

## 日本受精着床学会 2019 に参加して

荒木泰行

2019年8月1～2日に、「第37回日本受精着床学会総会・学術講演会」が、石原理先生（埼玉医科大学産科婦人科学教室教授）のもと、東京の京王プラザホテルで開催されました。私がお聞きできたご講演から興味あった演題を抜粋してご紹介させていただきます。

### 【一般演題】

#### 基-1 卵巣構造に着目した新たなガラス化凍結保存法の開発

川合智子 他（広島大学大学院 他）

卵巣のガラス化凍結技術の向上を目的に、凍結過程における卵巣の構造を調べた結果、卵胞と卵巣皮質間と二次卵胞内の卵と顆粒膜細胞間に剥離が生じていることが分かった。また、卵胞と卵巣皮質間にタイトジャンクションが認められ、二次卵胞の卵と顆粒膜細胞間に透明帯出現時に、タイトジャンクションが形成されることが明らかになった。これらのタイトジャンクションは、高張液への浸漬で消失し、等張液浸漬後も再構築されないことが示されたため、凍結前にコラゲナーゼによる前処理を行った結果、高張液下においても卵巣皮質と卵胞間、卵と顆粒膜細胞間の結合は維持され、マウス卵巣を凍結・融解し、移植試験に供試した結果、移植後の発情回帰が有意に短縮され、交配により正常数の産仔が継続的に得られた。

卵巣の凍結技術は今後さらに発達していくと思われませんが、コラゲナーゼでコラーゲン層を壊してから凍結するほうが、成績が向上するとは意外でした。なんでも壊れないようにすることを考えるだけでなく、違った着眼点も必要なのだと感じさせられました。

#### O-85 採精後から媒精開始に要する時間が ICSI 後の臨床成績に及ぼす影響

長尾洋三 他（蔵本ウイメンズクリニック）

採精から精子処理までの時間および精子処理から ICSI までの時間には、症例により様々になってしまうのが現状である。採精～精子処理（SC/SP）が2時間以内か以上か、精子処理から ICSI（SP/ICSI）が3時間以内か以上か、という観点から4グループに分けて検討した。結果、SC/SPが2時間以内のグループで処理後の精子運動率が高く、継続妊娠率がやや高い値であった。受精率、凍結分割胚数、凍結胚盤胞数にはそれぞれ差がなかった。

このご報告からすると、採精から精子処理までの時間は、あまり長くない方が良いのかもしれませんが、ただし、2時間以上のグループには自宅採精が多く含まれているかもしれないとのことでしたので、時間以外の搬送環境による影響もあるのかもしれませんが。

#### O-86 人工授精（AIH）における院内採精と自宅採精の比較

小玉真由美 他（立川メディカルセンター）

AIHにおける、院内と自宅採精の精子所見の違いについて検討を行った。結果、精液量、精子濃度、回収率（調整後回収運動精子数 / 総運動精子数）の項目で院内採精が有意に良好であった。また、平均最低気温が0℃以下と20℃以上の期間について検討を行ったところ、0℃以下では院内採精群の調整後の運動率が、20℃以上では自宅採精群の精子濃度、運動率、総運動精子数が有意に高く、回収率ではいずれも院内採精群が有意に高い結果となった。

冬に0℃以下になる様なことなど、各自施設の地域性の違いも考慮すべきポイントであると考えさせられました。環境の変化や処理までの時間を考えると、院内採精が望ましいのかもしれませんが、デリケートな部分でもあると思いますので、患者さんの希望を考慮して、結果に大きな影響が及ばない範囲でどちらを選択するか考えるべきだと感じました。

## O-89 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（英ウィメンズクリニック）

A社の1-Step medium（A社群）とHiGROW OVIT PLUS（OVIT群）の培養成績を比較検討した。2PNが4個以上得られた同一周期で得られた胚を2群に分けてsplit培養で検討した。D2分割率、D2良好分割率、およびD5胚盤胞発生率、D5良好胚盤胞率のいずれの項目でも両群間に有意差を認めなかった。しかしながら、IVF群とICSI群に分けて比較すると、IVF群のD5良好胚盤胞率がOVIT群で高い傾向がみられた。

OVITはヒトの卵管液組成を分析して開発された培養液で、必須アミノ酸濃度が低く、非必須アミノ酸が高く、特にタウリンを高濃度に含むことが特徴となっています。生理的な環境で胚を培養することは、もっと検討されるべきだと思っています。今後もっと蓄積されたデータが出てくることを期待しています。

