

ヒト胚培養の生殖内分泌学, 生殖生物学 ART ラボで有益な最新情報とその未来

寺田 幸弘

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻機能展開医学系産婦人科学講座

はじめに

生殖補助技術 (ART と略) は不妊症診療を補助する技術として誕生したが, 現在は一般的な治療に位置づけられるほど普及している. その変化は急速でさまざまな技術が導入されている. ART の質はさまざまな要因に左右されるが, 決定的な事項として適切かつ正確に配偶子, 胚を取り扱うことのできる人材の存在がある. どんなに良好な配偶子が得られても, それを取り扱う知識と技術を持ち合わせた人材が ART ラボに存在しないと, 妊娠, 挙児に至ることはできない. 筆者は, 一般社団法人日本卵子学会の胚培養士認定委員会委員を認定制度開始時点より担い, 昨年度まで認定委員会委員長を務めていた¹⁾. 胚培養士に必要な標準的知識と今後の ART の展開に注視すべき受精から着床までの細胞生物学, 生殖内分泌的な知識のいくつかを紹介する. 本稿は2020年12月に仙台市で開催された第25回日本生殖内分泌学会学術集会 (会長, 伊藤潔先生 東北大学災害医学研究所教授) 特別講演として同演題名で発表した内容を記述した.

ART ラボに有用な生殖内分泌学のトピックス

1. 抗ミュラー管ホルモン

ART の日常臨床で最近抗ミュラー管ホルモン (anti-Mullerian hormone; AMH) 測定値を目にすることがある. 詳しくは当会会員である群馬大岩瀬明教授による日本語総説²⁾に最新情報がほぼ網羅されており参照いただきたいが, 培養士として留意すべき必要のある事項に関して, 図1および図2に示す. この顆粒膜細胞より分泌される糖タンパクは卵胞のリクルートや発育を抑制する

働きをもっていることは認識すべきことであろう. 生物の体内には AMH のように「性腺の無分別な躍動を抑制する物質がまだまだ多く存在する」と考えられる. AMH の排卵誘発への応用はいまだ検討中と認識されるが, 抗がん剤投与時における卵巣の保護などもふくめた臨床応用への展開を筆者は期待している. なお, AMH 値による個人の妊孕性の評価に関しては否定的な報告が多い.

2. プレコンセプションケア

昨年の本学会のシンポジウムで取り上げられ, 本誌25号にも特集が組まれており参照されたい. 私が講演でしばしば使用するのが図3, 図4である. 女性のからだの性周期の中核は視床下部, 下垂体, 性腺をつなぐ自転車のチェーンのような構造であることは言を待たない. 近年になり, そのチェーンの回転に体のいろいろな部分が発関与してきていることが明らかになってきている. 図3を参照すると脂肪組織からのレプチンや膵臓からのインスリンが性周期に関与していることが理解できる. これは, やや短絡的な思考と指摘されることを恐れずに記述すると, エネルギー (脂肪) を蓄え, 糖代謝に関しても余裕をもった段階で体が妊娠することを許容すると判断し, からだ全体がそれに協調することが性周期の回転には必要なのである. 潜在的に不健康な状況のかたへの不妊治療の介入は慎重なスタンスが必要である. ART の

AMH (Anti-Müllerian hormone)

- ・グリコプロテイン
- ・TGF- β スーパーファミリー
- ・前胞状卵胞と小胞状卵胞の顆粒膜細胞によって産生される
- ・過剰な卵胞のリクルーメントを防いでいる
- ・FSH依存症の卵胞発育を抑制する
- ・月経周期に依存しない
- ・GnRHアゴニストの影響を受けない

