

## 日本生殖医学会 2019 に参加して

荒木泰行

2019年11月7～8日に、「第64回日本生殖医学会学術講演会」が、岡田弘先生（獨協医科大学埼玉医療センター泌尿器科 教授）のもと、神戸市で開催されました。私が聴講したご講演から、一部を簡単に抜粋してご紹介させていただきます。

### 【一般演題】

#### O-001. Crystal Violet を用いる Halo Sperm Test では DNA 断片化を検出できない

兼子智 他（東京歯科大学市川総合病院産婦人科 他）

Halo Sperm Test (HST) は、塩抽出した精子を Crystal Violet (CV) で染色して、精子頭部から伸長する繊維状 Halo の長短で DNA 断片化を判定する検査手法である。しかしながら、今回検討した結果、DNA 断片化をこの HST で検出できていないことが示された。CV は DNA 繊維への結合性が低く、実際は DNA 結合性タンパク質が染色された結果だと思われ、DNA 自体の断片化を示すものではないと結論づけた。

今まで私たちは、Halo テストが精子の DNA 断片化を調査する方法の1つだと信じてきたと思います。この報告が事実なら、過去に得た情報は考え直さなくてははいけないかもしれません。発表者らはアクリジンオレンジの方法も否定しています。質疑時、DNA 断片化を調べられるのは、現状は電気泳動法のみだと仰っていました。

#### O-002. Difined で Xeno-free な新規ヒト精子凍結保存液の開発

武内大輝 他（三重大学大学院医学系研究科産科婦人科 他）

市販されているヒト精子凍結試薬の多くには、HSA が含有されている。この生体由来物質を除外した凍結液を作成するために、低分子耐凍剤としてグリセロール、エチレングリコールやプロピレングリコール、高分子としてヒドロキシプロピルセルロースやカルボキシル化ポリリジン (CPLL) について、濃度等の条件を詳細に検討した。結果、グリセロールと CPLL の組み合わせで融解後の高い生存性を得られることが分かった。また、ラフィノースの添加も有効であった。

現状、本邦で多く使用されている胚凍結試薬には、既に HSA が含まれていません。しかし、HSA は胚の培養に不可欠であり、長時間浸漬しているこの胚培養液から HSA を除外できるようになればよいと思いますが、まずは精子凍結保護剤から HSA を除去できる日が近いかもしれません。

#### O-003. 最適な精製後精子保存環境（温度）に関する検討

樋口謙太 他（新橋夢クリニック）

密度勾配遠心分離後の洗浄精子の適切な保管温度について検討した。洗浄後の精子を 37℃と 25℃にそれぞれ保管し、3 時間と 24 時間後の運動性を調査した。結果、3 時間では 37℃群のほうが良好な運動性を示したが、24 時間後では 25℃のほうが良好であった。したがって、未熟卵子を体外培養して翌日媒精するような場合は、室温保存のほうが適していると考えられた。

原精液のストックも室温が適しているという報告もあります。精子は活発に運動できるエネルギーの量が限られているので、使用時以外は比較的低温（室温）でストックしてパワーを温存させるのが良さそうです。

#### O-045. 透明帯除去後のヒト 3 前核期胚の time-lapse imaging system を用いた動的解析

湯本啓太郎 他（ミオ・ファティリティ・クリニック リプロダクティブセンター 他）

ヒト胚のタイムラプス観察から、第 1 卵割時に透明帯と卵細胞質の間に Perivitellin thread (PT) が 50%以上の胚で確認され、fragment 発生に関与しているとの報告がある。そこで、異常受精 3PN 胚の透明帯を人為的に除去し、その後の発生過程をタイムラプスで観察した。結果、卵割率は 2PN 胚と同等であり、33.3%は胚盤胞へ

と発生した。第1卵割時のfragment量20%未満の胚は66.7%で、透明帯を除去することでfragment発生率を減少させられる可能性が示唆された。

透明帯と卵細胞質の間に繊維状の物質が効率で発生しているということ、私は知りませんでした。分割時にこの繊維が細胞を引っ張ってしまい、fragが発生するのではないかとのことです。GV期に卵丘細胞から伸びた突起は透明帯を貫通して卵母細胞まで達しています。通常は成熟の過程でこの結合は解離しますが、上記のような現象は、この突起の解離が正常にされていないことが原因かもしれないとのこと。

#### O-047. 卵子個数は媒精時の精子濃度により多前核受精に影響するか

杉本貴章 他（府中のぞみクリニック）

精子の媒精濃度と卵子数における多精子受精の検討。検討1)では、媒精濃度10万/mLに固定して卵子数1、2、3、4個のときの多前核率を調査したところ、1個群で有意に高くなった。検討2)では、卵子数を1個に固定して媒精濃度5万と10万/mLの2群を検討した結果、多前核率は5万/mL群で有意に低くなった。しかし、代わりにOPN率が高くなったことから、結果的に得られた2PNの率は同等であった。

