

## 日本卵子学会 2019 に参加して

荒木泰行

2019年5月25～26日に、「第60回日本卵子学会学術集会」が、堀内俊孝大会長（県立広島大学生命環境学部教授）のもと、広島国際会議場で開催されました。興部会演題が多かったですが、私がお聞きできたご講演から抜粋してご紹介させていただきます。

### 【一般演題】

#### O-18 ヒトGV期卵の体外成熟培養における卵胞液添加培養液と胚盤胞用培養液の比較検討

中橋真朗 他（高崎ARTクリニック 他）

低刺激周期で得られたGV期卵を成熟培養するため、30%卵胞液を媒精用培養液に加えた群（FF群）と卵胞液不含有の胚盤胞培養液（BL群）、および媒精用培養液のみ（G-IVF群）について比較検討を行った。成熟率はそれぞれ58.3% vs 60.5% vs 61.7%、ICSI受精率は59.7% vs 50.9% vs 51.9%で有意差を認められなかった。胚盤胞獲得率はFF群10.4%、BL群5.5%、G-IVF群3.0%であり、有意差はないもののFF群で高い結果となった。BL群で1例のみ出産例が確認されている。

ヒトの卵子は、体内では卵胞液の中でMII期にまで成熟する。成熟前に採卵してしまった未熟卵を卵胞液を用いてIVMすることは理にかなっていると思われるが、作業面で煩雑な点もある。今回の検討で媒精用よりも胚盤胞用培養液のほうが良好な結果が得られているので、今後の検討で更なる成績の向上や簡略化が期待されると思います。

#### O-24 収縮胚盤胞の凍結が臨床成績へ与える影響

村上加奈 他（浅田レディース品川クリニック 他）

凍結直前に収縮していた胚盤胞（S群）と、収縮していなかった胚盤胞（N群）の成績を比較した。S群の妊娠率36.3%に対して、N群では48.8%で有意に高い値であった。流産率はS群35.8%、N群21.9%で有意差を認めた。融解4時間後に胞胚腔の体積が回復した胚の率は、S群で79.5%、N群91.9%とS群で有意に低かった。しかしながら、融解後に堆積が回復した胚盤胞の妊娠率は、S群44.0%、N群47.8%で有意差なかった。

凍結前収縮胚盤胞では、その時点で発生を停止している胚（もしくはしそうな胚）の含まれている率が、非収縮群よりも高いことがこのような結果であった原因の1つではないかと感じました。発表者らはS群の凍結時の平衡化時間が影響しているとの主張であったが、本発表内では平衡化時間の検討は含まれていなかったため、今後のご発表を期待しています。

#### O-25 胚盤胞の凍結融解に伴う回復不良胚の発生要因

末永めぐみ 他（松田ウイメンズクリニック）

融解後の胚盤胞胞胚腔の回復状態と凍結前の胚グレードの関係を検討した。胞胚腔回復不良胚の率は、7.3%であった。多変量解析の結果、クライオトップ上の胚数、ICMグレード、TEグレード、採卵時妻年齢において、胞胚腔回復不良に影響があるということが分かった。ICMグレードBでAに比してオッズ比1.99、TEグレードCでAと比べて2.78と有意であり、女性年齢が1歳上昇することにオッズ比も1.05上昇した。

TEのグレードが融解後の回復率に大きく影響していることは想像しやすいが、ICMのグレードも影響しているとの結果でした。発表者によれば、ICMとTEのグレードにはある程度の相関があることが、原因ではないかとのことでした。

## O-27 凍結胚移植由来の児が過重となる要因の解析

的場麻理 他 (IVF 大阪クリニック他)

融解胚移植で誕生した児の体重が重くなることは知られている。そこで、男女別にその傾向に違いが無いかが検討した。男女とも新鮮胚移植と比較して凍結胚移植で児の体重は有意に増加していた。男児では在胎週数が有意に増加してしたのに対して、女児では母体年齢が凍結胚移植群で有意に高いという結果であり、それ以外の項目に差は認めなかった。また、重回帰分析をしたところ、男児は在胎週数が、女児は母体年齢と移植法が影響しているという結果であった。

