

博士論文

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

平成 28 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

池田 千秋

博士論文

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

平成28年3月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

池田千秋

目次

第一章	緒論	4
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	
	序論	13
	材料および方法	16
	結果	19
	考察	21
	要約	24
	図および表	25
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	
	序論	32
	材料および方法	34
	結果	36
	考察	37
	要約	39
	図および表	40
第四章	胚代謝産物の網羅的解析	
	序論	44
	材料および方法	47
	結果	48
	考察	50
	要約	53

	図および表	55
第五章	総合論議	60
第六章	総括	66
	謝辞	70
	引用文献	71

第一章

緒論

1. 生殖補助医療の歴史

1-1 生物の発生と受精機構の解明

17~18 世紀前半において、生物の発生は前成説、すなわち卵や精子の中に予め小さな胎児が含まれており、それが子宮内で成長するという考え方が主流であった。卵に関する前成説（卵原説と呼ばれている）を唱えたのが Malpighi (1672) であり、彼は、ニワトリの卵を顕微鏡で観察し、その中に小さなヒヨコの形をしたものを発見したと主張した。一方、Leeuwenhoek (1678) は、独自の単眼顕微鏡を作製し、精液の中に動くものを見出し、これこそが生命の根源であるとする「精原説」を唱えた。しかし、19 世紀に顕微鏡の技術革新が起こったことで、多くの科学者により初期胚の詳細な観察がなされ、前成説は否定された (Schleiden, 1838; Schwann, 1839)。そして、生命は初期胚から発生するという後世説が唱えられ、この初期胚は精子の核と卵の核の合体という受精により作り出されることが明らかになった (Hertwig, 1875)。

精子と卵の核が融合する受精がどのようにして生じるかは、さらに 100 年以上後に体外受精 (*in vitro* fertilization: IVF) 技術の発展に伴って明らかにされてきた。Chang (1951) と Austin (1951) は、それぞれ別々にウサギとラットを用いた研究を行い、射出精液中の精子は卵内に侵入して受精を完遂する能力はないこと、雌の生殖道内に数時間留まることで精子は受精能力を獲得することを見出した。Austin (1951) は、この研究成果を著した論文中で、このような精子の機能的変化を受精能獲得 (capacitation) と命名した。この精子の受精能獲得に関する知見がブレークスルーとなり、Chang (1959) は、交尾後の雌ウサギから回収した子宮内精子と排卵された成熟卵を用いて体外受精を行い、その卵割胚を別の雌ウサギの子宮に移植して産子を得ることに成功した。さらなる研究により、体外処理により精子の受精能獲得を促す手法がハムスター (Yanagimachi and Chang, 1963)、マウス (Iwanatsu and Chang, 1969) およびモルモット (Yanagimachi, 1972) で発表され、多くの動物種で体外受精が可能になった。

この精子の受精能獲得は、いずれの動物種においても Ca^{2+} 依存性という共通の仕組みで誘起されるが、その誘導に要する時間には種特異性があり、ヒトでは 5~6 時間程

度である (Yanagimachi, 1994). この受精能獲得を誘起する精子内部への Ca^{2+} 流入は、細胞膜コレステロール/リン脂質比の低下による精子細胞膜の流動性の変化に起因すると報告されている (Hoshi et al., 1990). この細胞膜の流動性変化に要する時間が動物種や同一種でも精子を回収した部位により異なるため、受精能獲得に要する時間差が生じている. しかし、精子内部に Ca^{2+} が流入した後は、いずれの動物種および回収部位においても、精子細胞質内のタンパク質がリン酸化され、そのタンパク質の機能的変化を介してグルコースの嫌氣的解糖系による ATP 産生が亢進される. この産生された ATP と流入した Ca^{2+} 両者により、精子尾部の微少管における滑り込み運動が活性化され、精子の運動性は著しく亢進される (Baldi et al., 2000; Hernandez-Gonzalez et al., 2006; Arcelay et al., 2008; Visconti, 2009).

受精能を獲得し、尾部の鞭毛運動により運動性が飛躍的に高まった精子は、精子頭部の膜表面に局在するヒアルロニダーゼにより卵を覆う卵丘細胞層の細胞間マトリクス構成因子であるヒアルロン酸を分解することで、卵の透明帯に到達する (Yanagimachi, 1994). ヒトの透明帯は、ZP1 (分子量約 100 kDa), ZP2 (約 75 kDa), ZP3 (約 55 kDa), および ZP4 (約 65 kDa) という 4 種類の糖タンパクで構成されている (Lefievre et al., 2004). このうちの ZP3 に含まれる第一精子レセプター (primary receptor) に受精能を獲得した精子は結合し (Bleil and Wassarman, 1980; Beebe et al., 1992), 透明帯を通過するために必要な精子の先体反応 (acrosome reaction) が誘起される. この第一精子レセプターは精子と卵の動物種特異的結合を担うと考えられており (Gwatkin, 1977; Yanagimachi, 1978, 1984; Schmell and Gulyas, 1980; Bedford, 1981), 同一種の精子のみ先体反応が開始され、透明帯への通過が可能となるので、異種の受精は起こらない仕組みになっている.

透明帯表面で先体反応を起こした精子は、先体内部のアクロシンなどのタンパク分解酵素を放出して透明帯構造を軟化させ、さらに尾部の激しい運動により透明帯を通過し、精子は卵子細胞膜と結合することが可能となる (Yanagimachi and Noda, 1970; Bedford, 1977). この結合は、精子の Izumo と卵の CD9 によるリガンドと受容体との特異的結合であり、この反応により卵の原形質膜と精子の細胞膜の融合が開始する (Inoue et al., 2007). この融合は、精子頭部の赤道部位の前方と卵の微絨毛との間で始まり (堀内ら, 1980), 中片部および尾部の精子原形質膜が卵原形質膜にジッパーのように取り込まれながら、中片部および尾部のすべてが卵細胞質内に引き込まれる (Phillips, 1980).

卵細胞質内に取り込まれた 1 つの精子において、頭部の脱凝縮が直ちに開始され、精子核タンパク質のプロタミン間におけるジスルフィド結合が乖離し、プロタミンから卵由来のヒストンへと精子由来核の DNA 結合タンパク質が置換される (Philpott et al., 1991). さらに、精子由来核の周囲は滑面小胞体に取り囲まれ、それが核膜を形成することで、雄性前核が形成される (Lassalle and Testart, 1991). その後、雌雄前核は互いに接近し、両前核の核膜消失、紡錘体の形成、染色体の赤道面への配列に続き、染色体の両極への移動と細胞分裂が生じ、胚としての最初の分裂を成し遂げる. 精子と卵の原形質膜が融合すると、精子中心部付近に局在している phospholipase C zeta (PLC ζ) が卵細胞質内に放出され、局所的に PLC ζ による phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) の分解が生じ、inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP3) と diacylglycerol が合成される (Saunders et al., 2002; Ramadan et al., 2012). IP3 は、小胞体に局在するリアノジン受容体に結合し、小胞体からの Ca²⁺放出を促進させることから (Cox et al., 2002; Malcuit et al., 2006), 卵細胞質の滑面小胞体から Ca²⁺が反復性のスパイク状に放出される Ca²⁺オスシレーションが生じる (Vitullo and Ozil, 1992). この Ca²⁺オスシレーションにより、卵減数分裂の再開による第二極体の放出と雌性前核の形成、精子中心体の分離、精子頭部の脱凝縮とそれに続く雄性前核の形成が誘発される.

また Ca²⁺オスシレーションは、精子・卵膜融合の生じた部位付近の卵細胞質に存在する顆粒 (表層顆粒) を開裂 (エキソサイトーシス) させ、加水分解酵素、タンパク分解酵素および過酸化酵素を卵腔内に放出させる. この局所現象は数秒以内で卵表面全面に広がり (Wang et al., 1997), 卵腔内を充満した酵素が、透明帯の精子受容体である ZP3 に作用し、精子の結合と先体反応の誘発が阻止される. その結果、新たな精子が卵へ進入することが防止されるという多精子侵入拒否反応が成立し (Barros and Yanagimachi, 1971), 1 卵 1 精子により種特異的な染色体数が維持された受精卵となる.

1-2 体外受精の生殖工学および生殖医療への応用

上述したようにウサギ, ゴールデンハムスター (Yanagimachi and Chang, 1964) やマウス (Whittingham 1968) において、体外受精の研究が盛んに行われ、体外受精研究の黎明期から産子が得られていた. しかし、ウシ, ブタなどの大型家畜では実験の困難さ等もあって 1960 年代に入っても体外受精の成功例は報告されていなかった. Iritani et al. (1969, 1971, 1974) は、家畜の雌生殖器内の生理的環境と精子の受精能獲得

機構を解明するために、ヒツジ、ブタ、ウサギから子宮と卵管の分泌液を連続的に採取し、それらの分泌量や生化学的性状を明らかにした。この分泌液の組成値は、世界各国で開発された卵や初期胚の培養液の組成決定の基本となり、現在まで広く利用されている。また、発情期に採取された分泌液中に存在する非透析性、熱不安定性のタンパク質が精子の受精能獲得に関与することを見出し、これらの成果が体外受精の成功に大きく寄与することになった。そして彼らは、上述の精子処理法、体外受精培地の開発にとどまらず、食肉処理場で得られる多数の未成熟卵子を体外培養で成熟させる手法も確立することで、ウシ (Iritani and Niwa, 1977) およびブタ (Iritani et al., 1978) の体外受精に世界で初めて成功した。

このような実験動物や家畜での成功から、ヒトの体外受精研究がはじめられたが、最初の問題はいかにして成熟卵を手に入れるかであった。Edwards et al. (1969) は、ヒト未熟卵の体外成熟の研究を行い、体外成熟させた卵を受精させることができたが、この受精卵は2細胞期で発生を停止した。そこでEdwardsは、マウスの研究成果を考察することで、排卵直前の卵胞から回収した卵は体外受精に適し、その後の初期発生能も良好なのではないかと仮説立てた。この仮説を臨床応用へと発展させるため、Edwardsは産婦人科医師 Steptoe の協力を得て、内視鏡下で排卵直前に卵を吸引回収する技術を確立した (Steptoe and Edwards, 1970)。このような歴史を経て、体外受精のヒト臨床応用が始まったが、妊娠しても流産 (Kretzer et al., 1973) や異所性妊娠 (Steptoe and Edwards, 1976) という失敗が続いた。しかし、1978年7月25日に世界初の体外受精・胚移植 (*in vitro* fertilization and embryo transfer: IVF-ET) 児、ルイーズ・ブラウンが誕生した (Steptoe and Edwards, 1978)。その後、オーストラリアの Lopata (1980) が、続いてアメリカの Jones et al. (1982) が体外受精児の誕生を報告し、日本でも1983年に東北大学の鈴木雅洲らのチームによって日本初の体外受精児の誕生が報告された (Suzuki et al., 1983)。

1-3 顕微授精技術の発展

顕微授精は、受精時における精子と卵の相互作用を研究するための研究モデルとして試みられたのが始まりである。Hiramoto (1962) はウニで、Graham (1966) はカエルで、いずれも1個の精子を微小ガラス針で細胞質内に注入し、それぞれ初期受精現象である精子頭部の膨化、精子から変形した雄性前核の形成を認めた。哺乳類では、

Uehara and Yanagimachi (1976, 1977) はハムスター卵にヒトやハムスター精子を注入する実験を行い、人為的注入により雄性前核が形成されることを明らかにした。これらの研究成果は、透明帯通過や膜融合の過程が動物種固有であり、受精そのものは非同種間でも成立しうることを証明したものであった。

体外受精 (IVF) に要する精子数は、卵 1 個あたりおよそ 50,000 個程度であり、射出精子数の少ない男性不妊症においても IVF は適応可能である。しかし、精子数が極端に少ない高度乏精子症や運動性が著しく低い精子無力症などの重度の男性不妊では、IVF では受精が成立できない症例が多い。そこで Cohen et al. (1988) は、運動性が低く、精子数も少ない症例において、基礎生物学の分野で開発された顕微注入技術を応用することを発案し、透明帯開孔法 (partial zona dissection: PZD) による受精補助技術を用いた妊娠例を報告した。また、Ng et al. (1988) は、細く伸展したガラス管内に精子を吸引し、そのガラス管で透明帯を貫通することで囲卵腔内に精子を直接注入する囲卵腔内精子注入法 (subzonal insemination: SUZI) を開発し、それにより得られた受精卵の移植による妊娠成功例を報告した。これらの顕微鏡下で受精補助となる顕微授精は、男性不妊患者への福音となった。しかし、その後の症例の増加により、重度の不妊症症例では PZD や SUZI の治療効果が乏しいことも明らかにされた。そこで、Palermo et al. (1992) らは、ガラス管に吸引した精子を直接卵細胞質内に注入する卵細胞質精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) を考案し、これにより受精した初期胚を移植することで 4 例の妊娠を報告した。この成功例に続いて、世界中の施設での追試により高い治療成績が報告され、現在では ICSI が顕微授精の主流になっている。

1-4 培養液の開発

初期胚用培養液の開発は 1940 年代にウサギやマウスを用いた研究から端を発し、1950 年代には組成既知の合成培地が登場した。初期の合成培地は、タイロード液 (Tyrode, 1910) やクレブス・リンゲル重炭酸緩衝液 (Krebs-Ringer bicarbonate medium: KRB; Krebs, 1950) といった体細胞様の平衡塩類溶液を基礎として必要な栄養素を添加するという考え方で開発された。特に KRB は、マウスをはじめ多くの動物種において体外受精や初期胚培養に用いる培養液の基礎となっており、Whitten (1956) は 5.55 mM グルコースを添加した KRB 培地でマウスの 8 細胞期胚を胚盤胞まで発育させた。さらに McLaren and Biggers (1958) は、この Whitten 等の培養液を用いて得たマウス胚

盤胞を移植し、産子を得ることに成功した。その後、M16 (Whittingham, 1971), M2 (Quinn et al., 1982) や TYH (Toyoda et al., 1971) など様々な培養液が考案され、現在でも実験動物ではこのような単純な組成の培養液が主流となっている。

ヒト胚用の培養液の開発初期には、マウスで良好な成績を得た単純組成液の試験が行われ、BWW (Biggers- Whitten- Whittingham; Biggers et al., 1971) やタイロード液を改良した T6 (Whittingham, 1971) などがヒト胚培養液として用いられた。一方、多種類の栄養素が含まれる細胞培養用の Ham's F-10 (Ham, 1963) などの培養液も初期のヒト体外培養系において広く用いられた。しかし、細胞培養液は、株化された細胞に適した培養環境を与えるように考案されたもので、初期胚培養用に考案されたものではなく、後にこういった培養液には初期胚にとって悪い影響を与える様々な因子が含まれていることも指摘されてきた。

単純合成培地や細胞用培養液に変わり、Quinn et al. (1985) は受精卵が初期卵割を行う場である卵管に着眼し、その腔内を充満する卵管液成分の解析を行った。彼らは、その解析データを参考にして HTF (human tubal fluid) を開発した。当初の HTF は完全に卵管液成分を模倣しているとはいえない点があったため、1990 年代に修正が行われて現在に至っているが、ヒト体外受精-初期胚培養用としては最も長年にわたって使用されている培養液である。

体外受精卵の移植においては、受精後 2~3 日目に 4~8 細胞期の胚を卵管や子宮に移植するのが一般的である。一方、胚盤胞まで安定して培養が継続できれば、より発生能力が安定した胚を選択して移植できるようになり、妊娠率の向上、移植胚数の減少、多胎防止につながるというメリットがある。しかし、受精後の胚培養を HTF など 1 種類の培養液で行うシングルメディウムには胚盤胞への発生率が低いという問題点があった。

哺乳動物の胚発生は前半と後半の 2 つの周期から構成され、母性 RNA の働きにより未分化状態で細胞分裂を行う前半と、ゲノム DNA の制御により分化しながら胚盤胞へと変化していく後半に分けることできる (Braude, 1988; Telford et al., 1990)。この 2 つの期間をマウス胚で比較すると、グルコース、ピルビン酸、乳酸、アミノ酸など、主要成分の栄養要求性が大きく変化している。これはヒト胚においても例外ではなく、8 細胞期ごろを境に胚の栄養要求性が大きく変化することが知られている (Leese and Barton, 1984)。また、卵管液と子宮液の成分に違いがあることが生体成分の分析によって報告されており、胚が卵管から子宮へと移動するに伴って胚をとりまく環境が大き

く変化することも明らかになっている (Gardner et al., 1996). そこで, Gardner and Lane (1998) はシーケンシャルメディアを用いた 2 段階培養法を開発し, 8 細胞期までとそれ以降に組成の異なる培養液を用いることで胚盤胞への発生率が向上することを明らかにした. シーケンシャルメディアの開発には実際の卵管液や子宮液中の主要成分の分析が必要であり, Gardner et al. (1996) は, グルコース, ピルビン酸, 乳酸などの含量を測定し, それらをシーケンシャルメディアの開発に利用している. しかしながら, 卵管液と子宮液の組成は変化しやすいことも報告され (Summers and Biggers, 2003), 培養液開発のための基礎データ収集における問題点となっている. 培養液は, *in vitro* での条件下で胚発育にとって最適となる必要があり, 今後ヒト卵管液や子宮液のさらなる解析が進み, 生体内のアミノ酸やビタミン組成を反映した培養液の開発が期待される.

1-5 体外受精・胚移植の問題点

体外受精・胚移植の技術は革新的な不妊症の治療法として導入され, 全世界に普及した. しかし, 胚移植後の妊娠率はいまだ低く, 流産率も高い. 妊娠率を上げるために複数個移植されてきたが, 多胎率が高いという問題点があった.

この複数個の初期胚を子宮に移植する方法は, 1978 年ヒト体外受精 8 細胞期胚を子宮に移植し, 挙児が得られて以来, 媒精後 2~3 日目の 4~8 細胞期胚を子宮に移植することが一般的であった. このような早期移植の理由として体外環境における胚の暴露時間を短縮することが挙げられる. しかし, 通常この時期, 胚は卵管内に存在し, このような早期の胚移植は非生理的といわざるを得なかった. その後, 培養液の改良と共に胚盤胞移植が広く行われるようになった. 胚盤胞移植による利点は, 生理的に子宮腔内に存在する胚盤胞を子宮内に移植することにより胚のステージと子宮環境を一致させることができ, また培養時間延長のため胚の淘汰による良好胚の選別が可能である.