## O-90 培養液別にみたヒト胚の発育とアミノ酸代謝の比較検討

熊迫陽子（セント・ルカ産婦人科 他）

HiGROW OVIT（OVIT）、もしくは従来のシングルメディウム（C液）30 $\mu$ Lのドロップ1個につき受精卵1個、Day5-6まで培養後に培養液上清を回収し、アミノ酸分析を行った。得られた分析結果からアミノ酸代謝量を算出し、個々の胚発育および患者背景等との関連性について検討した。結果、C液で培養すると胚の必須アミノ酸の取り込み量が増加していた。原因としては、C液は卵管内と比較して高濃度の必須アミノ酸を含んでいるからであると思われる。同様の胚発育であっても、用いる培養液によってアミノ酸代謝が異なることが明らかとなり、卵管内環境と同じ組成に設定された培養液と従来の培養液で培養された胚とは、形態評価では測れない違いがあることが示唆された。

培養液のアミノ酸組成の違いにより、胚に取り込まれたり胚から排出されたりしているアミノ酸量に違いがあったとのこと。アミノ酸の代謝量に違いがあるということは、何らかの影響があると考えの方が自然だと思いますが、更なるメカニズムが解明されてくることを願っています。

## O-91 培養方法の違いによる浸透圧の変化

鈴木菜々瀬 他（俵IVFクリニック 他）

培養液量とディッシュ形状2種類およびミネラルオイル2種類について、ドライインキュベーター中6日間での浸透圧変化について比較検討した。結果、培養液量60 $\mu$ Lよりも、80 $\mu$ Lで浸透圧の上昇は緩やかになった。また、培養液ドロップ液面とオイルの接地面積の小さいWOWでは、浸透圧の上昇を認めない期間が長かった。さらに、オイルは製品によってはロット間で浸透圧の変化に大きな違いがある製品が確認された。比重の大きいオイル（ヘビーオイル）では浸透圧上昇が緩やかであった。

ドライインキュベーターでのドロップ長期培養では、浸透圧が上昇することが複数の施設から報告されていて、培養液量を増やす、培養液とオイル接地面の少ないディッシュ使用、ヘビーオイルの使用等で浸透圧上昇を抑えられることが分かっています。しかし、オイルのロットによって浸透圧の変化に差が生じる製品が存在するという知見は初めて知りました。ドライインキュベーターをご使用の施設は、留意する必要があるのかもしれない。

## O-92 受精胚の適切な温度・気相環境を維持する培養デバイスの開発

大林徹也 他（鳥取大学研究推進機構 他）

インキュベーターから胚を取り出したときに、温度と気相の状態を維持できるデバイスの開発を行っている。インキュベーター外に取り出した時だけ、ディッシュの入った容器を密閉して内部気相状態を維持するチャンバーを開発した。また、潜熱蓄熱材という温度を37 $^{\circ}$ C付近に維持できる素材を利用して、インキュベーター外でも温度低下を最小限にした胚培養用の容器も開発している。

タイムラプスインキュベーターの導入により、胚を外に取り出さずに観察することが可能になっているが、導入およびランニングコストの面で、まだまだ全面的にというわけにはいかないと思います。インキュベーターから取り出して観察する際に、胚周囲の環境をなるべく壊さないデバイスの開発は望まれていることだと思います。

### O-93 Gx 培養液は高齢者 ART の胚発育を改善する

神野正雄 他（ウィメンズクリニック神野 他）

最近販売された、3種の抗酸化物質を添加した培養液（Gx 培養液, Vitrolife）。の高齢者への ART 成績について検討した。平均年齢 40 歳の 14 症例を 2 群に分け、Gx と GIII シリーズを用いて受精率と胚発生率を比較した結果、Gx シリーズが有意に高い胚盤胞形成率が得られた。次いで、41～47 歳の 9 症例に対して Gx のみの培養を試みたところ、臨床妊娠率 44%と高い結果であった。

抗酸化剤の効果が高齢者だけに現れるものなのか、興味があります。また、抗酸化剤は、受精～初期胚～胚盤胞にいたる、どのステージで有意な働きをしているのかという点も明らかになってくればよいなと思いました。

