

博 士 論 文

卵胞液中の酸化ストレスが受精卵に及ぼす影響の検討

寺 尾 宏 美

# 卵胞液中の酸化ストレスが受精卵に及ぼす影響の検討

生殖・発達・加齢医学専攻

指導教員 大須賀 穰 教授

松浦 宏美

## 目次

要旨 .....	4
1) 序文 .....	5
2) 方法 .....	10
1. 卵胞液の採取.....	10
2. 受精卵の培養.....	10
3. ホルモン値、子宮内膜の測定.....	11
4. 酸化ストレスと抗酸化能の測定.....	12
5. 8-OHdG の測定 .....	13
6. 受精状態と胚の分割状態の評価.....	14
7. 統計学的解析.....	14
8. 倫理委員会の承認とインフォームドコンセントについて .....	15
3) 結果 .....	16
1. 患者の背景.....	16
2. 採卵数と評価対象卵胞数.....	16
3. 受精率と妊娠数.....	16
4. d-ROM、BAP の測定値 .....	17
5. 受精状態と d-ROM、BAP の関係 .....	17
6. 初期胚の状態と d-ROM、BAP の関係 .....	18
7. 胚盤胞の状態と d-ROM、BAP の関係 .....	18
8. OSI と受精状態、胚の分割の関係 .....	18
9. 妊娠の有無による比較 .....	19
10. カットオフ値.....	19
11. パラメーターごとの相関.....	20

12. 合併症と d-ROM、BAP の関係 .....	20
13. 子宮内膜症性嚢胞の有無と酸化ストレス .....	21
4) 考察 .....	22
5) 結論 .....	31
謝辞 .....	32
略語 .....	33
文献 .....	35
図 .....	41

## 要旨

近年、日本では晩婚化が進み、不妊治療を受けるカップルの不妊原因として、加齢による妊孕性低下、特に加齢による卵子数の減少、卵巣機能低下は深刻な問題である。また、加齢による体外授精・胚移植プログラムにおける胚の質低下は顕著であり、卵子の質の低下も難治性の不妊症の原因である。加齢による卵子の質低下は酸化ストレスが原因の一端であるとの仮説のもと、酸化ストレスが卵胞および卵子の質に及ぼす影響について卵胞液中の酸化ストレスと抗酸化能を測定し、その卵胞由来の受精卵の受精、分割状況と対応させて検討した。酸化ストレスはd-ROMテストで測定し、受精において正常受精群が異常受精群より低く有意差を認めた。抗酸化能はBAPテストで測定し、胚盤胞では良好胚盤胞群で不良胚盤胞群より高く、有意差を認めた。酸化ストレスと抗酸化能のバランスを見るために算出したOSIにおいては、受精、初期胚、胚盤胞のすべての段階で良好な結果を得られた群で低値を示し、有意差を認めた。以上より、酸化ストレスは卵子の受精能を低下させ、抗酸化力は胚の正常な分割に寄与し、OSIは受精から分割のすべての段階で影響を及ぼしていることが示唆された。

## 序文

近年の日本において少子化は深刻な問題である。2018（平成 30）年の出生数は、86 万 4,000 人となり 90 万人を割り込んだ。合計特殊出生率も近年、減少傾向が続いているが、2018 年は、1.42 と前年より 0.01 ポイント下回った（図 1）。近年の晩婚化が少子化の一因とされているが、厚生労働省の人口動態統計調査によると平均初婚年齢は夫、妻ともに上昇を続け、2017（平成 29）年で、夫が 31.1 歳、妻が 29.4 歳となった。1985（昭和 60）年と比較すると、夫は 2.9 歳、妻は 3.9 歳上昇しており、晩婚化の進行が示されている（図 2）。また、母の年齢階級別出生率の年次推移をみると、昭和 50 年代以降は 20 歳代の出生率が大きく低下し、近年は 30～40 歳代の出生率が上昇傾向となっている（図 3）。出生時の母親の平均年齢を出生順位別にみると、2017 年においては、第 1 子が 30.7 歳、第 2 子が 32.6 歳、第 3 子が 33.7 歳と 上昇傾向が続いており、1985 年と比較すると第 1 子では 4.0 歳、第 2 子では 3.5 歳、第 3 子では 2.3 歳それぞれ上昇している（図 4）。さらに、夫婦が結婚生活に入ってから第 1 子出生までの平均同居期間をみると、平成 28 年では 2.42 年となっており、昭和 55 年に比べ 0.81 年延びた。期間別の内訳を年次推移でみると、2 年未満の割合が大きく減少し、3 年以上の割合が大きく増加している（図 5）。この状況より、今後もさらに晩婚化、出生時年齢の上昇は進行すると考えられ、それに伴い不妊に悩むカッ

プルは増加していると考えられる。

「不妊」とは、妊娠を望む健康な男女が避妊をしないで性交をしているにもかかわらず、一定期間妊娠しないものと定義され、日本産科婦人科学会では、この「一定期間」について「1年というのが一般的である」としており、2015年にその期間が従来の2年から、1年に短縮された。その理由として「女性の晩婚化やキャリア形成指向等の理由により女性の妊娠する年齢が上昇する中、不妊（症）の定義の変更により女性がより早期に適切な不妊治療を受けることにつながると期待される」としている[1]。挙児を希望するカップルの10～15%が不妊であり、健康な夫婦の1割以上が不妊に悩んでいると考えられている。また、女性の加齢と不妊は密接に関係し、不妊の割合は20歳代前半までは5%以下であるが、20歳代後半より9%前後の不妊率になり、30歳代前半で15%、30歳代後半で30%、40歳以降では約64%が自然妊娠の望みがなくなると推定されている（図6）。国立社会保障・人口問題研究所の第15回（2015年）出生動向基本調査によると、不妊を心配したことがある（または現在心配している）夫婦の割合は、35.0%と前回（第14回2010年）（31.1%）よりも増加しており、子どものいない夫婦ではこの割合は55.2%（前回（第14回2010年）52.2%）にのぼる。実際に不妊の検査や治療を受けたことがある（または現在受けている）夫婦は全体で18.2%（同16.4%）、子どものいない夫婦では28.2%（同28.6%）であった

ことから深刻な状況であることがわかる[2] (図 7)。

不妊治療を希望し医療機関を受診すると、治療は不妊検査を経て一般不妊治療と呼ばれるタイミング法から始まり、人工授精でも妊娠が難しい場合、高度生殖医療（生殖補助医療 = ART : Assisted Reproductive Technology）と呼ばれる体外受精・胚移植へとステップアップしていくのが一般的である(図 8、9)。

ステップアップ治療は、ある治療に対し結果が出るかどうかで判断する。どのくらいで次に進むかは原因や年齢によるが、一般的に 5~6 周期でステップアップし、2 年以内に結果を出すことが望ましいとされている。このようにステップアップに伴い、時間と費用が増大していく(図 10)。日本産科婦人科学会によると、

2017 年の体外受精の出生児は 5 万 6617 人であった。2016 年に比べて 2507 人増え、過去最多を更新した。厚生労働省の統計では 2017 年の総出生数は 94 万 6065 人で、16.7 人に 1 人が体外受精で生まれた計算になる。1983 年に東北大での国内初の体外受精による出生児からの累計は約 58 万人にのぼる(図 11)。しかし

体外受精の成功率は低く、生児を得た女性の割合は、30 歳で 21.5%、35 歳で 18.4%、40 歳で 9.1%、42 歳では 4.5%と年齢とともに顕著に低下し[3] (図

12)、卵巣の加齢による妊孕性の低下は高度生殖医療 (ART) でも難治性である。

また、不妊治療は肉体的、精神的、経済的に負担が大きく[4]、自治体により種々の不妊治療に対する補助は整備されつつあるが、不定期で頻回の通院が必要と



なる不妊治療（図 13）と仕事の両立は困難であり、女性は離職をせざるを得ない状況に追い込まれるなど[5, 6]、社会的にも大きな問題となっている。

不妊の原因は女性因子、男性因子、原因不明に大別される[7]（図 14）。女性は 35 歳を境に妊孕性が急激に低下することが知られているが[8-10]（図 15）、その大きな要因として酸化ストレス（Oxidative stress : OS）などの蓄積による卵巣の加齢が挙げられる[11-14]。

酸化ストレスは、分子の損傷につながる酸化状態と酸化防止機構の不均衡として定義される[15]（図 16）。活性酸素種（Reactive Oxygen Species : ROS）は、さまざまな加齢性疾患の加齢プロセスと病態生理および加齢に伴う生殖能力の低下に関与することが示されている[16-19]。精子の質と機能は酸化ストレスの蓄積によって悪影響を受けることが知られており[20-24]、ROS は卵母細胞を損傷する可能性がある（図 17）。晩婚化の傾向と、ROS が加齢で増加するという以前の報告[25, 26]を考慮すると、適切な ROS 管理は妊孕性保持には不可欠であると考えられる。

哺乳類の卵巣では、前胞状卵胞はゴナドトロピン制御下で、卵胞液で浸された成熟卵胞へと成熟する。卵胞液は、卵母細胞の発達をサポートする生物学的微小環境であり、さまざまな化学メディエーターが含まれている。卵胞液は卵母細胞の成熟と卵丘の拡大に有益な効果を持っており[27]、適切な卵胞液は卵母細胞

胞の成熟度と質にプラスの効果があると考えられている[28-30]。卵胞液は、主にホルモン、酵素、抗凝固剤、電解質、活性酸素種、抗酸化物質で構成され、卵胞を満たす液体であり、卵胞内の細胞間のコミュニケーションの重要なメディエーターとして機能している。したがって卵胞液は、配偶子間のコミュニケーションから胚の発達まで、受胎プロセスのあらゆる段階の重要な要素である。

今回、卵母細胞の周囲にある卵胞液中の酸化ストレスに注目し、酸化ストレスと卵子の質について検討した。

## 方法

### 1. 卵胞液の採取と受精卵の培養

東京大学医学部附属病院女性診療科で2016年6月から2018年12月までにARTによる治療を受けていた124人の採卵時に総数709個採卵し、そのうち211個の卵胞液を研究対象として回収した。患者は、以前に当研究室で報告したプロトコル下[31]で卵巣刺激（Controlled ovarian stimulation: COS）をうけ、採卵された。採卵は経膈超音波ガイド下に行われ、サンプル用の卵胞液は平均直径 > 18 mm の卵胞から個別に吸引した。今回の採卵周期で多数の卵胞発育があり、複数採卵ができた場合も、一人の患者あたり最大3個までの卵胞液を研究対象とした。卵胞液の混合を避けるため、各卵胞には穿刺針に別々の試験管を接続し、吸引した。2つ以上の卵胞を穿刺したものや、血液や卵巣嚢腫の内用液が混入した卵胞液は除外した。卵子を回収した後、卵胞液を直ちに氷上に置き、1500 rpm で10分間遠心分離し、上清を-80℃で保存した。

### 2. 受精卵の培養

卵胞液から卵子卵丘複合体を回収し、5-6時間の培養後にヒアルロニダーゼで卵丘細胞を除去し、裸化処理を行った。精液は培養液の中に液化した精液もしくは遠心して分離した精子を培養液に入れ、泳いで上がってきた精子を回収する

スィムアップ法で処理し、培精した精子の中で運動性の良い、顕微鏡下に形の良い精子を選び、尾部に傷をつけることで不動化処理をした後、細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic sperm injection : ICSI) で受精させ (図 18)、採取した卵胞液と対応した状態で個別に培養し、受精状態と分割状態を記録した。顕微鏡下での細胞質内精子注入 (ICSI) の 17~20 時間後に受精の状態を確認し、その後初期胚は 3 日目に、初期胚で凍結保存したものを除き、引き続き培養された胚は 5 日目に観察した。

### 3. ホルモン値、内膜の測定

血清抗ミュラー管ホルモン (Anti-Müllerian hormone : AMH) および卵胞刺激ホルモン (Follicular stimulating hormone : FSH) レベルは COS の開始前に、基礎 FSH レベルは、月経初期 (月経開始から 2~5 日目) に測定した。血清エストラジオール (Estradiol : E2) のピーク値、プロゲステロン (Progesterone : P4)、および黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone : LH)、子宮内膜厚は、卵母細胞を成熟させるためのヒト絨毛性ゴナドトロピン (Human chorionic gonadotropin : HCG) をトリガーとして投与した日に測定した。子宮内膜厚は、診察担当医が経膈超音波を用いて子宮の正中矢状断面で子宮内膜の最大距離を測定した。

#### 4. 酸化ストレスと抗酸化能の測定

フリーラジカル選択評価器 (FREE Carrio Duo; Diacron International srl、Grosseto, Italy) および Diacron-reactive oxygen metabolites : d-ROM / Biological antioxidant potential marker : BAP キット (FREE Carrio Duo; Diacron International srl, Grosseto, Italy) を使って測定した (図 19)。d-ROMs テストと BAP テストの詳細な説明は既報があり [31, 32]、両方のテストでの測定は、それに従って実行した。

これまで酸化ストレスの元となる活性酸素・フリーラジカルは、その高い活性と短い半減期により、直接測定することは難しかった。今回の d-ROM テストでは活性酸素・フリーラジカルを直接測定するのではなく、代謝産物の ROOH を捉えて酸化ストレス測定として定量化している。測定原理としては、d-ROMs テストでは活性酸素・フリーラジカルが、体を構成する脂質・タンパク質・アミノ酸・核酸などを酸化させた際に生じる代謝産物であるヒドロペルオキシド (ROOH) をはじめとしたトータルの過酸化物を捉える。4.8PH の酢酸緩衝液にサンプルを混合し、鉄イオンの存在下で過酸化物をラジカルに戻す。そのラジカルと反応する呈色液 (N,N-ジエチルパラフェニレンジアミン) を混合し、その濃度を測定する。測定単位は『CARR U』で表される (図 20)。基準値を表 1 に示す。

※1 CARR U = 0.08 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / dL

抗酸化力を評価する BAP テストは、鋭敏な反応を捉えやすい鉄への還元力を抗酸化力として数値化している。測定原理としては、三価鉄塩  $\text{FeCl}_3$  と無色のチオシアン酸塩を反応させ、三価鉄  $\text{Fe}^{3+}$  イオンとして赤く呈色をさせる。そこにサンプルを添加し、サンプル中の抗酸化物質の作用で二価鉄  $\text{Fe}^{2+}$  イオンに還元され赤色が脱色する。その色の変化を光度計で 505 nm で計測し、還元力を抗酸化力として評価する。アッセイ結果は  $\mu\text{mol/L}$  で表した。アルブミン、ビリルビン、還元グルタチオン、尿酸などの内因性抗酸化物、ビタミン C・E、ポリフェノールなどの外因性抗酸化物質等の還元力を測定する (図 21)。基準値を表 2 に示す。

酸化ストレスと抗酸化能のバランスについて評価するため、それらの比である酸化ストレス指数 (Oxidative stress index : OSI) を算出した。OSI は次のように計算した :  $d\text{-ROMs} / \text{BAP} \times 100$  [32]。

## 5. 8-OHdG の測定

酵素結合免疫吸着アッセイ (OxiSelect™ Oxidative DNA Damage ELISA Kit, Cell Biolabs, Inc. USA) を使用して、別の OS バイオマーカーとして 8-OHdG を測定した。すべての手順は、機器製造業者の指示に厳密に従った。光学密度値は、450 nm の波長で、マイクロプレートリーダーで測定した。アッセイ結果は

ng / mL で表した。

## 6. 受精状態と胚の分裂状態の評価

顕微鏡下での細胞質内精子注入 (ICSI) の 17~20 時間後に受精の状態を確認し、2つの前核 (Pronucleus : PN) の確認をもって正常な受精とした (図 22)。未受精卵、1つの前核、3つ以上の前核を異常受精として分類した。初期胚は3日目に評価し、グレード1~3 (Veeck 分類による) (図 23) は良好な胚、グレード4~5 は不良な胚と見なした。初期胚で凍結保存したものを除き、5日目まで培養された胚盤胞は、Gardner 分類 (図 24) に基づいて3 BB 以上で良好胚と評価し、それ以下は不良胚と見なした。

## 7. 統計学的解析

統計学的解析は JMP Pro 15 software (SAS Institute Inc.) を用いて行った。複数の値を比較するために、分散分析後に Steel-Dwass test にて解析を行い、多変量の相関は、Pearson's moment correlation を使用して計算した。統計量は「平均値 ± 標準偏差」で示し、P 値 < 0.05 を統計的に有意とみなした。ROC 曲線 (受信者動作特性曲線) における最適カットオフ値は、Youden Index に基づいて決定した。

## 8. 倫理委員会の承認とインフォームドコンセントについて

当研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認（3594－（2））を得て、ヘルシンキ宣言を遵守し行った。対象患者には、卵巣刺激開始時に担当医より同意書を用いて個別に説明の上、同意を得た。



## 結果

### 1. 患者の特徴

東京大学医学部附属病院にて高度生殖医療（ART）治療を受けていた患者で ICSI による治療を受けるもののうち 124 人を対象とした。その採卵時に総採卵数 709 個のうち、211 個の卵胞を対象とし、卵子を回収した後の卵胞液を採取して分析した。患者の特徴を表 1 に示した。採卵時の平均年齢は  $38.49 \pm 4.39$  歳、BMI は  $22.47 \pm 3.44$  であった。患者一人当たりの総採卵数は  $5.61 \pm 4.66$  個であった。

### 2. 採卵数と受精から分割の評価対象数

総採卵数は 907 個で、そのうち対象卵胞数は 211 であった。ICSI 後 17～20 時間後に受精の評価を行い、2 前核を確認できた正常受精卵は 158 個、異常受精卵は 53 個であった。3 日目評価時に 7 細胞以上、グレード 3 以上の良好初期胚は 119 個、不良初期胚は 68 個であった。初期胚で凍結したものを除き、5 日目評価時に 3BB 以上の良好胚盤胞は 10 個、不良胚盤胞は 65 個であった（図 25）。

### 3. 受精率と妊娠数

今回の研究期間において対象の卵子の受精率は 74.9% であった。未受精または異常受精 23.7%。卵子が未熟であるため受精できなかったのは 1.4% のみで

あった。これは、ICSI 受精率の一般的な平均をやや上回る結果であった[3]。卵胞液が採取された卵子のうち、40 個の初期胚と胚盤胞が移植され、そのうち 10 個で妊娠が確認された。対象以外の胚移植で妊娠した数は 20 個であった。

#### 4. d-ROM、BAP 測定値

全卵胞液の測定結果平均値は d-ROM で  $412.49 \pm 118.61$  U. CARR、BAP で  $2542.36 \pm 636.72 \mu\text{mol/L}$  であった (表 3)。全血清の評価の基準値と比較すると d-ROM は強度の酸化ストレス、抗酸化力は適値であった。1 人の患者から 2 つ以上の卵胞液が収集されたもので卵胞液間に違いがあるかどうかを検討し、同じ患者から収集された卵胞液でも d-ROM と BAP の違いが存在した。1 人当たりの卵胞液間の差の平均は d-ROM で  $90.35 \pm 90.71$  U. CARR、BAP で  $633.99 \pm 590.65 \mu\text{mol/L}$  であった (図 26)。