自然流産の 50%以上が胚の染色体異常が原因によって引き起こされることが明らかになっている (Martinez et al., 2010; Kuliev et al., 2003). ヒト胚の培養過程で染色体検査を行うと初期胚に 75%, 胚盤胞まで成長したものでも 56%, さらに形態が良好な胚盤胞であっても 48%に染色体異常が認められる (Alfarawati et al., 2011). このように胚の染色体異常が高率に認められる要因として, 減数分裂の分配異常, あるいは減数分

裂時の染色体の断片化があげられる。卵側の要因としては、減数分裂再開時の染色体異常による DNA の断片化が多く認められ、これらは紡錘体形成不全に起因している。これらの紡錘体の異常は高齢女性から得られた卵に多い。すなわち、出生時にすでに第一減数分裂前期の大部分を終了し、休止している卵には時間の経過とともに活性酸素などの悪影響が蓄積されるため、紡錘体による染色体の不分離が引き起こされる。また、精子側の要因としても減数分裂時の染色体分配異常が報告されている (Chandley and Speed, 1995)。このような先天的な精子 DNA の断片化は精液所見の精子濃度や運動率、精子正常形態との相関があると報告されている (Irvine et al., 2000; Zini et al., 2001)。

現在、良好胚の選別は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が、形態学的特徴は定量性に欠けること、客観性に欠けることから、厳密な品質評価は困難である。実際、多胎予防の観点から選択的単一胚移植が薦められているが、複数個移植よりも妊娠率が低いのは、形態学的アプローチの限界が一因であると考えられる。多胎を防ぐという世界的な趨勢からも、生児に至る発生能を有する胚の非侵襲的な評価方法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

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ことは妊娠率の向上、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。良好胚の選別には形態学的評価が用いられることが多いが、形態学的特徴による評価は定量性、客観性に欠けることから、厳密な品質評価は困難である。胚を形態学的に評価する方法としては前核期、分割期、胚盤胞期など各ステージの評価法が報告されている。しかし、単一胚移植が、複数個移植よりも妊娠率が低いのは、形態学的アプローチの限界が一因であると考えられる。したがって、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。

以上のことから、本研究では体外受精成功の鍵となる「着床および発生能の高い、染色体正常な胚」を選択するための非侵襲的な方法の開発を目的とした。近年、第一分割のタイミングが胚の生育能に関係しているとの報告がある。そこで、第二章では胚の有糸第一分裂とその後の胚発生能について検討した。第三章では胚の有糸第一分割と妊娠率および流産率との関係を検討した。さらに第四章では、キャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置 (CE-TOF MS) を用いた網羅的な代謝産物測定 (メタ

ボローム解析)により, 初期胚を培養した培地の代謝産物を全量解析し, 胚の代謝機構を網羅的に解析した. この結果を基に, 良好胚を機能的に判別するマーカーを明らかにし, 移植後に高い妊娠率が期待できる胚を選択する手法の開発を試みた.

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

序論

1978年にヒト体外受精8細胞期胚を子宮内に移植し、挙児が得られて以来、媒精後2日から3日目の4~8細胞期での移植が一般的であった。このような早期移植の理由として、体外環境における胚の暴露時間を短縮することが挙げられる。しかし、体内受精ではこの時期の胚は卵管内に存在しているため、このような早期胚の子宮への移植は非生理的であり、最適な移植とはいえないと考えられる。したがって、妊娠率を上昇させるためには複数個の胚を移植することになるが、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。このような多胎妊娠を予防するためには移植胚数を制限する必要がある、世界的にも選択的単一胚移植 (elective Single Embryo Transfer: eSET) が広がっている (Gardner et al., 2000; Criniti et al., 2005; Ferraretti et al., 2012)。国内においても、2008年に日本産科婦人科学会から胚移植数を原則1個とする会告 (日本産科婦人科学会, 2010) が出されたのを受け、急速に eSET を施行する施設が増え、多胎妊娠は着実に低下している (苛原, 2012)。

妊娠率を下げずに胚移植数を減らすためには、高い発生能をもち、着床能の高い、もともと質の高い良好胚を1つ選択する必要がある。移植胚の選択は非侵襲的かつ短時間で行わなければならない、非侵襲的な胚評価法として発生段階別に様々な評価方法が報告されている。まず前核期評価では、Scott の Z-score (Scott et al., 2000) と Tesarik の分類 (Tesarik and Greco, 1999) があげられる。Z-score は、前核の大きさ、前核接合の有無、核小体の数、大きさ、および配列によって Z1 から Z4 まで分類するものである。Scott et al. (2000) は、この分類により Z1 と Z2 受精卵が胚盤胞期胚に到達する確率 (予測率) は 49.5% であるのに対して、Z3 と Z4 のそれは 28% であったと報告している。Tesarik の分類は、核小体数、前核の大きさ、および極性により Pattern 0 から Pattern 5 まで分類する手法である。この分類法により評価した Pattern 0 受精卵は、他の Pattern に分類された受精卵と比較して、その後の培養による胚発育停止率が有意に低いと報告されている (Tesarik and Greco, 1999)。さらに、この分類胚を1個以上含んで移植した場合、含まない場合と比較し有意に妊娠率が高かったことも示されている (Tesarik and Greco, 1999)。

このような培養過程の一点を観察し、胚を評価する手法に対して、Payne et al. (1997) は、倒立顕微鏡上で受精卵を培養し、その初期発生（卵割過程）を連続撮影するシステムを立ち上げた。この連続的に長期間観察できる体外培養装置（time-lapse cinematography: TLC）を用いた動的観察では、核小体は出現期間を通して前核内を激しく移動しており、核小体出現様式と胚のクオリティー（その胚の発生能と着床能）の間に一定の傾向はみられないとの報告が多数なされている（Payne et al., 1997; Mio and Maeda, 2008; Kaser and Racowsky, 2014）。したがって、非連続的静止画像における核小体を指標にした胚の質的評価は困難であると思われる。

分割期の評価法として、Veeck の分類（Veeck, 1988）が一般的に用いられている。本法は、割球数、割球の均一性、fragmentation という 3 つの基準で分類する手法であり、評価はしやすいが、fragmentation の具体的な数値がない、多核や発育速度の評価がないといったマイナス点も多い。高見澤ら（2008）は、余剰胚追加培養を含めた新鮮胚の胚盤胞到達率は 40.9 %（119 / 291）であり、day 2 / day 3 における Veeck 分類と胚盤胞到達率との相関関係はみられなかったと報告している。また、Veeck 分類でグレード 4, 5 の不良胚でも 38.1 % が胚盤胞に到達し、そのうち良好胚盤胞は 53 % もあったことから、分割期の形態的評価のみで発生能の高い胚を選択するのが難しいと考えられた。Baxter et al. (2006) は、day 3 胚の評価において Veeck の分類を用いて 23 人の培養士で検討したところ、観察者間でかなりの変動 (κ 係数 = 0.24) があり、観察者内でも中程度の変動 (κ 係数 = 0.69) があつたことを報告している。つまり、このような形態観察は、客観的な数値化が困難であることも注意点としなければならない。

胚盤胞期胚の評価では、Gardner の分類（Gardner et al., 2000）が用いられている。本法は、胚盤胞腔の広がりや孵化の程度によって 1~6 の 6 段階のスコアを付け、さらに 3 以上の胚盤胞については内細胞塊と栄養外胚葉の様子について A から C の 3 段階に評価し、3AA のように表記している。Gardner et al. (2004) は、3BB 以上のグレードの胚を 1 個移植した時の着床率は 60.9 % であり、それ以下の胚と比較して有意に高かったと報告している。このように体外培養が可能な着床前の胚盤胞期胚までにおいて、その過程である前核胚、分割期胚の形態的評価は難しいが、到達した胚盤胞期胚を用いた評価の有効性が示されている。さらに、培養液および培養環境の改良も加わり、現在では胚盤胞期胚移植が広く行われるようになってきた（Gardner et al., 2000, 2004; Ferraretti et al., 2012; Ahlstrom et al., 2013）。しかし、Coskun et al. (2000) や Utsunomiya et al. (2004) は、胚盤胞まで発育が進まず、移植がキャンセルになった症例を含めると

妊娠率は分割期胚移植と有意差はないと報告している。また、胚盤胞期胚まで体外で培養することで、一絨毛膜性双胎の増加や胚への酸化ストレス、モザイク卵の発生、体外環境では胚盤胞期胚まで成長しない症例もあるなど、本法の負の要因も考慮に入れる必要がある。

そこで、早期の培養段階において、その胚の移植により着床し、妊娠成立しうる能力の予知法を、非侵襲的かつ客観的に数値化できる評価法として考案することが望まれてきた。その一つとして、第一分割のタイミングが着床能の高い胚を選択する方法の1つとなると提案されている。Shoukir et al. (1997) は、顕微授精ではなく通常の体外受精を行った周期を対象として検討し、媒精後 25 時間で第一分割していた胚を早期分割胚 (early cleavage: EC)、分割していなかった胚を非早期分割胚 (no early cleavage: NEC) として臨床的妊娠率を比較検討した。その結果、EC 胚を移植したグループが NEC 胚を移植したグループと比較して有意に妊娠率が高かったと報告している。また、Fenwick et al. (2002) と Neuber et al. (2003) は、EC 胚と NEC 胚の培養 2 日目、3 日目の胚の質を比較したところ、EC 胚が有意にグレードの高い胚が多く、その後の胚盤胞発生率も高かったと報告している。

しかしながら、第一分割のタイミングと胚発生率、妊娠率の関係は、Day 2 や Day 3 新鮮胚を用いた研究が多い。これらの研究で用いられた新鮮胚移植では、有糸分裂の遅れが胚盤胞までの発育を妨げたのか、着床能が低下したのか、あるいは自然流産のリスクが上昇したのかを判定することができない。さらに、一般的な体外受精では、いつ受精したかが個々の受精卵で異なるため、精子侵入後から第一卵割まで要する時間差とその後の発生能とを比較検証することが困難である。そこで、本研究では、顕微授精症例を対象として、かつ 1 個胚培養システムで個々の受精卵の発生を観察することで、第一分割のタイミングと胚盤胞期胚への発生率の関係について詳細に検討を行った。

材料および方法

対象

2007年11月から2012年12月までにウィメンズ・クリニック大泉学園にて顕微授精を行った患者のうち女性年齢42歳以下の871周期を対象とした。平均年齢は 35.9 ± 3.4 歳、平均体外受精(IVF)回数は 2.7 ± 2.1 回であった。

卵巣刺激法

卵巣刺激には、GnRHアゴニストを使ったショート法またはロング法、GnRHアンタゴニスト法、もしくはクロミフェンを用いた。ロング法は採卵の前周期の月経21日目から早期LHサージ抑制剤として、GnRHアゴニストであるブセレリン酢酸塩(Buserecur; Fuji Pharma Co., Ltd., Japan)を連日鼻腔に噴霧投与した。ショート法では採卵周期の月経2日目からブセレリン酢酸塩スプレーを連日鼻腔に噴霧投与した。アンタゴニスト法では、主席卵胞が15-16mmになってからGnRHアンタゴニスト(Cetrotide; MerckSerono Co., Ltd., Germany) 0.25 mgを連日投与した。卵巣刺激において、GnRHアゴニスト法もGnRHアンタゴニスト法も月経3日目より150-300 IU recombinant FSH (Follisutim; Merck & Co., Inc., Kenilworth, N.J., USA)あるいはFSH製剤かhMG製剤(Folyrmon P; hMG Fuji; Fuji Pharma Co., Ltd., Japan)を連日投与した。卵胞刺激後、血中E2値と卵胞発育をモニターしながら主席卵胞が18mm以上になった時点でhCG(HCG Mochida; Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Japan) 5,000-10,000単位もしくはGnRHアゴニストを投与した。その後34時間から35時間後に経膈超音波ガイド下にて採卵を行った。

低刺激法は、月経周期3日目から50 mgのクエン酸クロミフェン塩(Serophene; MerckSerono Co., Ltd., Germany)を連日経口投与し、もし3個以上の卵胞が発育してきたら100 IU recombinant FSHを連日投与した。投与後、血中E2値と卵胞発育をモニターしながら主席卵胞が18mm以上になった時点でGnRHアナログを噴霧投与し、その後34時間から35時間後に経膈超音波ガイド下にて採卵を行った。

精液調整

採卵当日に夫から精液を採取し、30分以上保温の後、液化を確認し精液調整を行った。調整にはIsolate (Irvine Scientific, USA)を用いた密度勾配遠心二層法とSwim-up

法を組み合わせて良好精子を回収した。

37°Cに加温した lower layer に同様に加温した Upper layer を重層、さらに液化した精液をその上に重層し、400×g にて 20 分間遠心後、上層を吸引除去し、沈渣を回収した。これを 37 °C, 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂ に調整した加湿型インキュベータ (Astech Co., Ltd., Japan) 内で平衡化した 5% ヒト血清アルブミン (Human Serum Albumin: HSA; Irvine Scientific, USA) を添加した HFF99 medium (Fuso Pharmaceutical Industries, Ltd., Japan) 1 ml の下層に沈め、インキュベータ内で 15 分間静地させた。その後、上層部を 0.3 μl 回収したものを運動良好精子として使用した。

媒精・胚培養

採取した卵子卵丘細胞複合体 (COC) を 5% HSA を添加した HFF99 medium で 2～4 時間前培養した後、ヒアルロニダーゼ (Irvine Scientific, USA) により卵子裸化处理を行った。第一極体の確認により成熟卵子の判定を行い、成熟卵子にのみ ICSI を施行した。ICSI 後、ミネラルオイル (Irvine Scientific, USA) を被せた 25 μl の Cleavage medium (Cook, Australia) ドロップに卵子を 1 個ずつ移し、加湿型インキュベータ内で培養を行った。

受精確認を媒精から 19～21 時間後に行い、雌雄両前核の確認できたものを正常受精卵として胚盤胞まで培養を行った。培養には 37 °C, 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂ の無加湿型インキュベータ (K-SYSTEMS Kivex Ltd., Denmark) を用い、day 3 に培養液を Blastocyst medium (Cook, Australia) に交換した。

胚評価

媒精後、19～21 時間で受精を確認し、同日媒精から約 25 時間後に再度確認を行った。この時第一卵割を開始していた胚を EC 胚、前核は消失していたが卵割は認められなかった胚を BD 胚、前核が認められた胚を PN 胚とした。

分割期胚の評価には、Veck の分類を用いた (Veck, 1988)。培養 3 日目に 6 細胞以上でグレード 2 以上の胚を良好分割胚とした。

Grade 1: 細胞の形態が均等で fragmentation が認められない胚

Grade 2: 細胞の形態が均等でわずかに fragmentation が認められる胚

Grade 3: 細胞の形態が不均等な胚 or 少量の fragmentation が認められる胚

Grade 4: 細胞の形態が均等 or 不均等でかなりの fragmentation が認められる胚

Grade 5: 細胞をほとんど認めず fragmentation が著しい胚

胚盤胞期胚の評価には Gardner の分類を用い (Gardner et al., 2000), 胚の発生段階をグレード 1~6, 内細胞塊 (inner cell mass: ICM) 形態を A~C, 栄養外胚葉 (Trophectoderm: TCM) 形態を A~C に分類し, グレード 3BB 以上を良好胚盤胞期胚とした.

統計処理

各実験結果に対し, Statcel - The Useful Addin Forms on Excel (OMS publishing Inc, Saitama, Japan) を用いて統計解析を行った. 平均値の比較は, Fisher の最小有意差検定により判定し, 5%水準で有意差を評価した. 第一分割のタイミングと卵巣刺激法は二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) を行い多重比較を行った.

実験計画

【実験 1】

ICSI 施行後 25 時間に胚を観察し, 早期分割 (EC 胚), 2PN 消失 (BD 胚), 2PN 継続 (PN 胚), を確認し, その発現率と患者背景を比較検討した. 卵巣刺激法によるそれぞれの胚の発現率を比較検討した.

【実験 2】

EC 区, BD 区, PN 区の培養 3 日目の胚の割球数とグレードを比較した.

【実験 3】

EC 区, BD 区, PN 区の培養 5, 6 日目の胚盤胞到達率, 良好胚盤胞発生率を比較した. また卵巣刺激法別の EC 区, BD 区, PN 区の胚盤胞到達率, 良好胚盤胞発生率を比較検討した.

結果

【実験 1】

卵子に ICSI を施行し 25 時間後に観察した本実験における卵提供患者背景と結果を表 1 に示した。EC 区, BD 区, PN 区で患者年齢, IVF 回数に有意差は認められなかった。EC 胚, BD 胚, PN 胚の発現率は, それぞれ 34.7% (606/1748), 28.3% (495/1748), および 37.0% (647/1748) であった。

卵巣刺激法別の各期発現率を表 2 に示した。EC 胚の発現率は, Clomiphene+FSH 法と比較して Agonist 法, Antagonist 法において有意に低かった ($P < 0.05$)。また, BD 胚の発現率は, Clomiphene+FSH 法と比較して Agonist 法, Antagonist 法において有意に高かった ($P < 0.05$)。

【実験 2】

培養 3 日目のそれぞれの区の割球数は, EC 区 7.8 ± 2.0 個, BD 区 7.1 ± 1.8 個, PN 区 6.4 ± 2.0 個であり, EC 区が BD 区, PN 区に比較して有意に割球数が多く, 分割スピードが速かった (表 3, $P < 0.05$)。

培養 3 日目の胚のグレードは, EC 区 2.2 ± 0.7 , BD 区 2.3 ± 0.7 , PN 区 2.4 ± 0.8 であり, EC 区が BD 区, PN 区に比較して有意にグレードが高かった。

【実験 3】

培養 5, 6 日目のそれぞれの区の胚盤胞到達率と良好胚盤胞発生率を表 4 に示した。胚盤胞到達率は, EC 区 74.7%, BD 区 63.3%, PN 区 37.2% であり, EC 区が, BD 区および PN 区と比較して有意に高かった ($P < 0.001$, $P < 0.0001$)。Gardner 分類による 3BB 以上を良好胚盤胞とした時の良好胚盤胞発生率は, EC 区 44.7%, BD 区 26.9%, PN 区 13.9% で EC 区が他の区より有意に高かった ($P < 0.0001$)。

卵巣刺激法別の胚盤胞到達率を図 1 に示した。卵巣刺激法別の良好胚盤胞発生率を図 2 に示した。いずれの卵巣刺激法でも PN 区, BD 区よりも EC 区が胚盤胞到達率および良好胚盤胞発生率が高値であった。

表 5 に第一分割のタイミングと卵巣刺激法を 2 要因とした胚盤胞到達率と良好胚盤胞発生率に関する二元配置 ANOVA 解析結果を示した。この結果, 胚盤胞到達率は第一分割のタイミングによって有意な差があった ($P = 0.0004$) が, 卵巣刺激法では有意

な差は認められなかった ($P = 0.4507$). 良好胚盤胞発生率も第一分割のタイミングにより有意差があった ($P = 0.0018$) が, 卵巣刺激法ではその差は認められなかった ($P = 0.4207$).