### O-98 先体反応誘発法の検討

竹本洋一 他（セントマザー産婦人科医院 他）

ヒト精子の先体反応を人為的に誘発する方法について検討した。界面活性剤およびリゾレシチンを用いた方法では、先体のみならず細胞膜にもダメージが加わりやすく最適条件が難しかった。また、Piezo パルスを用いた方法では、先体が部分的に消失した精子は 41%得られた。また、純水を使用した方法でも 50%程度誘発できた。

自然の受精では先体反応を完了した精子のみが卵細胞の中に進入するのに対して、ICSI では先体反応を起こしていない精子を注入している。動物種によっては先体とともに精子を注入すると受精できないものも存在することから、先体が卵細胞に入ることは避けられるなら避けたいところです。ですので、精子を生存させたまま先体反応を誘起する人為的な方法の開発は、望まれている技術だと思います。

### O-110 凍結融解精子および新鮮精子を用いた ICSI における精子運動率別の受精・培養成績の比較検討

遠藤美幸 他（田園都市レディースクリニック 他）

採卵当日に新鮮精子の確保が難しいことが予め分かっている場合は、事前に凍結を行うことがある。これらの凍結精子と新鮮精子を用いた ICSI の成績を、精子運動率の違いにより検討した。結果、受精率に有意差は認められなかったが、原精液所見で運動率 10%以下の群では、凍結群で胚盤胞発生率の低下が示唆された。

ICSI に凍結精子を用いたとしても、成績に違いは生じないという認識でしたが、元もと運動率の低い症例では発生率が低下するのかもしれないとのご発表でした。凍結融解しても運動性を保持している精子を用いたほうが成績良好との説も聞きますので、今後のさらなる検討がなされることを期待しています。

### O-111 新規ヒト精子凍結液の開発について

中田久美子 他（山下湘南夢クリニック 他）

精子凍結試薬の開発を目的に、卵黄の代替えとして大豆由来のレシチンをグリセロールベースの凍結保護剤に含有させて検討した。また、更に各種ビタミンを添加した群においても検討を行った。レシチンと各種ビタミンを添加した区では、非添加に比べて融解後の精子運動率が有意に高い値となった。卵黄含有区で以前高いものの、卵黄以外の成分を含有させても融解後の運動性が向上させられることが分かった。

Vitrification と急速凍結法の開発により、現在では卵子や胚の凍結は、かなり満足のいく生存率を達成していると思われるが、精子に関してはその開発が遅れていると思います。将来、精子の数が減少してくる懸念もあり、極少



数の精子を高い生存率で凍結保存することは、今後必要になってくる技術だと思っていますので、未来を見据えた場合、精子凍結保護剤や凍結方法の開発が望まれていると思います。

### O-120 過排卵処理がマウス胚の体内発生能に及ぼす影響の検討

江副賢二 他（加藤レディスクリニック）

過排卵処理を施した雌マウスと無処理マウスをオスと交配し、妊娠 1~4 日目に卵管もしくは子宮から回収した胚の数を調査した。結果、過排卵区において妊娠 3~4 日目で胚数が有意に減少した。また、3 日目で回収した胚を体外培養したところ、無処理区の胚に比較して処理区では胚盤胞発生率が有意に低下した。さらに、処理区のマウスに抗エストロゲン薬や抗アンドロゲン薬を投与したところ、妊娠 4 日目の胚盤胞回収率が回復したことから、過排卵処理による血中ステロイドホルモンの上昇が関与している可能性が示唆された。

一般的には、新鮮胚移植と比較して凍結融解胚移植の成績が良好なことが知られていますが、このご発表のようなことが影響しているのだな、と再認識させられました。もしもホルモン拮抗剤の投与等で、新鮮胚でも凍結胚と同等の妊娠率が出せるようなプロトコルができれば、凍結の手間やコストが現状よりも低減できるのかなと思いました。

### O-121 マウス受精卵での人工細胞核構築

鈴木由華 他（近畿大学生物理工学部 他）

DNA を結合させた直径約 3 $\mu$ m の磁気ビーズをマウス受精卵に注入して、ビーズ周囲の核膜やヒストンの動向をタイムラプスによって観察した。結果、DNA ビーズの周辺に核膜様の構造体が確認され、ある程度の DNA の集合体があれば、受精卵内では人工的に核膜を形成させられることが明らかとなった。

将来的には核を人工的に形成させようとする、とても夢のあるお仕事だと思います。ICSI で第 2 極体が放出されているにも関わらず多核になるような現象は、染色体の一部が固まりから離れてしまうことが原因だと推測していますが、このご報告のようにある程度の DNA（染色体）があれば、卵細胞内ではそれを認識して核膜を形成してしまうのだと思います。