図1 AMH とは

連絡先: 寺田幸弘

秋田大学大学院医学系研究科医学専攻機能展開医学系産婦人科学講座

〒010-8543 秋田市本道1-1-1

TEL: 018-884-6163

FAX: 018-884-6447

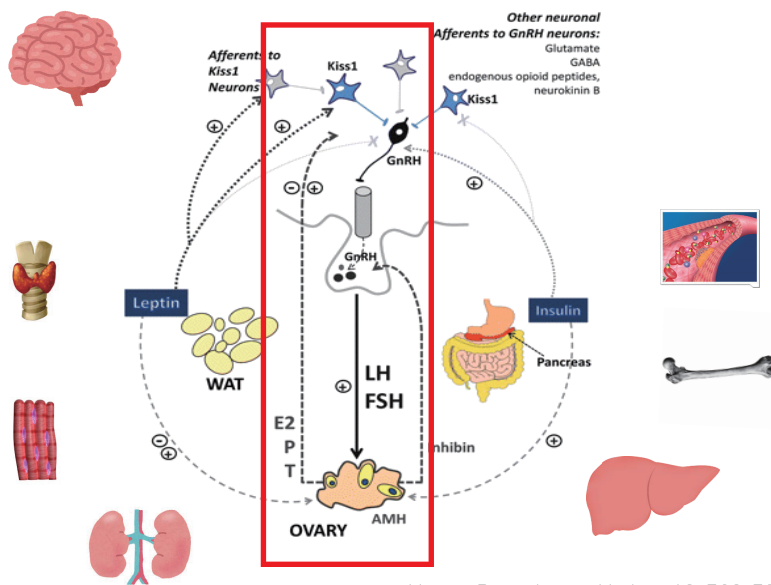
E-mail: teraday@doc.med.akita-u.ac.jp

ARTにおけるAMH

- ・ 卵胞数と正の相関を示す
- ・ 年齢とは負の相関を示す
- ・ AMH値と妊孕性の関連については不明
- ・ 低AMH値 → ARTにpoor responder
- ・ 高AMH値 → OHSSになりやすい

- ・ AMH < 0.5 ng/mL
 - ・ IVF周期で卵胞が3個以下
- ・ AMH < 1.0ng/mL
 - ・ 採卵可能なベースライン
- ・ AMH > 1.0ng/mL but < 3.5ng/mL
 - ・ 排卵誘発に適度に反応する
- ・ AMH > 3.5ng/mL
 - ・ OHSSに注意が必要

図2 ARTにおけるAMH



Human Reproduction Update, 18: 568-585, 2012 改編

図3 性中枢とからだの連関



図4 月経はどんなときに止まるか=体はどんな時に妊娠を拒絶するか

ゴールは妊娠することではなく、患者が健康な状態でわが子を手にすることである。プレコンセプションケアはARTの本質を向上させ、そのための生殖医学に関するヘルスリテラシーも今後さらに重要になってくると考えている。

胚培養士に有用な生殖生物学のトピックス

1. 受精の本質とそのゴール

ICSIが不妊症診療に導入されて久しくその施行周期数は通常のIVFを上回る状況になっている。図5にICSI後の受精停止卵子の核と微小管の状況を示す³⁾。ICSI後の受精障害、受精停止の最も頻度の高い原因は精子由来卵子活性化因子の不足、欠如等に起因する卵子活性化障害である。活性化が惹起されず分裂期のままの卵子細胞

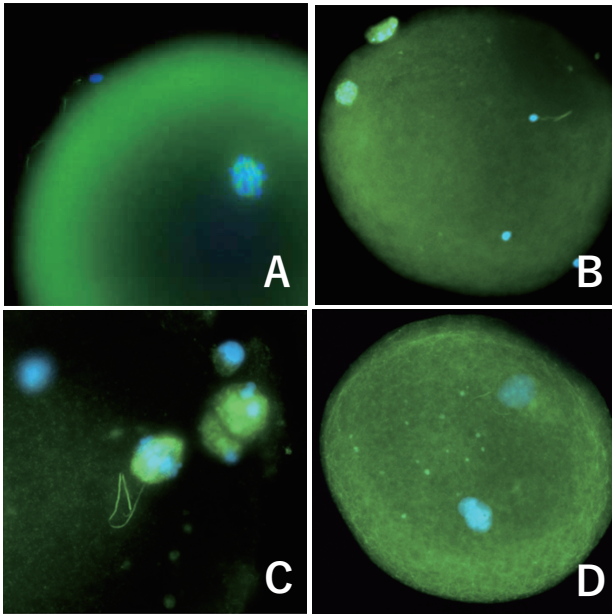


図5 ICSI後の受精停止例の核相(青)と微小管(緑)形成(文献1, 改変)