考察

高度生殖補助医療（Assisted Reproductive Technology: ART）の成功率を上げるためには、発生能の高い胚を選択することが不可欠である。現在多くの施設では胚移植の際の胚の選択に胚の形態によるスコアリングシステムが用いられているが、形態的特徴は定量的ではなく、厳格な判断は難しい。これに替わる非侵襲的方法として近年、胚呼吸量を調べて胚の質を調べる方法が開発されており、呼吸活性によって胚を選択すると高い着床能が予測できる（Abe and Hoshi, 2003; Utsunomiya et al., 2008）。しかし、呼吸量を測定する装置とスキルがそれぞれのラボに要求される。一方、第一分割のタイミングを見ることは特別な機器も培養士のスキルも必要とせず、移植に適した胚を選択できるのではないかと考えられる。

これまでに第一分割の早い受精卵から発生した胚（EC 胚）は分割の遅い胚と比較して妊娠率と着床率が高く、EC 胚は良好な 4 細胞期胚、8 細胞期胚、胚盤胞への発育に強く関与していることが報告されている（Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998, 2001; Fenwick et al., 2002; Tsai et al., 2002; Van Montfoort et al., 2004）。本研究においても培養 3 日目の分割数は BD 胚、PN 胚と比較して EC 胚が最も多く、グレードも最も高かった（表 3）。また、胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率においても BD 胚、PN 胚と比較して EC 胚がともに有意に高かった（表 4）。この事実から、早期分割胚は発育能力の高い胚であることが示された。

これまでに ICSI 由来胚で BD 胚・PN 胚が、低い発育能力をもつ理由は明らかになっていないが、不完全な受精過程が前核の遅い形成と第一分割を遅らせるだけでなく、胚盤胞への発育能力を低くする可能性がある。精子侵入後、卵子活性化は MII ステージから anaphase II（ANII）への減数分裂の再開を意味し、 Ca^{2+} オスシレーションによって誘導される。小胞体からの細胞質への Ca^{2+} の一過性の反復誘導は Cyclin B と Mos を分解し、CDK1 活性と ERK1/2 活性を低下させる。両者は MII ステージの維持を要求するので、その活性低下は第二極体排出の発動要因となるだけでなく、雌性前核形成を誘導する。さらに Ca^{2+} オスシレーションは、母性 mRNA（maternal RNA）を選択的に分解するとともに胚性遺伝子の転写活性のスタートにも寄与することで、卵の遺伝子発現から胚性の遺伝子発現パターンへと劇的な変化を誘起させる。このような受精のみならず胚発生の出発点となる Ca^{2+} オスシレーションは、卵に侵入した精子の細胞膜が消失し、精子細胞質が卵細胞質に拡散することで、そこに含まれる PLC ζ の卵

細胞膜付近への移動に起因している。すなわち、PLC ζ は細胞膜構成因子であるリン脂質 PIP2 を分解し、inositol tri phosphate (IP3) を産生する。この IP3 は、小胞体 (ER) の膜上に局在するリアノジン受容体に作用し、Ca²⁺が放出される。精子における PLC ζ の蓄積量は精子毎によって異なっており、IP3 レセプターは卵成熟の間にリン酸化されることが知られている (Wakai et al., 2012)。このように、精子を挿入した卵の PLC ζ または IP3 レセプターが低活性であると Ca²⁺オスシレーションが不十分であるかもしれない。さまざまな哺乳動物で Ca²⁺の異常が後期胚や胎仔の発生異常を引き起こす可能性も報告されており (Ozil and Huneau, 2001; Knott et al., 2005)、受精障害のみならず良好胚が得られない症例でも卵活性化障害を疑う必要があるのかもしれない。

マウスを用いた実験では、受精時に起こる Ca²⁺オスシレーションが加齢により変化することが明らかにされている (Igarashi et al., 1997)。また、卵の加齢により、小胞体への Ca²⁺の取り込み、IP3 受容体を介した Ca²⁺の放出、カルシウムストアの低下が起きていることが明らかにされている (Takahashi et al., 2000, 2009)。さらに、加齢卵では ATP 産生が低下していること (Igarashi et al., 2005)、ミトコンドリアにおいて活性酸素の発生による酸化ストレスが起きていることが明らかにされており (Takahashi et al., 2003)、これが細胞質内のカルシウム制御機構の異常と Ca²⁺オスシレーションの変化およびその後の胚発育の悪化に関与していると考えられている。

受精直後の胚の中には受精前の卵に由来する母性 mRNA 量が圧倒的に多く、そこから翻訳されたタンパク質によって発生が調節されている。胚性の遺伝子発現が始まってしばらく経過すると転写レベルが上昇し、胚のゲノムから転写された mRNA の量が増加する。この受精後の胚由来の遺伝子発現は zygotic gene activation (ZGA) と呼ばれている。一方、母性 mRNA は分解が進むことから新規に合成されるタンパク質は胚ゲノム由来の mRNA から翻訳されたものがその多くを占めるようになり、それまでとタンパク質合成パターンが大きく変化する。このような時期の遺伝子発現を major ZGA と呼ぶ (Schultz, 1993)。これに対し発現開始直後の転写レベルの低い時期は minor ZGA と呼ばれることがある。このような ZGA が起きる時期は動物種によって異なり、minor ZGA の発現開始時期はヒト、マウス、ウシでは 1 細胞期、ウサギは 2 細胞期、ブタでは 4 細胞期である。ZGA における遺伝子発現様式についてはマウスで多くの研究がなされており、まず 1 細胞期におこる minor ZGA については、雌性および雄性前核で開始時期はほとんど同じであるが転写活性は大きく異なり、雄性前核の方が雌性前核より高い。転写がもっとも早く検出されるのは S 期の中ごろであり、その後 G2 期の終

わりまで転写活性は次第に上昇している (Aoki et al., 1997). 第一細胞周期の S 期の持続時間が胚盤胞形成率と関与しているとの報告がある. ウシ胚においては S 期が長く, G1 期が短い胚 (Comizzoli et al., 2000), マウスにおいては G2 期が短い胚 (Schabronath and Gartner, 1988) の胚盤胞形成率が高いことが示されている. これは胚性遺伝子の発現と関連があるかもしれず, 第一細胞周期の S 期の持続時間は, 続く第一分割のタイミングに影響してくると考えられる. また, S 期が短いと DNA の複製が不完全になりやすく, DNA 複製異常がおこりやすくなるのではないかと考えられた. このような結果として前核の形成と第一分割が遅れるだけでなく, 受精した胚の不完全な能力が胚盤胞期まで影響するかもしれない.

妊孕性の高い胚の選別は ART を成功に導く重要な鍵のひとつである. 臨床的には非侵襲的な形態評価に頼らざるを得ず, 発生段階的別にさまざまな報告がされているが, どの方法にも限界がある. 本研究で検討した第一分割のタイミングによる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.

以上より, 第一分割のタイミングの早い胚は, 培養 3 日目の細胞数が多くグレードが高い胚であることが示された. また胚盤胞到達率, 良好胚盤胞到達率ともに高く発生能力の高い胚であることも示された. これらの結果より, 早期分割胚は, 移植の際に, より発生能力の高い胚を選択する際のマーカーになると考えられた.

要約

現在 IVF による初期胚移植において、妊娠出産に至る可能性が高い最適な胚を選択するための信頼できるマーカーが存在しないことが、低い着床率の原因の一つとなっている。近年、第一分割の早い胚は、その後の発生能力が高い胚であることが報告されている。そこで、第一分割の時期と胚発生能との関係を明らかにすることを目的とし、初期分割のスピードとグレード、さらに胚盤胞期胚への発育能力を調べた。

本章実験 1 では、顕微授精を施行したすべての胚 ($n=1,748$) において、媒精 25 時間後の胚の状態による発生能の違いを検討した。その時点で分割が認められた胚を EC 胚、前核が消失していた胚を BD 胚、前核が継続して認められた胚を PN 胚とした。それぞれの胚は、5 日目あるいは 6 日目まで培養し ($n=1,120$)、胚盤胞期胚への発育を評価した。その結果、培養 3 日目のそれぞれの区の割球数は、EC 区 7.8 ± 2.0 、BD 区 7.1 ± 1.8 、PN 区 6.4 ± 2.0 であり、EC 区が BD 区、PN 区に比較して有意に割球数が多く、分割スピードが速かった。また、胚のグレードは、EC 区 2.2 ± 0.7 、BD 区 2.3 ± 0.7 、PN 区 2.4 ± 0.8 であり、EC 区が BD 区、PN 区に比較して有意にグレードが高かった。胚盤胞到達率は、EC 区 74.7 %、BD 区 63.3 %、PN 区 37.2 % で EC 区が BD 区および PN 区に比較して有意に高かった ($P < 0.001$, $P < 0.0001$)。Gardner 分類による 3BB 以上を良好胚盤胞とした時の良好胚盤胞発生率は、EC 区 44.7 %、BD 区 26.9 %、PN 区 13.9 % で EC 区が他の区より有意に高かった ($P < 0.0001$)。また、二元配置 ANOVA 解析において、胚盤胞到達率は第一分割のタイミングによって有意な差があった ($P = 0.0004$) が、卵巣刺激法では差は認められなかった ($P = 0.4507$)。良好胚盤胞発生率も第一分割のタイミングにより有意差があった ($P = 0.0018$) が、卵巣刺激法ではその差は認められなかった ($P = 0.4207$)。

これらの結果より、第一分割のタイミングが早い胚には、卵巣刺激法に関わらず発生および着床の潜在能力の高い胚が多いと考えられた。体外受精後の第一分割のタイミングによる評価は、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く、胚移植の際の良好胚選択の指標になると期待される。

表 1. 患者背景と EC, BD および PN 胚の発現率

	EC	BD	PN	<i>P value</i>
周期数	301	276	294	
患者年齢 (歳)	35.8 ± 3.4	35.8 ± 3.4	36.0 ± 3.4	<i>N.S.</i>
IVF 回数 (回)	3.1 ± 2.1	2.4 ± 2.1	2.6 ± 2.2	<i>N.S.</i>
胚数	606	495	647	
発現率 (%)	34.7	28.3	37.0	

EC : ICSI 後 25 時間で分割を開始していた胚.

BD : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を消失していた胚.

PN : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を継続していた胚.

周期数, 胚数の数値は対象区における n 数を示す.

患者年齢, IVF 回数における数値は平均値 ± 標準偏差を示す.

発現率における数値は割合を示す.

患者年齢, IVF 回数において各実験区に有意差なし (*N.S.*).

表 2. 卵巣刺激法別の EC, BD および PN 胚の発現率

	GnRH agonist (n = 604)	GnRH antagonist (n = 717)	Clomiphene (n = 123)	Clomiphene + FSH (n = 304)	合計 (n = 1748)
EC (%)	32.5 (197) ^a	31.0 (222) ^b	39.0 (48)	45.7 (139) ^{a,b}	34.7 (606)
BD (%)	34.9 (226) ^a	41.1 (295) ^b	37.4 (46)	26.3 (80) ^{a,b}	37.0 (647)
PN (%)	36.6 (181)	27.9 (200)	23.6 (29)	28.0 (85)	28.3 (495)

EC : ICSI 後 25 時間で分割を開始していた胚.

BD : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を消失していた胚.

PN : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を継続していた胚.

数値は各項目における割合, () 内の数値は n 数を示す.

同一列内の同符号間に有意差あり ($P < 0.05$) .

表 3. 第一分割のタイミング別の培養 3 日目における割球数とグレード

	EC	BD	PN	<i>P value</i>
割球数	7.8 ± 2.0 ^{a,b}	7.1 ± 1.8 ^{a,c}	6.4 ± 2.0 ^{b,c}	<i>P</i> < 0.05
グレード	2.2 ± 0.7 ^{a,b}	2.3 ± 0.7 ^{a,c}	2.4 ± 0.8 ^{b,c}	<i>P</i> < 0.05

EC : ICSI 後 25 時間で分割を開始していた胚.

BD : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を消失していた胚.

PN : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を継続していた胚.

データを平均値±標準偏差で示す.

同一列内の同符号間に有意差あり (*P* < 0.05) .

表 4. 第一分割のタイミング別の胚盤胞到達率および良好胚盤胞発生率

	EC	BD	PN
胚数	387	338	395
胚盤胞到達率 (%)	289 (74.7) ^{a,b}	214 (63.3) ^{a,c}	147 (37.2) ^{b,c}
良好胚盤胞発生率 (%)	173 (44.7) ^{b,c}	91 (26.9) ^{b,d}	55 (13.9) ^{c,d}

EC : ICSI 後 25 時間で分割を開始していた胚.

BD : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を消失していた胚.

PN : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を継続していた胚.

胚数, 胚盤胞到達率, 良好胚盤胞発生率の数値は対象区における n 数を示す.

() 内の数値は各項目の対象区における割合 (%) を示す.

同一列内の同符号間に有意差あり (^a $P < 0.001$; ^{b,c,d} $P < 0.0001$).

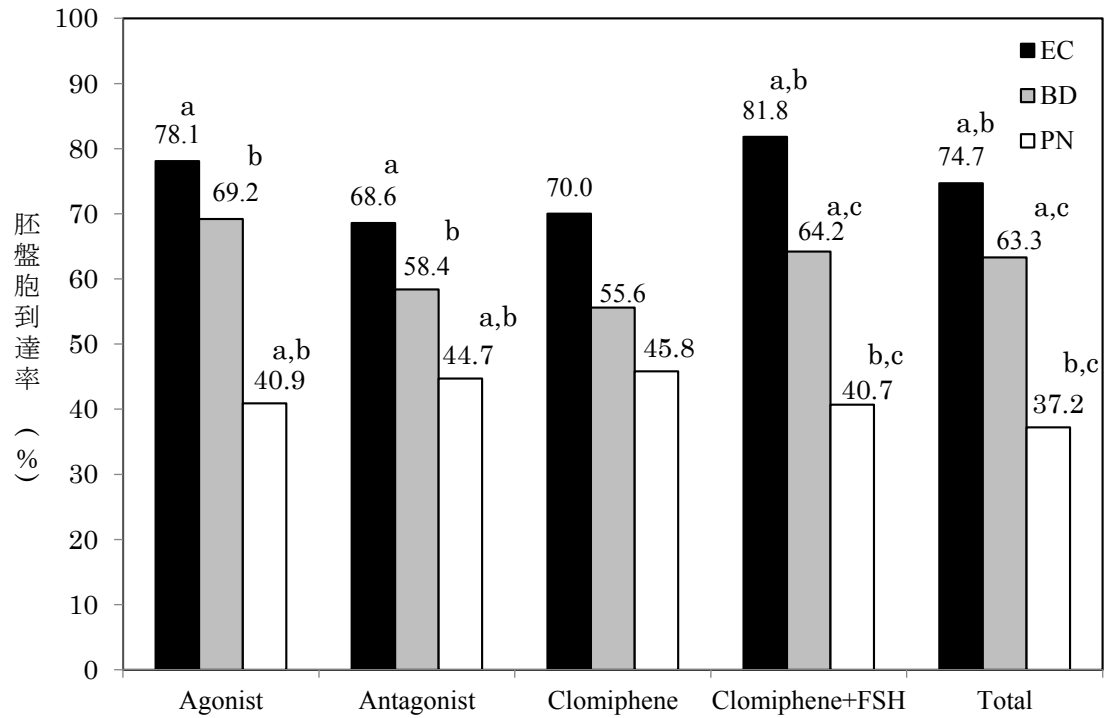


図 1. 各種卵巣刺激法で得られた卵子を ICSI し、培養 25 時間後に発育速度の違いにより分類した胚 (EC, BD および PN) の胚盤胞到達率

EC : ICSI 後 25 時間で分割を開始していた胚.

BD : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を消失していた胚.

PN : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を継続していた胚.

同一卵巣刺激法内の同符号間に有意差有り ($P < 0.05$).

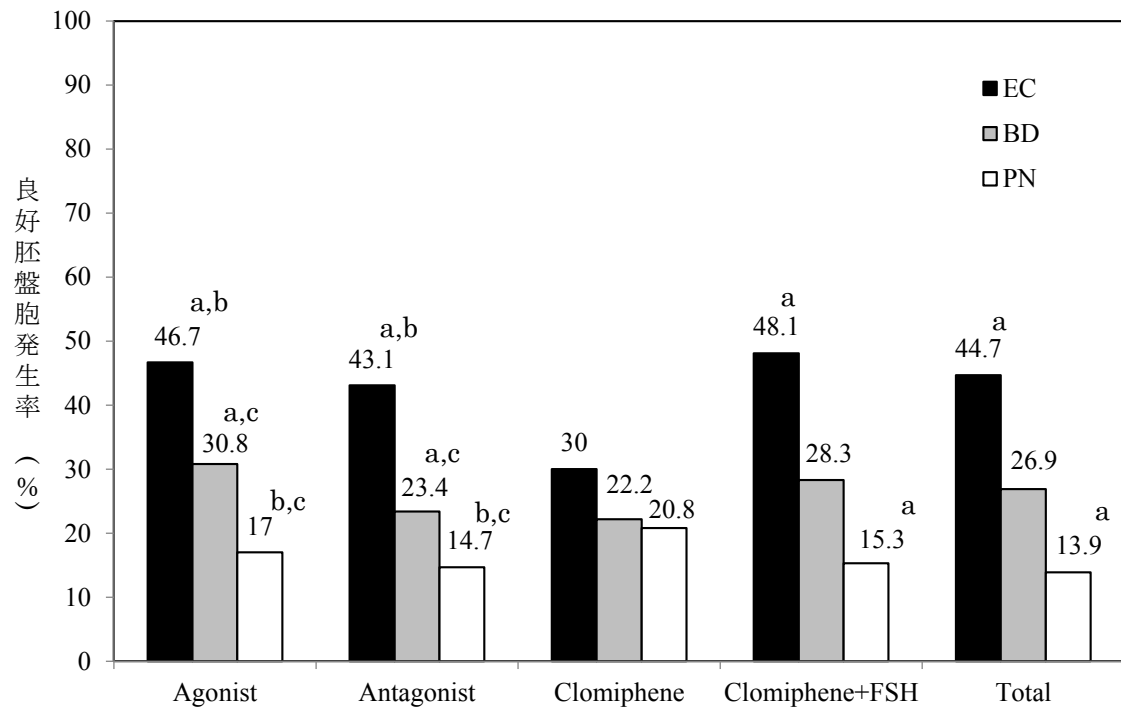


図 2. 各種卵巣刺激法で得られた卵子を ICSI し、培養 25 時間後に発育速度の違いにより分類した胚 (EC, BD および PN) の良好胚盤胞発生率

EC : ICSI 後 25 時間で分割を開始していた胚.