### O-127 アポディゼーション位相差顕微鏡による ヒト初期胚卵腔の顆粒状構造の動態観察（第 2 報）

園田彩奈 他（ミオ・ファティリティ・クリニック 他）

アポディゼーション位相差顕微鏡法という方法を用いて、無染色でヒトやマウスの未受精卵や初期胚の観察を試みた。マウス未受精卵および IVF 由来初期胚では、卵腔内に通常の倒立顕微鏡では可視できなかった顆粒が確認された。また、この顆粒物質はヒト IVF 由来 1PN の 60% (3/5)、ヒト IVF 由来 3PN の 33% (2/6) に確認できたが、ヒト未受精卵および ICSI 由来 2PN 胚では確認されなかった。

顕微鏡とは、そこにある全ての物質を可視化しているわけではないということを再認識させられるご発表でした。通常の業務で見ている顕微鏡像には、見えていない物質もそこに可能性があります。また、興味深いことに今回観察された顆粒物質は、種や発生ステージの違いで可視に違いがあるということですので、これらが何なのか？どんな影響があるのか？今後のご報告が楽しみです。

### O-133 ICSI の際に透明帯に形成される穿刺孔は孵化不成立のリスク因子となる

井上岳人 他（うめだファティリティクリニック 他）

廃棄希望の IVF 由来胚盤胞に、ICSI 穿刺孔を人為的に作成し (mimic-ICSI)、タイムラプスを用いて孵化の様子を観察した。結果、mimic-ICSI 群では開けた小孔から脱出する胚が多く、通常の IVF 胚で見られる大きな亀裂を生じて脱出する胚は少なかった。mimic-ICSI 群では完全脱出率も低下した。

ICSIで脱出様式がIVFと異なることが、インジェクションピペットで開けた穴が原因であることが改めて確認されたご発表です。ただし、実際に胚移植した場合は、子宮内で透明帯を溶解するメカニズムがあるとされていますので、どの程度ICSIでの穿孔孔に注意が必要か議論が必要なところだと思います。

#### O-134 カルシウムイオノフォアによる卵子活性化が著効しなかった症例の塩化ストロンチウムによる卵子活性化効果

中島由里絵他（リプロダクションクリニック東京 他）

カルシウムイオノフォア（Ca群）で受精率、胚発生が改善できなかった症例に対し、塩化ストロンチウム（Sr群）を実施し、成績を比較検討した。結果、2PN率と胚盤胞発生率においてSr群で有意に高率であった。特に射出精子を用いた症例ではSr群で良好な成績であった。先のCa群で2PNが得られなかった13症例で、その後のSr処理によって8例が2PN胚を得られた。

人為的な卵活性化処理を施工しても結果に結びつかない例も沢山遭遇していると思いますが、カルシウムイオノフォアと塩化ストロンチウムでは、活性化の機序が少し違うと思われるので、一般的に多く選択されているイオノフォアでうまくいかなかった症例に対しては、塩化ストロンチウム法も選択肢に入れてもよいのかも知れません。

#### O-135 c-IVF 後の前核非形成卵子に対する精子侵入の有無と発育停止に関する細胞生物学的解析

葛原大貴 他（ミオ・ファティリティ・クリニック）

C-IVFでの非受精は、精子の進入自体が起こっていない可能性が高いとされているが、詳細を調査するために、核、微小管、中心体をそれぞれ蛍光染色で染め分けて検討を行った。50個の卵のうち、中心体シグナルを認めたため精子進入があったとされる卵が2個確認された。このことから、C-IVFの非受精卵の中には、精子進入後に発生停止した卵も含まれていることが確認された。

ICSIを行っても受精しない症例がありますが、このご報告のようにC-IVFの精子進入後に発生が停止してしまう例があるということは、精子の卵細胞内に進入する能力と卵を活性化する能力は、あまり関連していないのかもしれない。また、レスキューICSIを実施するにあたっては、精子が進入しているにもかかわらず、卵が活性化していない例が少なからず存在していることも頭に入れておかなければと思います。