これらから、凍結胚移植による児の体重増加は男女で別々の要因がある可能性が示唆されたという、興味深いご発表です。胚移植のステージに関しては、初期胚も胚盤胞も混在したデータでの解析なので、影響は不明とのことでした。

## O-28 卵子凍結融解後の回復培養液へのシステアミン添加の効果：マウス卵子を用いた検討

原田義久 他 (県立広島大学大学院 総合学術研究科 他)

未受精卵子のグルタチオン (GSH) 濃度は高く、受精過程の精子膨化で重要な役割を果たすが、凍結融解による酸化ストレスで GSH 濃度が低下することも考えられる。そこで、GSH の合成促進物質であるシステアミンの融解後の回復培養液への添加が有効であるか検討した。融解後の回復時間を検討した結果、融解 1 時間後に ICSI を行った群が一番胚盤胞の発生率が高かった。システアミンを添加した群では無添加に比べて、初期発生スピードが速くなったが、胚盤胞率に差は認められなかった。

今後、未受精卵子を凍結して治療に用いる機会も増えてくるのではないかと思います。超急速凍結法の開発によって未受精卵の生存率は高くなりましたが、このような融解後の回復培養技術等まだまだ改善の余地は沢山あるかと思しますので、様々なご検討が発表されるのを願っています。

## O-29 KVS デバイスによるマウス卵子のガラス化保存における Antifreeze protein の効果

桃沢健二 他 (北里大学 獣医学部 他)

KVS デバイスとは、極薄の液吸収体を先端に装着した卵凍結用の新規デバイス (製品名: Diamour) である。今回は、このデバイスを用いて、不凍たんぱく質 (AFP) の凍結液への添加による効果を検討した。AFP は AFPⅢ (ニチレイ) を用いて、0.5mg/mL の濃度で平衡化及びガラス化液に添加した。マウス卵子の凍結融解の結果、AFP 区で生存率 95.5% と無添加区 90.7%、胚盤胞率 77.8% と 66.2% であり、AFP 区で高い傾向を示した。

Diamour の形状はクライオトップに似ているが、先端に吸水性のシートが張り付けてあることが特徴です。私は実際に胚を凍結したことはありませんが、胚周囲のガラス化液を吸収してくれるので、作業者の液量調整のテクニックの差を埋めてくれるものと言われています。不凍たんぱく質等、卵凍結技術はまだまだ発展してくるのかもしれない。

## O-37 高度乏精子症における密度勾配液を用いた精子調整方法の有用性の検討

西村江美 他 (リプロダクションクリニック東京 他)

一般的に乏精子症と呼ばれる運動精子濃度が 100 万/mL 以下の症例を対象として、培養液と混和して遠心したのみの群 (Wash 法) と 55% 密度勾配液に重層遠心した群 (密度勾配法) について比較検討した。結果、ICSI 施行卵あたりの発生率 (25.4% vs 33.1%) と良好胚盤胞率 (10.5% vs 15.1%) であり、密度勾配群で有意に高い値であった。運動精子が少ない症例においても密度勾配法を選択することは推奨できると考えられた。

マクラーチャンバーで観察したときに精子が非常に少なく感じても、原精液をディッシュに垂らして観察すると、意外と沢山いるものです。密度勾配の条件を緩めて (濃度を下げる、試薬量を減らす、精液と試薬の境界面を混和

して崩す等)、それでも ICSI できるだけ精子が得られないような非常にシビアな症例以外は、密度勾配遠心は行ったほうが良いと私も思っています。

### O-39 3社の精子凍結保護剤を用いた精巣内精子融解後における運動率の比較

岸本匡史 他 (リプロダクションクリニック大阪)