1mLの2重ディッシュ内はある程度の空間があり、媒精濃度が同じであれば各卵子(COC)に群がる精子の数には限りがあるので、COCが1個でも3個でも、結果は同じだと私は考えていました。しかしながら、この報告では、1個と2個で多前核率に差が出たとのこと。COCの数によって媒精精子濃度を調整するほうが良いことを示唆していると思いますが、皆さんはどうされているのでしょうか？

#### O-107. 抗酸化剤添加ワンステップメディアムを用いた培養成績の検討

藤村佳子 他（高崎ARTクリニック 他）

最近発売開始された抗酸化剤添加培養液について検討を行った。媒精から初期胚移植、あるいは胚盤胞までの培養に同社の抗酸化剤不含有培養液との臨床成績を比較した結果、受精率には差が無かったが、初期良好胚率において、抗酸化剤含有群で有意に良好な結果であった。過去のシーケンシャルメディアムとの比較検討では、抗酸化剤添加群よりもシーケンシャル群で拡張胚盤胞率が高い傾向にあった。

媒精培養液に抗酸化剤が含有された群で、初期胚までの成績が良好であったことから、媒精環境での酸化ストレスの上昇に対して抗酸化剤の含有が有効に機能したことが示唆された結果だと思いました。

#### O-108. 高アルカリ性の精子調整液を用いた精子調整によるIVF およびICSI 後の培養成績～sibling oocytes

前倫太郎 他（リプロダクションクリニック大阪 他）

一般的な製品よりもphをアルカリ性に傾けた精子処理試薬を用いて、臨床成績を検討した。密度勾配試薬と洗浄培養液をアルカリ性に傾けた製品を使用した群(G群)と通常の製品の群(S群)に分けて、スイムアップまで行って精子を回収し、c-IVFもしくはICSIに用いた。Sibling oocyteの検討において、G群ではC-IVFの良好胚盤胞率が有意に高かった。しかしながら、ICSIの2PN率は、G群においてやや低率であった。

精子はアルカリ性環境で運動率が高まると言われていますので、媒精環境をアルカリ性にするとう受精率が高まることは予想できますが、抄録では受精率自体には差が表れなかったとのこと。しかしながら、良好胚盤胞率が高かったとのことですので、精子の選別もしくは卵自体に何かしらの良い影響はあるのかもしれない。

#### O-109. 無加湿下における長期微小滴培養は浸透圧上昇を引き起こし胚発育に悪影響を与える

田中晶子 他（IVFなんばクリニック 他）

作成できるドロップの液量が30 $\mu$ L(GPS)と100 $\mu$ L(LinKID)の2種類のディッシュを用いて、無加湿インキュベーター内での6日間培養後の浸透圧変化を測定したところ、30 $\mu$ L群で有意に高くなった。これらの培養環境で培養した胚のday5の胚盤胞率および良好胚盤胞率は、100 $\mu$ L群で有意に高かった。

このご報告では、通常の1ドロップに1胚入れる培養とWOW ディッシュを用いた集団培養を比較しているようですので、必ずしも浸透圧変化による成績の違いだけとは言えないと思いますが、ドライ環境ではドロップの大きさが浸透圧変化に関係していることは事実だと思しますので、同環境のご施設では注意が必要だと思いました。

#### O-110. 培養 dish の ID 識別に用いられる素材の安全性評価試験

河野博臣 他（山下湘南夢クリニック 他）

ディッシュの患者等識別に使用しているマーカークラベルの胚への影響を調べる目的で、熱印字ラベル、色鉛筆、ノンキシレンマーカークラベルをそれぞれディッシュに添付し、マウス胚の培養を試みた。結果、印字ラベルではほぼ影響が認められなかったが、色鉛筆やノンキシレンマーカークラベルは胚発生を阻害した。ノンキシレンマーカークラベルは6時間風乾した後でも毒性を示した。

本報告では、実験の為に過剰に塗布していますので、通常名前等を記すだけの量でどの程度影響が出るのか知りたいところではありますが、ノンキシレンマーカークラベルが顕著にマウス胚の発生を阻害したという結果には驚きました。この類のマーカークラベルを使用されているご施設もあるのではないのでしょうか？

#### O-112. 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）

抗酸化剤添加培養液（Gx 培養液）の高齢患者への臨床効果を確認するために、Gx と GIII シリーズで比較したところ、Gx 群で胚盤胞率が有意に高かった。また、41～47 歳の 9 症例に Gx を用いたところ臨床妊娠率は 44% であり、日産婦の統計よりも有意に高い値であった。

高齢患者で非常に高い妊娠率を出されているので、今後の追試データに期待したいと思います。

#### O-113. オイルの被覆方法、量および性状の違いが WOW dish 内の培養液浸透圧に与える影響

森香菜江 他（浅田レディースクリニック 他）

WOW ディッシュを用いて 60 $\mu$ L の培養液ドロップに、Light オイルと Heavy オイルを 3.0mL と 4.5mL 被せる 4 群を用意して、無加湿型インキュベーター内に入れ、浸透圧の経時的変化を調査した。結果、Heavy オイルを 4.5mL 被せた群の浸透圧変化が一番小さかった。また、他の検討で培養液ドロップを作製時、直ちにドロップ部分からオイルを被せる方法が浸透圧上昇を低減させるのに有効であることも判明した。