BD : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を消失していた胚.

PN : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を継続していた胚.

同一卵巣刺激法内の同符号間に有意差有り ($P < 0.05$).

表 5. 第一分割のタイミングと卵巣刺激法を 2 要因とした胚盤胞到達率と良好胚盤胞発生率に関する二元配置 ANOVA 解析

		Source	d.f.	<i>P value</i>
胚盤胞到達率 (%)	第一分割のタイミング		2	0.0004
	卵巣刺激法		3	0.4507
良好胚盤胞発生率 (%)	第一分割のタイミング		2	0.0018
	卵巣刺激法		3	0.4207

d.f.; degree of freedom.

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

序論

第二章では、第一分割のタイミングがその後の胚の発生能と密接な関係にあ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。現在の高度生殖補助医療では、受精直後の胚の発生能を評価（推定）するマーカーがないため、実際に3日培養しての分割胚の形態的評価、5日以上培養しての胚盤胞到達により胚の質を確認し、移植に用いている。しかし、このような長期間の体外培養は、高酸素、光刺激、限定された栄養基質の培地であるなど胚にとってストレスであり、いち早く体内に戻す（移植する）ことがのぞまれていることから、第二章において受精25時間以内に判定できる発生能マーカーの有用性が示唆された。

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はないことも分かってきた。すなわち、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%以上に到達している（Gardner et al., 2000; Mullin et al., 2012）。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（Wennerholm et al., 1998; Pantos et al., 1999; Nybo et al., 2000; Martinez et al., 2010）。したがって、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また担保することが、高度生殖補助医療の医療成績の向上に必要である。

高度生殖補助医療技術（Assisted Reproductive Technology: ART）によって成立した妊娠後の流産率が高い理由としては、ARTを受ける女性の年齢が比較的高いこと、採卵後も頻回に受診を要することから早期の流産を確認しやすいことが考えられる。このようなARTにおける自然流産において、その50%以上が胚性のaneuploidyによって引き起こされることも明らかにされている。特に、40歳以上の患者で胚の染色体異常に起因する流産が多く見られ、その原因として卵の減数分裂過程の染色体分配が高齢女性で異常を起こしやすいことが報告されている（Simpson, 1980; Kuliev et al., 2003; Martinez et al., 2010）。すなわち、第一減数分裂過程において二価染色体が第一極体と二次卵母細胞とに均等に分離されない染色体不分離が多発すると考えられている。

(Oliver et al., 2008; Ghosh, 2009).

また、精子の染色体異常も自然流産のリスクを引き上げる要因となる。精子の染色体異常の頻度は、ハムスター卵を用いた研究では10% (異数性1-3%, 構造異常5-10%) であり、FISH法を用いた研究では、精子の各常染色体の平均ダイソミー率は、0.1-0.2%と報告されている (Gardner et al., 2003)。さらに精液または精巣上体の酸化ストレスは、DNAダメージを誘導することが知られている (Zini et al., 2008)。特に体外での精子操作は酸化ストレス条件であり、精子が活性酸素のダメージを受けやすい状況下にあると考えられている (Aitken et al., 1997)。

上記のような配偶子形成過程における染色体異常に加え、Yamagata et al. (2009) は、ICSI卵の26.3%が第一卵割時に異常な染色体分配を引き起こすと報告している。精子や卵において染色体分配異常が起こる場合、それ以外の細胞内小器官や細胞骨格そのものにも異常が生じている可能性が高いことから、例えそれらが受精に用いられても発生能は低いと推定される。しかし、第一卵割の異常では、染色体分配が異常を呈した受精卵であっても胚盤胞期胚まで成長する。したがって、第一卵割における染色体分配異常に着眼することが、現在のARTにおける問題点である体外発生能と移植成績が正の相関をもたらさないことを解決する切り口になると期待できる。

このように、染色体異常の発生機序としては、卵や精子の作られる段階で起こる染色体不分離の他にも受精の段階である程度発生していると思われる。第二章の結果より、第一分割の遅れは不完全な受精過程が関与しているのではないかと推察された。本章では、第一有糸分裂の遅い、早いというタイミングがヒト体外受精胚移植の臨床成績に影響を与えるかを検討するために、第一分割のタイミングをモニタリングした胚を1個胚培養システムで胚盤胞に発育させ、その凍結胚盤胞期胚を次周期以降に融解し、胚移植を行い、その臨床成績を検証した。

材料および方法

対象

2007年11月から2012年12月までにウィメンズ・クリニック大泉学園にて顕微授精を行い、その後凍結融解胚移植を行った209周期を対象とした。平均年齢は35.9±3.4(27-42)歳だった。流死産絨毛・胎児染色体分析は、インフォームドコンセントを得られた症例に対してのみ検査を実施した。

卵巣刺激法、採卵法、媒精・胚培養、胚評価、実験結果の有意差検定については第二章と同様に行った。

胚の凍結保存

Gardner の分類により内部細胞塊と栄養膜外胚葉がグレード B 以上のものを形態良好な胚盤胞とし、条件を満たした胚盤胞期胚を次周期以降のために凍結保存した。胚を Vitrification Kit と Cryotop (KITAZATO BioPharma, Japan) を用いた急速ガラス化法で凍結し、液体窒素中に保存した。

融解胚盤胞移植

自然周期またはホルモン補充周期により融解胚盤胞移植を行った。Vitrification Kit (KITAZATO BioPharma, Japan) を用いて融解し、移植まで2~5時間の回復培養を行った。経膈超音波ガイド (MochidaSimense Co., Ltd., Japan) 下で北里 ET カテーテル (KITAZATO Co., Ltd., Japan) を用いて移植を行った。

黄体補充と妊娠判定

胚移植後の黄体補充には、自然周期の場合は hCG 注射 (HCG Mochida[®], Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Japan), ホルモン補充周期の場合はエストラジオール (ESTRANA[®] TAPE, Hisamitsu Pharmaceutical Co., Inc., Japan) 貼付とプロゲステロン膈錠 (LUTINUS[®] Vaginal Tablet, Ferring Pharmaceuticals Co., Ltd., Switzerland) を併用した。妊娠判定には、経膈超音波 (MochidaSimense Co., Ltd., Japan) を用い、子宮内に胎嚢を確認した周期を妊娠成立とした。

実験計画

【実験 1】

形態良好な胚盤胞期胚に到達した胚を凍結保存し，次周期以降に融解し，胚移植を行った． EC 区と BD 区， PN 区の患者において，採卵時の患者年齢， IVF 回数，臨床的妊娠率，流産率を比較検討した．各実験区の卵巣刺激法ごとの臨床的妊娠率，流産率も比較検討した．

【実験 2】

PN 胚由来の胚盤胞を移植して妊娠が確認されたが，妊娠 12 週未満に流産した症例に対して流産産絨毛・胎児組織 (Products of Conception: POC) 染色体分析を行った．

結果

【実験 1】

顕微授精により得られた受精卵を培養し、形態良好であった胚盤胞期胚を凍結保存した。凍結融解胚移植を希望した患者に、採卵周期の次周期以降に患者の子宮着床最適時期に併せて胚を融解し、胚移植を行った（表 6）。各実験区において患者年齢、IVF 回数に有意差は認められなかった。EC、BD および PN 区の臨床的妊娠率は、それぞれ 62.3 %、57.9 %、25.6 %であり、PN 区に比較して EC、BD 区が有意に高かった ($P < 0.01$)。しかし、流産率は EC、BD 区に比較して PN 区が有意に高かった ($P < 0.01, P < 0.05$)。

卵巣刺激法別の臨床成績を表 7 に示した。Antagonist 法と Clomiphene+FSH 法において臨床的妊娠率は、PN 区に比較して EC 区が有意に高かった ($P < 0.05, P < 0.01$)。流産率は、Agonist 法、Antagonist 法および Clomiphene +FSH 法において EC 区に比較して PN 区が有意に高かった ($P < 0.01, P < 0.05$)。

表 8 に臨床的妊娠率と流産率に関する二元配置 ANOVA 解析結果を示した。この結果、臨床的妊娠率においては第一分割のタイミングによって有意な差があった ($P = 0.0043$) が、卵巣刺激法では差は認められなかった ($P = 0.6860$)。流産率も第一分割のタイミングにより有意差があった ($P = 0.0055$) が、卵巣刺激法ではその差は認められなかった ($P = 0.5349$)。

【実験 2】

PN 由来胚を移植して妊娠し、流産した 8 症例に POC 染色体検査を行った。その結果、8 症例すべてに染色体異常が認められた（表 9）。

考察

ARTによる胚移植数は、従来までは日本産科婦人科学会の見解により3個以下と提示されてきたが、妊娠率を向上させるために1胚ではなく複数胚を移植するため、多胎妊娠が高頻度で見られる現状に変化はなかった。水口ら(1995)の調査では、ARTの多胎妊娠率が20~35%に達しており、それが周産期医療に多大な影響を与えてきた。母胎における多胎妊娠の問題点として、妊娠高血圧症候群などの母体の合併症の増加や切迫早産がある。また、新生児側からは、早産による児の予後の悪化や新生児集中治療室(NICU)の慢性的な占有といった問題が生じている。分娩施設並びに産科医不足が社会問題となっている現在、ARTによる不妊治療成功の指標として単胎妊娠率を用いるべきとの見解が2008年4月に日本産科婦人科学会より出され、胚移植は原則として単一とすると提示された(日本産科婦人科学会, 2010)。しかし、選択的単一胚移植(e-SET)において最も重要な鍵となる胚選別の基準に統一された見解がないのが現状である。

第二章では、第一分割の早い胚が遅い胚に比較して有意に胚盤胞発生率が高く(74.4 v.s. 37.2%, $P < 0.0001$)、第一分割のタイミングがその後の胚の発生能と関係していることが明らかになったため、本章では第一分割のタイミングが臨床成績にどのような影響を与えるかを検討した。実験1において第一分割のタイミングの早い順番にEC, BD, PN区の臨床的妊娠率を比較すると、PN区に比較してEC, BD区の臨床的妊娠率が有意に高い値を示した。これまでの研究においても、第一分割の早い胚を移植すると分割の遅い胚を移植した周期と比較して、臨床的妊娠率が有意に高いことが報告されている(Shoukir et al., 1997; Sakkas et al., 1998, 2001; Bos- Mikich et al., 2001; Lundin et al., 2001; Fenwick et al., 2002; Tsai et al., 2002)。しかしながら、その多くは2個以上の胚を移植しており、これではどの胚が妊娠したのか判別することは難しい。本研究では単一胚移植を行っているので、これまでの仮説である「第一分割のタイミングと妊娠」の関係を明確化するという画期的成果を得ることができたと考えられる。

また、実験1のEC区, BD区, PN区における臨床妊娠後の流産率を比較検討した結果、流産率は、PN区に比較してEC, BD区が有意に低かった。Van Montfoort et al. (2004)は、Day2胚移植の流産率において、第一分割の早い胚を移植し、妊娠に至ったグループが、分割が遅い胚と比較して低かったと報告している(早期分割胚20% v.s. 遅延胚41.7%)。さらに、Lundin et al., (2001)も早期分割胚と移植後の流産率の関係

を検討し、第一分割の早い胚を移植し妊娠したグループが、分割の遅い胚を移植し妊娠したグループよりも流産率が低く（12.1 v.s. 20.2 %, $P=0.036$ ）、出生率が有意に高かった（34.3 v.s. 24.0 %, $P=0.0009$ ）と報告している。このように、早期分割胚を移植することで流産リスクが低くなり、児が得られる可能性が高くなるのではないかと考えられた。そこで実験 2 では、第一分割の遅い PN 胚を移植し妊娠に至ったが、流産した 8 症例について、流死産絨毛・胎児組織（POC）染色分析を行った結果、全症例で染色体異常が認められた。

それでは、胚の分割スピードと染色体異常には何らかの関係があるのだろうか？ Munne et al. (1993) は、発育停止胚の 71 %が染色体異常であることを報告しており、Magli et al. (2007) は受精後 62 時間で 8 細胞になった胚と比較して発生を停止した胚や分割遅延胚は有意に染色体異常が高いことを報告している。Yamagata et al. (2009) はライブセルイメージング技術を開発し、マウス胚において ICSI を行い、その卵割時における紡錘体や染色体動態を観察した。その結果、26.3 %が第一卵割の際に abnormal chromosome segregation (ACS) を起こしていたと報告している。しかし、ACS を起こした胚であっても正常な形態の胚盤胞期胚に成長したが、その ACS 胚を移植した結果、胎齢 7.5 日前後ではほぼ全てが流産した。この報告は、第一分割における染色体分配異常が、ICSI における低出産率の原因のひとつになっていることを示唆している。染色体の分配異常がゆっくりしたスピードの分割を導くのか、あるいは有糸分裂のタイミングの遅れが APS を引き起こすのか、を判断するのは難しい。しかし、1 つの可能性として、同じ時期に ICSI により精子を注入したにもかかわらず、第 1 卵割が起こるタイミングが遅いことは、精子が卵を活性化する能力が低い、あるいは精子による刺激を卵が感受する能力が低いという受精障害ととらえることができる。この仮説の立証には、ICSI 後の第二極体放出タイミングと第一卵割のタイミングに相関がある予想されるため、タイムラプス装置を用いた検討が必要と考えられる。

以上より、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、その結果、染色体分配異常が現れると考えられた。したがって、第一有糸分裂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になると期待される。

要約

現在、体外受精による初期胚移植において、妊娠出産に至る可能性高い最適な胚を選択するための信頼できるマーカーが存在しないことが、低い着床率の原因の一つとなっている。IVF や ICSI のような生殖補助医療 (ART) を必要とする不妊カップルの数が過去 20 年間の間に急速に増大してきた。ART の成績を伸ばすためには、非侵襲的な技術を用いた発生能力の高い胚の選択が、必要不可欠である。しかしながら、多くの不妊治療クリニックが ART 後の高い自然流産率 18~30 % を報告している。さらに、流産の頻度は自然妊娠よりも ART 妊娠の方が著しく高いとの報告もある。

本章では、第一分割のタイミングと臨床的妊娠率、流産率との関係を調べた。媒精後 25 時間で観察を行い、その時点で分割が認められた胚を EC 胚、前核が消失していた胚を BD 胚、前核が認められた胚を PN 胚とした。それぞれの胚は 5 日目あるいは 6 日目まで培養し、良好な胚盤胞期胚 (Gardner 分類 3BB 以上) へ発育した胚を凍結保存した。コントロール凍結融解良好胚盤胞移植は 209 周期行った。EC、BD および PN 区の臨床的妊娠率は、それぞれ 62.3 %、57.9 %、25.6 % であり、PN 区に比較して EC、BD 区が有意に高かった ($P < 0.01$)。しかし、流産率は EC、BD 区に比較して PN 区が有意に高かった ($P < 0.01, P < 0.05$)。また、第一分割の遅い PN 胚を移植し妊娠に至ったが、流産した 8 症例について、流死産絨毛・胎児組織 (POC) 染色分析を行った結果、全症例で染色体異常が認められた。

これらの結果より、体外受精後の第一分割の早い胚には、発生能力が高く、着床率が高いだけでなく、流産率も低い胚が多いことが示唆された。よって、早期分割胚は胚移植の際の良好胚選択の指標になるだけでなく、流産を減らすケアプログラムとして利用できるのではないかと考えられた。

表 6. 第一分割のタイミング別の臨床成績

	EC	BD	PN	<i>P value</i>
周期数	109	57	43	
患者年齢 (歳)	35.3 ± 3.3	35.6 ± 3.5	35.5 ± 4.2	<i>N.S.</i>
IVF 回数 (回)	3.1 ± 2.0	3.0 ± 2.0	3.4 ± 2.7	<i>N.S.</i>
臨床的妊娠率 (%)	62.3 (68/109) ^a	57.9 (33/57) ^b	25.6 (11/43) ^{a,b}	^{a,b} <i>P</i> < 0.01
流産率 (%)	4.4 (3/68) ^c	15.2 (5/33) ^d	72.7 (8/11) ^{c,d}	^c <i>P</i> < 0.01 ^d <i>P</i> < 0.05

EC : ICSI 後 25 時間で分割を開始していた胚.

BD : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を消失していた胚.

PN : ICSI 後 25 時間で前核 (2PN) を継続していた胚.

周期数の数値は対象区における n 数を示す.

患者年齢, IVF 回数における数値は, 平均値 ± 標準偏差を示す.

臨床的妊娠率, 流産率における数値は割合を示す.

() 内の数値は, 臨床的妊娠率では (臨床的妊娠数/移植周期数), 流産率は (流産数/臨床的妊娠数) を示す.

患者年齢, IVF 回数において各実験区に有意差なし (*N.S.*).

同一列内の同符号間に有意差あり (^{a,b,c}*P* < 0.01; ^d*P* < 0.05).

表 7. 各種卵巣刺激法における EC, BD および PN 胚の臨床成績

卵巣刺激法		EC	BD	PN	<i>P value</i>
GnRH agonist	臨床的妊娠率 (%)	65.6 (21/32)	61.9 (13/21)	40.0 (6/15)	<i>N.S.</i>
	流産率 (%)	0 (0/21) ^{a,b}	30.8 (4/13) ^a	66.7 (4/6) ^b	^{a,b} <i>P</i> < 0.01
GnRH antagonist	臨床的妊娠率 (%)	64.9 (24/37) ^c	47.6 (10/21)	28.6 (4/14) ^c	^c <i>P</i> < 0.05
	流産率 (%)	4.2 (1/24) ^a	0 (0/10) ^b	75.0 (3/4) ^{a,b}	^{a,b} <i>P</i> < 0.01
Clomiphene	臨床的妊娠率 (%)	62.5 (5/8)	66.7 (2/3)	0 (0/3)	<i>N.S.</i>
	流産率 (%)	0 (0/5)	0 (0/2)	(0/0)	
Clomiphene + FSH	臨床的妊娠率 (%)	68.8 (22/32) ^a	66.7 (8/12) ^c	9.1 (1/11) ^{a,c}	^a <i>P</i> < 0.01, ^c <i>P</i> < 0.05
	流産率 (%)	9.1 (2/22) ^a	12.5 (1/8) ^c	100 (1/1) ^{a,c}	^a <i>P</i> < 0.01, ^c <i>P</i> < 0.05
合計	臨床的妊娠率 (%)	62.3 (68/109) ^a	57.9 (33/57) ^b	25.6 (11/43) ^{a,b}	^{a,b} <i>P</i> < 0.01
	流産率 (%)	4.4 (3/68) ^a	15.2 (5/33) ^c	72.7 (8/11) ^{a,c}	^a <i>P</i> < 0.01, ^c <i>P</i> < 0.05

臨床的妊娠率, 流産率における数値は割合を示す.