#### 5. 受精状態と d-ROM、BAP の関係

受精状態と d-ROM と BAP の関係を分析した。d-ROM の値は、正常な受精群で  $377.16 \pm 88.37$  U. CARR、異常な受精群で  $503.60 \pm 116.59$  U. CARR であった ( $P < 0.0001$ ) (図 27)。正常な受精群は  $2392.72 \pm 537.77 \mu\text{mol/L}$ 、異常な受精群は  $2394.92 \pm 654.03 \mu\text{mol/L}$  の BAP 値を示した。有意差は認めなかつ

た ( $P = 0.98$ ) (図 27)。

## 6. 初期胚の状態と d-ROM、BAP の関係

3 日目の初期胚の場合、d-ROM の値は、良好胚群の場合  $377.32 \pm 86.14$  U. CARR、不良胚群の場合  $427.88 \pm 116.75$  U. CARR であった ( $P = 0.0023$ ) (図 28)。3 日目の初期胚群の BAP 値は、良好胚群では  $2480.42 \pm 542.41 \mu\text{mol/L}$ 、不良胚では  $2176.13 \pm 509.23 \mu\text{mol/L}$  であった ( $P = 0.0002$ ) (図 28)。

## 7. 胚盤胞の状態と d-ROM、BAP の関係

5 日目の胚では、良好胚盤胞群で  $357.60 \pm 70.82$  U. CARR、不良胚盤胞群で  $415.54 \pm 114.96$  U. CARR であった ( $P = 0.0431$ ) (図 29)。5 日目の胚の BAP 値は、良好胚盤胞群は  $2789.00 \pm 505.45 \mu\text{mol/L}$  で、不良な胚盤胞群は  $2248.25 \pm 476.17 \mu\text{mol/L}$  であった ( $P = 0.0083$ ) (図 29)。

## 8. OSI と受精状態、胚の分割の関係

酸化ストレスと抗酸化能のバランスについて評価するため、d-ROM と BAP の比を百分率で表した酸化ストレス指数 (OSI) を各ステージで算出した。OSI は、正常な受精群で  $16.39 \pm 5.92$ 、異常な受精群で  $22.67 \pm 11.85$  であった ( $P$

<0.0001)。3日目の初期胚のOSIは、良好胚では15.73 ± 5.46、不良胚では20.09 ± 10.73であった (P <0.0001)。5日目の胚のOSIは、良好胚盤胞群は12.96 ± 2.24で、不良な胚盤胞群は17.92 ± 8.41であった(胚盤胞(P <0.0001) (図30)。

## 9. 妊娠の有無による比較

d-ROMは妊娠ありの群で342.80 ± 51.78 U.CARR、妊娠なしの群で409.93 ± 84.13 U.CARRであった (P =0.025)。BAP値は、妊娠なしの群は2637.33 ± 830.15 μmol/ L、妊娠ありの群は2355.40 ± 360.14 μmol/ Lであった。有意差は認めなかった (P = 0.41)。OSIは妊娠なしの群で17.23 ± 7.15、妊娠ありの群で14.84 ± 2.98であった。有意差は認めなかった (P = 0.25) (図31)。

## 10. カットオフ値

本試験における主要仮説検定は、正常受精、D3の良好初期胚、D5の良好胚盤胞についてROC曲線における曲線下面積(AUC)を算出し、Youden Indexに基づいてカットオフ値を算出した。d-ROMについては正常受精のカットオフ値は400 U.CARR、AUC 0.81、D3の良好初期胚のカットオフ値は464 U.CARR、AUC 0.64、D5の良好胚盤胞のカットオフ値は391 U.CARR、AUC 0.68であった (図32)。BAP

については正常受精のカットオフ値は 2483  $\mu\text{mol/L}$ 、AUC 0.53、D3 の良好初期胚のカットオフ値は 2591  $\mu\text{mol/L}$ 、AUC 0.65、D5 の良好胚盤胞のカットオフ値は 2463  $\mu\text{mol/L}$ 、AUC 0.80 であった (図 33)。OSI については正常受精のカットオフ値は 16.64、AUC 0.73、D3 の良好初期胚のカットオフ値は 18.32、AUC 0.71、D5 の良好胚盤胞のカットオフ値は 14.25、AUC 0.83 であった (図 34)。

## 11. パラメーターごとの相関

パラメーターごとに相関を検討したところ、既報と一致して、年齢、AMH、および収集された卵子の数に相関関係がみとめられた [33-36] (図 35)。AMH および総採卵数は、年齢の増加に伴い減少した ( $P < 0.001$ )。年齢は、酸化ストレスマーカーおよび抗酸化マーカーと有意な相関を示さなかった。OSI と d-ROM は相関係数 0.60 ( $P < 0.001$ ) で正の相関、OSI と BAP は -0.57 ( $P < 0.001$ ) で負の相関を認めた。(図 36)

## 12. 合併症と d-ROM、BAP の関係

対象患者の合併症は子宮内膜症 28 人(うち 8 人の子宮内膜症の既往を含む)、子宮因子については、子宮筋腫 27 人、子宮奇形や手術後の子宮頸部狭窄など 6 人と自己免疫疾患 10 人、卵管因子 9 人であった (一人の患者が重複して合併症

を有しているものも含む)。各合併症について d-ROM と BAP に有意差は認められなかった。

### 13. 子宮内膜症性嚢胞の有無と酸化ストレス

子宮内膜症は子宮外に子宮内膜線や間質を認める全身疾患であり、月経困難症や不妊の原因となる。卵巣子宮内膜症性嚢胞内では高度の酸化ストレスや細胞傷害、DNA 損傷が引き起こされているとの既報があり [37]、今回の研究対象として卵胞液採取した患者のうち、卵巣子宮内膜症性嚢胞の合併症のある患者 20 人の 30 個の卵胞液と、ない患者の卵胞液で測定した d-ROM、BAP と OSI を比較し、有意差は認められなかった (図 37)。

## 考察

ROS は卵巣で重要な生理学的役割を果たし、適度の ROS は成熟卵、胚形成に不可欠であると考えられている [38]。抗酸化物質は減数分裂の再開をブロックし、ROS の形成は、卵母細胞の成熟を誘導する [39]。しかし、卵母細胞での酸化ストレスの発生は、染色体分離のエラー、および細胞成分の損傷を引き起こし、卵の質が低下する可能性がある [25]。実際酸化ストレスによる DNA 損傷マーカーである 8-OHdG について卵丘細胞、顆粒膜細胞中の値と受精率、良好胚の発生率との間に負の相関関係を認めたとの報告がある [40]。今回、卵胞液中の酸化ストレスは全血清での基準値と比較して高い状態であったが、卵巣での ROS の発生源は、食細胞性マクロファージ、実質のステロイド産生細胞、および内皮細胞とされている [41]。また、卵胞の発達段階での ROS 産生は、ミトコンドリアで起こる酸化リン酸化に起因する可能性がある。卵胞では顆粒膜細胞が  $H_2O_2$  を生成するという報告があるが、その理由は完全には解明されていない [42]。さらに酸化ストレスの実臨床における評価方法は現在のところ定まったものはない。

今回酸化ストレスの評価では、高い再現性に基づいて測定できる OS の総量として d-ROM を測定した。これまで酸化ストレスの評価に関しては様々な物質で測定されており、抗酸化酵素、抗酸化物質、代謝産物に大別される。抗酸化酵素、抗酸化物質についてはその増減や代謝産物の検出で、代謝産物についてはその

存在と量で評価する。既報では脂質、タンパク質、および炭水化物の酸化生成物の濃度、ならびに抗酸化酵素、抗酸化剤の濃度を測定するアッセイ等が使用されている。例えば代謝産物については脂質過酸化物[11, 43]および過酸化脂質から最終産物として生成することを利用して、マロンジアルデヒド[44-46]が測定されている報告がある。マロンジアルデヒドはチオバルビツール酸(TBA)と反応させ反応生成物を吸光度から過酸化脂質量として推定する方法（チオバルビツール酸法, TBA 法）[44, 47]として利用されている。しかし、過酸化脂質の濃度は生体内では微量であり、pH、加熱時間などの条件でTBAによる呈色が影響を受ける可能性があり、実験者によって変動する可能性がある。さらに、プロスタグランジンが生成される過程でフリーラジカル反応が行われ、副産物としてマロンジアルデヒドが生成されることが明らかにされてきたため[48]、純粋な過酸化脂質を定量することは難しいと考えられる。現在のところ、生体試料中の過酸化脂質そのものを測定する方法はまだ確立されていない。また、8-OHdGはDNAを構成する塩基の一つ deoxyguanosine (dG)の8位がヒドロキシル化されたものであり、dGはDNAの4種類の塩基のうち最も活性酸素による酸化を受けやすいため、主要な酸化生成物である8-OHdGは活性酸素による生体への影響を鋭敏に反映するDNA酸化損傷マーカーである[40]。化学的に比較的安定な物質のため2次代謝などを受けにくいことから、生体内における酸化ストレスを定量的



に反映するとされているが、DNA の酸化損傷であり、トータルの過酸化物を捉えるものではない。このように酸化ストレスの測定にはこれまで一定した指標がない状態である。抗酸化力も同様に、抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ活性[49, 11]、熱化学発光アッセイ[50]、および、抗酸化酵素と抗酸化物質を合わせた総抗酸化能[43, 51]によって測定されている報告があるが、これらのさまざまな物質を測定した結果は一貫していない。

今回の研究で測定した d-ROM と BAP について産婦人科領域での過去の研究は少ないが、卵巣子宮内膜症性嚢胞を有のある群とない群で卵胞液中の d-ROM、BAP 値の比較を行ったが有意差を認めなかったとされるもの[52]、卵胞液と血清で酸化ストレスの分析を行い、全血清で子宮内膜症患者の BAP の低下を認め、d-ROM で妊娠転帰との間に正の相関を認めたとされる既報がある[53]。また、酸化ストレスの増加とともに抗酸化物質の生産が増加[54]するとの既報はあるが、それらのバランスについて検討されたものはない。今回の研究の重要な点は、生体内での偏在がある酸化ストレスと抗酸化能について卵胞液で測定したこと、卵胞内の個別の環境をトータルの過酸化物を捉える d-ROM、抗酸化酵素、内因性、外因性の抗酸化物質を総合して還元力として捉える BAP テストを指標として使用したことである。また、これまで個別の卵胞液と卵子の受精状態、胚分割を対応させて分析した報告はほとんど行われていないが、その値と卵胞液と卵子の

受精、胚分割が各卵胞について明確に対応して記録され、統計的有意性が得られたことである。今回の結果からは d-ROM は主に受精に関連し、値が低い方が正常受精となっている。BAP は主に胚の分割と関連しており、値の高い方が良好な初期胚、胚盤胞となっている。OSI については受精から胚の分割まで通して関連し、値の低い方が良好な結果が得られている。ROC 曲線により算出した AUC でも同様の傾向があり、治療上の指標とできる可能性があると考ええる。

胚盤胞では、BAP が胚の分割に関連していることを考慮すると、胚の抗酸化能力がその質に影響を与える可能性がある。以前の報告では、卵母細胞における酸化防御システムの存在が示唆されていた[55]。胚発生の初期段階では、トリカルボン酸サイクルは主にピルビン酸と乳酸を主要なエネルギー源として使用している。圧縮段階まで、エネルギー生産は解糖系を使用し、最終的に胚盤胞段階で優先的に消費される[56-60]。これは、ROS が胚の分裂時に生成され、培地に蓄積されることを示唆している。ここで抗酸化能と ROS のバランスが取れていないと、胚の質が低下することにつながると考えられる。

卵胞液は、血清を含むいくつかの要因で構成されている[61]。抗酸化物質は、体内で生合成されるか、食物摂取[62, 63] および経口摂取によって得られる(例、アスコルビン酸(ビタミンC)、カロテン、レチノール(ビタミンA)、 $\alpha$ -トコフェロール(ビタミンE) およびユビキノール(コエンザイムQ))。治療としては

卵胞液中の環境の改善として、血清中の抗酸化物質の濃度を高めるため、スカベンジャーとして、抗酸化力の高い食事の摂取や、サプリメントとして上記の抗酸化物質の経口投与や、強い抗酸化能を持つ物質として近年研究されているメラトニン[64, 65]、コエンザイム Q10 [66]の培養液への添加で胚質の改善を認めたとの報告もあり、L-カルニチン[67]、メラトニン[68, 69]に関しては経口投与の有効性が示唆されているが卵胞液中の抗酸化物質を選択的に上げる方法はまだ研究されていない。今後は末梢血でも今回の卵胞液での検討と同様な評価が理論上可能であるため、卵胞液と血清の相関を検討する必要があると考える。この際、卵胞液中で選択的に濃度上昇がある抗酸化物質と胚の質の相関を検討することや、上記のような抗酸化物質の経口投与等の酸化ストレスを軽減させる治療をおこなった後に、今回われわれが測定したマーカー群を測定し、治療効果の有無をみることも不妊治療患者の治療法の可能性を検討するための重要な課題である。

高度生殖医療（ART）の治療は、現在のところ年齢因子に対しての治療が確立されておらず、晩婚化が進む中、治療開始年齢は上がり、難治性の患者が残っていくため、妊娠率改善は時間との戦いとなっている。その中で重要となるのはより着床率、生産率の高い胚を得ること、またそれを的確に選択し移植していくことである。精子においては SCSA（精子クロマチン構造検査）などの DNA 損傷の

程度をもって質を評価する方法が臨床に適用されているが、卵子においては評価方法がない状況である。現在は受精後の移植胚の選択時に、初期胚においては分割された細胞それぞれ（割球）の大きさが均一か不均一なサイズかという分割のきれいさと、細胞の破片であるフラグメンテーションの量で振り分ける Veeck らの分類、胚盤胞においては成長速度と細胞数をもとにグレードを振り分ける Gardner 分類において良好胚に正常胚が多く、着床率がよいとされ選択されている。しかし胚盤胞の形態学的評価が良好なものほど染色体正常である確率が高いものの（最良 56.4%、良 39.1%、並 42.8%、不良 25.5%）、成長速度の違いによる染色体正常率は変わらず（5 日目 46.6%、6 日目 39.8%、7 日目 43.5%）、形態学的評価と着床能との関連は認めず、反対に染色体正常胚は形態学的分類、成長速度に相関せず等しい着床率を示したとの報告がある。近年は形態学的分類のみで移植胚を選択するだけでは不十分と考えられてきており、着床率に関しては様々な研究がなされている[70]。2010 年には、タイムラプス・イメージングによる連続観察により、適切な時期に分割する胚が着床率の高い胚であるとの報告が出され[71]、良好胚を選別する新たな方法として有用になることが期待されていた。しかし、初期胚の段階で着床率を判断するという意味では有用であるが、パラメーターのばらつきはあるものの、実際に妊娠率が最大の群でも 32%との報告があり[72, 73]、胚盤胞まで培養するのであればその評価の方法としては着

床前診断の方が勝っていると考えられる。ただ、現在欧米において広く行われている着床前診断の PGS (Preimplantation Genetic Screening) ((PGT-A) Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies) にも限界があり、4~5 個の TE (Trophectoderm: 栄養外胚葉) 細胞から正常胚を推測する検査のため、細胞を採取することによる胚へのダメージがあることと、検査が高額であること、胎児となる ICM (Inner Cell Mass: 内部細胞塊) 細胞を正確に反映しないことなどの問題点があげられている。ICSI で単一初期胚移植を実施した 232 個の胚のタイムラプスパラメータと生産の関係を後方視的に検討した既報において有意差が認められたのは、前核が並置した時に中央にあることで 2.20 倍に出産率が増加することと、2 細胞の時に多核があることで 0.51 倍低下したという報告があり [74]、胚の質はかなり初期に決定されることを示唆している。このことより、今回の結果で得られた、d-ROM と受精の関係は、胚の質を予測する有効な手段になりえるのではないかと考えられる。現在は一つの検査で着床率、生産率の高い胚を選択することは難しい状況である。d-ROM、BAP の測定は従来廃棄していた卵胞液を少量採取するのみで測定できるため胚への侵襲は無く、簡易に行うことができるため、他の検査と組み合わせて胚移植の際の移植胚選択の指標として使用できるマーカーとなり得るのではないかと期待される。また、今回は受精の状態や胚の分割状態を個別に記録する必要があったため、一般体外受

精（コンベンショナル）による共培養ではなく、個別培養の ICSI を対象としたが、これまでの報告では、共培養された胚は、より良い分割結果になることが知られている [75]。これは、共培養胚で交換された卵胞液内のアミノ酸などのメタボロームが原因ではないかと考えられている。このことから ROS でも同様の現象が推測でき、受精方法や培養方法の選択時に適した卵子を選択する必要性があると考えられる。臨床での利用方法は、複数採卵できた場合、今回の結果では d-ROM が低い方が正常受精する確率が高いので、授精方法の振り分け、一般体外受精（コンベンショナル）と ICSI に適した卵子を選択する指標とする他、OSI の値で胚盤胞到達率を予測し、初期胚で凍結するか、培養を継続するかの指標とできる可能性がある。また、培養液に抗酸化物質の添加を検討する基準と使用し、治療の成績向上を目指せる可能性がある。

この研究の限界は、被験者が少数であること、大学病院を受診している患者であること、そして ICSI を受けている患者に限定されていることでバイアスがかかっている可能性があることである。また、順次移植している段階のため妊娠転機と酸化ストレスの評価がまだ難しい状態である。したがって、継続して妊娠例の情報を蓄積して行き、より多くの被験者を含むさらなる研究が必要であると考える。そして今後マーカーとして利用するためには、閾値を決定することも必要である。また、検討をより容易なものにするのであれば、末梢血でも同様な評

価が理論上可能であるため、卵胞液との相関を検討する必要がある。酸化ストレスを軽減させる治療をおこなった後に今回われわれが測定したマーカー群を測定し、治療効果の有無をみることも重要な課題である。そのようにリアルタイムのモニタリングをすることで、最終的に不妊症患者の治療成績向上に結びつけたい。

## 結論

本研究の結果に基づいて、酸化ストレスは卵子の受精能を低下させ、抗酸化力は胚の正常な分割に寄与し、酸化ストレスと抗酸化能のバランスは受精から分割のすべての段階で重要であると示唆された。

今後もさらに晩婚化は進み、将来的に高度生殖医療（ART）を受けるカップルは増加すると考えられる。高齢カップルの治療では限られた時間で効率よく結果を出すことが求められているが、卵胞液の d-ROM と BAP のレベルは、体外受精の成功を予測できる潜在的なマーカーとして使用できると考えられる。



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、採卵時の検体の採取、回収にご協力いただきました先生方、培養士の皆さまに深謝いたします。また、終始適切な助言を頂きご指導いただきました、東京大学医学部産科婦人科学教室 平池修准教授、同 藤井知行教授、同 大須賀穰教授に心よりお礼を申し上げます。

