

学位論文の要旨

論文題目 ヒト卵体外成熟培養法開発のための生理学的研究

広島大学大学院生物圏科学研究科

学生番号 D 090389

氏名 日下 千賀子

第一章 緒論

ヒトでは、挙児希望の夫婦において男女のどちらかに生殖障害がある場合、不妊治療として体内成熟卵を用いた体外受精 (*in vitro* fertilization: IVF) が行われる。しかし、加齢により女性の卵巣機能が低下した症例では、体内成熟卵を得ることが難しい。このため、未成熟卵を採卵し、体外で受精可能な状態へと成熟させる体外成熟培養技術に注目が集まっている。しかし、ヒトにおいて体外成熟卵の IVF 後の胚発生能は、体内成熟卵のそれと比較し低いのが現状である。体外成熟卵の発生能が低い理由として、未成熟卵の採卵数が少ないこと、ヒト卵に適した体外成熟培養条件が確立されていないためと考えられている。

したがって本研究では、未成熟卵の採卵法の開発と、体内の卵成熟過程を体外で模倣する培養法の考案を行い、高い発生能を有するヒト卵の獲得が可能な体外成熟培養法の確立を目的として研究を行った。

第二章 採卵前の卵胞刺激ホルモン投与が体外成熟培養に及ぼす影響の検討

未成熟卵の採卵は卵胞発育が不十分であるため、採卵数が少ないと報告されている。そこで、卵胞数増加を促進する卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone: FSH) 投与を行った。また、卵胞期での FSH 投与は卵胞数増加だけではなく、卵丘細胞層の肥厚化、卵胞ホルモン (estradiol: E_2) 分泌を促進するため、採卵時における卵の形態像や受精後の発生能に影響を及ぼすと考えられる。そのため FSH 投与周期区と自然周期区において、採卵数、末梢血ホルモン、卵・卵丘細胞複合体 (cumulus oocyte complex: COC) の卵丘細胞層数、IVF 後の発生能、胚移植後の妊娠能について比較した。その結果、FSH 投与周期区において、採卵数が自然周期区のそれと比較して有意に高く、さらに IVF 後の桑実期胚到達率も有意に高い値を示した。末梢血ホルモンでは、FSH 投与周期区で E_2 濃度が有意に高く、LH/FSH 比が有意に低かった。しかし、FSH 投与により、卵丘細胞層数は増加しなかった。また、自然周期区での胚盤胞期胚到達率は、グレード A COC (卵丘細胞層数が 5 層以上) が最も高く、次いでグレード B COC (3~4 層)、グレード C COC (2 層以下) であった。一方 FSH 投与周期区では、グレード B COC において、最も胚盤胞期胚到達率が高く、グレード C COC と比較し桑実期胚到達率が有意に高い値を示した。胚移植を行うと妊娠率は FSH 投与周期区全体で 52.6% であり、妊娠率は形態良好な胚盤胞期胚に到達した場合、卵丘細胞層数による違いは見られなかった。以上の結果から、採卵前の FSH 投与により採卵数が増加し、卵胞閉鎖を阻害する結果、IVF 後の発生能が向上したと考えられた。体外成熟卵を用いた IVF による胚移植での妊娠率は 4~25% とする他の報告と比較し、本法では 52.6% と高く、体外成熟卵であっても高い妊娠能を持つことが明らかになった。

第三章 体外成熟培養における培養条件の検討

第二章において、グレード C COC は発生能が最も低かった。しかし、グレード C COC はグレード B COC に次いで採卵される割合が高いため、妊娠率向上のため、グレード C COC に適した培養条件の検討が必要であると思われた。グレード C COC では卵丘細胞数が少ないため、オートクライン因子の不足が考えられた。ブタ卵において体外成熟培養時の黄体ホルモン

(progesterone: P₄) 濃度は卵の成熟能や発生能と関連するため、ヒト卵において P₄ に着目した。まず、P₄ 分泌を促進できる性腺刺激ホルモンの添加条件を検討した。その結果、他の培養条件と比較し、200 mIU/ml FSH, 1 IU/ml human chorionic gonadotropin (hCG) の培養条件において COC が分泌した P₄ 濃度と成熟率が最も高かった。卵丘細胞が膨潤した成熟卵は卵丘細胞が膨潤しなかった成熟卵と比べ P₄ 分泌濃度が有意に高く、IVF 後の発生能も高い傾向にあった。以上から、ヒト体外成熟培養系の P₄ 分泌を促進するには、200 mIU/ml FSH, 1 IU/ml hCG の培養条件が適していることが明らかになった。