() 内の数値は, 臨床的妊娠率では (臨床的妊娠数/移植周期数), 流産率は (流産数/臨床的妊娠数) を示す.

同一列内の同符号間に有意差あり (^{a,b}*P* < 0.01; ^c*P* < 0.05).

同一列内の各実験区間に有意差なし (*N.S.*) .

表 8. 第一分割のタイミングと卵巣刺激法を 2 要因とした臨床的妊娠率と流産率に関する二元配置 ANOVA 解析

	Source	d.f.	<i>P value</i>
臨床的妊娠率 (%)	第一分割のタイミング	2	0.0043
	卵巣刺激法	3	0.6860
流産率 (%)	第一分割のタイミング	2	0.0055
	卵巣刺激法	3	0.5349

d.f.; degree of freedom.

表 9. PN 胚由来胚盤胞移植後の流死産絨毛・胎児組織 (POC) 染色体検査結果

Patient no.	Age (year)	No. of IVF attempts	Karyotype
1	30	3	47,XY,+22
2	35	5	47,XY,+22
3	35	4	47,XX,+8
4	36	3	47,XX,+22
5	36	2	47,XY,+22
6	38	2	47,XX,+16
7	39	2	47,XY,+22
8	39	1	47,XX,+15

Karyotype : 染色体数, 性染色体の内訳, 異常の内訳を示す.

第四章 胚代謝産物の網羅的解析

序論

第二章および第三章の結果から、第一分割のタイミングは、第一分割時の染色体分配の正常性との関連性が高いことが明らかになった。さらに、第一分割のタイミングは移植後の流産リスクの低い真の良好胚を選択することができるマーカーとなることも示された。生殖補助医療において、上述のような精度の高いマーカーにより移植前に妊娠に至りうる良好胚を選択することは、多胎妊娠の回避のみでなく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。また、この手法を家畜の受精卵移植に応用することにより、有用形質をもった個体を効率よく生産することも可能になると期待できる。

現在、ヒト初期胚のみでなく家畜においても、良好胚の選別は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が、形態学的特徴による評価は定量性や客観性に欠けることから、厳密な品質評価は困難である。実際、ヒトでは多胎予防の観点から選択的単一胚移植が薦められているが、複数個移植よりも妊娠率が低いのは、形態学的アプローチの限界が一因であると考えられる。したがって、受精卵の第一卵割のタイミングにより染色体の正常性を予知するという新たな動態評価のみでなく、機能的評価も行うことで、発生能と染色体の正常性の両者を担保した真の良好胚を選択し、高い移植成功率がもたらされると期待できる。実際、本研究の第二章において、第一分割が起こるタイミングが早い胚は、培養3日目の分割スピードが速く、胚盤胞到達率も高い値を示した。この結果は、3日目までの初期胚の機能の差異により発生能が予測可能であることを示唆している。

培養3日目までの初期卵割期胚は、細胞分裂に必須なエネルギー生産機構をミトコンドリア主体から細胞質での糖代謝主体に変化する時期である。そもそも減数分裂過程の卵は糖代謝を行うのに必須な glucose 6 phosphate dehydrogenase や hexokinase がほとんど発現していない (Biggers, 1967; Fagbohun and Downs, 1992; Downs and Utecht, 1999)。枯渇するピルビン酸やアセチル CoA を卵はギャップジャンクションを介して卵丘細胞から供給され、それらを TCA サイクルの原料に用いて電子伝達系で ATP を合成する (Downs and Utecht, 1999)。排卵過程に卵丘細胞と卵のギャップジャンクシ

ンは閉鎖することから、受精後の初期胚では早期に卵丘細胞に依存したエネルギー生産からの切り替えが必要となる (Gilula et al., 1978). この切り替えは、胚ゲノムの活性化 (zygotic genome activation: ZGA) による上述の酵素の新規合成によりもたらされるが、これはマウスでは2細胞期で、ヒトにおいては4~8細胞期でおこる (Clegg and Piko, 1982; Flach et al., 1982; Biggers et al., 1988). すなわち、培養3日目までにZGAが誘起され、胚の代謝活性は劇的に上昇し、その上昇は特に胚盤胞が拡張する時期に顕著になる.

上述の通り、着床前の胚盤胞期胚への発生過程では、解糖系がエネルギー生産の主要経路へと変化していく。これは、ZGAにより解糖系に関わる酵素群が新規合成されるからであり、このグルコース消費の着床前胚の遅い段階での増加は、マウス、ラット、ヒト、ウシ、ヒツジなどさまざまな種でみられる (Leese and Barton, 1984; Brinson and Leese, 1991; Matsumoto et al., 1999). ウシとマウスにおいて、胚盤胞期に培養液中のグルコースの取り込み量の高い胚は、移植した後の成長が良いことが報告されている (Renard et al., 1980; Gardner and Leese; 1988). また、Gardner et al. (2001) は、day 4でグルコースの取り込み量の高いヒト胚は、取り込み量の低い胚に比べて胚盤胞到達率が有意に高かったと報告している.

しかし、Hardy et al. (1989) と Gott et al. (1990) は、グルコース代謝ではなくピルビン酸の取り込みが高い初期胚は、胚盤胞期胚への発生が高いことを報告している。さらに、近年、細胞呼吸活性 (酸素消費量) を指標とする非侵襲的な胚の評価法などが検討され (Shiku et al., 2001; Utsunomiya et al., 2008), 呼吸活性の中庸な胚の着床率が高いと報告されている。この結果は、電子伝達系がある程度必要であるが、それに依存しすぎている胚は正常ではないという複雑な胚の発生過程における代謝メカニズムを示唆している。重要な点として、胚の栄養要求性や代謝パターンは、複数の栄養素のバランスでなっており、Hardy 等のピルビン酸取り込みの研究や近年の呼吸の研究を比較する時には、培養条件の違いや対象胚のステージの違いを考慮する必要がある。

以上のことから、胚の新たな正常性マーカーとして単純に1つの代謝経路を評価することは、形態的評価と同様にその胚の一部分の状態をとらえているにすぎず、正確な胚の選別マーカーとはなり得ないと考えられる。胚の機能の結末点となるようなマーカーを探索すること、さらにそのような複数マーカーの総合点で判定することが必要である。

そこで、本研究では、胚の機能評価を可能とする代謝機構を網羅的、かつ非侵襲的に解析する研究を実施するため、キャピラリー電気泳動—飛行時間型質量分析装置

(CE-TOF MS) を用いた網羅的な代謝産物測定 (メタボローム解析) により, 初期胚を培養した培地の代謝産物を全量解析し, それらから, 胚の代謝機構を網羅的に解析し, 良好胚と不良胚におけるそれらを比較解析した. この結果から, 機能的に良好胚を判別するマーカーを明らかにし, 移植後高い妊娠率が期待できる胚を選択する手法を開発することを本章の目的とした.

材料および方法

体外受精施行前に体外培養についての説明を行い、インフォームドコンセントを得られた症例について培養液のサンプリングを行った。卵巣刺激法，採卵法，媒精・胚培養，胚評価，実験結果の有意差検定を第二章と同様に行った。

培養液のサンプリングおよびメタボローム解析

受精確認後 Day1 から Day3 まで培養した培養液を 1.5 ml のサンプルチューブに入れて -80 °C で冷凍保存した。胚盤胞期胚まで発育し，さらに移植により妊娠した胚を発生良好群，胚盤胞期胚まで発育せず分割を停止したものを発生不良群に分類し，その培養液のプールサンプルを混合し，メタボローム解析に供した（Human Metabolome Technologies Inc, Yamagata, Japan）。

ピルビン酸・乳酸の測定方法

Pyruvate Assay Kit (Bio Vision, USA) を用いて，培養液中のピルビン酸量を測定した。培養液と等量の Reaction Mix (Pyruvate Assay Buffer, Pyruvate prove, Enzyme Mix) とを混合し，暗所で 30 分間反応させた。蛍光プレートリーダーを用い O.D.570 nm の波長で測定した。

培養液中の乳酸量については，Lactate Assay Kit (Bio Vision, USA) を用いて同様に測定した。

実験計画

【実験 1】

受精卵を Day1 から Day3 まで培養した培養液を発生良好群と発生不良群に分類し，CE-TOF MS によるメタボローム解析を行った。両者の培養液中の代謝産物を比較した。

【実験 2】

実験 1 の結果から，発生良好群と発生不良群の代謝産物の中でピルビン酸と乳酸濃度に差があることに注目した。受精卵を Day1 から Day3 まで個別に単一培養した培養液中のピルビン酸濃度と乳酸濃度を測定した。それぞれの濃度を発生良好群と発生不良群で比較した。

結果

【実験 1】

胚盤胞期胚まで発育し、移植により妊娠に至ったものを発生良好群、培養 3 日目までは良好であったが胚盤胞期胚まで発育せず分割を停止したものを発生不良群に区分した。それぞれの群の培養 3 日目までの培養液を混合してメタボローム解析により代謝産物の特定と濃度比較を行った。

培養液を採取した患者背景を表 10 に示した。発生良好群と発生不良群において比較検討した結果、患者年齢、ART 回数、Day3 胚の割球数、Day3 胚のグレードのいずれにおいても両群間に有意差は認められなかった。

メタボローム解析を行い、培養液中の代謝物を特定した。主成分分析 (Principle Component Analysis: PCA) 結果を図 3 に示した。階層的クラスタ解析 (Hierarchical Cluster Analysis: HCA) 結果より 58 個の代謝産物が得られた (表 11)。発生良好群と発生不良群を比較すると多くの物質が両群ともに発生過程で生産されていたが、Terephthalic acid, 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1, 3-propanediol, Glyoxylic acid, 2-Hydroxybutyric acid, Propionic acid, 2-Hydroxyvaleric acid は両群ともに消費されていた。これらの代謝物はアミノ酸代謝経路に関する物質が多く含まれていた。発生良好群では、TCA サイクルの中間代謝物である Succinic acid, Citric acid, Malic acid が増加していた。また Lauric acid, Pelargonic acid, 5-Oxohexanoic acid, Ile, Valeric acid, Butyric acid, Decanoic acid, Undecanoic acid, ρ -Toluic acid, Hexanoic acid, Heptanoic acid, Asp, Lactic acid, 2-Hydroxy-4-methylvaleric acid, Cystine, Leu は発生不良群で多量に生産されていた。これらの代謝物には脂肪酸代謝経路に関与する物質が多く含まれていた。さらに、Taurin, Cyclohexylamine, Sarcosine, Pantothenic acid は発生不良群で多量に消費されていた。以上のように発生良好群と発生不良群の代謝産物に顕著な差が認められた。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を比較すると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。

【実験 2】

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。発生良好群のピルビン酸使用量は、 0.25 ± 0.03 mM、発生不良群は、 0.24 ± 0.03 mM であり、両群間に有意差は認められなかった。また、そ

それぞれの群の乳酸使用量は、 0.43 ± 0.13 mM と 0.44 ± 0.30 mM であり、両群間に有意差は認められなかった。

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が有意に高かった(図 4, $P < 0.05$)。

考察

第二章，第三章では，第一分割のタイミングが第一卵割時の染色体分配の正常性と関連性が高いことを明らかにし，移植後の流産リスクの低い真の良好胚を選択することができるマーカーとなることを示した．本章では，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と考え，培地中の代謝産物の網羅的解析を行った．胚盤胞期胚まで発育し，その後移植し妊娠に至ったものを発生良好群，培養 3 日目までは良好であったが胚盤胞期胚まで発育せず分割を停止したものを発生不良群として代謝産物を比較したところ，両群間には明らかな差が認められた(実験 1)．

初期胚のエネルギー代謝は，受精卵の発生段階に応じてダイナミックに変化する (Whittingham, 1969; Ginsberg and Hillman, 1975)．マウスでは，未受精卵から 2 細胞期まではピルビン酸を主なエネルギー源とした代謝を行うが，ミトコンドリアによるクエン酸回路→酸化リン酸化の好氣的代謝も同時に機能しており，受精前後のピルビン酸代謝はこの時期の主要な ATP 発生源となっている (Biggers et al., 1967; Gardner et al., 1988)．一方，2 細胞期以降からグルコースの取り込みが上昇し，8 細胞期以降でグルコースを利用した解糖系主体の代謝に変化する．その後，着床前後の低酸素状態では，グルコース代謝は主に乳酸産生に至る嫌氣的代謝によって営まれていることが知られている (Benos and Balaban 1983; Lane and Gardner, 2000; Trimarchi, 2000)．

本章において，乳酸の消費量よりもピルビン酸の消費量が多い胚が，移植後の妊娠率が高いことが示された．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が知られている (Brinster, 1971)．マウス胚は，受精直後から 2 細胞期までピルビン酸絶対要求性であり，乳酸のみでは第一分割をサポートすることはできないが，1 細胞期でも 2 細胞期でも乳酸はただちに酸化され，ピルビン酸に変換される (Wales and Whittingham, 1967, 1973)．このマウスにおける代謝機構と本研究成果は矛盾するものであるが，この矛盾こそ ZGA 時期の違いに起因し，ヒトでは培養 3 日目まではピルビン酸依存的な状態にあり，よりピルビン酸を消費した初期胚が胚盤胞期胚に発達し，妊娠に至ると考えられた．また，発生良好群では，TCA 回路の中間代謝物である Succinic acid, Citric acid, Malic acid が増加していたことは，ヒト胚では培養 3 日目までは嫌氣的解糖よりも呼吸代謝が重要であることを示している．既存の呼吸量を指標

とした胚の選別は、胚盤胞期胚で実施されている (Shiku et al., 2001; Date et al., 2011). しかし、この時期には嫌氣的解糖が支配しており、本章の結果から考えると呼吸活性測定は培養 3 日目まで連続的に測定し、その初期値の高さ、その後の減少比率を測定することで、受精直後に代謝活性が高く、その後 ZGA により嫌氣的解糖系へと代謝系がシフトしたことを指標化でき、代謝から ZGA を推定することにより、遺伝子発現の正常な良好胚を選別できると考えられた。

本章のメタボローム解析データから代謝経路全体を網羅するため主成分分析 (principal component analysis: PCA) を行った結果、脂肪酸代謝とアミノ酸代謝の重要性も示された。まず、脂肪酸代謝においては、発生不良胚では脂肪酸、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。パントテン酸はビタミン B₅ とも呼ばれ、糖質・脂質・タンパク質の代謝に補酵素として関与しているが、特に脂質の代謝において重要な役割を果たすとされている。Dunning et al. (2010) は、マウスの卵成熟と着床前胚発育において、脂肪酸の代謝基質としての働きに着眼し、脂肪酸代謝の第 1 段階である β -酸化の役割と制御について研究した。まず彼らは、卵成熟あるいは 1 細胞期に β -酸化を阻害すると、その後の胚盤胞発育率が減少することを示した。一方、長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に輸送するためのキャリアである L-カルニチン添加は、卵成熟過程で β -酸化が促進され、体外受精後の胚盤胞発育率は有意に増加することから、脂質代謝が初期胚の発育に不可欠であると結論づけた。また Yamada et al. (2012) は、中鎖脂肪酸であるオクタン酸がマウス胚において着床前胚の発生のためのエネルギー源として有用であることを報告している。実験 1 において脂肪酸代謝の中間物質である中鎖脂肪酸が発育不良胚において顕著に増加していた。このことは、代謝が活性化され増加したのか、それとも代謝活性が低いために中間産物が蓄積したのかは不明であるが、検出される脂肪酸代謝物が胚の発生マーカーとなりうると考えられた。

Houghton et al. (2002) は、High performance liquid chromatography (HPLC) を用いた研究で、異なるステージのヒト初期胚培養液中の 18 種類のアミノ酸濃度を測定し、発生停止した胚と胚盤胞を形成した胚ではアミノ酸代謝の異なるプロファイルを示したことを報告している。その結果は、day 2 と day 3 胚では、グルタミン、アルギニン、メチオニンの取り込み量が低値であり、さらにアラニンとアスパラギンの産生能が低いという 2 つの要因が胚盤胞まで発生する確率を高くすることを示している。また、8 細胞期から桑実期胚までのアミノ酸代謝の解析では、セリンの取り込みが低く、グリ

シンとアラニンの産生が低い胚の胚盤胞到達率が高値であった。さらに、アミノ酸の消費と産出についても検討し、発生停止した胚よりも発育している胚においてアミノ酸の代謝回転が低いことを示した。Brison et al. (2004) は、同じく HPLC を用いた研究で、ヒト初期胚の培養液中グリシンとロイシンの減少とアスパラギンの上昇が、高い臨床妊娠率と生産率を予測する指標となることを報告している。さらに Seli et al. (2008) は、Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$) を用いた研究で、培養液中のグルタミン酸レベルの増加が臨床妊娠率および生産率に關与していることを明らかにしている。また、Houghton et al. (2002) は、発育良好なヒト胚は発育不良胚よりもメチオニン産生能が有意に高いことを示している。一方、本研究において、発育良好胚を培養した培地中で上昇していたアミノ酸は、チロシン、バリン、グルタミン酸、スレオニン、メチオニンであった。これらと既存の研究成果から、良好胚マーカーとしてグルタミン酸とメチオニンが有力な候補となると考えられた。

以上の結果から、培養 3 日までの初期胚の代謝機能の差により、その後の発生能が予測できることが明らかになった。ヒト初期胚は、ピルビン酸を主体としたエネルギー生産のみならず、脂質代謝、アミノ酸代謝も同時に機能しており、その代謝能力の差によって発生に差が生じてくると考えられた。これらのことより、妊孕力の高い新たな選別マーカーとしては複数の代謝産物を評価する必要があると思われた。その候補として培養液中のピルビン酸/乳酸取り込み量比、中鎖脂肪酸量、グルタミン酸量、メチオニン量の測定が有効であると推察される。

要約

現在、ヒト初期胚のみでなく家畜のそれにおいても、良好胚の選別を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が、形態学的特徴は定量性、客観性に欠けることから、厳密な品質評価は困難である。実際、多胎予防の観点から選択的単一胚移植が薦められているが、複数個移植よりも妊娠率が低い要因として、従来の形態学的アプローチの限界が一因であると考えられる。したがって、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。