精巣内精子採取術 (TESE) によって得られた精巣精子の凍結保存について、3社の市販の凍結保護試薬 (SpermFreeze™、CryoSperm™、SpermFreezeSolution™) を用いて比較検討した。なお、SpermFreeze にのみ卵黄が含有されている。凍結融解の結果、SpermFreezeSolution が CryoSperm と比較して運動率の低下が有意に少なかった。

射出精子を凍結する場合は、卵黄の含有されている精子凍結保護剤のほうが、精子運動保持率の高いことが一般的に知られていると思いますが、今回の報告では精巣内精子においては、卵黄不含有でも遜色ないということです。現在の臨床現場では卵黄不含有の試薬が多く採用されているように見受けられますが、これは生存率よりも安全性を考慮してのことと思われる。しかし、精巣組織の場合は生存性を考慮したとしても、卵黄不含有で問題ないのかもしれない。

### O-40 極少数精子凍結保存用デバイス “MAYU” によりマウス精巣組織の凍結融解を行う際の凍結液の比較について

中田久美子 他 (山下湘南夢クリニック 高度生殖医療研究所 他)

極少精子凍結用に開発されたデバイス “MAYU” を用いて、精巣組織を凍結する際の凍結試薬をマウスをモデルに検討した。用いたのは、卵凍結用の ES と VS (V 区)、マウス精子凍結用の CARD FERTIUP 精子凍結液 (F 区)、細胞凍結用 CELLBANKER1 (C 区)。結果、融解後の組織破壊が顕著であったのは V 区であった。ICSI 後の受精率に差はなかったが、胚盤胞発生率は V 区 37.8% で、F 区 64.4% や C 区 68.8% に比べて有意に低い値であった。

VS は耐凍剤がエチレングリコールと DMSO の凍結試薬であるが、精巣凍結には不向きなようです。FERTIUP はおそらくラフィノース、CELLBANKER1 は DMSO が主成分だと思われますが、前者はマウス精子用に開発されたこと、後者は細胞保存に向いていることが、マウス精巣の凍結に対してよい結果がでたのかもしれないと思いました。

ここから 4 演題は、日本卵子学会と扶桑薬品工業が共同で開発したワンステップ培養液 (製品名: OVIT および OVIT PLUS) の演題が続きました。OVIT は、ヒト卵管内液の組成を詳細に分析して開発された受精後から胚盤胞までの培養用で、従来品と比較して全体的に必須アミノ酸濃度が低く、非必須アミノ酸が高い設定となっていて、特にタウリンを高濃度に含んでいることを特徴としています。ご発表内容に関しては、分かりやすいように表にまとめてみました。

### O-59 卵管液組成に基づく 1-step medium を用いた受精卵培養の検討

白岩優綺 他 (英ウィメンズクリニック)

	OVIT	対象	
全体: D2 良好胚率	53.1%	53.3%	NS
全体: 良好胚盤胞率	23.7%	23.0%	NS
IVF: すべての項目で有意差なし			NS
ICSI: D2 良好胚率	43.9%	45.0%	NS
ICSI: D5 胚盤胞率	61.5%	47.5%	P < 0.05
ICSI: D5 良好胚盤胞率	22.0%	20.2%	NS

## O-60 新しく開発されたヒト卵管内液組成類似培養液の臨床的有用性について

大津英子 他（セント・ルカ産婦人科）

	OVIT	対象	
D3 良好胚率	18.2% (271/1493)	13.6% (203/1493)	P < 0.05
胚利用率（移植＋凍結）	45.1% (673/1493)	36.6% (547/1493)	P < 0.01
新鮮胚移植着床率	16.3% (23/141)	20.2% (25/124)	NS
融解胚移植着床率	37.4% (82/219)	31.6% (54/171)	NS

## O-61 新規培養液導入の際の培養成績の検討（従来品 vs. HiGROW OVIT）

垣井麻莉 他（オーク住吉産婦人科 他）

	OVIT	対象	
胚盤胞到達率	37.3%	31.6%	NS
凍結率	51.8%	43.4%	P=0.002
融解胚移植妊娠率	31.6%	28.6%	NS
妊娠継続率	50.0%	38.9%	NS

