

## 博士論文要旨

所 属 臨床検査学専攻博士後期課程

学籍番号	218DS01	氏名	中澤 留美
(博士論文題目) Noninvasive embryo evaluation method combining time-lapse images with biomarkers in follicular fluid and serum			
キーワード: Biomarker、Embryo evaluation、Noninvasive、Time-lapse imaging、Embryo-synchronous development time			
(目的) 体外受精・胚移植の技術は不妊症の治療法として導入され全世界に普及したが胚移植後の妊娠率は、いまだに低い。高度生殖補助医療の成功率を上げるためには、胚移植前に採卵で得られた卵や胚の中から最も発生能力、着床能力の高い胚を選択することは重要である。現在多くの施設では移植胚の選別に、形態学的評価を用いている。近年、Time-Lapse Imaging-incubator systemにより、受精卵、胚を連続的に観察できるようになり、動的パラメーターの有用性について評価されている。しかし、形態学的特徴は客観性、定量性に欠けることから、安定的で厳密な胚の質的評価が困難であることが、いまだ妊娠率が低い原因であると考えた。そこで、より精度の高い胚評価法を確立するために、動的パラメーターのみでは胚評価には限界があると考え、客観的に定量評価ができるバイオマーカーを新たなパラメーターとして追加し、非侵襲的で複合的な胚評価法を確立する事を目的とした。			
(方法) 2018年10月から2019年4月までに厚仁病院にて採卵を施行し、卵胞液が採取でき、Conventional-IVFにて媒精し、受精が確認された58周期70個の卵子と卵胞液、そして血清を対象とした後方視的コホート研究を行った。 採卵後、卵子に精子を媒精し4～5時間後に第2極体が確認できた卵子を、Time-Lapse Imaging-incubator system Embryo Scope+™(ES+)にて胚盤胞まで培養した。2前核は正常な受精と判断し、他の核は異常な受精と判断した。タイムラプスマニタリングを用いた動的パラメーターは、S2(3細胞から4細胞までの分割時間)およびS3(5細胞から8細胞までの分割時間)を測定した。培養した胚は胚盤胞に到達した時点で、胚を凍結し液体窒素中に保存した。次周期以降に、胚を融解し移植まで3～5時間の回復培養を行い、単一融解胚盤胞移植を施行した。妊娠判定には、血中HCG値と経膈超音波を用い胎嚢確認した周期を妊娠成立とした。 卵胞液と血清中のバイオマーカー測定は、酸化ストレス値(d-ROMs)および抗酸化			

力値 (BAP) は、FREE Carrio Duo® (wismerll) を使用し測定した。酸化ストレス度 (Oxidation Stress Index : OSI) は、d-ROMs / BAP x 100 の値とした。

dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) の測定は、全自動エンザイムイムノアッセイ装置 AIA®-2000 (TOSOH BIOSCIENCE) を用い、試薬は専用試薬である E テスト「TOSOH」®II (DHEA-S) を使用した。Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) 測定は、電気化学発光免疫測定法(ECLIA 法) cobas®e 411 plus を用い、試薬は専用試薬であるエクルーシス試薬 IGF-1(Roche Diagnostics)を使用した。

検討 1 : 各バイオマーカー値の、血清中と卵胞液中の相関を調べた。また、各バイオマーカー値と採卵時の妻年齢の相関を調べた。

検討 2 : 正常受精群と異常受精群間、胚盤胞到達群と非到達群間、そして妊娠群と非妊娠群間において、血清と卵胞液の各バイオマーカー (DHEA-S、IGF-1、d-ROMs、BAP、OSI) と動的パラメーター (S2、S3) そして臨床パラメーター (Age、BMI) について差の検定を行った。正常受精の有無、胚盤胞形成の有無、妊娠の有無に影響を与える因子、その影響 (オッズ比) を調べるため、正常受精の有無、胚盤胞形成の有無、妊娠の有無を従属変数とし、卵胞液中バイオマーカー、血清バイオマーカー、S2、S3、BMI、Age を共変量としロジスティック回帰分析 (forward Stepwise) を行い、影響する因子として基準を満たす変数を選択した。

#### (結果)

58 サイクルの患者から 70 個の血清、卵胞液および卵子を採取した。採卵できた 70 個の卵子のうち 56 個が正常受精し、そのうち 40 個が胚盤胞を形成した。28 周期に単一融解胚移植を施行し、10 周期で妊娠した。そのうち 7 症例が出産し 3 症例は流産した。現在、12 個の胚盤胞は凍結保存している。