ドライインキュベーターで培養しているご施設が増え、更には 5 日以上培養液交換を行わないワンステップ培養も多くなってきていると思います。これらの環境では、オイルの種類や量、被せ方まで注意したほうが良いのかもしれない。

#### O-114. Gx 培養液のマウス胚による有効性の検討：より有効な運用法と潜在的リスクの発見

神野正雄 他（ウィメンズクリニック神野 他）

抗酸化剤含有 Gx 培養液で ICR 系マウスの胚を培養したところ、卵細胞質中に褐色顆粒の形成が認められた。Gx 培養液の影響を受ける胚ステージを調査するために、抗酸化剤不含有のシーケンシャル（G1、G2）やワンステップ（G-TL）培養液と組み合わせて検討したところ、初期培養に Gx のみならず G-TL を使用した場合に、褐色顆粒の形成が認められた。また、初期培養に G1、後期培養に Gx を用いたところ、良好な胚盤胞発生率が得られた。

マウス胚での結果ですが、必ずしも全てのステージで抗酸化剤が高濃度で含まれていることが良いというわけでは無いのかもしれないことを示されています。適切なステージでの抗酸化剤の含有が有効なのかもしれないので、更なる研究が期待されると思いました。

---

### O-116. タイプが異なるミネラルオイルが加湿型・無加湿型インキュベーターの培養成績に与える影響の検討

北上茂樹 他（古賀文敏ウイメンズクリニック）

加湿の状態とオイルの種類（Heavy と Light）の関係を検討した。加湿 Heavy のほうが加湿 Light よりも Day3 良好胚率は有意に高かったが、胚盤胞到達率は加湿 Light のほうが有意に高い結果であった。また、無加湿環境の検討では、Heavy オイルで培養した群が全体的に良好な結果であった。

---

最近、無加湿インキュベーターでの Heavy と Light オイルの浸透圧変化や胚培養成績についての報告は散見されますが、加湿環境での検討は少ない気がします。加湿環境でも、オイルの性情による培養成績に違いがあるのかどうか興味はあります。

---

### O-124. マウス精子幹細胞の自己複製様式の多様性とその位置付け

高島誠司（信州大学学術研究院繊維学系）

マウスの精子幹細胞は、GDNF の存在下では自己複製を繰り返して継代培養可能なことが知られているが、今回の研究で FGF2 でも培養できることを発見した。さらに、この FGF2 で培養した細胞は GDNF で培養した細胞と異なる特徴を示し、分化が少し進んだ状態で維持されている可能性が確認された。

---

生殖細胞の幹細胞を in-vitro で増殖させる手法は、将来的に重要な技術になると思います。さらに、分化の状態をコントロールする手法も重要であり、このようなご研究が生殖細胞に対して盛んに行われることを願っています。

---

### O-170. 当院における着床前遺伝子診断（PGT）の臨床成績

渡邊みあ 他（竹内レディースクリニック附設高度生殖医療センター 他）

2008 年から分割胚生検の FISH 法、2014 年から TE 採取、2016 年から大学機関と連携して NGS を用いた PGT を行ってきた。PGT-SR に関して、FISH 法を用いた症例の妊娠率や流産率は NGS に移行して改善された。大学との連携により PGT-M に関して良好な妊娠率が得られている。

---

特に PGT-M は高度な診断技術が必要なため、実施できる施設数が少なく、患者さんは苦勞されていると思います。細胞を採取する技術が広まれば、クリニックで採取した検体を大学等の専門機関で検査するような体制が発展して、患者さんの負担が減ると思いました。

---

### O-171. 3 前核由来胚盤胞の染色体核型の検討

兼子由美 他（西村ウイメンズクリニック 他）

ICSI 後の 3PN 胚由来胚盤胞の TE を採取して、NGS による PGT-A 解析を行った。また、タイムラプス画像を用いて PN の直径を測定して、PGT-A の結果を交えて考察を行った。NGS の特性から正確に 3 倍体を検出することはできないが、可能性の高い胚をある程度判別することはできる。3PN 胚由来胚盤胞には、3 倍体の可能性が高い胚に加えて 2 倍体の可能性が高そうな胚も存在していた。さらに、第 2 極体の放出や PN の直径の不均等を観察すると倍数性を予想できるかもしれないことを発見した。

---

3PN でも PN サイズが不均等で、第 2 極体を放出していた胚は、2 倍体である可能性が高そうということです。倍数性を判定できる NGS 法等が発展してきて更に詳細が検討されてくれば、タイムラプス画像だけで倍数性をある程度予想することが可能になってくるのかもしれませんが。