3AA 以上を良好胚盤胞とした。

## 5. 評価項目

検討項目は精子調整後の平均運動精子濃度, 平均非運動精子濃度, 平均精子濃度, 平均精子運動率, 受精率, 分割率, 良好分割期胚率, 胚盤胞発生率, および良好胚盤胞率( $\geq 3AA$ )とした。なお, 胚盤胞発生率については, 分割胚数から初期胚凍結もしくは初期胚移植をした胚を除いた数を母数とした。胚盤胞発生率は採卵から5日目に胚盤胞への成長を認めた胚とした。

各項目において統計学的有意差検定は $\chi^2$ 乗検定およびStudent's t検定を用い,  $P < 0.05$ をもって統計学的に有意差ありとした。

## 6. 結果

検討対象48症例において2層パーコール法群, 単層パーコール-swim up法群の精子調整後所見は平均運動精子濃度:  $17.3 \pm 11.4 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $12.6 \pm 3.7 \times 10^6/\text{ml}$ , 平均非運動精子濃度:  $0.7 \pm 0.9 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $0.3 \pm 0.5 \times 10^6/\text{ml}$ , 平均精子濃度:  $18.0 \pm 11.5 \times 10^6/\text{ml}$ ,  $15.1 \pm 16.0 \times 10^6/\text{ml}$ , および平均精子運動率:  $94.8 \pm 5.8\%$ ,  $97.2 \pm 4.1\%$ であり, 平均運動精子濃度( $P=0.008$ ), 平均非運動精子濃度( $P=0.008$ )で2層パーコール法群が単層パーコール-swim up法群に比べて有意に高く, 平均精子運動率( $P=0.021$ )では単層パーコール法群が2層パーコール法群と比較し有意に高かった(表1)。

対象症例の全体の回収卵子は495個で, その内訳は2層パーコール法群が236個, 単層パーコール-swim up法群が259個であった。2層パーコール法群および単層パーコール-swim up法群の受精率はそれぞれ77.5%(183/236), 72.2%(187/259), 分割率は88.0%(161/183), 86.6%(162/187), 分割期胚あたりの良好分割胚率はそれぞれ60.9%(98/161), 61.7%(100/162)であった。D5胚盤胞発生率はそれぞれ57.4%(74/129), 57.9%(73/126), D5胚盤胞あたりの良好胚盤胞発生率は23.0%(17/74), 28.8%(21/73)であった。これら全ての項目において両群に有意な差を認めなかった(表2)。

## 7. 考察

2層パーコール法の精子調整過程は単層パーコール-swim up法と比較し, パーコールの遠心処理を10分, swim-up法を5~30分, 精子調整全工程における時間を合計20~45分短縮可能である。Shekarrizら<sup>9)</sup>の報告から, 密度勾配法では遠心時間の長さに伴い, 精液中の活性酸素が増加すると示唆しており, 遠心時間が短い方が精子調整に適していると考えられる。活性酸素の上昇は精子運動性の低下, 精子核DNA断片化に関連するとされており, DNA断片化率の高い症例では精子運動率が低下し, 妊孕性に影響する<sup>1)</sup>と報告されている。これらのことから, 活性酸素の産出が抑えられる精子調整方法を選択することが望ましいと示唆される。

Kimらはgの大きさは精子に影響を与えているとしており,

表1 2層パーコール法と単層パーコール-swim up法における精子調整後所見の比較

|                                      | 2層パーコール法        | 単層パーコール-swim up法 | 有意差       |
|--------------------------------------|-----------------|------------------|-----------|
| 平均運動精子濃度( $\times 10^6/\text{ml}$ )  | 17.3 $\pm$ 11.4 | 12.6 $\pm$ 3.7   | $P=0.008$ |
| 平均非運動精子濃度( $\times 10^6/\text{ml}$ ) | 0.7 $\pm$ 0.9   | 0.3 $\pm$ 0.5    | $P=0.008$ |
| 平均精子濃度( $\times 10^6/\text{ml}$ )    | 18.0 $\pm$ 11.5 | 15.1 $\pm$ 16.0  | NS        |
| 平均精子運動率(%)                           | 94.8 $\pm$ 5.8  | 97.2 $\pm$ 4.1   | $P=0.021$ |

表2 2層パーコール法群と単層パーコール-swim up法群における培養成績の比較

|                | 2層パーコール法群            | 単層パーコール-swim up法群    | 有意差 |
|----------------|----------------------|----------------------|-----|
| 受精率            | 77.5 % ( 183 / 236 ) | 72.2 % ( 187 / 259 ) | NS  |
| 受精卵あたりの分割率     | 88.0 % ( 161 / 183 ) | 86.6 % ( 162 / 187 ) | NS  |
| 分割期胚あたりの良好胚率   | 60.9 % ( 98 / 161 )  | 61.7 % ( 100 / 162 ) | NS  |
| D5 胚盤胞発生率      | 57.4 % ( 74 / 129 )  | 57.9 % ( 73 / 126 )  | NS  |
| D5 胚盤胞あたりの良好胚率 | 23.0 % ( 17 / 74 )   | 28.8 % ( 21 / 73 )   | NS  |
| D5, D6 胚盤胞発生率  | 62.8 % ( 81 / 129 )  | 63.5 % ( 80 / 126 )  | NS  |