採卵時妻年齢は 26 歳から 46 歳(平均 39.2±5.0 歳)であった。すべてのバイオマーカー値(mean±SD)は、血清中と比較して卵胞液中で低かった。

#### 検討 1.

卵胞液中と血清中の相関は、DHEA-S :  $r=0.88$  ( $p<0.01$ )、IGF-1 :  $r=0.83$  ( $p<0.01$ )、d-ROMs :  $r=0.55$  ( $p<0.01$ )、OSI :  $r=0.45$  ( $p<0.01$ ) で、強い相関があった。BAP の卵胞液中と血清中に相関はなかった  $r=0.22$  ( $p=0.66$ )。BAP は、血清中の濃度よりも卵胞液中の濃度が高い症例が 45.7% (32/70) に見られた。採卵時の妻年齢とバイオマーカー値の相関は、FF-DHEA-S :  $r=-0.25$  ( $p<0.05$ ) で、弱い負の相関があったが、Serum-DHEA-S :  $r=-0.19$  ( $p=0.10$ ) で相関はなかった。FF-IGF-1 :  $r=-0.43$  ( $p<0.01$ )、Serum-IGF-1 :  $r=-0.41$  ( $p<0.01$ ) で、負の相関が認められた。d-ROMs、BAP、OSI においては、卵胞液中と血清中ともに年齢と相関はなかった。

#### 検討 2

##### <正常受精群と異常受精群の比較>

正常受精率は、80.0% (56/70) であった。すべてのバイオマーカーおよび動的パラメーターにおいて 2 群間に有意差は認められなかった。しかし、FF-DHEA-S ( $\mu\text{g/dl}$ ) (正常受精 :  $204.7\pm109.9$  vs 異常受精 :  $179.9\pm63.8$ )、Serum-DHEA-S ( $\mu\text{g/dl}$ ) (正

常受精：229.5±113.7 vs 異常受精：211.6±69.1)、FF-IGF-1 (ng/ml) (正常受精：99.5±26.1 vs 異常受精：88.7±31.9)、Serum-IGF-1 (ng/ml) (正常受精：133.5±33.3 vs 異常受精：116.5±27.8) で、正常受精群で高い傾向にあった。そして、d-ROMs、OSI は、正常受精群で低い傾向にあった。ロジスティック回帰分析の結果、正常受精の有無において最終的に採用された因子はなかった。

#### <胚盤胞形成群と非形成群の比較>

胚盤胞形成率は、71.4% (40/56) であった。すべてのバイオマーカーにおいて2群間に有意差は認められなかった。しかし、FF-DHEA-S (µg/dl) (形成：217.0±115.2 vs 非形成：174.1±91.6)、Serum-DHEA-S (µg/dl) (形成：242.1±118.2 vs 非形成：198.1±98.0)、FF-IGF-1 (ng/ml) (形成：100.5±26.3 vs 非形成：97.0±26.2) で、胚盤胞形成群で高い傾向にあった。年齢(年)は、形成：38.5±4.6 vs 非形成：41.0±4.0 で、胚盤胞形成群で若年齢だった。S2 (h)、S3 (h) は、有意差はないものの胚盤胞形成群にくらべ非形成群で遅延した。ロジスティック回帰分析の結果、最終モデルでオッズ比(95%信頼区間)が統計的に有意であったのは、年齢：0.72 (0.54-0.95)、動的パラメーターS3：0.89 (0.81-0.98) の2因子であった。

#### <妊娠群と非妊娠群の比較>

妊娠率は、35.7% (10/28) であった。バイオマーカーと動的パラメーターにおいて、2群間に有意な差は認められなかった。年齢(年)は、妊娠：34.6±3.9 vs 非妊娠 40.1±3.8 で、妊娠群で有意に若年齢であった (P<0.05)。ロジスティック回帰分析の結果、最終モデルで統計的に有意であったのは、年齢：0.67 (0.49-0.92) であった。

#### (考察)

移植胚の選択は非侵襲的で再現性が高く、かつ短時間で行わなければならない。本研究では、タイムラプスモニタリングパラメーターを用いた動的パラメーターとして、観察者によってばらつきが少なく安定して判定し易い S2、S3 を測定した。S2 は、正常受精、胚盤胞形成、妊娠群に有意な差は認められなかったが、短縮された。S3 は、胚盤胞到達群で、非到達群と比較して有意に短縮された。このことより、動的パラメーターとして S2、S3 の分割時間が早い胚は、発生能の高い胚の選択マーカーになると考えられた。