## O-62 HiGROW OVIT Plus を用いた培養成績と臨床成績の検討

結城笑香 他（仙台 ART クリニック）

	OVIT	対象	
D5 胚盤胞発生率	59.4%	53.9%	P=0.079
総胚盤胞発生率	65.4%	60.3%	P=0.095
良好胚盤胞発生率	40.7%	35.7%	P=0.097
妊娠率	39.0%	30.2%	P=0.493
流産率	6.3%	15.4%	P=0.573

はっきり有意差が確認されている項目は少ないですが、ほとんどの項目で対象群と比較して OVIT で高い傾向になる結果だったようです。従来のワンステップメディウムの特にアミノ酸組成は、通常の体細胞培養に用いられている培養液のアミノ酸組成を半分にしたりしただけの組成であり、胚培養に最適されていたとは言い難いと思います。その点、OVIT はヒト卵管内のアミノ酸組成に近づけてありますので、今後も発展にも期待できると考えています。

### O-63 ヒト卵管液アミノ組成を基本とするウシ胚培養液の開発

近藤綾香 他（山形大学大学院理工学研究科）

OVIT がウシの胚発生培養液として有効かどうか検討した。体外受精後の受精卵を既存培養液である IVD101 と OVIT にインスリン、TGF- $\alpha$  および Apo-transferrin を添加した培養液（OVIT+GF）の 2 群に分けて培養を行った。結果、桑実期以降の発生に顕著な違いが表れ、胚盤胞発生率は OVIT+GF 群 41.9%、IVD101 群 32.7%であった。また、OVIT+GF 群では細胞数が多く、ICM と TE の細胞数比が生体に近かった。さらに、酸素消費量やミトコンドリア膜電位も良好な値を示した。

今後、OVIT に添加したグロースファクターの種類や濃度の検討により、さらに発生率が向上する可能性があるという印象を受けました。これらのウシでの改良結果が、ヒトの胚培養にフィードバックされてくれば、ヒト用の胚培養液の発展に寄与するものと期待がもてるご研究だと思いました。

### O-64 シングルステップメディウムを用いたヒト胚のアミノ酸代謝の検討

熊迫陽子 他（セント・ルカ産婦人科 他）

培養による胚のアミノ酸消費量を測定して検討した。OVIT とコントロールの培養液でヒト胚をドロップ培養し、5~6 日後に培養液中のアミノ酸の変化量を調べた結果、必須アミノ酸の取り込み量が、OVIT に比べてコントロールで多かった。コントロールはヒト卵管内と比べて高濃度の必須アミノ酸を含んでいるため、非生理的に過剰なアミノ酸の取り込みが起こっているものではないかと思われた。

非常に興味深いご研究だと思いました。シングルステップメディウムの登場で、“胚は自分に必要な分のアミノ酸だけを取り込む”という説がありますが、胚は非生理的な状態にさらされた状態では、調節機能が追いつかずに、異常なアミノ酸の取り込みを起こしているのかもしれないということを示唆しています。生体に近づけた培養液組成に設定することの重要性を認識させられました。

### O-82 卵丘細胞除去時のヒアルロニダーゼがウシ卵子に及ぼす影響

芦部詩織 他（宇都宮大学大学院 農学研究科 他）

ICSI の際の卵丘細胞剥離に用いているヒアルロニダーゼ処理が、ウシ卵子に及ぼす影響について検討した。0.1% ヒアルロニダーゼ溶液添加（添加区）と（非添加区）にウシ卵子-卵丘細胞複合体を入れて、浸透によって卵丘細胞を剥離して、その後、c-IVF および ICSI の成績を比較した。また、卵子内カルシウム量を測定した。結果、添加区では胚盤胞発生率が有意に低く、卵子内カルシウム量が有意に高かった。

ヒトにおいても卵丘細胞剥離時のヒアルロニダーゼ処理における最適な条件は、未だ認識されていないと思われます。今後、濃度や浸漬時間、ピペットの太さなど、細かな条件について検討がなされるといいなと思いました。