200gでは精子の運動性に影響はないが、400gまたは600gでの遠心は運動性を低下させると報告している<sup>10)</sup>。また、600g以上の遠心は精子の運動性を低下させるが300g～500gでは精子にほとんど悪影響を及ぼさないという報告<sup>11)</sup>もある。従来法ではswim up法を行うために密度勾配遠心法で精子を多く回収することを念頭に置いて600gを採用していたが、300gでの遠心を選択することにより精子へのダメージを軽減できる可能性が示唆される。

また、2層パーコール法は単層パーコール-swim up法に比べて精子調整後の運動精子濃度が有意に高く(表1)、運動性においてより良好な精子を回収できたことが考えられる。一方、swim up法は運動精子の回収率が低く、パーコール処理後の所見が不良の場合swim up法を行うことで運動精子数がさらに少なくなり、良好な運動精子を回収することが困難となる可能性がある。

拝郷<sup>12)</sup>は、密度勾配遠心法単独処理と密度勾配遠心法後にswim up法を行う密度勾配遠心法-swim up法とで臨床成績に有意な差はなく、cIVF周期の精子処理は密度勾配遠心法単独処理で充分であると示唆している。本研究において2層パーコール法と単層パーコール-swim up法を比較したところ、培養成績の全ての項目において両群間に有意な差は見られなかった。このことから、2層パーコール法は、単層パーコール-swim up法と同程度の良好精子が回収でき、精子調整において有用であることが示唆された。本検討においては調整方法の違いによる精子DNAフラグメンテーションについての解析は行わなかったため、今後は精子DNAフラグメンテーションへの影響も検討していく必要性が考えられた。

spermatozoa. *Ibt J Fertil Womens Med*, 42: 412-417, 1997.

- 6) Politch JA, Xu C, Tucher L, Anderson DJ: Separation of human immunodeficiency virus type 1 from motile sperm by the double tube gradient method versus other methods. *Fertil Steril*, 81: 440-447, 2004.
- 7) Veeck LL: In: *Atlas of the human oocyte and early conceptus*, 2nd ed., pp151-153, Williams & Wilkins Co, 1991.
- 8) Gardner DK and Schoolcraft WB: *Towards Reproductive Certainty: Fertility & Genetics Beyond*. Proceedings of the 11th World Congress on in Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics, pp347-371, Carnforth Parthenon Press, 1999.
- 9) Shekarriz M1, DeWire DM, Thomas AJ Jr, Agarwal A: A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *Eur Urol*, 28: 31-35, 1995.
- 10) Kim S, Agca C, Agca Y: Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, 25: 1051-1064, 2013.
- 11) Lee WI, Gaddum-Rosse P, Smith WD, Stencher M, Blandau RJ: Laser light-scattering study of the effect of washing on sperm motility. *Fertil Steril*, 38: 62-67, 1982.
- 12) 拝郷浩佑: Conventional IVFにおける最適な精子処理方法の検討～密度勾配遠心法単独処理と密度勾配法トSwim up法併用処理後の臨床成績の比較～, 第20回日本臨床エンブリオロジスト学会 ワークショップ・学術大会・市民講座, 2015.

## 参考文献

- 1) 片寄治男: 精子機能検査法・精子調整法: 生命の誕生に向けて生殖補助医療胚培養士認定講習会テキスト. 日本卵子学会, pp87-95, 2010.
- 2) Yamanaka M, Tomita K, Hashimoto S, Matsumoto H, Satoh M, Kato H, Hosoi Y, Inoue M, Nakaoka Y, Morimoto Y: Combination of density gradient centrifugation and swim-up methods effectively decreases morphologically abnormal sperms. *J Reprod Dev*, 62: 599-606, 2016.
- 3) Amiri I, et al.: Comparison of the DNA Fragmentation and the Sperm Parameters after Processing by the Density Gradient and the Swim up Method. *JCDR*, 6: 1451-1453, 2012.
- 4) Zhou QZ, Feng CQ, Zou YG, Shu W, Li TQ, Li F, Liu CD, Mao XM: Single- and two-layer gradient centrifugation in sperm separation: comparison and appraisal. *Zhonghua Nan Ke Xue*, 16: 217-219, 2010.
- 5) Sharma RK, Seifarth K, Agarwal A: Comparison of single- and two-layer Percoll separation for selection of motile