## 略語

OS - Oxidative stress

FF - Follicular fluid

ART - Assisted reproductive technology

ROS - Reactive oxygen species

d-ROM - Diacron-reactive oxygen metabolites

BAP - Biological antioxidant potential marker

ICSI - Intracytoplasmic sperm injection

OSI - Oxidative stress index

COS - Controlled ovarian stimulation

AMH - Anti-Müllerian hormone

FSH - Follicular stimulating hormone

E2 - Estradiol

P4 - Progesterone

LH - Luteinizing hormone

8-OHdG - 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay

PN - Pronucleus

ROC - Receiver operating characteristic curve

AUC - Area under the curve

TBA - Thiobarbituric acid

SCSA - Sperm chromatin structure test

PGS - Preimplantation genetic screening

PGT-A - Preimplantation genetic testing for aneuploidies

TE - Trophectoderm

ICM - Inner cell mass

## 文献

- [1].日本産科婦人科学会 (2015). "不妊症の定義の変更について." Retrieved 30 May, 2018, from [http://www.jsog.or.jp/news/html/announce\\_20150902.html](http://www.jsog.or.jp/news/html/announce_20150902.html).
- [2].国立社会保障・人口問題研究所 (2015). "2015 年社会保障・人口問題基本調査 <結婚と出産に関する全国調査> 第 15 回出生動向基本調査結果の概要." 不妊の心配経験や治療経験は増加傾向. Retrieved June 11, 2018, from [http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12601000-Seisakutoukatsukan-Sanjikanshitsu\\_Shakaihoshoutantou/0000138824.pdf](http://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12601000-Seisakutoukatsukan-Sanjikanshitsu_Shakaihoshoutantou/0000138824.pdf).
- [3].日本産科婦人科学会 (2017). "平成 28 年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告 (2015 年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および 2017 年 7 月における登録施設名)." 2018, from <http://fa.kyorin.co.jp/jsog/readPDF.php?file=69/9/069091841.pdf>.
- [4].M. Brandes, J.O. van der Steen, S.B. Bokdam, C.J. Hamilton, J.P. de Bruin, W.L. Nelen and J.A. Kremer **When and why do subfertile couples discontinue their fertility care? A longitudinal cohort study in a secondary care subfertility population** Hum Reprod, 24 (2009), 3127-3135
- [5].NPO 法人 Fine (2017). "「仕事と不妊治療の両立に関するアンケート Part 2」." Retrieved 11 June, 2018, from [http://j-fine.jp/prs/prs/fineprs\\_ryoritsu2\\_1710.pdf](http://j-fine.jp/prs/prs/fineprs_ryoritsu2_1710.pdf).
- [6].厚生労働省 「女性の活躍推進企業データベース」 (2017). "不妊治療と仕事の両立に係る諸問題についての総合的調査研究事業調査結果報告書". Retrieved 30 May, 2018, from <http://www.mhlw.go.jp/bunya/koyoukintou/pamphlet/dl/30d.pdf>.
- [7].日本産婦人科医会 (2016, 2016). "2.不妊症の定義・分類・治療法." Retrieved 30 May, 2018 from <http://www.jaog.or.jp/lecture/2-%E4%B8%8D%E5%A6%8A%E7%97%87%E3%81%AE%E5%AE%9A%E7%BE%A9%E3%83%BB%E5%88%86%E9%A1%9E%E3%83%BB%E6%B2%BB%E7%99%82%E6%B3%95/>.
- [8].L. Henry **Some data on natural fertility** Eugen Q, 8 (1961), 81-91
- [9].J.E. Dew, R.A. Don, G.J. Hughes, T.C. Johnson and S.J. Steigrad **The influence of advanced age on the outcome of assisted reproduction** J Assist Reprod Genet, 15 (1998), 210-214
- [10].**ACOG Committee Opinion. Age-related fertility decline** Obstet Gynecol, 112 (2008), 409-411
- [11].E.B. Pasqualotto, A. Agarwal, R.K. Sharma, V.M. Izzo, J.A. Pinotti, N.J. Joshi and B.I. Rose **Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures** Fertil Steril, 81 (2004), 973-976
- [12].F.J. Martin-Romero, J.R. Ortiz-de-Galisteo, J. Lara-Laranjeira, J.A. Dominguez-Arroyo, E. Gonzalez-Carrera and I.S. Alvarez **Store-operated calcium entry in human oocytes and**

- sensitivity to oxidative stress** Biol Reprod, 78 (2008), 307-315
- [13].N.B. Karuputhula, R. Chattopadhyay, B. Chakravarty and K. Chaudhury **Oxidative status in granulosa cells of infertile women undergoing IVF** Syst Biol Reprod Med, 59 (2013), 91-98
- [14].B.P. Mihalas, K.A. Redgrove, E.A. McLaughlin and B. Nixon **Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage** Oxid Med Cell Longev, 2017 (2017), 4015874
- [15].H. Sies **Biological redox systems and oxidative stress** Cell Mol Life Sci, 64 (2007), 2181-2188
- [16].N.H. Zawia, D.K. Lahiri and F. Cardozo-Pelaez **Epigenetics, oxidative stress, and Alzheimer disease** Free Radic Biol Med, 46 (2009), 1241-1249
- [17].S.D. van Otterdijk, J.C. Mathers and G. Strathdee **Do age-related changes in DNA methylation play a role in the development of age-related diseases?** Biochem Soc Trans, 41 (2013), 803-807
- [18].M. Zampieri, F. Ciccarone, R. Calabrese, C. Franceschi, A. Burkle and P. Caiafa **Reconfiguration of DNA methylation in aging** Mech Ageing Dev, 151 (2015), 60-70
- [19].P. Davalli, T. Mitic, A. Caporali, A. Lauriola and D. D'Arca **ROS, Cell Senescence, and Novel Molecular Mechanisms in Aging and Age-Related Diseases** Oxid Med Cell Longev, 2016 (2016), 3565127
- [20].A. Agarwal and R.A. Saleh **Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment** Urol Clin North Am, 29 (2002), 817-827
- [21].A. Agarwal, R.A. Saleh and M.A. Bedaiwy **Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction** Fertil Steril, 79 (2003), 829-843
- [22].S.C. Sikka **Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology** J Androl, 25 (2004), 5-18
- [23].L.C. Saalu **The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation** Pak J Biol Sci, 13 (2010), 413-422
- [24].E.Y. Ko, E.S. Sabanegh, Jr. and A. Agarwal **Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity** Fertil Steril, 102 (2014), 1518-1527
- [25].J.J. Tarin **Potential effects of age-associated oxidative stress on mammalian oocytes/embryos** Mol Hum Reprod, 2 (1996), 717-724
- [26].E.I. Kovalenko, A.A. Boyko, V.F. Semenov, G.V. Lutsenko, M.V. Grechikhina, L.M. Kanevskiy, T.L. Azhikina, W.G. Telford and A.M. Sapozhnikov **ROS production, intracellular HSP70 levels and their relationship in human neutrophils: effects of age** Oncotarget, 5 (2014), 11800-11812
- [27].D.A. Dumesic, D.R. Meldrum, M.G. Katz-Jaffe, R.L. Krisher and W.B. Schoolcraft **Oocyte**

- environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health** *Fertil Steril*, 103 (2015), 303-316
- [28].M. Attaran, E. Pasqualotto, T. Falcone, J.M. Goldberg, K.F. Miller, A. Agarwal and R.K. Sharma **The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization** *Int J Fertil Womens Med*, 45 (2000), 314-320
- [29].A. Revelli, L. Delle Piane, S. Casano, E. Molinari, M. Massobrio and P. Rinaudo **Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics** *Reprod Biol Endocrinol*, 7 (2009), 40
- [30].S.E. Elizur, O. Lebovitz, R. Orvieto, J. Dor and T. Zan-Bar **Reactive oxygen species in follicular fluid may serve as biochemical markers to determine ovarian aging and follicular metabolic age** *Gynecological Endocrinology*, 30 (2014), 705-707
- [31].M.R. Cesarone, G. Belcaro, M. Carratelli, U. Cornelli, M.T. De Sanctis, L. Incandela, A. Barsotti, R. Terranova and A. Nicolaides **A simple test to monitor oxidative stress** *Int Angiol*, 18 (1999), 127-130
- [32].P. Celi, M. Sullivan and D. Evans **The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood** *Vet J*, 183 (2010), 217-218
- [33].M. Appasamy, E. Jauniaux, P. Serhal, A. Al-Qahtani, N.P. Groome and S. Muttukrishna **Evaluation of the relationship between follicular fluid oxidative stress, ovarian hormones, and response to gonadotropin stimulation** *Fertil Steril*, 89 (2008), 912-921
- [34].K.R. Hansen, N.S. Knowlton, A.C. Thyer, J.S. Charleston, M.R. Soules and N.A. Klein **A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause** *Hum Reprod*, 23 (2008), 699-708
- [35].J. Kwee, R. Schats, J. McDonnell, A. Themmen, F. de Jong and C. Lambalk **Evaluation of anti-Mullerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve** *Fertil Steril*, 90 (2008), 737-743
- [36].Y. Asada, Y. Morimoto, Y. Nakaoka, T. Yamasaki, Y. Suehiro, H. Sugimoto, M. Yoshida and M. Irahara **Age-specific serum anti-Mullerian hormone concentration in Japanese women and its usefulness as a predictor of the ovarian response** *Reprod Med Biol*, 16 (2017), 364-373
- [37].K. Yamaguchi, M. Mandai, S. Toyokuni, J. Hamanishi, T. Higuchi, K. Takakura and S. Fujii **Contents of endometriotic cysts, especially the high concentration of free iron, are a possible cause of carcinogenesis in the cysts through the iron-induced persistent oxidative stress** *Clin Cancer Res*, 14 (2008), 32-40
- [38].N. Sugino **Reactive oxygen species in ovarian physiology** *Reprod Med Biol*, 4 (2005), 31-44

- [39].H.R. Behrman, P.H. Kodaman, S.L. Preston and S. Gao **Oxidative stress and the ovary** J Soc Gynecol Investig, 8 (2001), S40-42
- [40].T. Seino, H. Saito, T. Kaneko, T. Takahashi, S. Kawachiya and H. Kurachi **Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program** Fertil Steril, 77 (2002), 1184-1190
- [41].B. Halliwell and J.M. Gutteridge **Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease** Hum Toxicol, 7 (1988), 7-13
- [42].J. Blohberger, T. Buck, D. Berg, U. Berg, L. Kunz and A. Mayerhofer **L-DOPA in the human ovarian follicular fluid acts as an antioxidant factor on granulosa cells** J Ovarian Res, 9 (2016), 62
- [43].S. Das, R. Chattopadhyay, S. Ghosh, S. Ghosh, S.K. Goswami, B.N. Chakravarty and K. Chaudhury **Reactive oxygen species level in follicular fluid--embryo quality marker in IVF?** Hum Reprod, 21 (2006), 2403-2407
- [44].W.D. Brown and A.L. Tappel **Fatty acid oxidation by carp liver mitochondria** Arch Biochem Biophys, 85 (1959), 149-158
- [45].O. Oral, T. Kutlu, E. Aksoy, C. Ficicioglu, H. Uslu and S. Tugrul **The effects of oxidative stress on outcomes of assisted reproductive techniques** J Assist Reprod Genet, 23 (2006), 81-85
- [46].E. Yalcinkaya, Y. Cakiroglu, E. Doger, O. Budak, M. Cekmen and E. Caliskan **Effect of follicular fluid NO, MDA and GSH levels on in vitro fertilization outcomes** J Turk Ger Gynecol Assoc, 14 (2013), 136-141
- [47].W.G. Niehaus, Jr. and B. Samuelsson **Formation of malonaldehyde from phospholipid arachidonate during microsomal lipid peroxidation** Eur J Biochem, 6 (1968), 126-130
- [48].N.M. Weinshenker and P.W. Ramwell **Review of the Intra-Science Research Foundation Symposium on the chemistry and pharmacology of prostaglandins** Prostaglandins, 1 (1972), 83-85
- [49].L. Sabatini, C. Wilson, A. Lower, T. Al-Shawaf and J.G. Grudzinskas **Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing in vitro fertilization** Fertil Steril, 72 (1999), 1027-1034
- [50].Z. Wiener-Megnazi, L. Vardi, A. Lissak, S. Shnizer, A.Z. Reznick, D. Ishai, S. Lahav-Baratz, H. Shiloh, M. Koifman and M. Dirnfeld **Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization** Fertil Steril, 82 Suppl 3 (2004), 1171-1176
- [51].S.K. Jana, N.B. K, R. Chattopadhyay, B. Chakravarty and K. Chaudhury **Upper control limit of reactive oxygen species in follicular fluid beyond which viable embryo formation is**

- not favorable** *Reprod Toxicol*, 29 (2010), 447-451
- [52].K. Nakagawa, M. Hisano, R. Sugiyama and K. Yamaguchi **Measurement of oxidative stress in the follicular fluid of infertility patients with an endometrioma** *Arch Gynecol Obstet*, 293 (2016), 197-202
- [53].A. Di Rosa, E. Albani, E. Morengi, V.M. Iommiello and P.E. Levi Setti **A new method to assess oxidative stress in ART cycles** *Gynecol Endocrinol*, 32 (2016), 210-212
- [54].P.J. Devine, S.D. Perreault and U. Luderer **Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity** *Biol Reprod*, 86 (2012), 27
- [55].M. Jozwik, S. Wolczynski, M. Jozwik and M. Szamatowicz **Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans** *Mol Hum Reprod*, 5 (1999), 409-413
- [56].J.D. Biggers, D.G. Whittingham and R.P. Donahue **The pattern of energy metabolism in the mouse oocyte and zygote** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 58 (1967), 560-567
- [57].A.L. Gott, K. Hardy, R.M. Winston and H.J. Leese **Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos** *Hum Reprod*, 5 (1990), 104-108
- [58].J. Conaghan, A.H. Handyside, R.M. Winston and H.J. Leese **Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro** *J Reprod Fertil*, 99 (1993), 87-95
- [59].D.K. Gardner, M. Lane, J. Stevens and W.B. Schoolcraft **Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential** *Fertil Steril*, 76 (2001), 1175-1180
- [60].A. Uyar and E. Seli **Metabolomic assessment of embryo viability** *Semin Reprod Med*, 32 (2014), 141-152
- [61].S. Baka and A. Malamitsi-Puchner **Novel follicular fluid factors influencing oocyte developmental potential in IVF: a review** *Reprod Biomed Online*, 12 (2006), 500-506
- [62].K.J. Davies **Oxidative stress: the paradox of aerobic life** *Biochem Soc Symp*, 61 (1995), 1-31
- [63].S. Vertuani, A. Angusti and S. Manfredini **The antioxidants and pro-antioxidants network: an overview** *Curr Pharm Des*, 10 (2004), 1677-1694
- [64].S. Keshavarzi, M. Salehi, F. Farifteh-Nobijari, T. Hosseini, S. Hosseini, A. Ghazifard, M. Ghaffari Novin, V. Fallah-Omrani, M. Nourozian and A. Hosseini **Melatonin Modifies Histone Acetylation During In Vitro Maturation of Mouse Oocytes** *Cell J*, 20 (2018), 244-249
- [65].T. Lin, J.E. Lee, J.W. Kang, R.K. Oqani, E.S. Cho, S.B. Kim and D. Il Jin **Melatonin supplementation during prolonged in vitro maturation improves the quality and development of poor-quality porcine oocytes via anti-oxidative and anti-apoptotic effects** *Mol Reprod Dev*, 85 (2018), 665-681



- [66].M. Stojkovic, K. Westesen, V. Zakhartchenko, P. Stojkovic, K. Boxhammer and E. Wolf **Coenzyme Q(10) in submicron-sized dispersion improves development, hatching, cell proliferation, and adenosine triphosphate content of in vitro-produced bovine embryos** *Biol Reprod*, 61 (1999), 541-547
- [67].Y. Kitano, S. Hashimoto, H. Matsumoto, T. Yamochi, M. Yamanaka, Y. Nakaoka, A. Fukuda, M. Inoue, T. Ikeda and Y. Morimoto **Oral administration of l-carnitine improves the clinical outcome of fertility in patients with IVF treatment** *Gynecol Endocrinol*, 34 (2018), 684-688
- [68].A.S. Batioglu, U. Sahin, B. Gurlek, N. Ozturk and E. Unsal **The efficacy of melatonin administration on oocyte quality** *Gynecol Endocrinol*, 28 (2012), 91-93
- [69].T. Nishihara, S. Hashimoto, K. Ito, Y. Nakaoka, K. Matsumoto, Y. Hosoi and Y. Morimoto **Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer** *Gynecol Endocrinol*, 30 (2014), 359-362
- [70].A. Capalbo, L. Rienzi, D. Cimadomo, R. Maggiulli, T. Elliott, G. Wright, Z.P. Nagy and F.M. Ubaldi **Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts** *Hum Reprod*, 29 (2014), 1173-1181
- [71].M. Meseguer, J. Herrero, A. Tejera, K.M. Hilligsoe, N.B. Ramsing and J. Remohi **The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation** *Hum Reprod*, 26 (2011), 2658-2671
- [72].N. Basile, M. Caiazzo and M. Meseguer **What does morphokinetics add to embryo selection and in-vitro fertilization outcomes?** *Curr Opin Obstet Gynecol*, 27 (2015), 193-200
- [73].N. Basile, P. Vime, M. Florensa, B. Aparicio Ruiz, J.A. Garcia Velasco, J. Remohi and M. Meseguer **The use of morphokinetics as a predictor of implantation: a multicentric study to define and validate an algorithm for embryo selection** *Hum Reprod*, 30 (2015), 276-283
- [74].J. Barberet, C. Bruno, E. Valot, C. Antunes-Nunes, L. Jonval, J. Chammas, C. Choux, P. Ginod, P. Sagot, A. Soudry-Faure and P. Fauque **Can novel early non-invasive biomarkers of embryo quality be identified with time-lapse imaging to predict live birth?** *Hum Reprod*, 34 (2019), 1439-1449
- [75].M.C. Magli, L. Gianaroli, A.P. Ferraretti, D. Fortini, A. Fiorentino and A. D'Errico **Human embryo co-culture: results of a randomized prospective study** *Int J Fertil Menopausal Stud*, 40 (1995), 254-259

図

表 1 d-ROM テスト（酸化ストレス度）判定基準

d-ROM 測定値		判 定
200～300	U.CARR	正常
301～320	U.CARR	ボーダーライン
321～340	U.CARR	軽度の酸化ストレス
341～400	U.CARR	中程度の酸化ストレス
401～500	U.CARR	強度の酸化ストレス
501～	U.CARR	かなり強度の酸化ストレス