受精確認後胚盤胞期胚まで発育し、その後移植し、妊娠に至ったものを発生良好群、培養 3 日目までは良好であったが胚盤胞期胚まで発育せず分割を停止したものを発生不良群に区分した。それぞれの群の培養 3 日目までの培養液を混合してメタボローム解析により代謝産物の特定と濃度比較を行った結果、発生良好群と発生不良群の代謝産物に有意な差があ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。

以上の結果から、培養 3 日までの初期胚の代謝機能の差により、その後の発生能が

予測できることが明らかになった。よって受精卵を培養する過程で複数の代謝基質をモニタリングすることにより、より妊孕力の高い胚を選択できる新たなマーカー開発につながると期待される。

表 10. 培養液を採取した患者の背景比較

	発生良好群	発生不良群
周期数	8	10
年齢 (歳)	36.8±3.4	35.6±3.4
ART 回数 (回)	3.25±3.4	2.25±3.4
Day 3 胚の割球数	9.25±3.4	7.55±3.4
Day 3 胚のグレード	2.1±3.4	2.0±3.4

周期数は対象群における n 数を示す。

それ以外の項目の数値は平均値±標準偏差を示す。

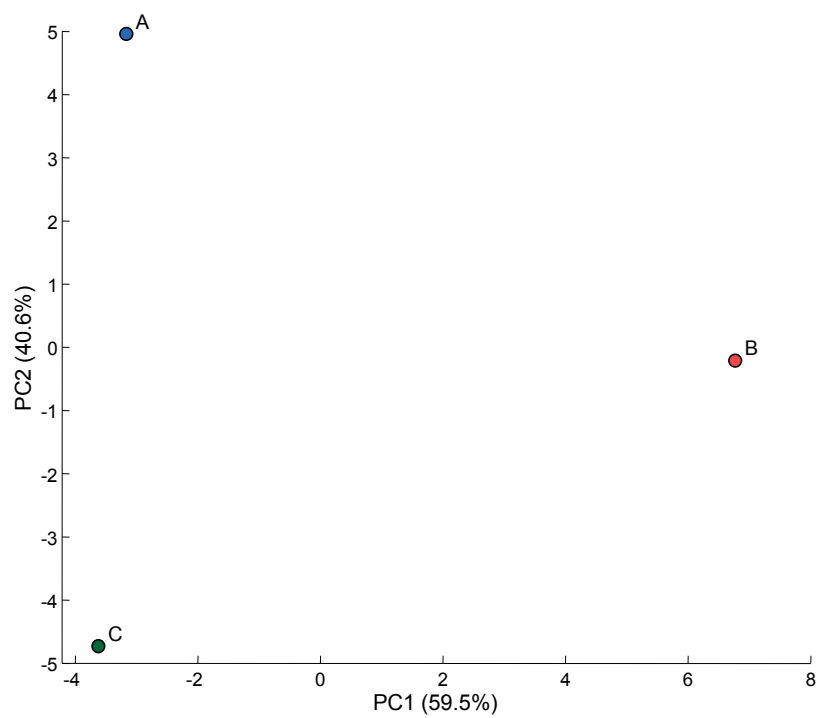


図 3. 主成分分析 (PCA) 結果

PC1, PC2 はそれぞれ第一主成分得点, 第二主成分得点を示し, () 内の数字は各主成分の寄与率を示す.

A : コントロール.

B : 発生良好群.

C : 発生不良群.

表 11-1. 階層的クラスター解析 (HCA) 結果

HMT DB † Compound name	<i>m/z</i>	MT	Standardized Relative Area §		
			Control	発生良好群	発生不良群
Terephthalic acid	165.019	16.46	1.134	-0.380	-0.755
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol	122.081	8.19	1.152	-0.510	-0.642
Glyoxylic acid	72.993	11.52	1.140	-0.729	-0.411
2-Hydroxybutyric acid	103.039	9.56	1.038	-0.957	-0.081
Propionic acid	73.030	10.70	0.940	-1.051	0.112
2-Hydroxyvaleric acid	117.055	9.01	0.871	-1.092	0.222
Lauric acid	199.169	7.44	0.603	-1.154	0.551
Pelargonic acid	157.123	7.91	0.367	-1.132	0.765
5-Oxohexanoic acid	129.056	8.88	0.366	-1.131	0.765
Ile	132.101	10.20	0.230	-1.095	0.865
Valeric acid	101.060	9.05	0.141	-1.063	0.922
Butyric acid	87.045	9.66	0.129	-1.058	0.929
Decanoic acid	171.138	7.74	0.126	-1.057	0.931
Undecanoic acid	185.154	7.58	0.008	-1.004	0.996
<i>p</i> -Toluic acid	135.045	8.93	-0.005	-0.997	1.003
Hexanoic acid	115.076	8.66	-0.053	-0.972	1.026
Heptanoic acid	129.092	8.34	-0.069	-0.964	1.033
Asp	134.044	11.54	-0.118	-0.936	1.054
Lactic acid	89.024	10.65	-0.142	-0.921	1.063
2-Hydroxy-4-methylvaleric acid	131.071	8.61	-0.536	-0.618	1.154
Cystine	241.029	10.97	-0.865	-0.230	1.095
Leu	132.101	10.31	-0.906	-0.168	1.073
Asn	133.060	10.48	-1.133	0.375	0.758
Ornithine	133.096	6.87	-1.150	0.488	0.662
Arg	175.118	7.16	-1.152	0.644	0.508
Trp	205.096	11.00	-1.151	0.650	0.501
Glycerophosphocholine	258.108	21.53	-1.141	0.723	0.419
Ala	90.055	9.04	-1.137	0.745	0.392
5-Oxoproline	128.035	9.28	-1.134	0.756	0.378
Lys	147.112	6.93	-1.117	0.813	0.304

表 11-2. 階層的クラスター解析 (HCA) 結果

HMT DB † Compound name	<i>m/z</i>	MT	Standardized Relative Area §		
			Control	発生良好群	発生不良群
Pro	116.070	10.78	-1.115	0.819	0.296
Benzoic acid	121.029	9.64	-1.110	0.830	0.281
Gln	147.076	10.74	-1.096	0.863	0.233
Phe	166.085	11.06	-1.085	0.884	0.201
Ser	106.049	9.99	-1.080	0.894	0.186
His	156.076	7.35	-1.066	0.917	0.149
Gly	77.042	8.21	-1.029	0.968	0.060
Isobutylamine	74.096	7.07	-0.879	1.088	-0.209
Tyr	182.080	11.33	-0.787	1.125	-0.338
Pyruvic acid	87.009	12.65	-0.640	1.152	-0.512
Val	118.086	10.01	-0.625	1.153	-0.529
Glu	148.060	10.93	-0.590	1.155	-0.564
Thr	120.064	10.51	-0.542	1.154	-0.612
Succinic acid	117.019	20.78	-0.541	1.154	-0.613
Citric acid	191.018	26.07	-0.494	1.151	-0.657
Met	150.058	10.71	-0.489	1.150	-0.662
Malic acid	133.014	21.18	-0.402	1.138	-0.736
Melamine	127.072	7.66	0.058	0.970	-1.028
Triethanolamine	150.112	8.19	0.215	0.875	-1.090
Choline	104.107	6.93	0.282	0.829	-1.111
Ibuprofen	205.122	7.58	0.366	0.765	-1.131
Tyramine	138.090	8.19	0.377	0.757	-1.134
Octanoic acid	143.107	8.16	0.432	0.712	-1.143
Diethanolamine	106.086	7.68	0.552	0.603	-1.154
Taurine	126.021	21.94	0.573	0.581	-1.155
Cyclohexylamine	100.112	7.72	0.642	0.510	-1.152
Sarcosine	90.055	9.50	0.724	0.417	-1.141
Pantothenic acid	218.102	7.45	0.850	0.252	-1.102

† 検出ピークの *m/z* と MT から HMT データベースに照合し得られた候補化合物。

§ 検出ピークの Relative area を標準化した値。

緑が濃いほど平均よりも小さいことを示し、赤が濃いほど平均よりも大きいことを示す。

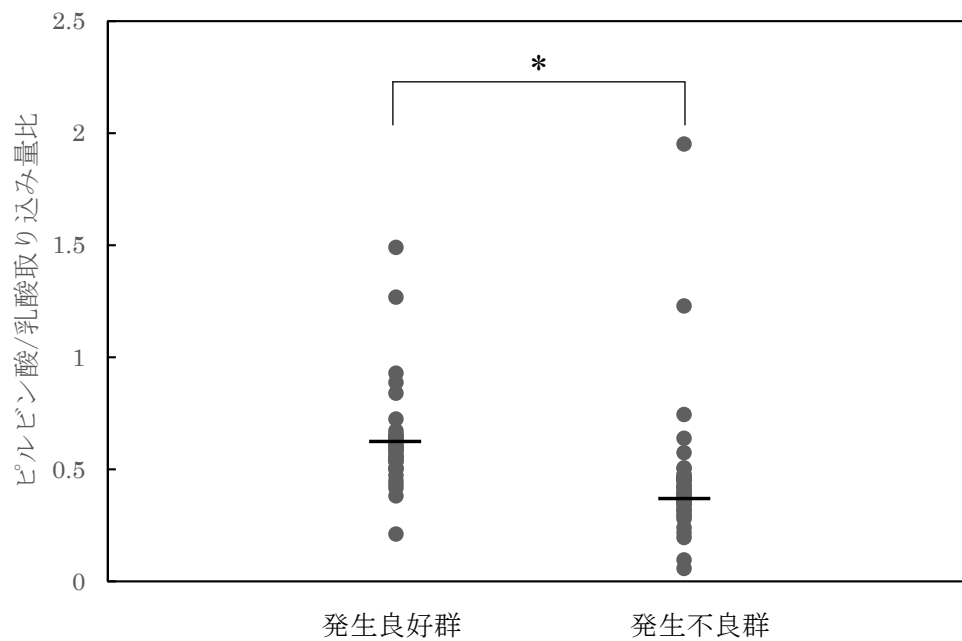


図 4. ピルビン酸/乳酸取り込み量比較

* : 発生良好群と発生不良群のピルビン酸/乳酸取り込み量間に有意差あり ($P < 0.05$).

第五章 総合論議

1974年以降、日本の合計特殊出生率は人口置換水準を継続的に下回っている。2015年6月に公表された「人口動態統計」(Ministry of Health Labor and Welfare, 2015)によると、合計特殊出生率は1.42人と人口置換水準の出生率2.07人の7割弱に相当するに過ぎない。このような少子化の傾向は女性の高学歴化による晩婚化が主因と考えられ、日本以外の先進諸国でも広く認められる現象である(Blossfeld and De Rose, 1992; Kohler et al., 2002)。晩婚化により妊娠適齢期ではない女性が妊娠を望むことが多くなり、その結果として高齢妊娠が増加している。また、加齢による自然妊娠率の低下のため、不妊治療の1つの方法である体外受精を希望する患者は年々増加し、2012年度には37,953人と全出生児の3.7%(37,953 / 1,037,231)に相当する体外受精児が誕生している(Ministry of Health Labor and Welfare, 2013; Japan Society of Obstetrics and Gynecology, 2014)。

現在、日本において体外受精(*in vitro* fertilization: IVF)を施行する患者の中央値は37歳と高齢になっている(Saito et al., 2010)。30代後半の女性では、卵の発達および成熟を担保する卵胞内細胞である顆粒膜細胞数が少ないことや、その顆粒膜細胞の機能低下が報告されている(Pellicer et al., 1994; Seifer et al., 1996, 2002; Tatone et al., 2006; Gonzalez-Fernandez et al., 2011)。したがって、自然妊娠が難しいため、外因性ホルモン投与による卵巣刺激を行い、IVFを行うことにより30代後半の不妊女性に妊娠をもたらすことができる。

こうした社会情勢と、卵巣刺激にIVFと胚移植(ET)を組み合わせた高度生殖補助医療技術の発展により、高齢妊娠の割合は増加傾向にある。それに伴って、高齢妊娠で発生しやすい妊娠高血圧症や早産のリスクが高くなり、周産期管理を難しいものとしている。さらに、胚移植に伴う多胎妊娠の増加により、周産期医療や新生児医療の現場に以下の様な問題が生じている。まず母体においては、多胎妊娠は単胎妊娠と比較して周産期死亡率が高い。特に品胎妊娠は、単胎妊娠と比較して約12倍、双胎妊娠と比較しても約6倍も周産期死亡率が高いと報告されている(齋藤, 2008)。また、出生した児においても、早産に伴って出生後の死亡率が増加するという問題がある。特に32週以前の早産では、1,500g未満の低出生体重児となる可能性が高く、生後7日

未満の早期新生児死亡率も、品胎において単胎や双胎のそれと比較して有意に高い (The ESHRE Capri Workshop Group, 2000). 従来の IVF-ET では、体外受精によって得られた受精卵を 4~8 細胞期胚になるまで (2~3 日間) 体外培養後、子宮内に移植する初期胚移植が多く施設で実施されていた。しかし 4~8 細胞期では初期胚のその後の発生能力を見極めるのが困難であり、安定した治療成績を得るためには複数個の初期胚を移植せざるを得ないのが現状である。したがって、妊娠率を高めるために複数個の胚を移植することで多胎妊娠が増加し、その結果、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。このような多胎妊娠を予防するためには移植胚数を制限することであり、世界的にも選択的単一胚移植 (elective Single Embryo Transfer: eSET) が広がっている (Gardner et al., 2000; Ferraretti et al., 2012). 国内においても、2008 年に日本産科婦人科学会から胚移植数を原則 1 個とする会告 (日本産科婦人科学会, 2010) が出されたのを受け、急速に eSET を施行する施設が増え、多胎妊娠は着実に低下している (苛原, 2012). しかし、移植周期あたりの妊娠率が低下して、患者の治療期間が長期化している現状にある。

妊娠率を下げずに胚移植数を減らすためには、高い発生能を持ち、着床能の高い、得られた受精卵の中で最も質の高い良好胚を選択する必要がある。この移植胚の選択は、非侵襲的かつ短時間で行わなければならない、多くの施設は形態学的評価によって移植する胚を選択している。しかし、このような形態学的な判定法は、定量性に欠けること、客観性に欠けることから、厳密な品質評価は困難である。したがって、発生能力の高い胚の非侵襲的な評価方法の検討が必要だと考えられる。胚評価法として、発生段階別に様々な評価方法が報告されているが、その一つに、受精後の第一分割のタイミングの早い胚はその後の胚発生能力が高いとの報告がある (Shoukir et al. 1997; Fenwick et al., 2002; Neuber et al., 2003). そこで、本研究の第二章において、ICSI 施行 25 時間後の胚の状態による発生能の違いを検討した。その結果、早期分割胚 (EC 胚) は、胚盤胞到達率の高い、つまり発生能力の高い胚であることが明らかになった。また、第一分割のタイミングにより、卵巣刺激方法に関係なく胚盤胞到達率の高い胚を選択できることが確認された。これまでに ICSI 由来の分割遅延胚 (PN 胚) において発達能力が低い理由は明らかにされていないが、不完全な受精過程は前核の遅い形成と第一分割を遅らせるだけでなく、胚盤胞への発達能力を低くする可能性がある。マウス胚 (Schabronath et al., 1988) やウシ胚 (Comizzoli et al., 2000) では、第一細胞周期の DNA 複製期 (S 期) の持続時間が胚盤胞到達率と関与しているとの報告がある。こ

れは胚性遺伝子の発現と関連があるかもしれず、第一細胞周期の S 期の持続時間は、続く第一分割のタイミングに影響してくると考えられる。また、S 期が短いと DNA の複製が不完全になりやすく、DNA 複製異常がおこりやすくなるのではないかと考えられた。このような結果として、前核の形成と第一分割が遅れるだけでなく、受精した胚の不完全な能力が胚盤胞期まで影響するかもしれない。

現在の高度生殖補助医療では、受精直後の胚の発生能を評価（推定）するマーカーがないため、実際には 3 日間培養後の分割胚の形態的評価を実施し、その後に胚盤胞期胚に発達した胚を移植に用いている。しかし、このような長期間の体外培養は、高酸素および光刺激の存在、限定された栄養基質の培地を用いるなど胚にとってストレス環境下であり、いち早く体内に戻す（移植する）ことが望まれている。そこで、第二章における受精 25 時間以内に判定できる発生能マーカーが、移植後の着床率をも予測できるか否かを第三章で検討した。また、凍結胚盤胞期胚の移植により着床率は 50% 以上に到達しているが（Gardner et al., 2000; Mullin et al., 2012）、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ことから（Wennerholm et al., 1998; Pantos et al., 1999; Nybo et al., 2000; Martinez et al., 2010）、着床率に加えて妊娠継続率と流産率も併せて検証した。

その結果、第一分割のタイミングの検出は、着床率の高い良好胚を選択するのに有用な方法であるだけでなく、胚移植後の自然流産を減らすことができることを明らかにした。これまで第一分割のタイミングと胚発生率、妊娠率の関係は、day2 や day3 新鮮胚を用いた研究が多かった（Fenwick et al., 2002; Neuber et al., 2003）。しかしながら、これらの研究で用いられた Day 2 - 3 新鮮胚移植では、有糸分裂の遅れが胚盤胞までの発育を妨げたのか、着床能が低下したのか、あるいは自然流産のリスクが上昇したのかを判定することができない。そこで第三章では、第一分割のタイミングと胚発育との関係を 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を凍結し、その後コントロールサイクルで胚移植を行った。その結果、EC 胚移植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%, $P < 0.01$ ）。この結果は、これまで仮説であった第一分割のタイミングと妊娠との関係を明確にすることができた画期的な成果であると考えられる。

不妊治療を受ける女性の平均年齢は、年々上昇傾向にあるが、高齢妊娠は流産率の上昇と関連している。全年齢を含めた妊婦全体の流産率は約 15% といわれており、年

年齢別にみると母体が30歳以下では8~15%であるが、35歳で20%、40歳で40%、42歳で50%、45歳以上で70~80%と加齢とともに上昇する（関沢ら、2011）。しかし、流産のほとんどは母胎の妊娠維持能力ではなく、胎児側要因である染色体異常が原因である。第三章では第一分割の遅いPN胚を移植し、妊娠には至ったが、流産した8症例について、流死産絨毛・胎児組織（POC）染色体分析を行った結果、全症例で染色体異常が認められた。PN胚は胚盤胞到達率が低く、胚移植例も少ないため妊娠・流産例も少なくその原因解明には至っていない。動物実験では、マウスにおいて加齢個体卵におけるBRCA-1（breast cancer susceptibility gene 1）発現が低くなることにより、異数紡錘体が出現し、さらには染色体異常を生じるとの報告がある（Pan et al., 2008）。BRCA-1は乳ガンおよび卵巣ガンに關与するガン抑制遺伝子であるが、細胞周期のチェックポイントにおいて正しい染色体分離に必要とされており、BRCA-1が欠損もしくは変異した細胞では染色体異常が生じると報告されている（Wang et al., 2004）。Pan et al. (2008) は、BRCA-1が紡錘体形成に深く関わっており、発現低下によって紡錘体形成不全を引き起こすことから、加齢に伴うBRCA-1の発現低下は、卵における異数体出現の増加に關連があると結論付けている。