第二章において、発生能の高かった卵丘細胞層数 3 層以上の Good morphology グループ (グレード A COC とグレード B COC) と発生能の低かった卵丘細胞層数 2 層以下の Poor morphology COC (グレード C COC) の体外成熟培養後の P₄ 濃度を比較した結果、Poor morphology COC が有意に低かった。そこで、Poor morphology COC に対し、20 ng/ml P₄ を添加して培養した結果、無添加と比較し、受精率が有意に高かった。しかし、P₄ 分泌濃度が高かった Good morphology グループでは、20 ng/ml P₄ 添加により成熟率は上昇したが、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率は有意に低い値を示した。以上から、採卵時の卵丘細胞層数により P₄ 分泌量の不足が予想される場合は、外因性 P₄ を添加することによって卵の受精後の発生能が向上すると考えられた。

第四章 体外成熟培養における培地への添加因子の検討

体内成熟卵の卵胞液成分を解析し、体内での排卵過程を模倣し、卵の発生能を向上させる物質を特定できれば、その物質を体外成熟培地に添加することにより、卵の発生能が向上できると考えられる。そこで、体内成熟卵の採卵時に卵胞液を採取し、IVF 後に胚盤胞期胚に到達した発生良好群と、分割期胚で停止した発生不良群とに卵胞液を分類し、メタボローム解析に供試した。その結果、ピーク面積比の発生不良群/発生良好群比が 0.3 以下であったのは、Tyramine, Phosphocreatine, Hypoxanthine, Phosphorylcholine, Glutathione (GSSG) divalent, UMP, AMP, Cytidine, Inosine, Guanosine, S-Adenosylmethionine であった。この結果より、発生良好群の卵胞においてプリンヌクレオチド代謝物質が高濃度に存在することが明らかになった。プリンヌクレオチドはペントースリン酸経路の最終産物である phosphoribosyl pyrophosphate (PRPP) を骨格として合成される。そこで、卵胞発育・排卵期におけるペントースリン酸経路と *de novo* でのプリンヌクレオチド合成経路に着目し、未成熟マウスを用いて卵胞発育時の代謝酵素の遺伝子発現を検討した。Glucose 6 phosphate dehydrogenase をコードする *G6pdx* の発現量は eCG 非投与と比較し、eCG 投与後 24 時間で有意に上昇し、eCG 投与後 24 時間と比較し、eCG 投与後 48 時間時点において有意に減少していた。また、Glucose 6 phosphate dehydrogenase 活性は eCG 投与後、有意に減少し、mRNA 発現量の経時変化と一致しなかった。このため、体内での卵の発生能獲得に、ペントースリン酸経路によって制御されたプリンヌクレオチド合成経路が関与し、これらの代謝経路のタンパク質発現にはネガティブフィードバック機構が推定された。

発生良好群に高濃度で存在した Hx をヒト卵体外成熟培養系に 4 mM 添加し、成熟率、IVF による受精率、桑実期胚到達率、胚盤胞期胚到達率に及ぼす影響を検討した。その結果、予想に反して、いずれの指標も Hx 添加により有意に低い値を示した。以上から、卵の発生能の獲

得過程についてプリンヌクレオチドが関連する事、プリンヌクレオチドの発現量の調整にはペントースリン酸経路の律速酵素である Glucose 6 phosphate dehydrogenase が関与すると考えられた。しかし、ヒト卵の体外成熟培養系への応用には、Hx 添加によりネガティブフィードバックが推察されるため、その添加時期、添加量、添加する因子の詳細な検討が必要であると考えられた。

第五章 総合論議

本研究では正常月経周期の女性において、FSH 投与後に未成熟卵を採取し、それを体外成熟することで、体外受精胚移植により、妊娠率は 52.6 % と他の報告の妊娠率 (4~25 %) よりも高い成績を得ることができた。さらに、未成熟卵を卵丘細胞の付着により形態的に分類することで、形態良好な COC には 200 mIU/ml FSH, 1 IU/ml hCG 添加培地を用いること、形態が不良な COC には上述のホルモン環境に 20 ng/ml P₄ をさらに添加することで良好な成績が得られることも明らかとなった。したがって、本研究により、採卵時の卵丘細胞層数による新規のヒト卵体外成熟培養条件を考案することに成功した。本法が普及することにより、高齢女性の不妊治療成績が向上すると期待される。