新たなパラメーターとして5種類のバイオマーカーを、血清と卵胞液で測定し比較した結果、DHEA-S、IGF-1、d-ROMs、OSI は、血清中濃度と卵胞液中濃度の間に強い相関があり、採取が容易な血清中濃度を測定することで卵胞液濃度を推測できることが示された。

すべてのバイオマーカーの平均値は、血清中濃度に比べ卵胞液中濃度で低いことが分かった。しかし、BAP は血清中と卵胞液で相関がなく、卵胞液中の BAP が血清中より高値を示す症例が多いことが明らかとなった。これは、卵胞内には抗酸化物質が多く存在することを示している。抗酸化物質は scavenger として働き、DNA や細胞成分を保護していると報告があり (Jozwik M et al., 1999)、これらの結果は、卵胞液中において抗酸化作用で卵子を保護している可能性を示唆する重要な点である。DHEA-S や IGF-1 は年齢とともに減少することが証明されたが、受精や胚盤胞形成、妊娠の有意な指標にはならなかった。しかし、正常受精群、胚盤胞形成群において有意差はないものの正常

受精群、胚盤胞形成群で高い傾向であった。d-ROMs、OSI は、有意差はないものの正常受精群で低い傾向がみられた。DHEA-S や IGF-1 は、卵母細胞と胚の質に影響する (Hattori K et al., 2018) という報告や、卵胞液中の d-ROMs、BAP、OSI は、受精や細胞分裂に関与する (Terao Hiromi et al., 2019) との報告もあり、酸化ストレスの上昇は、脂質、タンパク質、酵素、DNA を酸化変性させ細胞や組織を障害することにより、卵や胚の質の低下に影響していることが明らかにされつつある。一般的に、酸化ストレスを評価する上では、複数の酸化ストレス指標を測定することが望ましいと考えられているが、卵胞液は採取が難しく採取量の少ないことより、微量の検体量で測定ができる d-ROMs、BAP を用いた。これらは、生体内の酸化ストレスを総合的に評価する指標であり、利点として微量の検体から短時間 (5 分程度) で簡便に測定ができるため、臨床への応用性が高いと考えられる。今後、DNA 損傷の標識になる 8-OHdG などサロゲートマーカーとなる新たな酸化ストレスバイオマーカーの測定も検討し、卵胞液中に存在する抗酸化物質を特定することで、卵母細胞における抗酸化防御システムが卵子や胚に与える影響を解明できれば、高度生殖補助医療成功率の向上に寄与できると考える。

年齢は、胚盤胞形成と妊娠に関係していた。ROC 曲線分析から得られた妊娠、非妊娠における母体年齢の最適カットオフ値は、36.1 歳 (感度 : 0.889、特異度 : 0.300) であった。AUC は、0.858 (95%CI:0.718-0.998) であった。本対象の採卵時妻平均年齢は 39.2±5.0 歳であったことから、不妊治療を受ける女性年齢の高齢化の背景が明らかとなった。加齢が妊娠率低下の要因の一つである可能性が考えられる。

#### (結論)

本研究では、タイムラプスモニタリングパラメーターにバイオマーカーを組み合わせることで、非侵襲的でより精度の高い胚選択法を提案することを目指したが、残念ながら明確にすることはできなかった。しかし、動的パラメーター (S2、S3) が短い方が胚発生能が高いことから、S2、S3 の早い胚を選択することが、移植胚の胚選択法として有用な方法と期待された。タイムラプスから得られる情報には他に多くのパラメーターがあるため、さらなる態様において胚選択の指標となる項目を探していく必要がある。

バイオマーカーパラメーターでは、卵胞液中の BAP が血清中 BAP に比べ高値の症例が多いことが明らかとなった。本研究で用いた測定項目は微量の検体量かつ短時間で測定ができることをメリットとしており、臨床での汎用性を考えた場合、十分価値のある基礎データと成り得る。卵胞液中に存在する抗酸化物質の卵母細胞における抗酸化防御システムが解明できれば、高度生殖補助医療成功率の向上に寄与できると考える。

年齢は受精には影響しないが、その後の胚盤胞形成や妊娠に影響があった。社会的な背景から今後も高齢女性不妊患者は益々増加し、体外受精・胚移植のニーズは高まるものと思われる。妊娠には母体年齢の因子は大きく関係しており、治療のステップアップには年齢因子も考慮する必要がある。

今後、胚発生動態と生体バイオマーカーを測定することにより移植胚を選択する評価法が提案できれば、非侵襲的に胚盤胞形成や妊娠成功の予測のための有望なツールになり、生殖補助医療成功率の上昇に寄与すると期待できる。