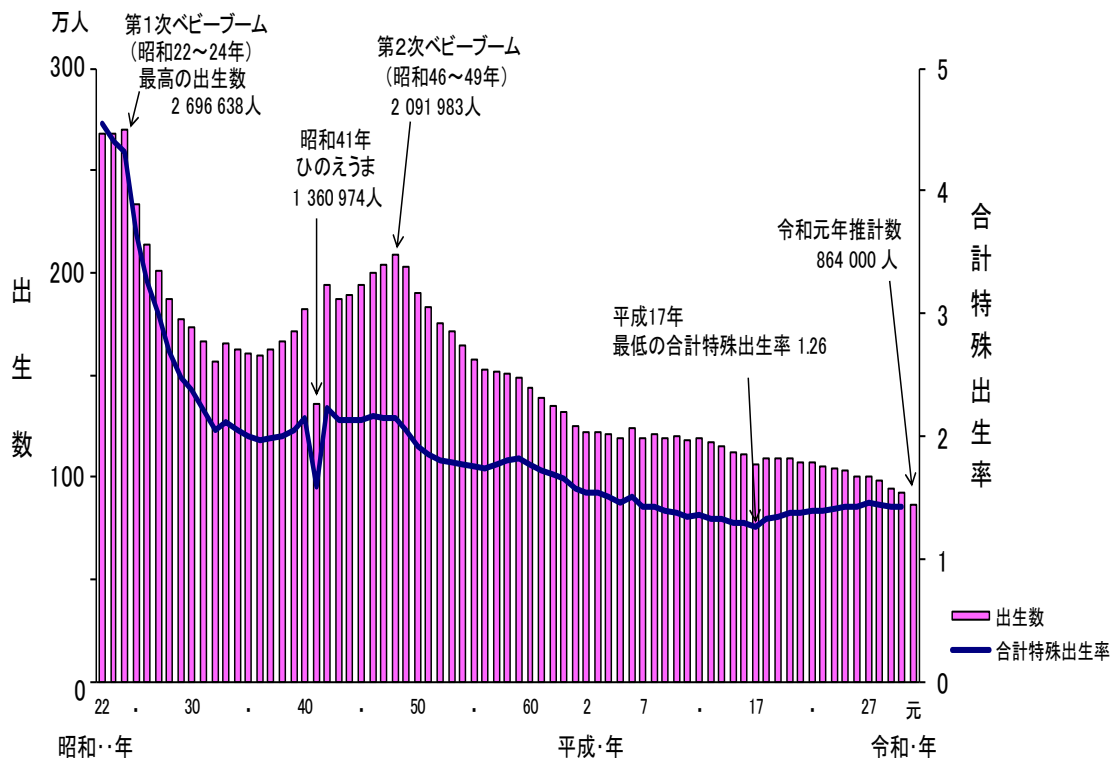
表 2 BAP テスト（抗酸化力）判定基準

BAP 測定値		判 定
2201 以上	$\mu$ mol/l	適値
2200～2001	$\mu$ mol/l	ボーダーライン
2000～1801	$\mu$ mol/l	抗酸化力がやや不足
1800～1601	$\mu$ mol/l	抗酸化力が不足
1600～1401	$\mu$ mol/l	抗酸化力がかなり不足
1400～	$\mu$ mol/l	抗酸化力が大幅に不足

表 3 患者の特徴

Factor	Mean $\pm$ SD	Range
Total number of patients	124	
Total numbers of follicle	211	
Average age (years old)	38.49 $\pm$ 4.39	26 - 45
Average age of husband (years old)	41.01 $\pm$ 5.99	27- 58
Average age difference (years old)	4.14 $\pm$ 4.40	0 - 23
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	22.47 $\pm$ 3.44	15.89 - 32.50
Basal FSH (mIU/ml)	10.90 $\pm$ 6.42	1.0 - 40.2
AMH (ng/ml)	2.19 $\pm$ 2.39	0.04 - 12.2
peak E <sub>2</sub> (pg/ml)	2091.81 $\pm$ 1936.67	248.9 – 10161.0
E <sub>2</sub> /follicle pg/ml	396.00 $\pm$ 210.34	37.9 - 995.0
P <sub>4</sub> (ng/ml)	0.80 $\pm$ 0.81	0.1 - 7.4
LH (mIU/ml)	5.79 $\pm$ 6.00	0.2 - 24.0
Thickness of the endometrium (mm)	7.92 $\pm$ 3.46	1.7 - 16.1
Total ovum account	5.61 $\pm$ 4.66	1 - 16
d-ROMs (U.CARR)	412.49 $\pm$ 118.61	203 - 835
BAP ( $\mu$ mol / L)	2542.36 $\pm$ 636.72	1212 - 4531
OSI	17.05 $\pm$ 6.64	7.75 - 55.52

図 1 出生数と合計特殊出生率の推移

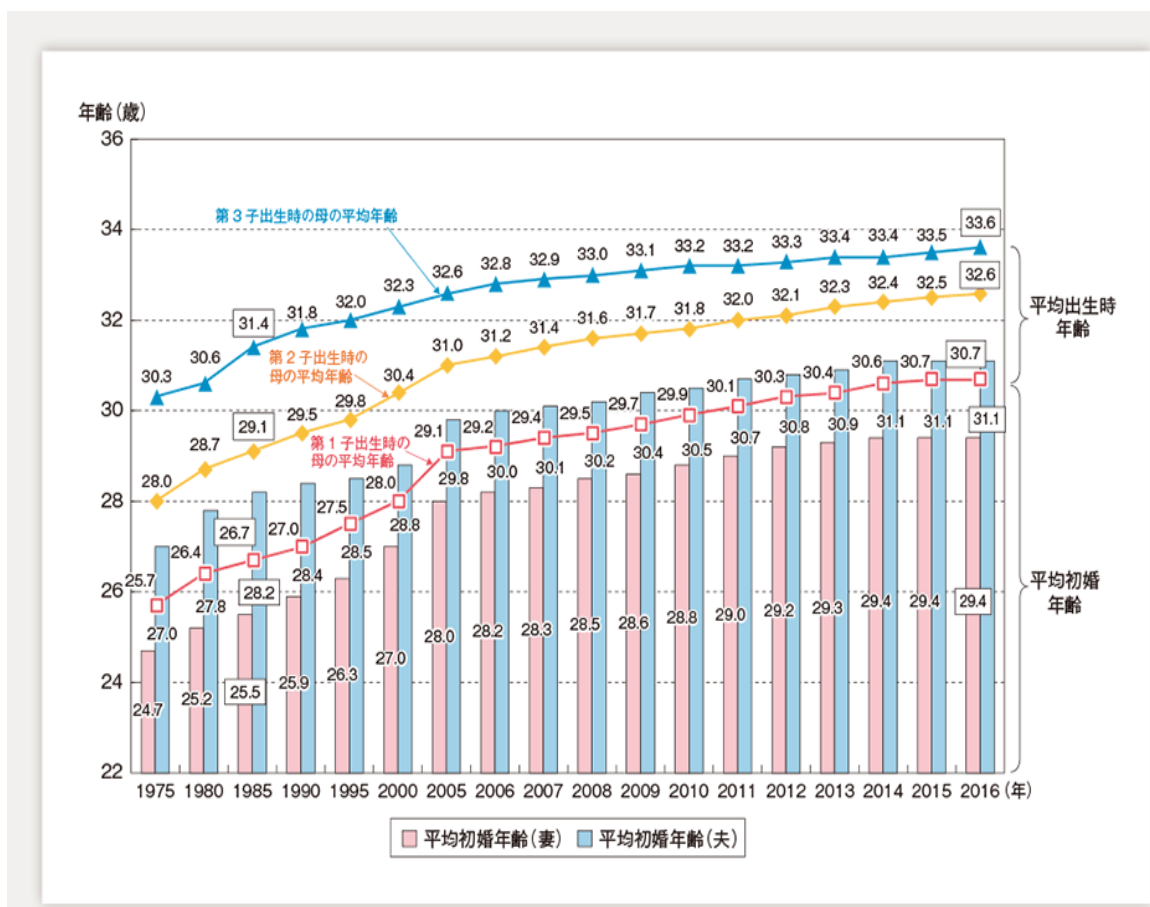


厚生労働省 令和元年(2019)人口動態統計の年間推計より

[http://www8.cao.go.jp/shoushi/shoushika/whitepaper/measures/w-2018/30webhonpen/html/b1\\_s1-1-2.html](http://www8.cao.go.jp/shoushi/shoushika/whitepaper/measures/w-2018/30webhonpen/html/b1_s1-1-2.html)

2018 (平成 30) 年の出生数は、86 万 4,000 人となり 90 万人を割り込んだ。合計特殊出生率は近年、減少傾向が続いているが、2018 年は、1.42 と前年より 0.01 ポイント下回った。

図 2 平均初婚年齢と平均出生時年齢の推移

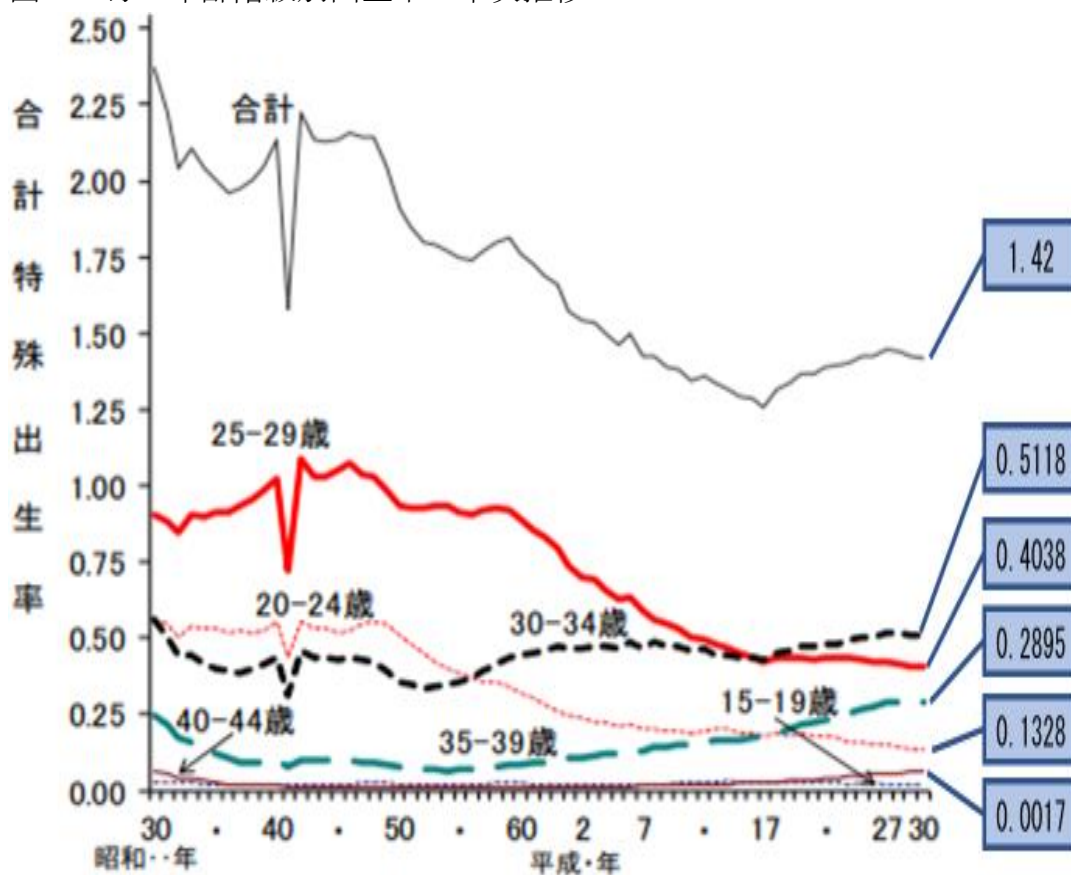


厚生労働省「我が国の人口動態」平成 30 年版より

<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai18/index.html>

女性の社会進出に伴い、初婚年齢並びに出生時年齢は年々上昇している。

図 3 母の年齢階級別出生率の年次推移

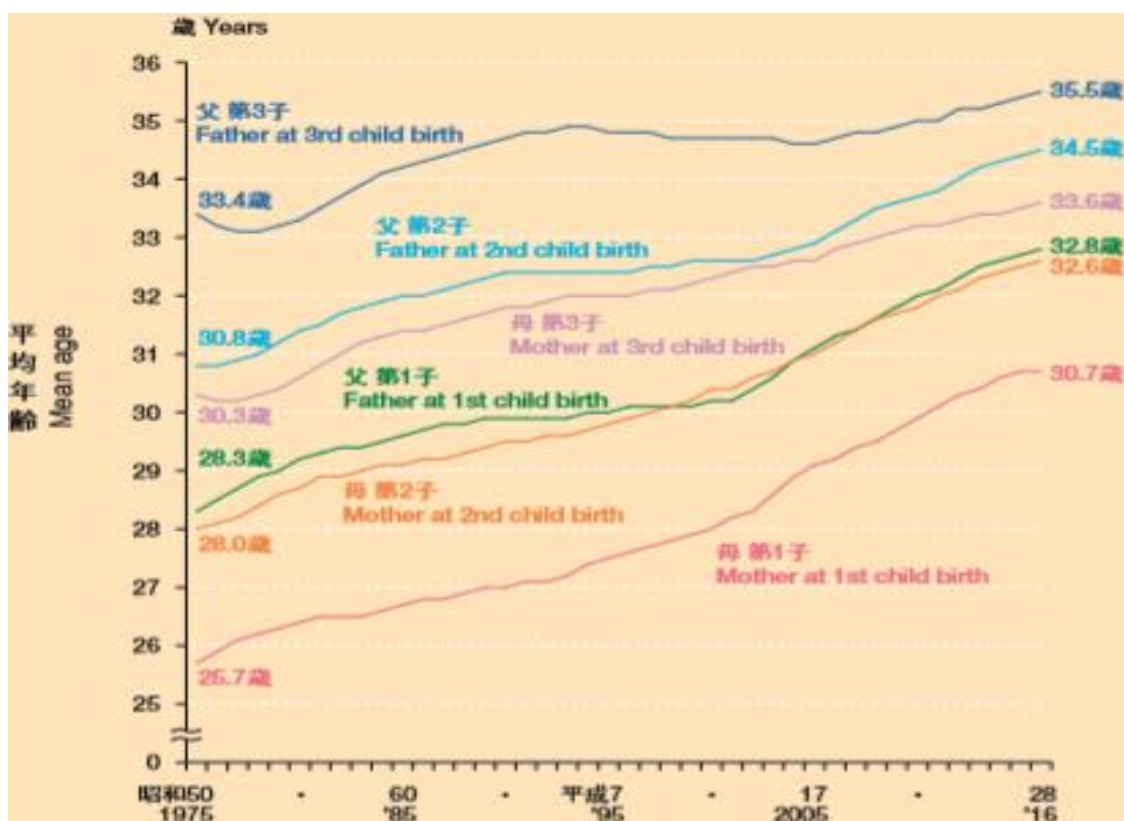


厚生労働省 平成 30 年(2018) 人口動態統計月報年計(概数) の概況

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1.html>

母の年齢階級別出生率の年次推移をみると、昭和 50 年代以降は 20 歳代の出生率が大きく低下し、近年は 30～40 歳代の出生率が上昇傾向となっている。

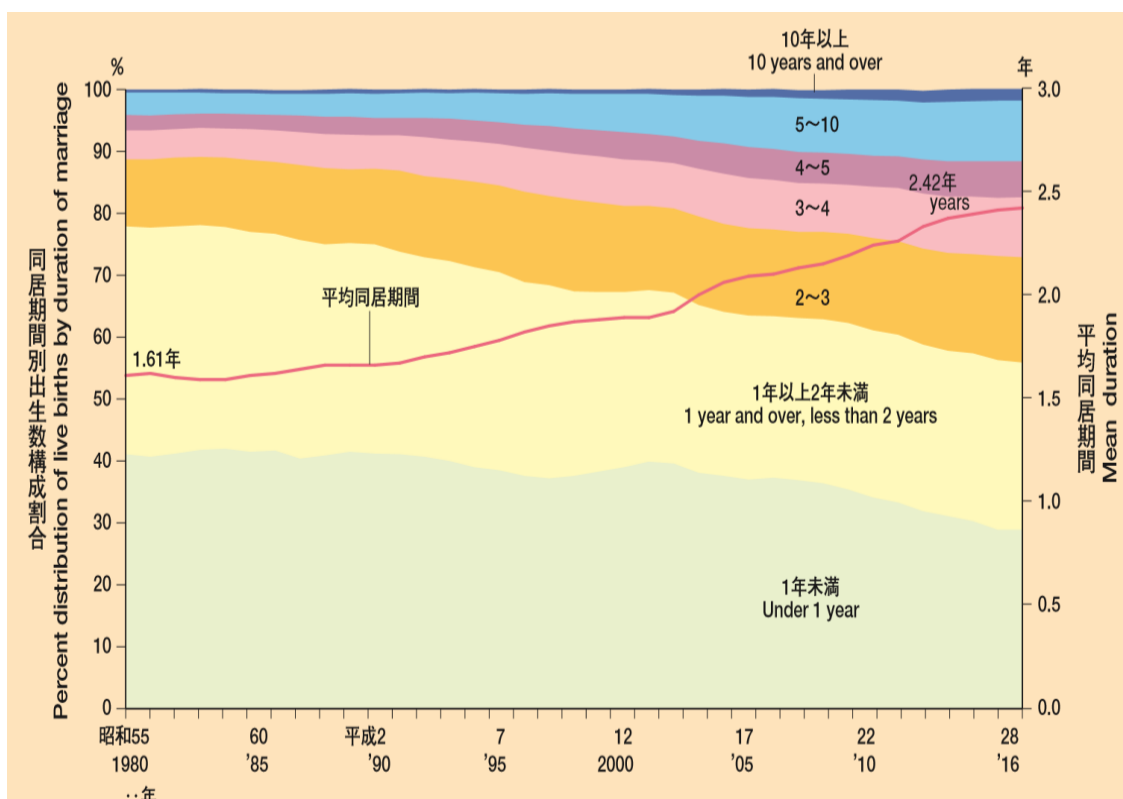
図4 出生順位別に見た父母の平均年齢の年次推移



厚生労働省「我が国の人口動態」平成30年版より

出生時の母親の平均年齢を出生順位別にみると、2017年においては、第1子が30.7歳、第2子が32.6歳、第3子が33.7歳と上昇傾向が続いており、1985年と比較すると第1子では4.0歳、第2子では3.5歳、第3子では2.3歳それぞれ上昇している。

