

学 位 論 文 の 要 旨

三 重 大 学

所 属	三重大学大学院医学系研究科 甲 生命医科学専攻 病態修復医学講座 女性骨盤外科学分野	氏 名	前沢 忠志
-----	--	-----	-------

主論文の題名

Possible selection of viable human blastocysts after vitrification by monitoring morphological changes

主論文の要旨

着床能力の高い胚盤胞を選別するのに形態学的評価は有効である。しかし、胚盤胞は孵化までに収縮と拡張を繰り返すことがわかっており、時に移植胚の選別に苦慮する。我々は、凍結融解胚盤胞の経時的变化を観察することにより、収縮胚の中からより良い胚を選別できるかを検討した。

移植時の収縮胚盤胞の着床率について検討するため、2006 年 1 月から 2012 年 12 月までに IVF なんばクリニックにてホルモン補充周期下での凍結融解単一胚盤胞移植を行った 2729 周期について、その着床率を調べた。研究には、凍結胚 107 個、新鮮胚 17 個を使用した。胚の形態（収縮と拡張）の違いと酸素消費量の関係を調べるため、55 個（凍結胚 38 個、新鮮胚 17 個）の胚盤胞について酸素消費量を測定した。HTF メディウム中での測定後、FCCP（脱共役剤）を添加し 10 分毎に 40 分まで測定し、その後シアンを添加し 10 分毎に 30 分まで測定した。結果は酸素消費量の実測値及び HTF メディウム中での酸素消費量を 100%とした相対値で示した。また、Time-Lapse image を使用し、69 個の凍結胚盤胞を融解後 15 分毎に 48 時間まで形態学的変化を記録した。

6.7%の凍結融解胚は収縮状態で移植され、収縮胚の着床率は 40%であった。拡張胚（51%）よりは有意に低かったが、40%とかなり高く、収縮胚の中には臨床的に能力が高く利用できる胚が多く含まれていることを示している。患者背景（年齢・内膜厚、凍結前の胚のグレード）には差は認めなかった。

収縮胚の酸素消費量（ 4.61 ± 0.48 fmol/s）は拡張胚（ 6.30 ± 0.38 fmol/s）に比べ有意に低かった。FCCP の添加後は、収縮胚の中には 187 ± 21 %まで上昇し、拡張胚（ 149 ± 5 %）や新鮮胚（ 144 ± 4 %）と同じレベルの酸素消費量を示すものがみられた。一方で、収縮胚の中には FCCP 添加後もほとんど変化なく（ 97 ± 13 %）、拡張胚や脱共役剤反応性（以下：反応性と略）の収縮胚よりも有意に酸素消費量は低値であった。シアン添加後は、反応性の収縮胚は、 20 ± 2 %まで低下し、拡張胚の 23 ± 1 %と違いはなかった。反応性の収縮胚の酸素消費量は 4.85 ± 0.63 fmol/s であ

り、非反応性の収縮胚 ($4.36 \pm 0.78 \text{ fmol/s}$) と違いはなかった。

収縮胚の酸素消費量は低いが、FCCP を添加することにより酸素消費量の増加する胚がみられた。しかし、FCCP 反応性の胚とそうでない胚は、HTF メディウム中での酸素消費量に差はないため、低侵襲な方法での判別は困難である。酸素消費量測定に用いた FCCP やシアンに暴露された胚は臨床では使用することができないため、移植時の収縮胚の形態学的変化を観察した。

Time-Lapse image では、融解 5 時間の時点で収縮している胚盤胞が 17 個 (25%) みられた。収縮胚盤胞のうち 12 個 (71%) は融解後 5 時間までに胞胚腔の形成がみられ、そのうち 4 個 (33%) は 24 時間までに孵化の段階まで至った。この値は、融解 5 時間で拡張している胚 (27%) と違いがなかった。

Time-Lapse image での分析により、融解後 5-6 時間で収縮している胚の中で、5 時間までに 1 回以上形態学的に拡張した胚には孵化の段階まで至った胚がみられ、その割合は拡張胚とほぼ同じであった。一方で、5 時間までに拡張しなかった胚は、孵化には至らなかった。この結果は、凍結融解胚盤胞の形態的変化の観察が以後の成長の潜在的な指針になることを示唆している。しかし、生体内では拡張や孵化の間に胚の収縮はほとんどみられず、胚が収縮を繰り返すことは準最適な培養環境により引き起こされたものである可能性がある。そのような収縮は、体外での培養・凍結過程を再検討することで減らせる可能性がある。

今回の検討では、融解後の凍結胚盤胞の形態学的変化を監視することで、臨床的に収縮胚から生存可能な胚を区別する有益な方法であることを示している。Time-Lapse での 5 時間の観察で胞胚腔の形成がみられなければ、追加融解や移植中止が必要となる。追加融解が行われれば、形態学的観察をする時間はない。このように、融解後の胚の生存能力を素早く評価する別の基準が必要である。さらなる研究で収縮胚の結末や胚盤胞のその後の成長を正しく評価できることが重要になる。Time-Lapse による短期間の観察は、収縮胚盤胞のよりよい選択を導ける可能性がある。