- A: 顕微注入自体のエラー.
- B: 顕微注入は成功しているが核相の変化はみとめられない.
- C: 卵子活性化障害 精子核は premature condensation of chromosomes (PCC) であり, 精子中心体が分裂しその周囲に紡錘体を形成している.
- D: 精子中心体機能不全が想定される 2前核期停止 雌雄の前核形成は認められるが接近融合がみとめられない.

質内の精子核は染色体様な形態を示し, 分裂した精子中心体によって形成された紡錘体に囲まれている. この状態は premature condensation of chromosomes (PCC) と呼ばれる. Mio, et al. によるタイムラプスシネマトグラフィーによるヒト受精から初期胚発育までの詳細な挙動解析により, 従来認識されていなかったヒト受精の種々のイベントが明らかになった⁴⁾. そこで報告された雌雄前核の接近, 融合という一連の動態は従来まで断片的に報告されてきていた精子中心体の機能を明瞭に示唆する発見であった.

「雌雄のゲノムが融合して新しい形質が生まれる」ことが受精と定義されるなら, 卵子中央で雌雄前核が融合した瞬間がそのゴールと認識される⁵⁾. 前核融合後には第一分裂紡錘体が形成され, 第一(体細胞)細胞分裂が間髪なく進行し終了している. 受精により創生された新しい形質は, こののち数十兆の細胞より構成される個体形成に向けてひたすら分裂していくのである. PGT-Aなどの導入により「胚構成細胞の染色体異数性」に関して生殖医学の耳目が集まっている. 第一体細胞分裂はその後の胚の染色体構成に大きな影響を及ぼすことは容易に想像できる. 受精という現象は第一体細胞分裂の終了をもってその本質的なゴールとすべきではないかと最近筆者は考えている.