図5 夫婦が結婚生活に入ってから第1子出生までの平均同居期間



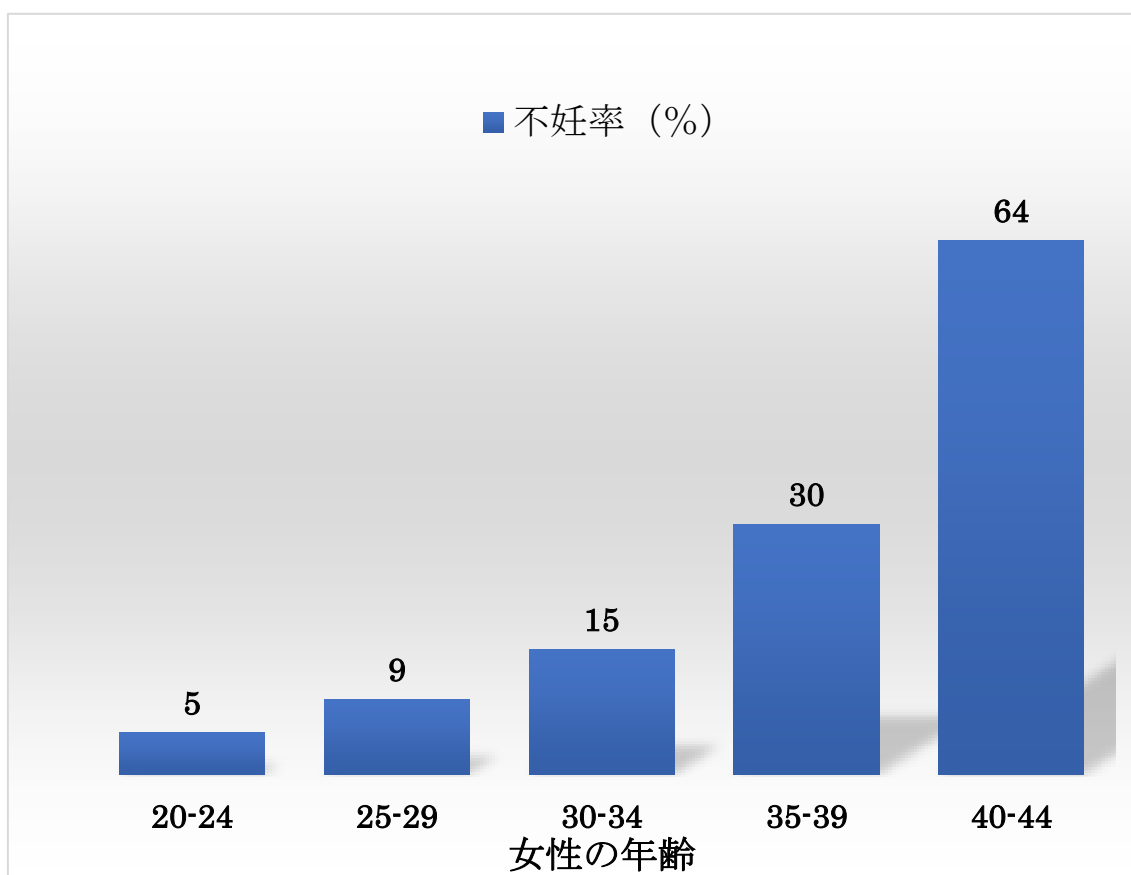
厚生労働省「我が国の人口動態」平成30年版より

<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/81-1.html>

夫婦が結婚生活に入ってから第1子出生までの平均同居期間をみると、平成28年では2.42年となっており、昭和55年に比べ0.81年延びた。期間別の内訳を年次推移でみると、2年未満の割合が大きく減少し、3年以上の割合が大きく増加している



図6 年齢別既婚女性の不妊率

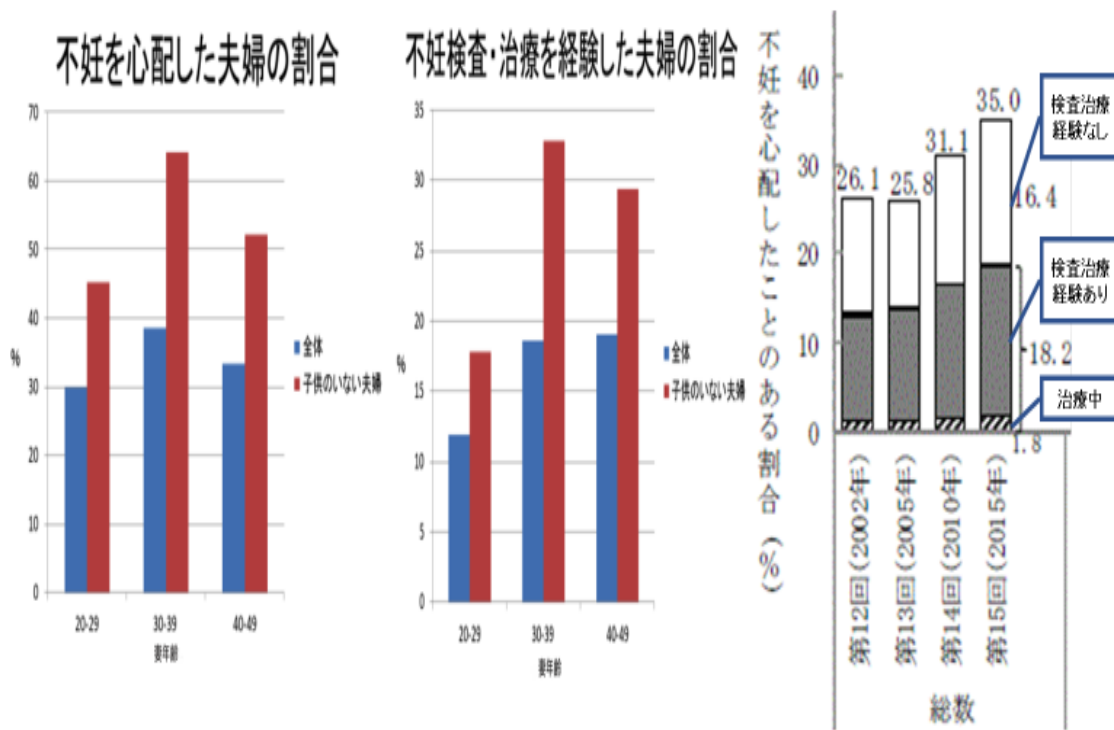


日本産婦人科医会 不妊の原因と検査より

<https://www.jaog.or.jp/lecture/5>

女性の加齢と不妊は密接に関係し、不妊の割合は20歳代前半までは5%以下であるが、20歳代後半より9%前後の不妊率になり、30歳代前半で15%、30歳代後半で30%、40歳以降では約64%が自然妊娠の望みがなくなると推定されている。

図7 不妊を心配した夫婦の割合・不妊検査、治療を経験した夫婦の割合



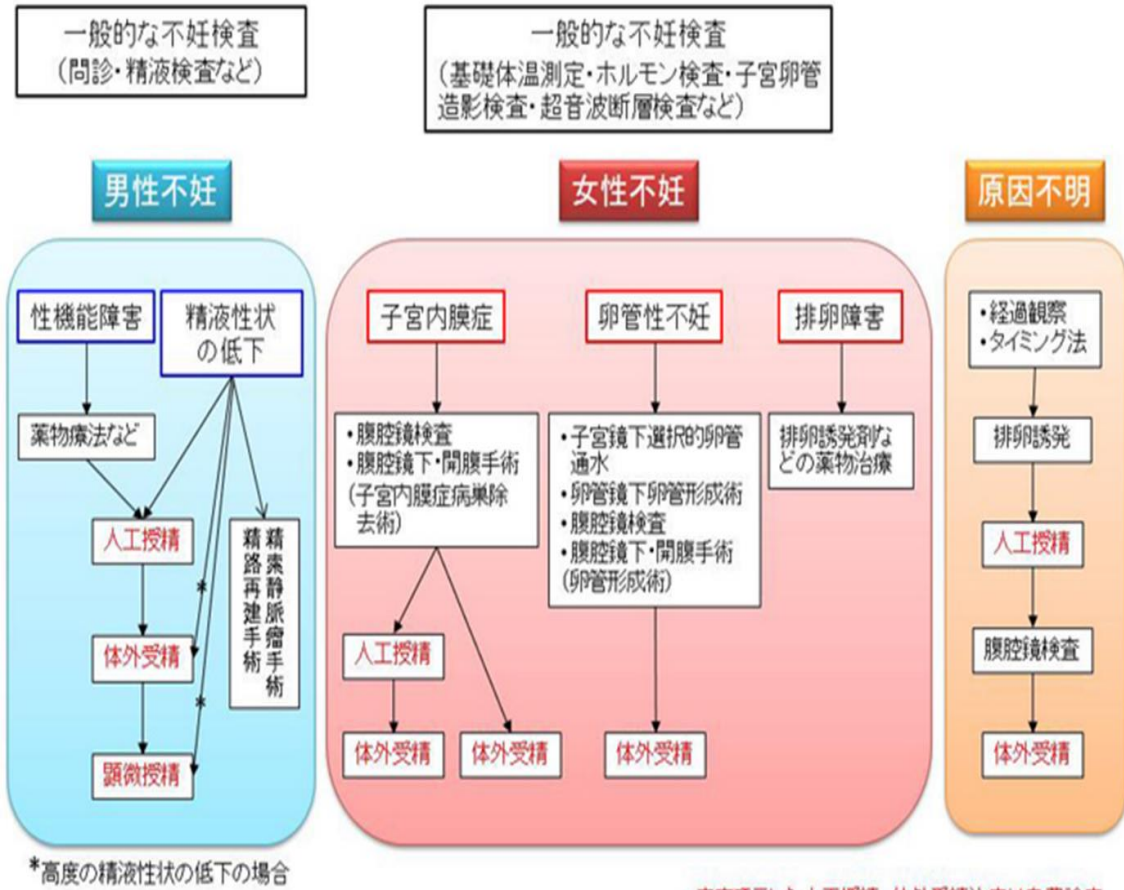
2015 国立社会保障・人口問題研究所

国立社会保障・人口問題研究所 第15回出生動向基本調査

[http://www.ipss.go.jp/ps-doukou/j/doukou15/report15html/NFS15R\\_html08.html](http://www.ipss.go.jp/ps-doukou/j/doukou15/report15html/NFS15R_html08.html)

不妊を心配したことがある（または現在心配している）夫婦の割合は、35.0%と前回（31.1%）よりも増加した。子どものいない夫婦ではこの割合は55.2%（前回52.2%）にのぼる。実際に不妊の検査や治療を受けたことがある（または現在受けている）夫婦は全体で18.2%（同16.4%）、子どものいない夫婦では28.2%（同28.6%）であった。過去の調査にくらべて、不妊の検査や治療経験のある夫婦の割合が上昇傾向にある。

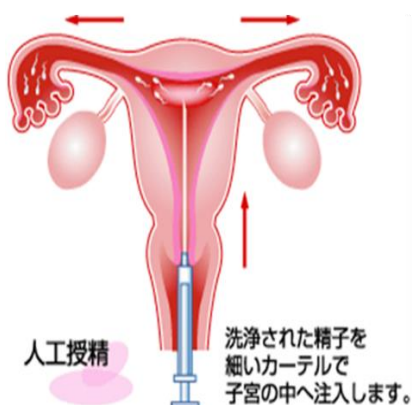
図 8 不妊治療の流れ（日本産科婦人科学会ホームページより引用）



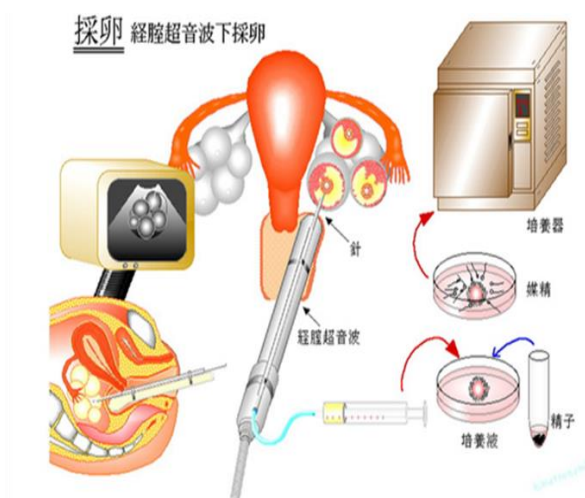
治療は不妊検査を経て一般不妊治療と呼ばれるタイミング法から始まり、人工授精でも妊娠が難しい場合、高度不妊治療と呼ばれる体外受精・胚移植へとステップアップしていくのが一般的である。

図9 人工授精と体外受精の概要

### <人工授精>



### <体外受精（採卵&胚移植）>



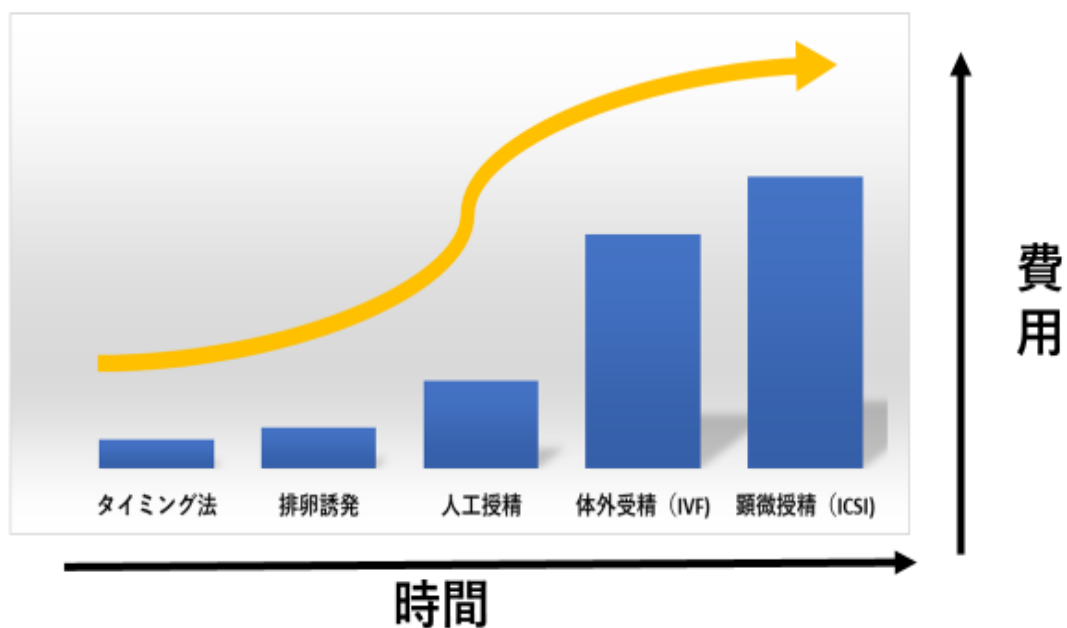
### 胚移植 ET (Embryo Transfer)



<http://www.ivf.co.jp/>より引用

人工授精は洗浄精子をカテーテルで直接子宮内に注入する。  
体外受精は排卵誘発により卵巣に育った卵胞を穿刺針で体外から穿刺吸引により回収し、採取した精子と受精させて培養した胚を子宮内に移植する。

図 10 不妊治療のステップアップ



ステップアップ治療は、ある治療に対し結果が出るかどうかで判断する。どのくらいで次に進むかは原因や年齢によるが、一般的に5~6周期でステップアップし、2年以内に結果を出すことが望ましいとされている。このようにステップアップに伴い、時間と費用が増大していく。

図 11 高度生殖医療による年別出生児数



日本産科婦人科学会 ART データブック 2016 年版

[https://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/2016data\\_20180930.pdf](https://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/2016data_20180930.pdf)

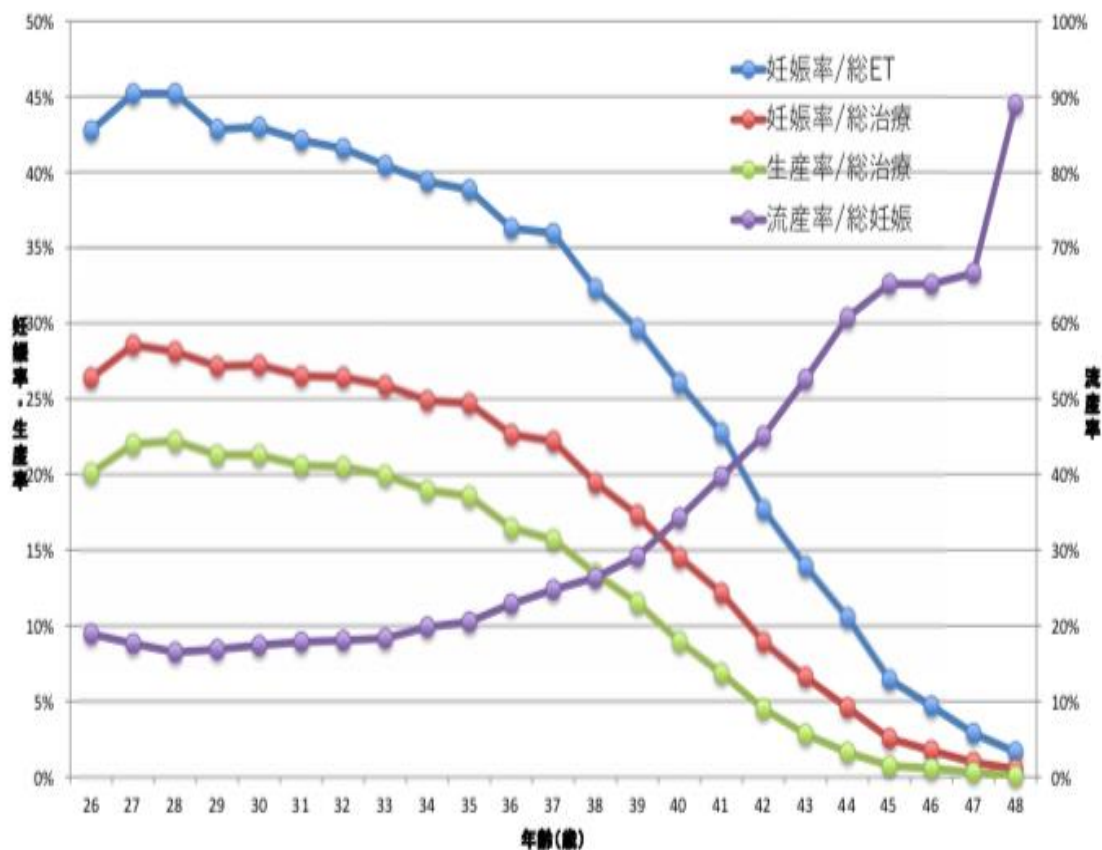
日本産科婦人科学会によると、2017 年の体外受精の出生児は 5 万 6617 人であった。2016 年に比べて 2507 人増え、過去最多を更新した。厚生労働省の統計では 2017 年の総出生数は 94 万 6065 人で、16.7 人に 1 人が体外受精で生まれた計算になる。

FET - Freeze-thaw embryo transfer: 凍結融解胚移植

ICSI - Intracytoplasmic sperm injection: 卵細胞質内精子注入法

IVF - In vitro fertilization: 体外受精

図 12 ART 妊娠率・生産率・流産率



日本産科婦人科学会 ART データブック 2016 年版

[https://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/2016data\\_20180930.pdf](https://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/2016data_20180930.pdf)