生殖補助医療を目的とした体外受精等の技術の普及により、その技術向上や安全性の確保などの観点から、卵・胚における代謝や発生機構の重要性が年々高まっている。卵は技術的制約や量的な問題から生化学的研究が極めて困難であるが、最近の発生生殖工学の進歩や分子イメージングなどの新しい手法の開発により、卵や初期胚におけるエネルギー代謝研究も従来に比べ飛躍的に進んできた。メタボローム解析は、細胞内の代謝産物をバイアスをかけない手法により網羅的に探索し、新規の代謝経路やこれまで解明されなかった代謝調節機構、あるいは遺伝子やタンパク質の機能やこれらの生体分子との相互作用を解き明かそうとする方法である。本研究において、受精確認後胚盤胞まで発育し、その後移植し妊娠に至ったものを発生良好群、培養3日目までは良好であったが、その後胚盤胞期胚まで発育せず分割を停止したものを発生不良群としてCE-TOF MSによる培養液のメタボローム解析を行い、代謝産物を比較したところ、両群間に明らかな差が認められた。主成分分析（principal component analysis: PCA）を行い、代謝物全体の変動パターンを調べた結果、脂肪酸代謝とアミノ酸代謝の重要性も示された。まず発生不良群では、中鎖脂肪酸、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、ビタミンB₅とも呼ばれ、糖質・脂質・タンパク質の代謝に補酵素として關与しているが、特に脂質の代

謝に重要な役割を果たすとされている。Dunning et al. (2010) は、マウスの卵成熟と着床前胚発育において、脂肪酸の代謝基質としての働きに着眼し、脂肪酸代謝の第 1 段階である β -酸化の役割と制御についての研究を行い、卵成熟あるいは 1 細胞期に β -酸化を阻害すると、その後の胚盤胞発育率が減少することを示した。本研究において脂肪酸代謝の中間物質である中鎖脂肪酸が発育不良胚において顕著に増加していた。このことは、代謝が活性化され増加したのか、それとも代謝活性が低いために中間産物が蓄積したのかは不明であるが、検出される脂肪酸代謝物が胚の発生マーカーとなりうると考えられた。アミノ酸代謝の報告としては、Seli et al. (2008) は、Proton nuclear magnetic resonance ($^1\text{H NMR}$) を用いたヒト胚の研究で、培養液中のグルタミン酸レベルの増加が臨床妊娠率および生産率に關与していると報告している。また、Houghton et al. (2002) は、発育良好なヒト胚は発育不良胚よりもメチオニン産生能が有意に高いことを示している。一方、本研究において、発育良好胚を培養した培地中で上昇していたアミノ酸は、チロシン、バリン、グルタミン酸、スレオニン、メチオニンであった。これらと既存の研究成果から、良好胚マーカーとしてグルタミン酸とメチオニンが有力な候補となると考えられた。また、ヒト初期胚は、ピルビン酸を主体としたエネルギー生産のみならず、脂質代謝、アミノ酸代謝も同時に機能しており、その代謝能力の差によって発生に差が生じてくると考えられた。よって妊孕力の高い新たな選別マーカーとしては、複数の代謝産物を評価する必要があると思われた。

以上記述してきたように、本研究における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検討は、体外受精の妊娠率の向上に貢献できると考えられる。一方、今回の網羅的な代謝物の解析により、多くの研究があるマウスやウシの代謝系とは異なるヒト胚特異的な代謝パターンが認められた。この結果は、マウスやウシなどの培養液を参考にして開発・改良されてきたヒト初期胚の培養環境を再検討する必要性を示唆している。実際、体外培養によりのヒト受精卵が胚盤胞期胚へ到達する割合は、マウスやウシのような他の哺乳動物と比較して、低いのが現状である (Lonergan et al., 1996; Sirisathien and Brackett, 2003)。したがって、本研究で明らかになったヒト初期胚の代謝機能に着眼することで、より発生能の高い体外受精胚の獲得を可能とする培養液の開発につながると期待される。

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、IVF-ET のニーズは高まるものと思われる。胚移植前に質的に最も良好な胚を選択することは、妊娠率の向上、多胎妊娠の回避、流産率低下のために有効である。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期胚まで培養後に凍結し、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 (Saito, 2010), それら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 ART 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などに応用することにより、その生産性向上が期待できると考えられる。

第六章

総括

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、流産率も高いのが現状である。妊娠率を向上させるため、初期胚の複数個移植が実施されてきたが、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。したがって、高度生殖補助医療において、移植前に発生能、着床能が高く染色体も正常な良好胚を選択することは、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。

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、胚盤胞期胚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確化する目的で、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。これらの結果から、早期分割胚は、その後の発生能力の高い胚であると結論づけられた。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

択するにあたっての優れたマーカーになると考えられた。

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に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ものの、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。したがって、着床までを担保する発生能を指標とするだけでなく、流産の原因となる染色体の異数性がない正常胚を選択することが、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に移植後の成績を検討した。胚発育は、1個胚培養システムで培養し、胚盤胞期胚に発育したすべての胚を凍結した。それらを胚移植した結果、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考えられた。

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により染色体の正常性を予知するとともに、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は、臨床における非侵襲的測定法の枠内で実施される必要があることから、培養後に培地中に検出される代謝産物の同定が有効であると考えた。そこで、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と培養3日目までは良好であったがそれ以後の分割期で停止した発生不良

群において、それぞれの3日目まで培養した培地をサンプルとしたメタボローム解析を行った。その結果、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、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、脂質代謝において中心的な役割を果たしていることが報告されており、発生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密接に関与している可能性が示唆された。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。これらの結果から、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。その結果、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かった。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、受精卵で最も活性が高く、胚盤胞期胚では減少することから、胚の発生能とLDH活性との間にも強い関係があることが示唆された。以上のことから、胚の代謝産物を複数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事が期待できる。

本研究により、

- 1, 第一分割のタイミングが早い胚は、その後の胚盤胞期胚への発生能力が高い。
- 2, 第一分割のタイミングが早い胚は、卵の出自 (女性年齢, 体外受精回数, 卵巣刺激法) に関わらず、移植後の着床率が高く、流産率が低い。
- 3, 第一分割のタイミングが早い受精卵は、染色体分配異常が起こりにくくなっている。
- 4, このような正常な受精卵は、アミノ酸類や脂肪酸など複合的基質を利用してATPを産生し、胚発生を行っており、複数の代謝マーカーにより発生能の高い初期胚を選択できる。

ことを明らかとした。これらの研究成果は、体外受精後の第一分割のタイミングを観

察するという特別な器具を要せずに良好な移植成績が期待できる受精卵を選択することを可能とする。さらに、この受精卵を培養する過程で、複数の代謝基質をモニタリングすることで、真の良好胚を選択し、ヒト高度生殖補助医療の治療成績向上に貢献できると期待される。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、懇切なるご指導とご助言を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科 准教授 島田 昌之 博士に謹んで感謝申し上げます。時に応じて厳しくご指導いただいたこと、また優しく励ましてくださったことを通して、私自身の至らなさを実感できたことは今後の人生の糧になるものであります。

また、本論文をご精読いただき、有益かつ丁寧でわかりやすい論文指導を行って頂いた生物圏科学研究科 教授 前田 照夫 博士には深く感謝を申し上げます。

本研究を取りまとめるにあたり、ご協力して頂いた生物圏科学研究科 教授 都築政起 博士、教授 吉村 幸則 博士から有意義かつ的確なご意見を頂いたことより、論文の内容を一層充実させることができました。深く感謝を申し上げます。

そして、社会人ドクターコース進学にあたり、賛同し、研究への多大なる援助と協力を頂きました医療法人レニア会 武谷 典子 副理事長に感謝の意を表します。

また、ウィメンズ・クリニック大泉学園 根岸 広明 院長ならびに堀川 道晴 医師には本研究について理解していただき、臨床の面からのご指導とご協力を頂きましたことを深く感謝申し上げます。さらに、ウィメンズ・クリニック大泉学園スタッフの皆様には、検体収集やミーティングなどの討議にご協力いただき、心より感謝致しております。

セント・ルカ産婦人科 宇津宮 隆史 院長には、博士課程後期進学以前から現在にわたり温かく見守っていただくとともに、多くのご支援ご指導を賜りました。この場を借りて感謝申し上げます。

最後に、広島大学大学院への進学を快く賛同し、本研究の遂行、論文作成にあたり、精神的に支えてくれた家族に感謝致します。

引用文献

- Abe H, Hoshi H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J Reprod Dev.* 2003; 49: 193-202.
- Ahlström A, Westin C, Wikland M, Hardarson T. Prediction of live birth in frozen-thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw morphology. *Hum Reprod.* 2013; 28: 1199-1209.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev.* 1997; 47: 468-482.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Wells D. First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum Reprod.* 2011; 26: 1560-1574.
- Aoki F, Worrall DM, Schultz RM. Regulation of transcriptional activity during the first and second cell cycles in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol.* 1997; 181: 296-307.
- Arcelay E, Salicioni AM, Wertheimer E, Visconti PE. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. *Int J Dev Biol.* 2008; 52: 463-472.
- Austin CR. Observations on the penetration of the sperm into mammalian egg. *Aust J Sci Res Ser B.* 1951; 4: 581-596.
- Baldi E, Luconi M, Bonaccorsi L, Muratori M, Forti G. Intracellular events and signaling pathways involved in sperm acquisition of fertilizing capacity and acrosome reaction. *Front Biosci.* 2000; 5: 110-123.
- Barros C, Yanagimachi R. Induction of zona reaction in golden hamster eggs by cortical granule material. *Nature.* 1971; 233: 268-269.

- Baxter Bendus AE, Mayer JF, Shipley SK, Catherino WH. Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading. *Fertil Steril.* 2006; 86: 1608-1615.
- Bedford JM. Sperm/egg interaction: the specificity of human spermatozoa. *Anat Rec.* 1977; 188: 477-487.
- Bedford JM. Why mammalian gametes don't mix. *Nature.* 1981; 291: 286-288.
- Beebe SJ, Leyton L, Burks D, Ishikawa M, Fuerst T, Dean J, Saling P. Recombinant mouse ZP3 inhibits sperm binding and induces the acrosome reaction. *Dev Biol.* 1992; 151: 48-54.
- Benos DJ, Balaban RS. Energy metabolism of preimplantation mammalian blastocysts. *Am J Physiol.* 1983; 245: C40-45.
- Biggers JD, Whittingham DG, Donahue RP. The pattern of energy metabolism in the mouse oöcyte and zygote. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1967; 58: 560-567.
- Biggers JD, Whitten, WK, Whittingham DG. The culture of mouse embryos *in vitro*. In *Methods in Mammalian Embryology*. (Ed. J.C. Daniel, Jr.), Freeman, San Francisco. 1971; pp. 86-116.
- Biggers JD, Bell JE, Benos DJ. Mammalian blastocyst: transport functions in a developing epithelium. *Am J Physiol.* 1988; 255: C419-432.
- Bleil JD, Wassarman PM. Mammalian sperm-egg interaction: Identification of a glycoprotein in mouse egg zonae pellucidae possessing receptor activity for sperm. *Cell.* 1980; 20: 873-882.
- Bos-Mikich A, Mattos AL, Ferrari AN. Early cleavage of human embryos: an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome. *Hum Reprod.* 2001; 16: 2658-2661.
- Blossfeld H, De Rose A. Educational expansion and changes in entry into marriage and motherhood. The experience of Italian women. *Genus.* 1992; 48: 73-91.
- Braude P, Bolton V, Moore S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-

- cell stages of preimplantation development. *Nature*. 1988; 332: 459-461.
- Brinster RL. Uptake and incorporation of amino acids by the preimplantation mouse embryo. *J Reprod Fert*. 1971; 27: 329-338.
- Brison DR, Leese HJ. Energy metabolism in late preimplantation rat embryos. *J Reprod Fert*. 1991; 93: 245-251.
- Brison DR, Houghton FD, Falconer D, Roberts SA, Hawkhead J, Humpherson PG, Lieberman BA, Leese HJ. Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover. *Hum Reprod*. 2004; 19: 2319-2324.
- Chandley AC, Speed RM. A reassessment of Y chromosomal behaviour in germ cells and Sertoli cells of the mouse as revealed by in situ hybridisation. *Chromosoma*. 1995; 104: 282-286.
- Chang MC. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited in the fallopian tubes. *Nature*. 1951; 168: 697-698.
- Chang, MC. Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*. 1959; 184: 466-467.
- Clegg KB, Pikó L. RNA synthesis and cytoplasmic polyadenylation in the one-cell mouse embryo. *Nature*. 1982; 295: 343-344.
- Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, Massey J. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet*. 1988; 16: 162.
- Comizzoli P, Marquant-Le Guienne B, Heyman Y, Renard JP. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biol Reprod*. 2000; 62: 1677-1684.
- Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, Al-Sufyan H, Al-Mayman H, Jaroudi K. Day 5 versus day 3 embryo transfer: a controlled randomized trial. *Hum Reprod*. 2000; 15: 1947-1952.

- Cox LJ, Larman MG, Saunders CM, Hashimoto K, Swann K, Lai FA. Sperm phospholipase Czeta from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca^{2+} oscillations, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction*. 2002; 124: 611-623.
- Criniti A, Thyer A, Chow G, Lin P, Klein N, Soules M. Elective single blastocyst transfer reduces twin rates without compromising pregnancy rates. *Fertil Steril*. 2005; 84: 1613-1619.
- Date Y, Takano S, Shiku H, Ino K, Ito-Sasaki T, Yokoo M, Abe H, Matsue T. Monitoring oxygen consumption of single mouse embryos using an integrated electrochemical microdevice. *Biosens Bioelectron*. 2011; 15: 100-106.
- Downs SM, Utecht AM. Metabolism of radiolabeled glucose by mouse oocytes and oocyte-cumulus cell complexes. *Biol Reprod*. 1999; 60: 1446-1452.
- Dunning KR, Cashman K, Russell DL, Thompson JG, Norman RJ, Robker RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol Reprod*. 2010; 83: 909-918.
- Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stage of fertilization invitro of human oocytes matured in vitro. *Nature*. 1969; 221: 631-635.
- Fagbohun CF, Downs SM. Requirement for glucose in ligand-stimulated meiotic maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*. 1992; 96: 681-697.
- Fenwick J, Platteau P, Murdoch AP, Herbert M. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Hum Reprod*. 2002; 17: 407-412.
- Ferraretti AP, Goossens V, de Mouzon J, Bhattacharya S, Castilla JA, Korsak V, Kupka M, Nygren KG, Nyboe Andersen A; European IVF-monitoring (EIM); Consortium for European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted reproductive technology in Europe, 2008: results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2012; 27: 2571-2584.
- Flach G, Johnson MH, Braude PR, Taylor RA, Bolton VN. The transition from maternal to

- embryonic control in the 2-cell mouse embryo. *EMBO J.* 1982; 1: 681-686.
- Gardner DK, Leese HJ. The role of glucose and pyruvate transport in regulating nutrient utilization by preimplantation mouse embryos. *Development.* 1988; 104: 423-429.
- Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril.* 1996; 65: 349-353.
- Gardner DK, Lane M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. *Hum Reprod.* 1998; 13: 148-159.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril.* 2000; 73: 1155-1158.
- Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schoolcraft WB. Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential. *Fertil Steril.* 2001; 76: 1175-1180.
- Gardner DK, Surrey E, Minjarez D, Leitz A, Stevens J, Schoolcraft WB. Single blastocyst transfer: a prospective randomized trial. *Fertil Steril.* 2004; 81: 551-555.
- Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG. *Chromosome Abnormalities and Genetic Counseling* 3rd ed. Oxford University Press. 2003; pp. 339-360.
- Ghosh S, Feingold E, Dey SK. Etiology of Down syndrome: Evidence for consistent association among altered meiotic recombination, nondisjunction, and maternal age across populations. *Am J Med Genet A.* 2009; 149A: 1415-1420.
- Gilula NB, Epstein ML, Beers WH. Cell-to-cell communication and ovulation. A study of the cumulus-oocyte complex. *J Cell Biol.* 1978; 78: 58-75.
- Ginsberg L, Hillman N. Shifts in ATP synthesis during preimplantation stages of mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 1975; 43: 83-90.

- González-Fernández R, Peña Ó, Hernández J, Martín-Vasallo P, Palumbo A, Ávila J. Patients with endometriosis and patients with poor ovarian reserve have abnormal follicle-stimulating hormone receptor signaling pathways. *Fertil Steril*. 2011; 95: 2373-2378.
- Gott AL, Hardy K, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1990; 5: 104-108.
- Graham CF. The regulation of DNA synthesis and mitosis in multinucleate frog eggs. *J Cell Sci*. 1966; 1: 363-374.
- Gwatkin RBL. *Fertilization Mechanisms in Man and Mammals*. Plenum Press, New York. 1977.
- Ham RG. An improved nutrient solution for diploid Chinese hamster and human cell lines. *Exp Cell Res*. 1963; 29: 515.
- Hardy K, Hooper MA, Handyside AH, Rutherford AJ, Winston RM, Leese HJ. Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1989; 4: 188-191.
- Hernandez-Gonzalez EO, Sosnik J, Edwards J, Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, et al. Sodium and epithelial sodium channels participate in the regulation of the capacitation-associated hyperpolarization in mouse sperm. *J Biol Chem*. 2006; 281: 5623-5633.
- Hertwig O. *Beiträge zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies*. W. Engelmann; Leipzig. 1875.
- Hiramoto Y. Microinjection of the live spermatozoa into sea urchin eggs. *Exp Cell Res*. 1962; 27: 416-426.
- 堀内俊孝, 高橋寿太郎, 菅原七郎, 正木淳二. 受精過程におけるラット卵子微絨毛の精子頭部捕獲の走査型電子顕微鏡による観察. *家畜繁殖学誌*. 1980; 26: 98-99.
- Hoshi K, Aita T, Yanagida K, Yoshimatsu N, Sato A. Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relation with capacitation. *Hum Replod*. 1990; 5:

71-74.