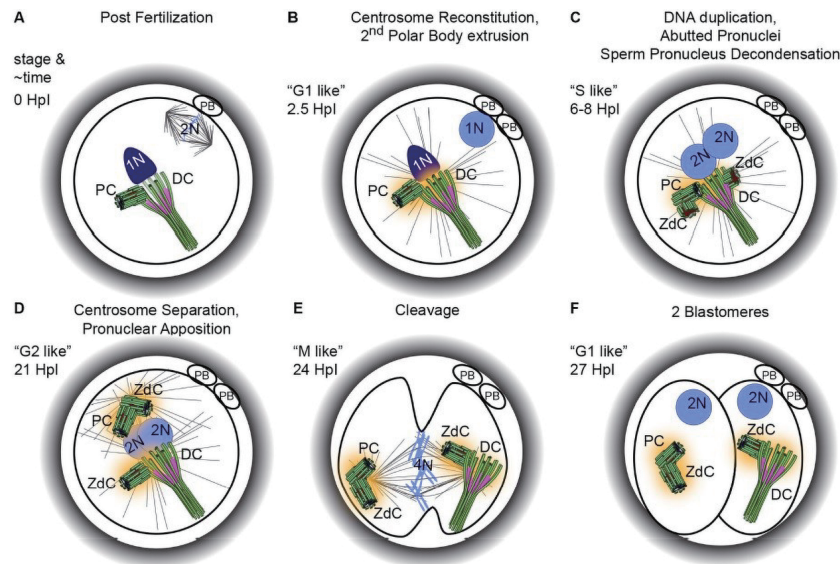


図6 受精における精子中心体の機能発現

- A: 精子侵入直後 PC: 近位中心小体 DC: 遠位中心小体 精子核は1倍体, 卵子核は第2極体放出前で2倍体.
- B: 精子中心体から精子星状体の形成がはじまる. 卵子核は第2極体が放出され1倍体,
- C: 雌雄前核の接近 両前核ともS期を経て2倍体になっている.
- D: 雌雄前核の融合と精子中心体の分離.
- E: 第一体細胞分裂 分裂した精子中心体により第一分裂紡錘体が形成され, 4倍体の融合受精核による染色体を分離.
- F: 第一細胞分裂の終了 このような経過を考慮すると受精のゴールとはこの時点ではないかと最近考えている.

表1 現在までに精子中心体機能不全が発症していると考えられた症例報告

報告	患者年齢	精子形態の特徴	引用
Nakamura et al.	1 man 38-year-old	75-100% 頭部断裂	Hum Reprod 2002; 17: 2930-2934.
Chemes et al.	10 sterile men	10-25% 頭部と中片の接着異常	Hum Reprod 1999; 14: 1811-1818.
Rawe et al.	1 man 36-year-old	中片の欠除	Hum. Reprod 2002; 17: 2344-2349.
Porcu et al.	2 brothers 25 and 36-year-old	1. 100% 奇形精子うち71% 尾部欠損 2. 98-100% 奇形精子 45-83% 尾部欠損 6-29% 尾部付着異常	Hum Reprod 2003; 18: 562-567.
Emery et al.	1 man 50-year-old	頭部と尾部の分裂 23% 正常頭部 2% 正常尾部	Fertil Steril 2004; 81: 686-688.
Sha et al.	1 man 30-year-old	奇形精子症 MMAF	Gene 2017; 633: 48-53.
Fonttis et al.	1 man 39-year-old	90% ミトコンドリア鞘異常	Reprod Biomed Online 2002; 5: 270-272.
Terada et al.	1 man 35-year-old	正常形態	Fertil Steril 2009; 91: 935 e11-935 e14.
Moretti et al.	1 man-year-old	円形頭部	Biol Reprod Med 2019.
Garanina et al.	2 men 41-year-old 34-year-old	正常形態	Cells 2019; 8: 180.
Moretti et al.	1 man 37-year-old	55% 頭部と尾部分離	Andrologia 2017; 49: e12701.

2. 受精における精子中心体の機能発現とその異常

卵子細胞質内に精子が侵入すると頸部に存在する中心体より微小管が放射状に形成される。この構造物は精子星状体と呼ばれ、げっ歯目以外の無脊椎動物も含めた生物の受精に広く観察される。前核の表面には dynein などの微小管モータータンパク質が存在しており、微小管上の輸送機能により雌性前核の雄性側への移動が起こると考えられている (図6)⁶⁾。ヒト受精時のタイムラプス映像を凝視すると、雌性前核は雄性前核側に引き寄せられるように移動しているように見える。しかし、最近になりウニの受精での前核移動では細胞膜側に進展する微小管による「押す力」が前核同士の「引き合う力」より重要であることが報告されている⁷⁾。前述したように、ICSI 後の受精停止の主因は卵子活性化障害であり、明らかな精子中心体の機能不全による受精の停止例は少ないと考えられる。2019年の Avidor-Reiss らの総説では筆者の報告も含めた中心体機能不全を疑わせる症例が提示されている (表1)⁸⁾。

3. PGT-A の細胞生物学的な解析

着床前胚細胞異数性検査 (preimplantation genetical test for aneuploidy; PGT-A) はヒト良好胚の選別にその有用性が期待され、本邦でも日本産科婦人科学会による臨床試験が進行している。しかし、300余個⁹⁾あるヒト胚盤胞構成細胞の将来胎盤に分化する栄養外胚葉 (trophoectoderm; TE) を数個採取した結果が、最終的な児の染色体構成をどの程度反映しているかは明らかではな