生殖補助医療を受けた女性の年齢による妊娠・流産・生産の確率（2016年）を示したものである。39歳を境に妊娠率と流産率が交差し、39歳の妊娠率は29.7%であるのに対し、流産率は29.1%であり、40歳の妊娠率は26%、流産率は34.3%と逆転し、その差は年齢に比例して広がっている。生児を得た女性の割合は、30歳で21.5%、35歳で18.4%、40歳で9.1%、42歳では4.5%と年齢とともに顕著に低下している。

ET - embryo transfer: 胚移植

図 13 不妊治療における月経周期ごとの通院日数の目安

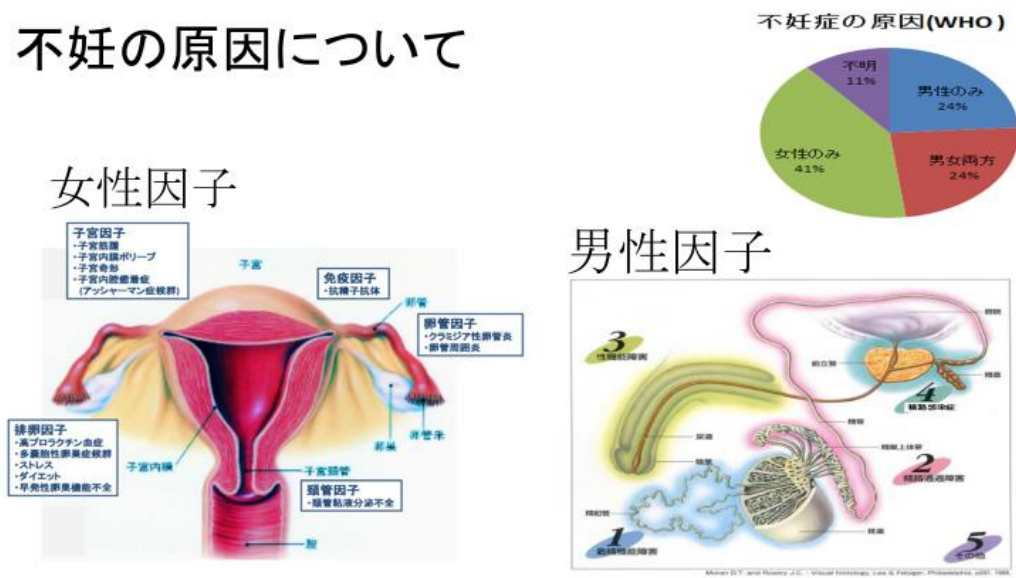
治療	月経周期ごとの通院日数の目安	
	女性	男性
一般不妊治療	診察時間 1回 30分程度の通院:4日~7日 人工授精を行う場合、上記に加え、 診察時間が1回2時間程度の通院:1日~	0~半日 ※手術を伴う場合には1日必要
生殖補助医療	診察時間 1回1~2時間程度の通院:4~10日 + 診察時間 1回あたり半日~1日程度の通院:2日	0~1日 ※手術を伴う場合には1日必要

(厚生労働省ホームページより引用)

不妊治療は女性の通院が主になり、肉体的、精神的、経済的に負担が大きく、月経周期により治療スケジュールが組まれるため、不定期で頻回の通院が必要となり、仕事との両立は困難となる。

図 14 不妊の原因

## 不妊の原因について

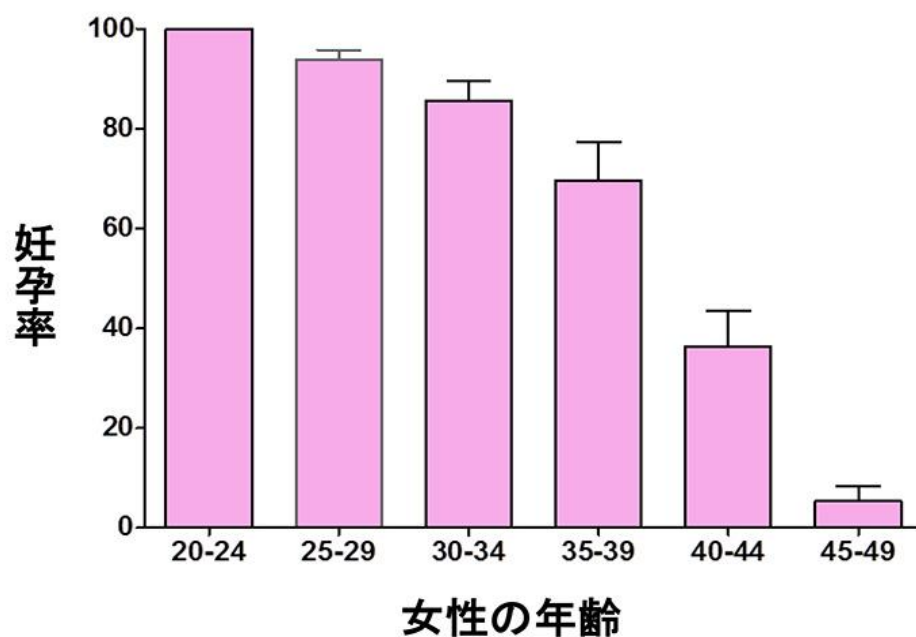


不妊の原因 (日本産科婦人科学会ホームページより引用)

不妊の原因は女性因子、男性因子、原因不明に大別される

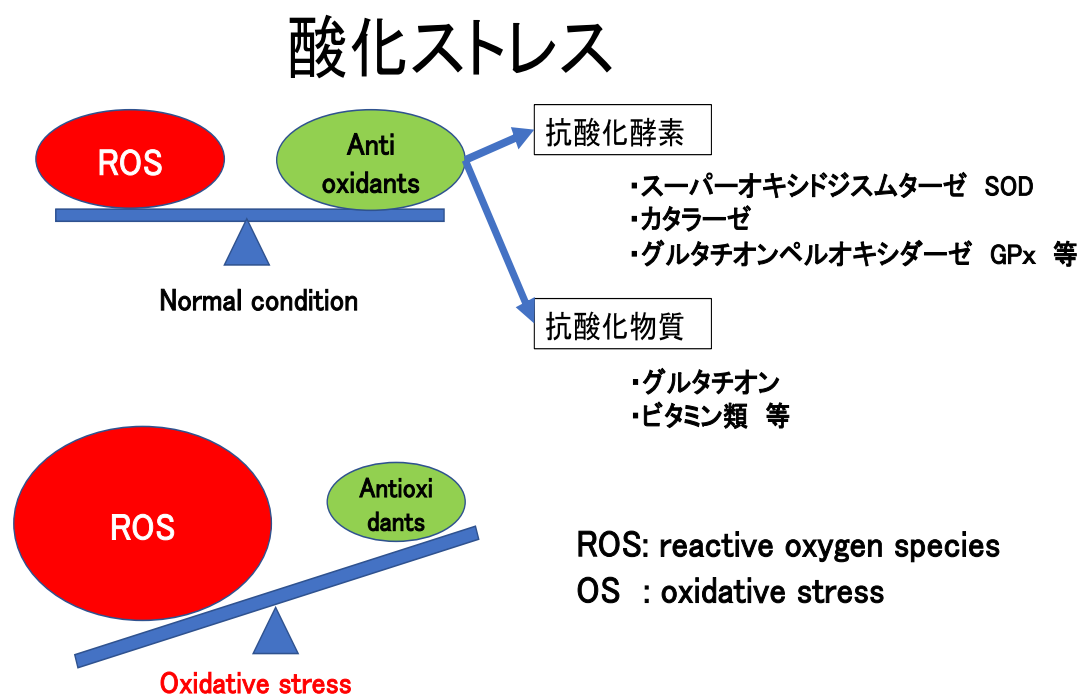


図 15 女性の年齢による妊孕力の変化（自然妊娠）



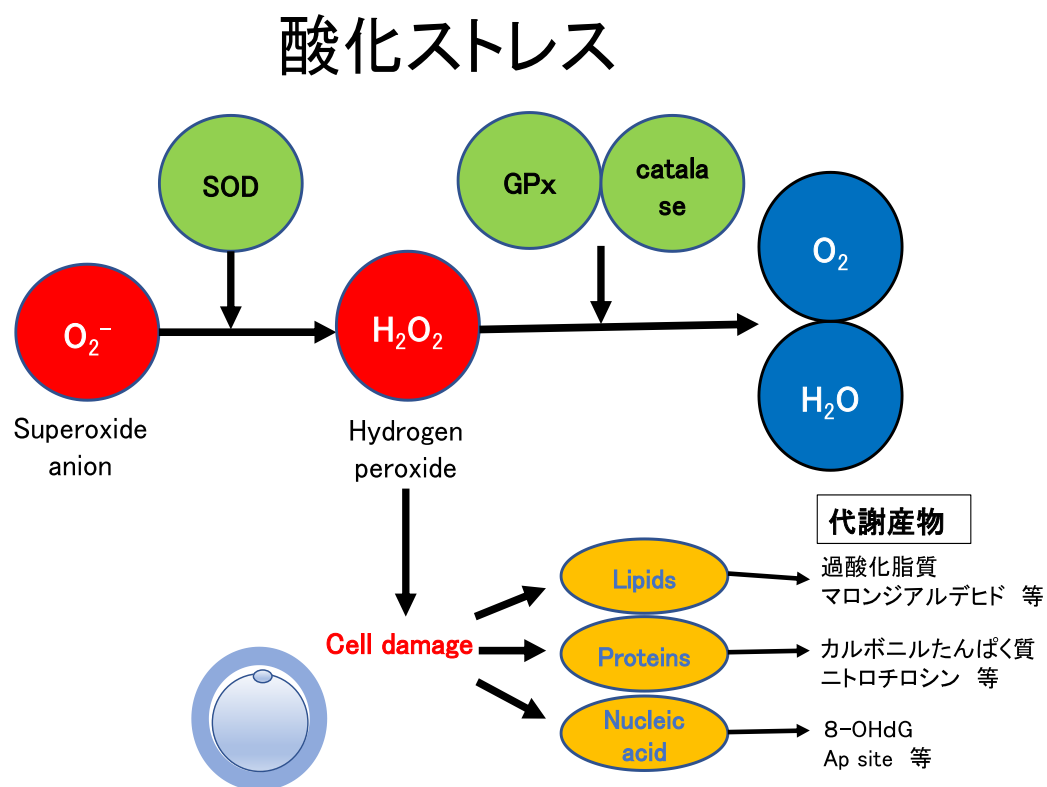
妊孕率は、女性 1,000 人あたりの出生数（17～20 世紀のアメリカ、ヨーロッパ、イランなど 10 ヶ所のデータ：Henry, L. (1961). Some data on natural fertility. *Eugenics Quarterly*, 8(2), 81-91.）を元に、20～24 歳を 100% として計算した。年齢の上昇に伴い（特に 35 歳以降）妊孕率の低下が認められる。データは平均 ± 標準偏差で示した。

図 16 酸化ストレス



酸化ストレスは、分子の損傷につながる酸化剤と酸化防止剤の不均衡として定義される。

図 17 酸化ストレスによる細胞障害



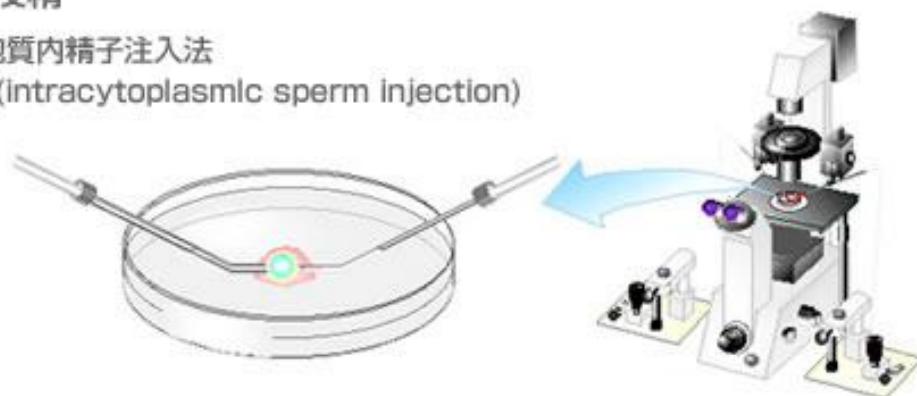
活性酸素種を分解する酵素としてスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) が挙げられるが、これらが消去できる量以上の活性酸素種が生成されていた場合、核酸 (DNA)、たんぱく質、脂質を攻撃し、細胞損傷を与える。酸化ストレスマーカーは抗酸化酵素、抗酸化物質、代謝産物に大別される。

図 18 顕微授精

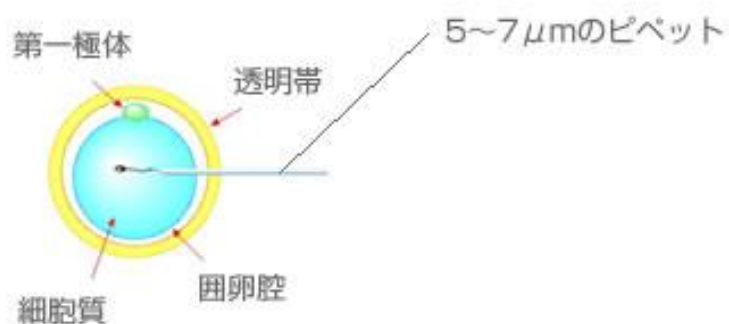
### 顕微授精

卵細胞質内精子注入法

ICSI (intracytoplasmic sperm injection)

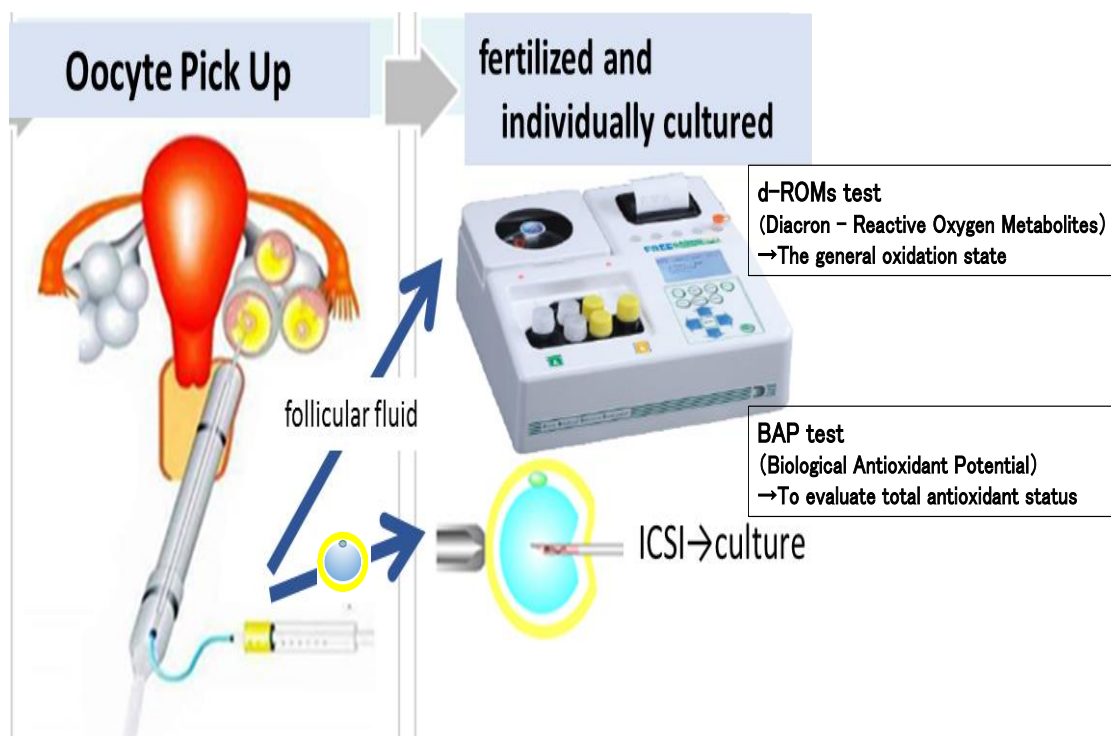


倒立顕微鏡下マイクロマニピュレーターを用いて×400倍率のもと行う



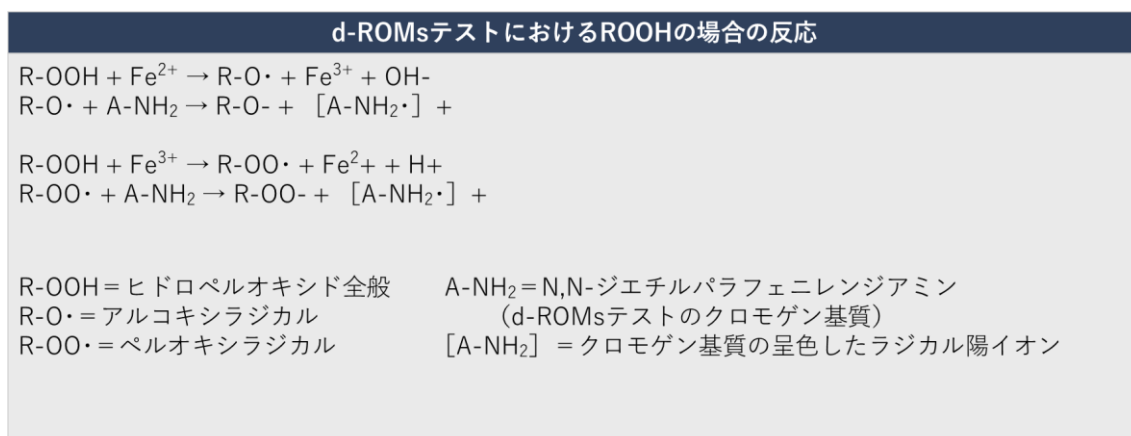
体外受精を実施しても受精が成立しなかった場合と、精子濃度や運動率が低く、体外受精をしても受精しないと判断される場合実施される。顕微授精ではピペットの先端に1個の精子を入れて卵子に顕微鏡で確認しながら直接注入する。(卵細胞質内精子注入法、ICSI)。

図 19 卵胞液回収と酸化ストレスの測定



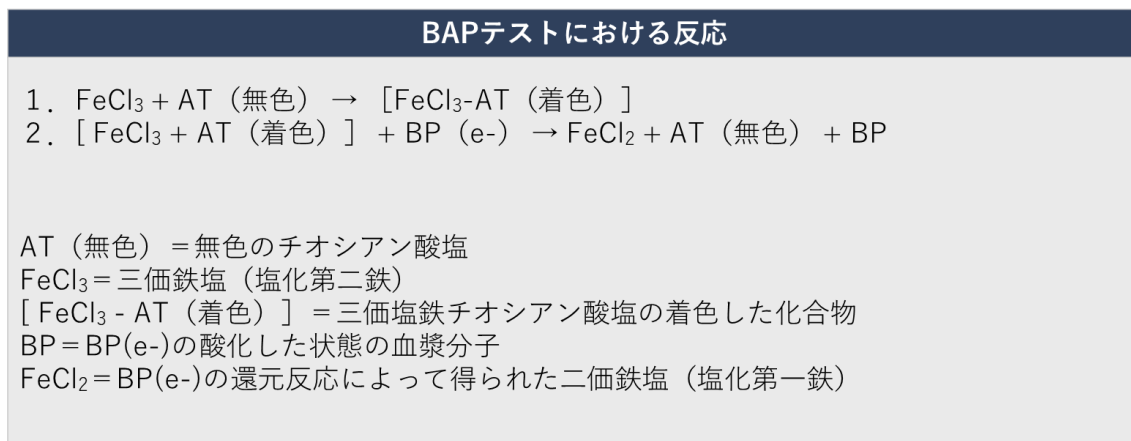
採卵時に採取した卵胞液の酸化ストレス、抗酸化能をフリーラジカル選択評価器 (FREE Carrio Duo; Diacron International srl、Grosseto, Italy) および d-ROM / BAP キット (FREE Carrio Duo; Diacron International srl, Grosseto, Italy) を使って測定した。