Houghton FD, Hawkhead JA, Humpherson PG, Hogg JE, Balen AH, Rutherford AJ, Leese HJ. Non-invasive amino acid turnover predicts human embryo developmental capacity. *Hum Reprod.* 2002; 17: 999-1005.

Igarashi H, Takahashi E, Hiroi M, Doi K. Aging-related changes in calcium oscillations in fertilized mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 1997; 48: 383-390.

Igarashi H, Takahashi T, Takahashi E, Tezuka N, Nakahara K, Takahashi K, Kurachi H. Aged mouse oocytes fail to readjust intracellular adenosine triphosphates at fertilization. *Biol Reprod.* 2005; 72: 1256-1261.

苛原稔. ART の副作用と合併症. *母子保健情報.* 2012; 66: 39-43.

Inoue N, Yamaguchi R, Ikawa M, Okabe M. Sperm-egg interaction and gene manipulated animals. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 2007; 65: 363-371.

Iritani A, Gomes WR, Vandemark NL. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in ewes. *Biol Reprod.* 1969; 1: 72-76.

Iritani A, Nishikawa Y, Gomes WR, VanDemark NL. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. *J Anim Sci.* 1971; 33: 829-835.

Iritani A, Sato E, Nishikawa Y. Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in sows. *J Anim Sci.* 1974; 39: 582-588.

Iritani A, Niwa K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil.* 1977; 50: 119-121.

Iritani A, Niwa K, Imai H. Sperm penetration in vitro of pig follicular oocytes matured in culture. *J Reprod Fertil.* 1978; 54: 379-383.

Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl.* 2000; 21, 33-44.

- Iwamatsu T, Chang MC. In vitro fertilization of mouse eggs in the presence of bovine follicular fluid. *Nature*. 1969; 224: 919-920.
- Japan society of obstetrics and gynecology. The Japan society of obstetrics and gynecology for assisted reproductive technology registry 2012. *Acta Obstet Gynaec Jpn*. 2014; 64: 2445-2481.
- Jones HW Jr, Jones GS, Andrews MC, Acosta A, Bundren C, Garcia J, Sandow B, Veeck L, Wilkes C, Witmyer J, Wortham JE, Wright G. The program for in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril*. 1982; 38: 14-21.
- Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA, Schultz RM, Williams CJ. Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase C ζ in triggering Ca²⁺ oscillations during fertilization. *Biol Reprod*. 2005; 72: 992-996.
- Kohler HP, Billari FC, Ortega JA. The emergence of lowest-low fertility in Europe during the 1990s. *Population and Development Review*. 2002; 28: 641-680.
- Krebs HA. Body size and tissue respiration. *Biochim Biophys Acta*. 1950; 4: 249-269.
- Kretzer D, Dennis P, Hudson B, Leeton J, Lopata A, Outch K, Talbot J, Wood C. Transfer of a human zygote. *Lancet*. 1973; 29: 728-729.
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in a series of 6,733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online*. 2003; 6: 54-59.
- Lane M, Gardner DK. Lactate regulates pyruvate uptake and metabolism in the preimplantation mouse embryo. *Biol Reprod*. 2000; 62: 16-22.
- Lassalle B, Testart J. Sequential transformations of human sperm nucleus in human egg. *J Reprod Fertil*. 1991; 91: 393-402.
- Leese HJ, Barton AM. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. *J Reprod Fertil*. 1984; 72: 9-13.

- Leeuwenhoek A. *Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de natis e` semini genitali animalcules*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1678; 12: 1040-1043.
- Lefièvre L, Conner SJ, Salpekar A, Olufowobi O, Ashton P, Pavlovic B, Lenton W, Afnan M, Brewis IA, Monk M, Hughes DC, Barratt CL. Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum Reprod*. 2004; 19: 1580-1586.
- Lonergan P, Carolam C, Langendonck AV, Donnay I, Khatir H, Mermillod P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod*. 1996; 54: 1420-1429.
- Lopata A. Successes and failures in human in vitro fertilization. *Nature*. 1980; 25: 642-643.
- Lundin K, Bergh C, Hardarson T. Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF. *Hum Reprod*. 2001; 12: 2652-2657.
- Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Lappi M, Ruberti A, Farfalli V. Embryo morphology and development are dependent on the chromosomal complement. *Fertil Steril*. 2007; 87: 534-541.
- Malcuit C, Kurokawa M, Fissore RA. Calcium oscillations and mammalian egg activation. *J Cell Physiol*. 2006; 206: 565-573.
- Malpighi, M. *De Formatione Pulli in Ovo* (London). Reprinted in H. B. Adelmanm, Marcello Malpighi and the Evolution of Embryology. Cornell University Press, Ithaca, NY, 1966.
- Martinez MC, Mendez C, Ferro J, Nicolas M, Serra V, Landeras J. Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. *Fertil Steril*. 2010; 93: 289-292.
- Matsumoto M, Otoi T, Suzuki T. Effect of glucose and lactate on development of in vitro produced bovine embryos in a modified synthetic oviduct fluid medium. *J Mamm Ova Res*. 1999; 16: 73-76.
- McLaren A, Biggers JD. Successful development and birth of mice cultivated in vitro as early

- as early embryos. *Nature*. 1958; 27: 877-878.
- Menkin MF, Rock J. In vitro fertilization and cleavage of human ovarian eggs. *Am J Obstet Gynecol*. 1948; 55: 440-452.
- Ministry of health labor and welfare. The vital statistics of Japan 2014. Ministry of health labor and welfare. Statistics and Information Department. Tokyo. Japan. 2015.
- Ministry of health labor and welfare. The vital statistics of Japan 2012. Ministry of health labor and welfare. Statistics and Information Department. Tokyo. Japan; 2013.
- Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol*. 2008; 199: e1-5.
- 水口弘司, 青野敏博. 生殖・内分泌委員会報告—本邦におけるゴナドトロピン療法により成立した多胎妊娠に関する全国調査結果報告書. *日産婦誌*. 1995; 47: 1298-1303.
- Mullin C, Berkeley AS, Grifo JA. Supernumerary blastocyst cryopreservation: a key prognostic indicator for patients opting for an elective single blastocyst transfer (eSBT). *J Assist Reprod Genet*. 2012; 29: 783-788.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1993; 8: 2185-2191.
- Neuber E, Rinaudo P, Trimarchi JR, Sakkas D. Sequential assessment of individually cultured human embryos as an indicator of subsequent good quality blastocyst development. *Hum Reprod*. 2003; 18: 1307-1312.
- 日本産科婦人科学会. 会告「生殖医療における多胎妊娠に関する見解」. *日産婦誌*. 2010; 62: 1265.
- Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC, Goh VH. Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet*. 1988; 2: 790.

- Nybo AA, Wohlfahrt J, Christens P, Olsen J, Melbye M. Is maternal age an independent risk factor for fetal loss? *West J Med.* 2000; 173: 331.
- Oliver JL, Bernaola-Galván P, Hackenberg M, Carpena P. Phylogenetic distribution of large-scale genome patchiness. *BMC Evol Biol.* 2008; 8:107.
- Ozil JP, Huneau D. Activation of rabbit oocytes: the impact of the Ca²⁺ signal regime on development. *Development.* 2001; 128: 917-928.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992; 340: 17-18.
- Pan H, Ma P, Zhu W, Schultz RM. Age-associated increase in aneuploidy and changes in gene expression in mouse eggs. *Dev Biol.* 2008; 316: 397-407.
- Payne D, Flaherty SP, Barry MF, Matthews CD. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997; 12: 532-541.
- Pellicer A, Marí M, de los Santos MJ, Simón C, Remohí J, Tarín JJ. Effects of aging on the human ovary: the secretion of immunoreactive alpha-inhibin and progesterone. *Fertil Steril.* 1994; 61: 663-668.
- Phillips DM, Shalgi R. Surface architecture of the mouse and hamster zona pellucida and oocyte. *J Ultrastruct Res.* 1980; 72: 1-12.
- Philpott A, Leno GH, Laskey RA. Sperm decondensation in *Xenopus* egg cytoplasm is mediated by nucleoplasmin. *Cell.* 1991; 65: 569-578.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG. Preservation of hamster oocytes to assay the freezing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil.* 1982; 66: 161-168.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril.* 1985; 44: 493-498.

- Ramadan WM, Kashir J, Jones C, Coward K. Oocyte activation and phospholipase C zeta (PLC ζ): diagnostic and therapeutic implications for assisted reproductive technology. *Cell Commun Signal*. 2012; 10: 12.
- Renard JP, Philippon A, Menezo Y. In-vitro uptake of glucose by bovine blastocysts. *J Reprod Fertil*. 1980; 58: 161-164.
- Saito H. ART registry system and present statue of ART in Japan. *Acta Obstet Gynaec Jpn*. 2010; 62: 739-745.
- 齊藤英和. 本邦における多胎妊娠の推移. *臨産婦*. 2008; 62: 242-245.
- Saito H. ART registry system and present statue of ART in Japan. *Acta Obstet Gynaec Jpn*. 2010; 62: 739-745.
- Sakkas D, Shoukir Y, Chardonens D, Bianchi PG, Campana A. Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator of embryo viability. *Hum Reprod*. 1998; 13: 182-187.
- Sakkas D, Percival G, D'Arcy Y, Sharif K, Afnan M. Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection. *Fertil Steril*. 2001; 76: 1150-1156.
- Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 2002; 129: 3533-3544.
- Schabronath J, Gärtner K. Paternal influence on timing of pronuclear DNA synthesis in naturally ovulated and fertilized mouse eggs. *Biol Reprod*. 1988; 38: 744-749.
- Schleiden MJ. Beiträge zur Phytogenesis. *Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin*. 1838; 137-176.
- Schmell ED, Gulyas BJ. Mammalian sperm-egg recognition and binding in vitro. I. Specificity of sperm interactions with live and fixed eggs in homologous and heterologous

- inseminations of hamster, mouse, and guinea pig oocytes. *Biol Reprod.* 1980; 23: 1075-1085.
- Schultz RM. Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays.* 1993; 15: 531-538.
- Schwann T. *Microscopic Investigations on the Accordance in the Structure and Growth of Plants and Animal.* 1839.
- Scott L, Alvero R, Leondires M, Miller B. The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod.* 2000; 15: 2394-2403.
- Seifer DB, Gardiner AC, Ferreira KA, Peluso JJ. Apoptosis as a function of ovarian reserve in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 1996; 66: 593-598.
- Seifer DB, DeJesus V, Hubbard K. Mitochondrial deletions in luteinized granulosa cells as a function of age in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2002; 78: 1046-1048.
- 関沢明彦, 四元淳子, 岡井 崇. 高齢妊娠と胎児異常. *日医雑誌.* 2011; 193: 2079-2083.
- Seli E, Botros L, Sakkas D, Burns DH. Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2008; 90: 2183-2189.
- Shiku H, Shiraishi T, Ohara H, Matsue T, Abe H, Hoshi H, Kobayashi M. Oxygen consumption of single bovine embryos probed by scanning electrochemical microscopy. *Anal Chem.* 2001; 73: 3751-3758.
- Shoukir Y, Campana A, Farley T, Sakkas D. Early cleavage of in-vitro fertilized human embryos to the 2-cell stage: a novel indicator of embryo quality and viability. *Hum Reprod.* 1997; 12: 1531-1536.
- Simpson JL. Genes, chromosomes, and reproductive failure. *Fertil Steril.* 1980; 33: 107-116.

- Sirisathien S, Brackett BG. TUNEL analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. *Mol Reprod Dev.* 2003; 65: 51-56.
- Stephoe PC, Edwards RG. Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet.* 1970; 1: 683-689.
- Stephoe PC, Edwards RG. Reimplantation of a human embryo with subsequent tubal pregnancy. *Lancet.* 1976; 24: 880-882.
- Stephoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. *Lancet.* 1978; 2: 366.
- Summers MC, Biggers JD. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update.* 2003; 9: 557-582.
- Suzuki M, Hoshi K, Hoshiai H, Saito A, Momono K, Mori R, Kyono K, Tsuiki A, Imaizumi H, Nagaike H, Uehara S, Naganuma T, Hirose Y. Pregnancy achieved through in vitro fertilization and embryo transfer. *Jpn J Fert Steril.* 1983; 28: 439-443.
- 高見澤聡, 柴原浩章, 鈴木光明. 胚盤胞移植の利点, 問題点は? *臨床婦人科産科.* 2008; 62: 502-507.
- Takahashi T, Saito H, Hiroi M, Doi K, Takahashi E. Effects of aging on inositol 1,4,5-triphosphate-induced Ca(2+) release in unfertilized mouse oocytes. *Mol Reprod Dev.* 2000; 55: 299-306.
- Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H. Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* 2003; 66: 143-152.
- Takahashi T, Igarashi H, Kawagoe J, Amita M, Hara S, Kurachi H. Poor embryo development in mouse oocytes aged in vitro is associated with impaired calcium homeostasis. *Biol Reprod.* 2009; 80: 493-502.
- Tatone C, Carbone MC, Falone S, Aimola P, Giardinelli A, Caserta D, Marci R, Pandolfi A,

- Ragnelli AM, Amicarelli F. Age-dependent changes in the expression of superoxide dismutases and catalase are associated with ultrastructural modifications in human granulosa cells. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12: 655-660.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev.* 1990; 26: 90-100.
- Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod.* 1999; 14: 1318-1323.
- The ESHRE Capri Workshop Group. Multiple gestation pregnancy. *Hum Reprod.* 2000; 15: 1856-1864.
- Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T. Studies on the fertilization of mouse eggs in vitro. *Jpn J Anim Reprod.* 1971; 16: 147-157.
- Trimarchi JR, Liu L, Porterfield DM, Smith PJ, Keefe DL. Oxidative phosphorylation-dependent and -independent oxygen consumption by individual preimplantation mouse embryos. *Biol Reprod.* 2000; 62: 1866-1874.
- Tsai YC, Chung MT, Sung YH, Tsai TF, Tsai YT, Lin LY. Clinical value of early cleavage embryo. *Int J Gynaecol Obstet.* 2002; 76: 293-297.
- Tyrode M. The mode of action of some purgative salts. *Arch Intern Pharmacodyn.* 1910; 17: 205-209.
- Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod.* 1976; 15: 467-470.
- Uehara T, Yanagimachi R. Behavior of nuclei of testicular, caput and cauda epididymal spermatozoa injected into hamster eggs. *Biol Reprod.* 1977; 16: 315-321.

- Utsunomiya T, Ito H, Nagaki M, Sato J. A prospective, randomized study: day 3 versus hatching blastocyst stage. *Hum Reprod.* 2004; 19: 1598-1603.
- Utsunomiya T, Goto K, Nasu M, Kumasako Y, Araki Y, Yokoo M, Abe H. Evaluating the quality of human embryos with a measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Mamm Ova Res.* 2008; 25: 2-7.
- Van Montfoort AP, Dumoulin JC, Kester AD, Evers JL. Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. *Hum Reprod.* 2004; 19: 2103-2108.
- Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci.* 1988; 541: 259-295.
- Visconti PE. Understanding the molecular basis of sperm capacitation through kinase design. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106: 667-668.
- Vitullo AD, Ozil JP. Repetitive calcium stimuli drive meiotic resumption and pronuclear development during mouse oocyte activation. *Dev Biol.* 1992; 151: 128-136.
- Wakai T, Vanderheyden V, Yoon SY, Cheon B, Zhang N, Parys JB, Fissore RA. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function during mouse oocyte maturation. *J Cell Physiol.* 2012; 227: 705-17.
- Wales RG, Whittingham DG. A comparison of the uptake and utilization of lactate and pyruvate by one- and two-cell mouse embryos. *Biochim Biophys Acta* 1967; 148: 703-712.
- Wales RG, Whittingham DG. The metabolism of specifically labeled lactate and pyruvate by two-cell mouse embryos. *J Reprod Fertil* 1973; 33: 207-222.
- Wang WH, Hosoe M, Shioya Y. Induction of cortical granule exocytosis of pig oocytes by spermatozoa during meiotic maturation. *J Reprod Fertil.* 1997; 109: 247-255.
- Wang RH, Yu H, Deng CX. A requirement for breast-cancer-associated gene 1 (BRCA1) in the spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101: 17108-17113.

- Wennerholm UB, Albertsson-Wikland K, Bergh C, Hamberger L, Niklasson A, Nilsson L, Thiringer K, Wennergren M, Wikland M, Borres MP. Postnatal growth and health in children born after cryopreservation as embryos. *Lancet*. 1998; 351: 1085-1090.
- Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature*. 1956; 177: 96.
- Whittingham DG. Fertilization of mouse eggs in vitro. *Nature*. 1968; 220: 592-593.
- Whittingham DG. The failure of lactate and phosphoenolpyruvate to support development of the mouse zygote in vitro. *Biol Reprod*. 1969; 1: 381-386.
- Whittingham DG. Culture of mouse ova. *J Reprod Fertil Suppl*. 1971; 14: 7-21.
- Yamada M, Takanashi K, Hamatani T, Hirayama A, Akutsu H, Fukunaga T, Ogawa S, Sugawara K, Shinoda K, Soga T, Umezawa A, Kuji N, Yoshimura Y, Tomita M. A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development. *Sci Rep*. 2012; 2: 930.
- Yamagata K, Suetsugu R, Wakayama T. Long-term, six-dimensional live-cell imaging for the mouse preimplantation embryo that does not affect full-term development. *J Reprod Dev*. 2009; 55: 343-350.
- Yanagimachi R, Chang M C. Fertilization of hamster eggs in vitro. *Nature*. 1963; 200: 281-282.
- Yanagimachi R, Chang M C. In vitro fertilization of golden hamster ova. *J Exp Zool*. 1964; 56: 361-375.
- Yanagimachi R, Noda YD. Physiological changes in the postnuclear cap region of mammalian spermatozoa: a necessary preliminary to the membrane fusion between sperm and egg cells. *J Ultrastruct Res*. 1970; 31: 486-493.
- Yanagimachi R. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs in vitro. *J Reprod Fertil*. 1972; 28: 477-480.
- Yanagimachi R. Sperm-egg association in mammals. In *Current Topics in Developmental B*

iology. 1978; 12: 83-105.

Yanagimachi R. Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. *Gamete Res.* 1984; 10: 178-232.

Yanagimachi R, "Mammalian fertilization," in *Physiology of Reproduction*, E. Knobil and J. D. Neil, Eds. Raven Press, New York, USA. 1994; pp. 189-317.

Zini A, Bielecki R, Phang D, Zenzes MT. Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation, in fertile men. *Fertil Steril.* 2001; 75: 674-677.

Zini A, Boman JM, Belzile E, Ciampi A. Sperm DNA damage is associated with an increased risk of pregnancy loss after IVF and ICSI: systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2008; 23: 2663-2668.