

学 位 論 文 の 要 旨

論文題目 妊孕力の高い良好胚選別のための非侵襲的な評価方法の開発

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

学生番号 D102072

氏 名 池田 千秋

第一章 緒論

ヒト体外受精・胚移植の技術は不妊症の革新的な治療法として導入され、全世界に普及したが、胚移植後の妊娠率はいまだに低く、流産率も高い。妊娠率を上げるために、初期胚は複数個移植されてきたが、その結果、多胎妊娠が増加し、周産期医療や新生児医療の現場で多くの問題が生じてきた。生殖補助医療において、移植前に質的にもっとも良好な胚を選択する事は、妊娠率の向上、多胎妊娠の回避、流産率の低下のために極めて重要である。現在、良好胚の選択は、移植日の形態学的評価によって行っている施設がほとんどである。しかし、形態学的特徴は定量性、客観性に欠けることから、厳密な胚の品質評価は困難であり、単一胚移植は、複数個移植よりも妊娠率が低い原因となっている。従って、より精度の高い胚評価法を確立するために、胚の機能的評価が必要であると考えた。以上のことから、本研究では、体外受精・胚移植成功の鍵となるもっとも妊孕力の高い胚を選択するための非侵襲的な方法の開発を目的とした。

第二章 ヒト顕微授精胚の第一分割のタイミングと胚発生

これまでに第一分割の早い受精卵から発生した胚は、分割の遅い胚と比較して高い妊娠率と着床率が期待できると報告されていることから、早期分割は、良好な4細胞期胚、8細胞期胚、胚盤胞への発育と高い相関関係があると考えられる。そこで、第一分割のタイミングと胚発生の関係を明らかにするため、顕微授精施行25時間後の胚の状態（EC：early cleavage, BD：pronuclear breakdown, PN：pronuclear）による発生能の違いを検討した。その結果、培養3日目の胚の分割数とグレードは、BD胚、PN胚と比較してEC胚が有意に高かった。また、胚盤胞到達率、良好胚盤胞発生率においても、BD胚、PN胚と比較してEC胚が有意に高かった。これらの事実から、早期分割胚は、その後の発生能力の高い胚であることが考えられた。良好胚の選択は、臨床的には非侵襲的な形態評価に頼らざるを得ず、発生段階別にさまざまな報告がなされているが、どの方法にも限界がある。第一分割のタイミングの評価は、特別な機器も必要とせず、分割を確認するだけなので観察者によってばらつきがでることもない。従って、第一分割のタイミングの早い胚は、移植の際により発生能力の高い胚を選択する際の優れたマーカーになると考えられた。

第三章 ヒト顕微授精胚の第一分割のタイミングと臨床成績

第二章では、ヒト顕微授精胚の第一分割のタイミングが、その後の胚の発生能と関与していることを明らかにし、早期分割胚がその後の高い発生能力の指標（発生能マーカー）となることを示した。しかし、発生能の高い胚の移植は着床率の向上につながるが、その後の妊娠継続を担保するものであるかは不明である。既報において、胚盤胞期胚をVitrification法により凍結し、採卵を行った次周期

以降に子宮環境を着床が起こりやすい状態へと誘導した後に胚移植することで、その成功率（着床率）は 50 % 以上に到達すると報告されている。しかしながら、胚移植後の自然流産率は 18~30 % と自然妊娠と比較して著しく高いことが報告されている。従って、着床までを担保する発生能だけでなく、流産が起こらない胚の正常性も担保することが、高度生殖補助医療の臨床成績の向上に必要である。そこで、顕微授精胚を単一胚移植した臨床成績について、第一分割のタイミング別に後方視的検討を行った。胚発育は、1 個胚培養システムでモニターし、胚盤胞期に発育したすべての胚は凍結を行い、その後コントロールサイクルで胚移植を行った結果、EC 胚を移植した時の臨床的妊娠率は、PN 胚を移植した時と比較して有意に高く（62.3 v.s. 25.6 %, $P < 0.01$ ）、流産率は有意に低かった（4.4 v.s. 72.7 %, $P < 0.01$ ）。以上の結果は、「第一分割のタイミングと妊娠」の関係を明確化するものであり、非侵襲的で簡便な客観的胚の選択マーカーとなる画期的成果である。また、第一分割の遅れ、つまり第一有糸分裂の遅れは、精子または卵の受精能力の低さを意味しており、それにより染色体分配異常という結果につながると考えられた。従って、第一分割のタイミングの検出は、着床率の高さだけでなく移植後の流産リスクの低い真の良好胚を選択する有用な方法となると期待される。

第四章 胚代謝産物の網羅的解析

受精卵の第一分割のタイミングという染色体の正常性予知とともに、初期胚発生過程において胚自身の機能的評価も行うことで、さらなる胚移植効率の向上が期待できる。このような連続的胚評価を臨床における非侵襲的測定法の枠内で実施することが必要であることから、培地中の代謝産物の測定が有効であると考え、メタボローム解析を行い、培養液中の代謝物を特定した。その結果、受精確認後胚盤胞期胚まで到達し、その後移植し妊娠に至った発生良好群、培養 3 日目までは良好であったが分割期で停止した発生不良群において、培養 3 日目までの両者の代謝産物に有意な差が存在することが明らかになった。代謝物全体の変動パターンを調べた結果、発生良好群では、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸などの TCA 回路の中間代謝物が増加しており、良好胚はエネルギー代謝が活性化していると考えられた。一方で発生不良群では脂肪酸、アスパラギン酸、ロイシンが顕著に増加し、パントテン酸が減少していた。パントテン酸は、脂質代謝を中心となることが報告されており、発育不良群で脂肪酸代謝の中間物質である中鎖脂肪酸が顕著に増加していたことも合わせて考えると、脂肪酸代謝は胚のその後の発生能力と相関することが示唆された。また、糖代謝経路に関する物質を発生良好群と発生不良群で比較した時、ピルビン酸量は発生良好群で高く、乳酸量は発生不良群で高かった。これより、発生良好群、発生不良群それぞれの培養 3 日目までの培養液をサンプリングし、ピルビン酸量と乳酸量を測定した結果、ピルビン酸/乳酸取り込み量比は、発生不良群と比較して発生良好群で有意に高い結果となった。乳酸をピルビン酸へ変換するときに用いられる乳酸脱水素酵素（lactate dehydrogenase, LDH）は、zygote 期で最も活性が高く、胚盤胞期では減少することから、胚の発生能と LDH 活性との関係が強く示唆された。以上のことから、胚の代謝産物を測定することにより、胚の質を評価することができ、より妊孕力の高い胚を選択する新たなマーカー開発につながると期待できる。

第五章 総合論議

社会的な背景から、今後も高齢女性不妊患者は益々増加し、体外受精・胚移植のニーズは高まるものと思われる。生殖補助医療において、移植前に妊娠に至りうる良好胚を選択する事は、多胎妊娠の回避、流産率の低下をもたらす、児と母体の健康維持のために重要なポイントである。妊孕力の高い良好胚選別のための評価方法を検討した本研究において、受精 25 時間後の第一分割のタイミングの早い胚を胚盤胞まで培養した後凍結し、その後移植した妊娠率は、62.3 %（68 / 109）であった。単一凍結胚移植の妊娠率は約 30 % と報告されており、その数値と比較して本研究で得られた妊娠率は高いものであった。従って、本研究の成果は、ヒト高度生殖補助医療成功率の上昇に寄与するものである。この技術を広く大型家畜の受精卵移植にも応用することにより、高い経済形質を持つ個体を効率よく生産できると考えられる。