図 20 酸化度測定 (d-ROMs テスト)



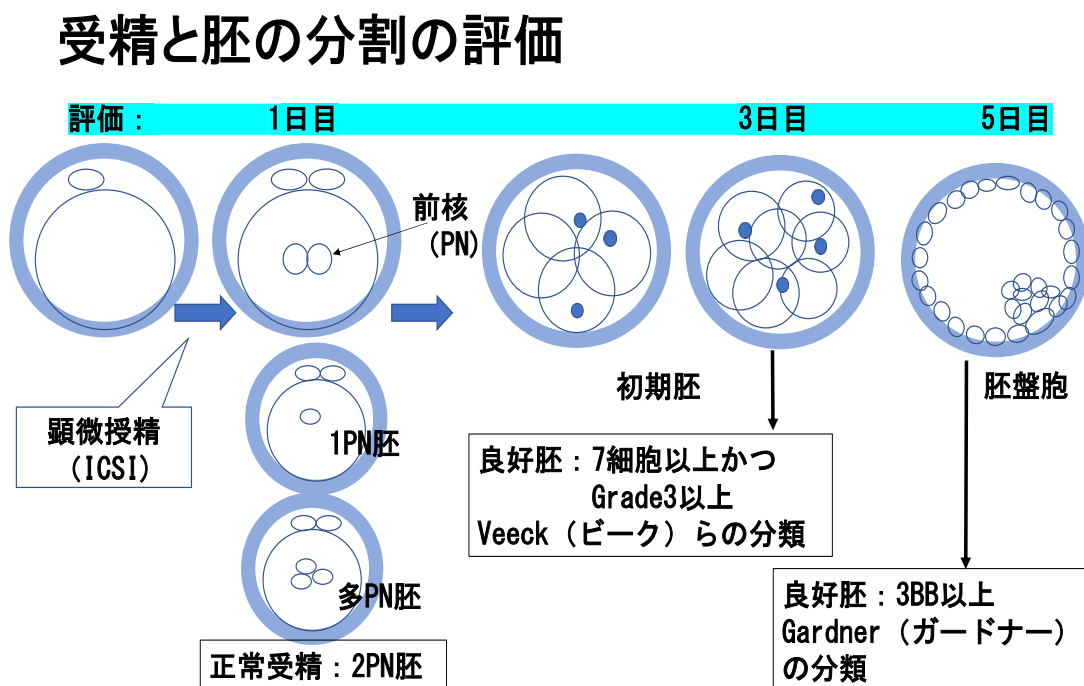
ウイスマー社ホームページより引用 [http://wismerll.co.jp/products/free\\_carrioduo/](http://wismerll.co.jp/products/free_carrioduo/)  
 呈色液クロモゲン (芳香族化合物) は活性酸素・フリーラジカルにより酸化されると、無色から赤紫色のラジカルカチオンになります。酸化ストレス度のマーカーであるヒドロペルオキシド (ROOH) を初めとした総合的な酸化度を定量化します。

図 21 抗酸化力測定 (BAP テスト)



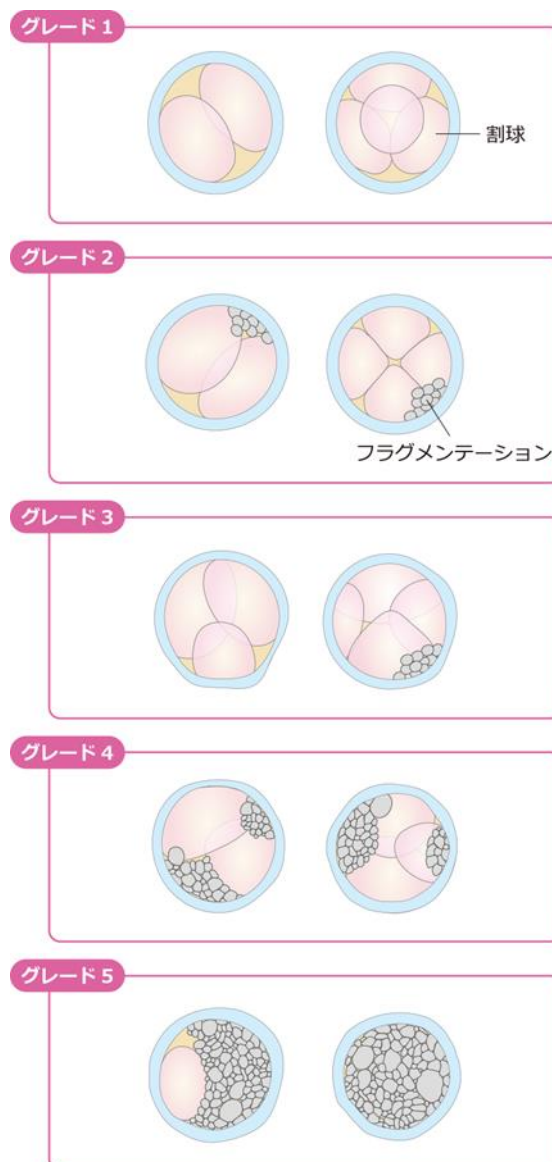
ウイスマー社ホームページより引用 [http://wismerll.co.jp/products/free\\_carrioduo/](http://wismerll.co.jp/products/free_carrioduo/)  
 三価鉄塩 FeCl<sub>3</sub> は、ある特定のチオシアン酸塩誘導物を含む無色の溶液に溶解すると三価鉄 Fe<sup>3+</sup>イオンの機能として赤く呈色します。そこにサンプルを添加すると、サンプル中の抗酸化物質の作用で二価鉄 Fe<sup>2+</sup>イオンに還元され脱色し、色の変化を光度計 505nm で計測し抗酸化力を評価します。

図 22 受精と胚の分割の評価



卵子の分割と評価についてであるが、今回は临床上と同様の形態学的な基準で、受精の状況は1日目に2PN胚であること、3日目に7細胞以上グレード38 (Veeck分類) 以上であること、5日目に3BB (ガードナー分類) 以上であることとした。

図 23 胚のグレード分類



Veeck (ビーク) らの分類

参考文献：中山貴弘：臨床婦人科産科 2013:67(10) , 1030-1037

Veeck 分類は形態的評価（細胞の均等性とフラグメンテーションの割合）によって分類する。数字が小さいほど良好胚である。

Grade 1…細胞の形態が均等でフラグメンテーションを認めない胚

Grade 2…細胞の形態が均等でわずかにフラグメンテーションを認める胚

Grade 3…細胞の形態が不均等な胚。または少量のフラグメンテーションを認める胚



Grade 4…細胞の形態が均等 or 不均等でかなりのフラグメンテーションを認める胚

Grade 5…細胞をほとんど認めずフラグメンテーションが著しい胚

図 24 胚のグレード分類



Gardner（ガードナー）の分類

- ・ 胞胚腔の大きさによる分類（左）
- ・ 内細胞塊と栄養外胚葉による細分類（下）

		栄養外胚葉 (TE)		
		A: 密で細胞数が多い	B: 疎で細胞数が少ない	C: 細胞が非常に少なく大きい
内細胞塊 (ICM)	A: 密で細胞数が多い			
	B: 疎で細胞数が少ない			
	C: 細胞が非常に少なく大きい			

参考文献：中山貴弘：臨床婦人科産科 2013:67(10) , 1030-1037

グレード 3 以上の胚盤胞は、さらに内細胞塊と栄養外胚葉の状態によって A~C に細分類される。内細胞塊は大きく鮮明であるほど良いとされ、栄養外胚葉は、大きさが均等で数が多いほど良いとされている。発育スピード（胞胚腔の大きさからみた発育状態）と内細胞塊、栄養外胚葉の状態を合わせてグレード分類して評価する。数値が高くより AA に近いものが質の高い胚盤胞となる。

#### 胚盤胞腔の広がり具合

- 1：初期胚盤胞 (early) 胚盤胞腔が全体の 1/2 以下
- 2：胚盤胞 胚盤胞腔が全体の 1/2 以上
- 3：完全胚盤胞 (full) 全体に広がった Full 状態
- 4：拡張胚盤胞 (expanded) 胚盤胞腔容積がさらに拡張し、透明帯が薄くなりつつある
- 5：孵化中胚盤胞 (hatching) TE が透明帯の外に脱出し始めている
- 6：孵化後胚盤胞 (hatched) 胚が完全に透明帯から脱出したもの

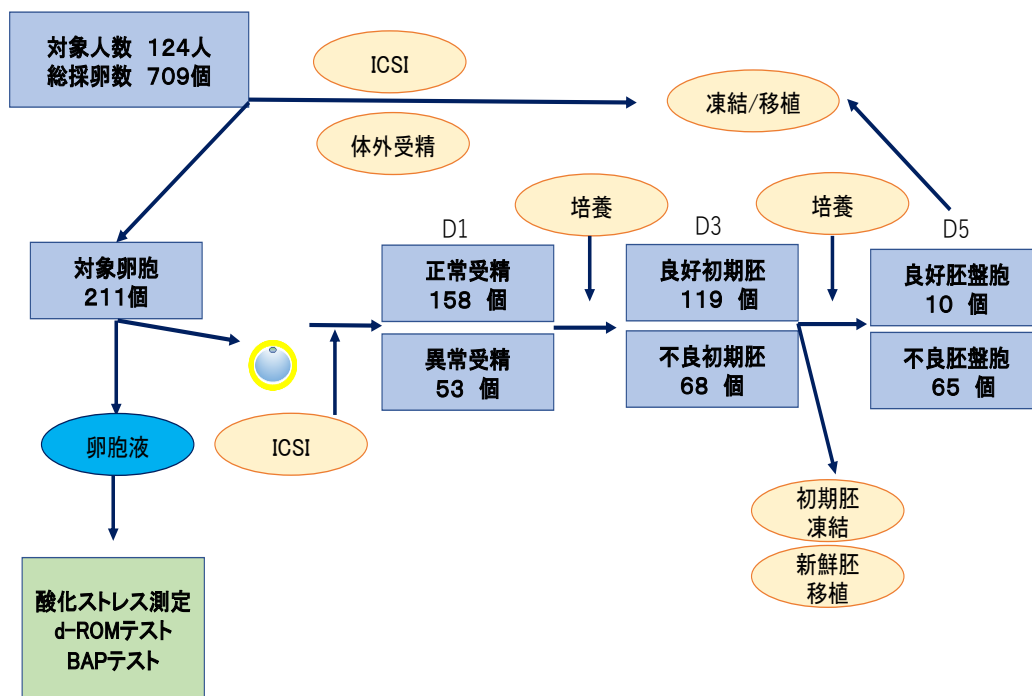
#### 内細胞塊 (ICM)

- A：細胞同士が密に接し、細胞数が多い
- B：細胞同士の密着が粗で、細胞数が少ない
- C：細胞数が非常に少ない

#### 栄養外胚葉 (TE)

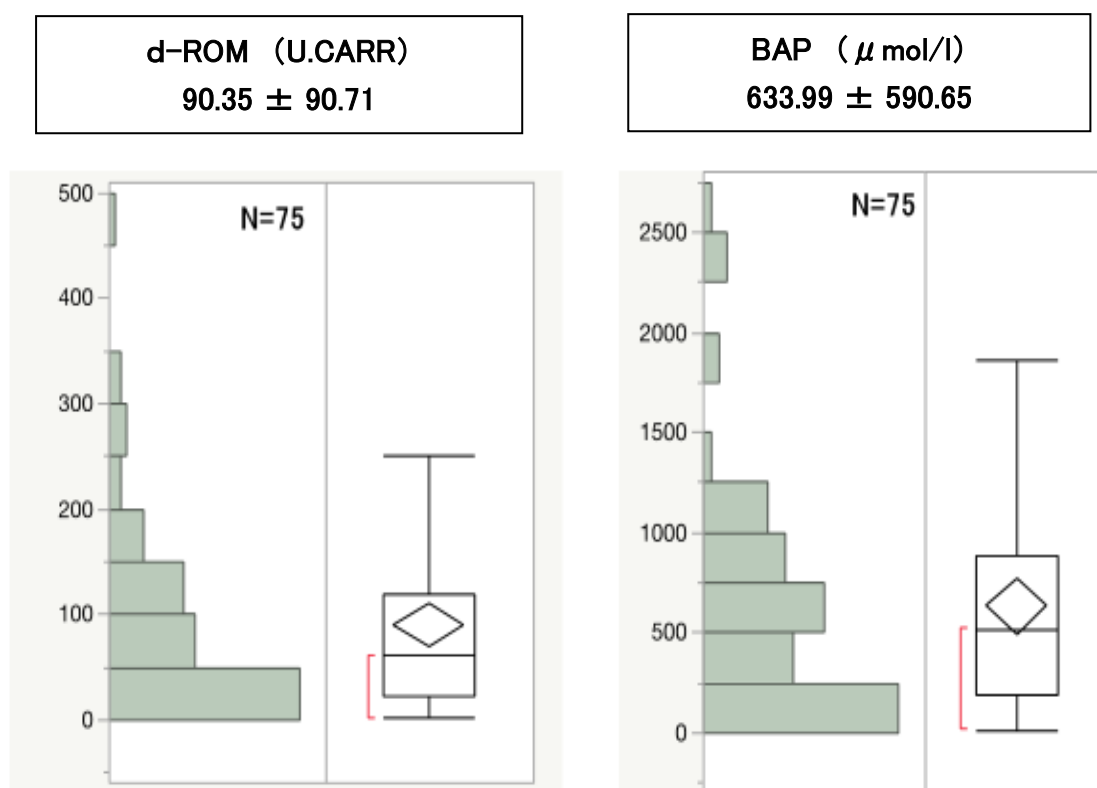
- A：細胞数が多く互いに接着した上皮を形成している
- B：細胞数が少なく、結合が粗な上皮を形成している
- C：数が少ない、大きな細胞が上皮を形成している

図 25 採卵数と受精から分割の評価対象数



総採卵数は 907 個で、そのうち対象卵胞数は 211 であった。ICSI 後 17～20 時間後に受精の評価を行い、2 前核を確認できた正常受精卵は 158 個、異常受精卵は 53 個であった。3 日目評価時に 7 細胞以上、Grade3 以上の良好初期胚は 119 個、不良初期胚は 68 個であった。初期胚で凍結したものを除き、5 日目評価時に 3BB 以上の良好胚盤胞は 10 個、不良胚盤胞は 65 個であった。

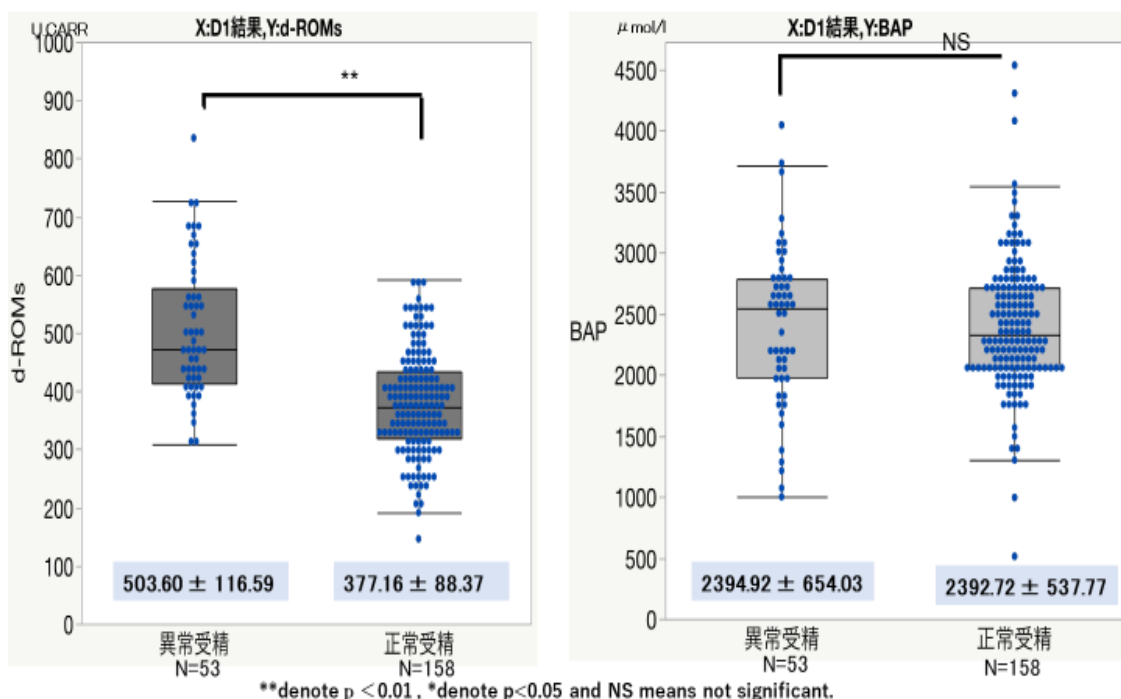
図 26 同一患者の複数の卵胞間の比較



1人当たりの卵胞液間の差の平均はd-ROMで90.35 ± 90.71 U. CARR、BAPで633.99 ± 590.65 μ mol/Lであった。

ヒストグラムは各区間の値を示した患者数を示す。箱ひげ図のひげの上端は最大値、箱の上端は第三四分位、箱の中央の線は中央値、箱の下端は第一四分位、ひげの下端は最小値を示す。