#### O-136 変性卵子が共培養する他の卵子のIVF成績に及ぼす影響

久保友紀 他（俵IVFクリニック 他）

検卵時に排除しきれなかった変性卵子、もしくは媒精中に変性したものと共培養された他の卵子の受精やその後の胚発生に与える影響について検討した。IVFの受精率はディッシュ中の変性卵数の増加と共に低下した。また、変性卵の存在はIVF後のレスキューICSIの受精率にも影響を及ぼしていた。その後、意識的に採卵時の変性卵を取り除いて検討を続けた結果、媒精後に変性した卵は受精率低下に影響を及ぼしていなかった。

媒精開始時から変性卵が混じっていると、成績低下につながる可能性があるということです。媒精前に正確に変性卵を検知して媒精環境から除外することは、重要なことなのかもしれません。

#### O-138 レスキューICSI 対象指標の確認：IVF 受精兆候観察のためのタイムラプスの有用性

三浦恵 他（おち夢クリニック名古屋 他）

レスキューICSIの必要性を判断する指標としてFertilization Cone (FC)とCytoplasmic Flare (CF)の有無を観察することが有用と報告してきたが、今回はこの確認にタイムラプスインキュベーターを用いて検討した。FCが確認できた率は従来の定点法13.0%、タイムラプス法19.9%で有意に高かった。また、タイムラプスで受精したかも(FCやCFが陽性)と判定した卵の実際の受精率は、有意に低下させることができた。

レスキューICSI実施の際、本当に非受精なのか、それとも精子進入が遅かったのか、という判断は非常に重要になってきます。このような何時起こっていつ消えているかハッキリしない現象を確認したい場合には、タイムラプスは大活躍してくれるツールであると思います。

#### O-139 Rescue ICSI には紡錘体観察が不可欠である

田口新 他（広島 HART クリニック）

短時間媒精後のレスキューICSI を実施する判断に、紡錘体の観察を取り入れて検討した。第2極体の放出のみで判断した時期と、紡錘体の有無を観察して判定した時期、さらに両者を使って判断した時期のレスキューICSI の正常受精率および3PN率を比較した。結果、第2極体と紡錘体の有無の両方を判断基準に使用した場合で、正常受精率が高くなり、3PN率が低い値であった。

MII 期に特徴的な紡錘体形状は、受精後に変化していきますので、紡錘体の形状を受精の有無判定に使用するのには、非常に有効だと思いました。ただし、上記 O-135 のご発表のように、精子進入したにも関わらず卵が活性化しなかった場合は、レスキューで注入した精子によって卵が活性化して、染色体異常の胚になる可能性があることも考慮しておく必要があるかと思えます。

#### O-144 胚盤胞のグレードと胚生検後の生存率、孵化率との関係

小林亮太 他（IVF 大阪クリニック 他）

PGT のために胚生検を行って凍結後、胚移植に供されなかった胚盤胞について、融解後の生存率、孵化率および胚生検前のハイグレードの関係を調査した。Day5 と Day6 の比較では、Day6 で融解後の生存率が有意に低かった。しかし、良好胚盤胞においては Day5 も Day6 も違いが無かった。生存した胚の孵化率は、Day5 と Day6 で差異を認めなかった。グレードの低い Day6 胚を慎重に生検することが必要だと思われた。

日本産婦人科学会の PGT-A の臨床研究が第2段階に進もうとしていて、本邦での PGT-A に関する検証データが飛躍的に増えてくるものと予想しています。このご発表のように、PGT-A の成績向上に寄与するようなご研究が沢山報告されるようになることを願っています。

#### O-145 次世代シーケンサー（NGS）を用いた流産絨毛組織の染色体数解析

三東光夫 他（日本リプロジェネティクス株式会社 他）

流産絨毛組織の染色体分析は、G 分染法による核型解析が一般的であるが、本研究では次世代シーケンサーを用いた方法（NGS 法）により染色体数解析を行ない、症例検討を行なった。156 症例中 134 症例では絨毛組織が確認でき、染色体の数的異常は母体年齢の上昇とともに増加していた。また、22 番、15 番、16 番、21 番、X 染色体の順で異常頻度が高い結果であり、既存の方法と概ね一致した結果が得られた。また、微少欠失やモザイクの検出も可能であった。

絨毛組織の培養が不要なこと、染色体の分染やそれを読み取る高度な経験が必要ないことは NGS の大きなメリットであると思います。ただし、NGS の性質上、倍数体や均衡型転座が検出できないという問題がありますので、このあたりの技術革新が早くできれば非常に強力なツールとなり得ると思いました。