い。われわれは、当院および日本産科婦人科学会の倫理委員会の承認のもと、患者との個別同意を得たうえで、当院で蓄積されている29個のヒト凍結胚盤胞を融解し、生検 TE および残りのヒト胚盤胞全細胞の核型を NGS による PGT-A で解析し、それぞれの結果を比較検討した。結果として TE の結果がモザイクでない場合はその診断結果と残りの胚構成全細胞の染色体異数性検査の結果がほぼ一致した。しかし、モザイクの場合は約半数に双方の結果に不一致がみられた¹⁰⁾。さらに、胚盤胞期での TE 細胞とその培養液中の浮遊 DNA の解析による胚細胞染色体異数性検査 (niPGT-A) の結果と、それらの胚をさらに受精後 8-10日目まで長期培養した全胚細胞の結果を比較した。結果として長期培養後の全胚細胞の結果は生検 TE 細胞の結果より培養液中の DNA 断片の解析の結果のほうが一致する傾向があることが明らかになった¹¹⁾。PGT-A の結果をどのようにとらえるかについては、臨床的なデータも重要であるが本稿で紹介したようなヒト胚の細胞生物学的な解析も重要であると考えている。

引用文献

1. 寺田幸弘, 木村直子, 高橋俊文, 柴原浩章, 斎藤英和, 新村末男, 柳田 薫 (2016) 我が国における生殖補助医療胚培養士の現状2015—生殖補助医療胚培養士および管理胚培養士の資格審査結果の解析—. 日本卵子学会誌, 1: 11-14.
2. 岩瀬 明 (2019) 抗ミュラー管ホルモン. 卵胞発育および卵巣予備能評価における意義. 群馬産科会誌, 26: 1-16.

3. Terada Y, Hasegawa H, Takahashi A. (2009) Successful pregnancy after oocyte activation by a calcium ionophore for a patient with recurrent intracytoplasmic sperm injection failure, with an assessment of oocyte activation and sperm centrosomal function using bovine eggs. *Fertil Steril*, 91 : 935. e11-4.
4. Mio Y, and Maeda K (2008) Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol*, 199 : 660. e1-5.
5. Terada Y, Schatten G, Hasegawa H, Yaegashi N (2010) Essential roles of the sperm centrosome in human fertilization: developing the therapy for fertilization failure due to sperm centrosomal dysfunction. *Tohoku J Exp Med*, 220 : 247-258.
6. Avidor-Reiss T and Fishman EL (2019) It takes two (centrioles) to tango. *Reproduction*, 157 : R33-R51.
7. Meaders JL, de Matos SN, Burgess DR (2020) A Pushing Mechanism for Microtubule Aster Positioning in a Large Cell Type. *Cell Rep*, 6 : 33
8. Avidor-Reiss T, Mazur M, Fishman EL (2019) The Role of Sperm Centrioles in Human Reproduction-The Known and the Unknown. *Front Cell Dev Biol*, 7 : 188.
9. Iwasawa T, Takahashi K, Goto M, Anzai M, Shirasawa H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y (2019) Human frozen-thawed blastocyst morphokinetics observed using time-lapse cinematography reflects the number of trophoblast cells. *PLoS ONE*, 14 (1) : e0210992.
10. Takahashi H, Takahashi K, Goto M, Hirakawa T, Hasegawa H, Shitara A, Iwasawa T, Togashi K, Makino K, Shirasawa H, Miura H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y (2021) Consistency between chromosomal status analysis of biopsied human blastocyst trophoblast cells and whole blastocyst cells *Repro Med Biol*. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12400>
11. Shitara A, Takahashi K, Goto M, Takahashi H, Iwasawa T, Onodera Y, Makino K, Miura H, Shirasawa H, Sato W, Kumazawa Y, Terada Y (2021) Cell-free DNA in spent culture medium effectively reflects the chromosomal status of embryos following culturing beyond implantation compared to trophoblast biopsy. *PLoS ONE*, 16 : e0246438.