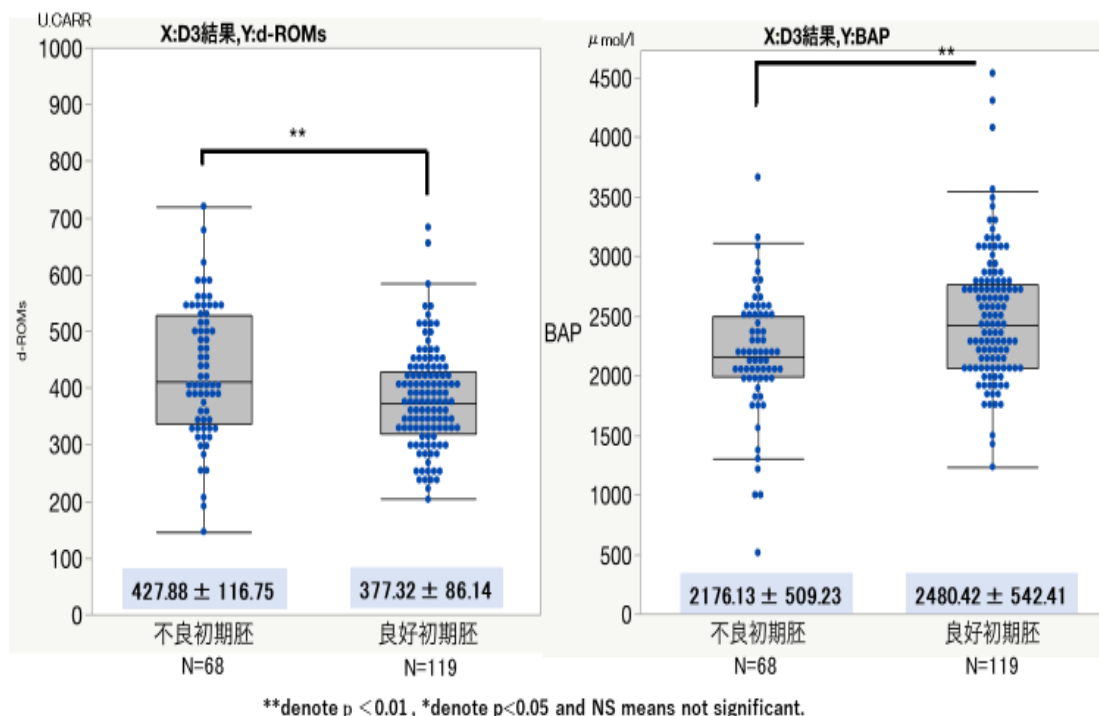
図 27 受精状態における酸化ストレス・抗酸化力の比較



d-ROM の値は、正常な受精グループで  $377.16 \pm 88.37$  U. CARR、異常な受精グループで  $503.60 \pm 116.59$  U. CARR であった ( $P < 0.0001$ )。正常な受精グループは  $2392.72 \pm 537.77 \mu\text{mol/L}$ 、異常な受精グループは  $2394.92 \pm 654.03 \mu\text{mol/L}$  の BAP 値を示した。有意差は認めなかった ( $P = 0.98$ )。

箱ひげ図のひげの上端は最大値、箱の上端は第三四分位、箱の中央の線は中央値、箱の下端は第一四分位、ひげの下端は最小値を示す。

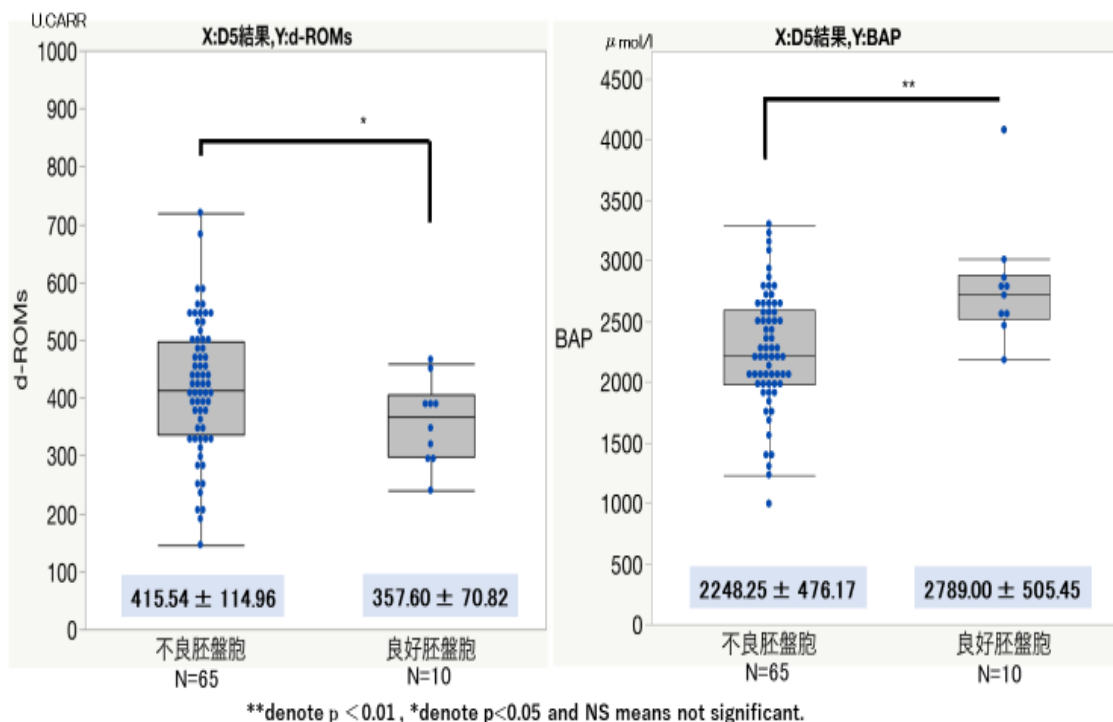
図 28 良好初期胚と不良初期胚における酸化ストレス・抗酸化力の比較



3日目の初期胚の場合、d-ROMの値は、良好胚の場合  $377.32 \pm 86.14$  U. CARR、不良胚の場合  $427.88 \pm 116.75$  U. CARRであった ( $P = 0.0023$ )。3日目の初期胚のBAP値は、良好胚では  $2480.42 \pm 542.41 \mu\text{mol/L}$ 、不良胚では  $2176.13 \pm 509.23 \mu\text{mol/L}$ であった ( $P = 0.0002$ ) (図 11)。

ヒストグラムは各区間の値を示した患者数を示す。箱ひげ図のひげの上端は最大値、箱の上端は第三四分位、箱の中央の線は中央値、箱の下端は第一四分位、ひげの下端は最小値を示す。

図 29 良好胚盤胞、不良胚盤胞における酸化ストレス・抗酸化力の比較

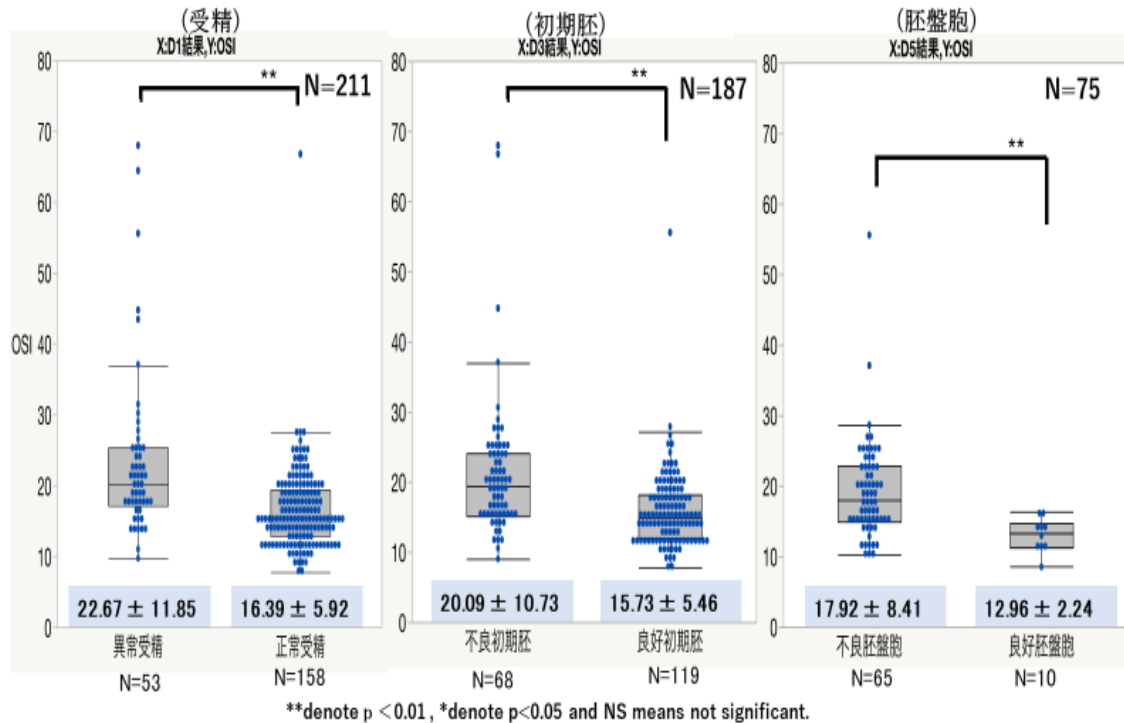


良好胚盤胞および不良胚盤胞でそれぞれ  $357.60 \pm 70.82$  U. CARR および  $415.54 \pm 114.96$  U. CARR であった ( $P = 0.0431$ )。5 日目の胚の BAP 値は、良好胚盤胞群は  $2789.00 \pm 505.45 \mu\text{mol/L}$  で、不良な胚盤胞群は  $2248.25 \pm 476.17 \mu\text{mol/L}$  であった ( $P = 0.0083$ )。

箱ひげ図のひげの上端は最大値、箱の上端は第三四分位、箱の中央の線は中央値、箱の下端は第一四分位、ひげの下端は最小値を示す。



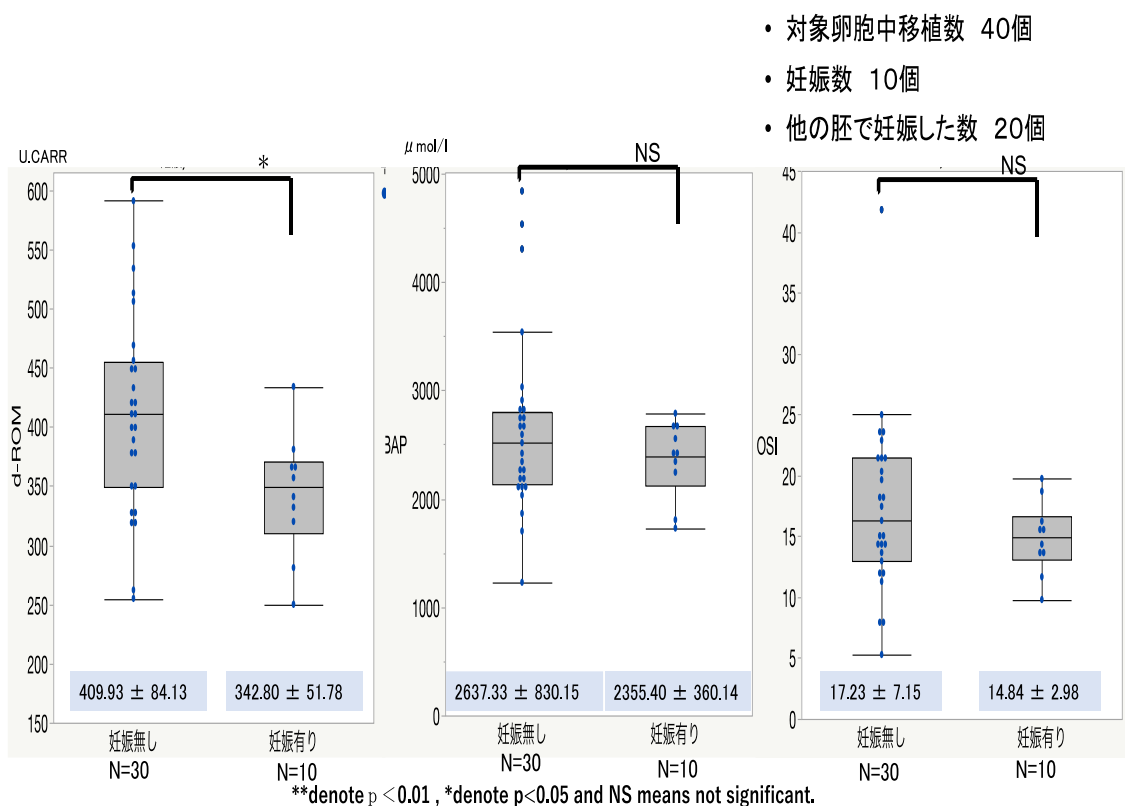
図 30 受精状態・初期胚・胚盤胞での OSI の比較



OSI は、正常な受精群で  $16.39 \pm 5.92$ 、異常な受精群で  $22.67 \pm 11.85$  であった ( $P < 0.0001$ )。3 日目の初期胚の OSI は、良好胚では  $15.73 \pm 5.46$ 、不良胚では  $20.09 \pm 10.73$  であった ( $P < 0.0001$ )。5 日目の胚の OSI は、良好胚盤胞群は  $12.96 \pm 2.24$  で、不良な胚盤胞群は  $17.92 \pm 8.41$  であった ( $P < 0.0001$ )。

箱ひげ図のひげの上端は最大値、箱の上端は第三四分位、箱の中央の線は中央値、箱の下端は第一四分位、ひげの下端は最小値を示す。

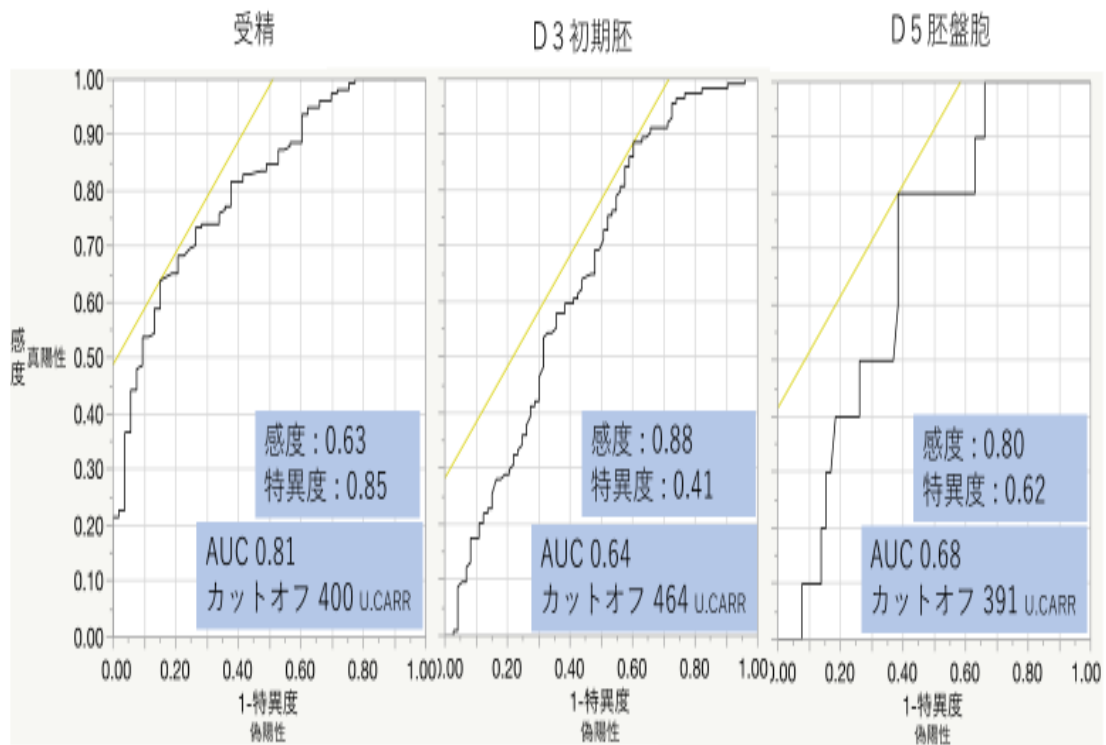
図 31 妊娠の有無による酸化ストレス・抗酸化力・OSI の比較



d-ROM は妊娠ありの群で 342.80 ± 51.78 U.CARR、妊娠なしの群で 409.93 ± 84.13 U.CARR であった (P = 0.025)。BAP 値は、妊娠なしの群は 2637.33 ± 830.15 μmol/L、妊娠ありの群は 2355.40 ± 360.14 μmol/L であった。有意差は認めなかった (P = 0.41)。OSI は妊娠なしの群で 17.23 ± 7.15、妊娠ありの群で 14.84 ± 2.98 であった。有意差は認めなかった (P = 0.25)

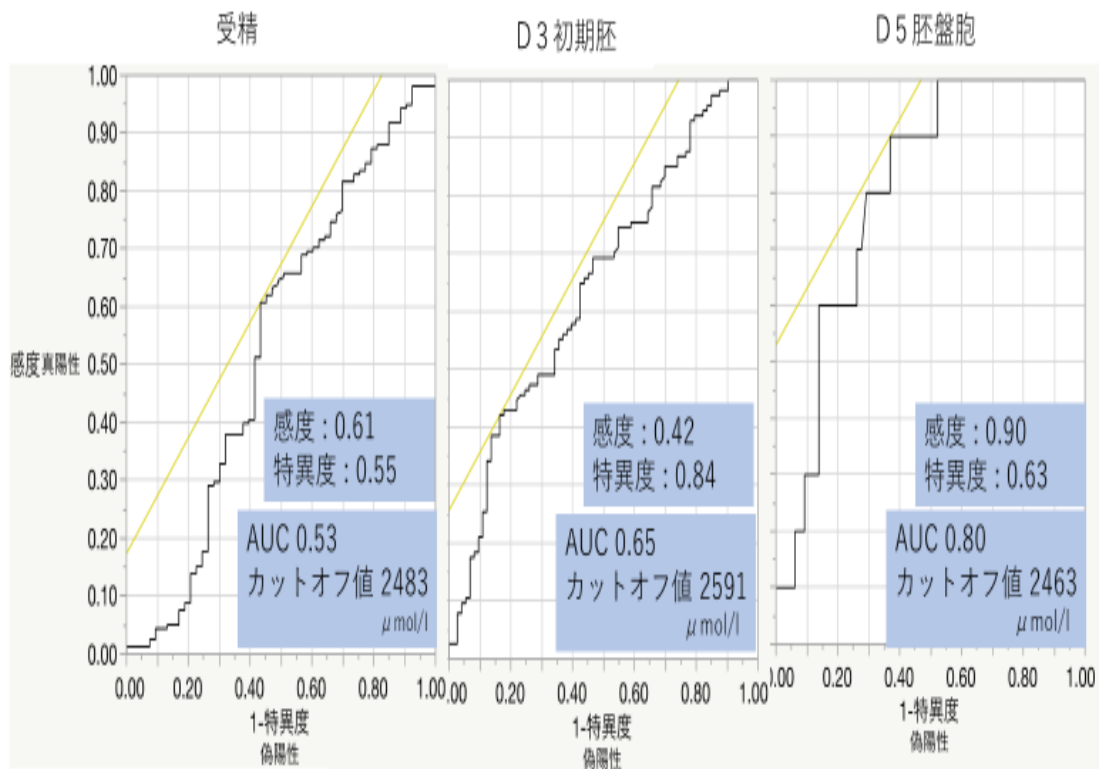
箱ひげ図のひげの上端は最大値、箱の上端は第三四分位、箱の中央の線は中央値、箱の下端は第一四分位、ひげの下端は最小値を示す。

図 32 d-ROM における受精・初期胚・胚盤胞でのカットオフ値



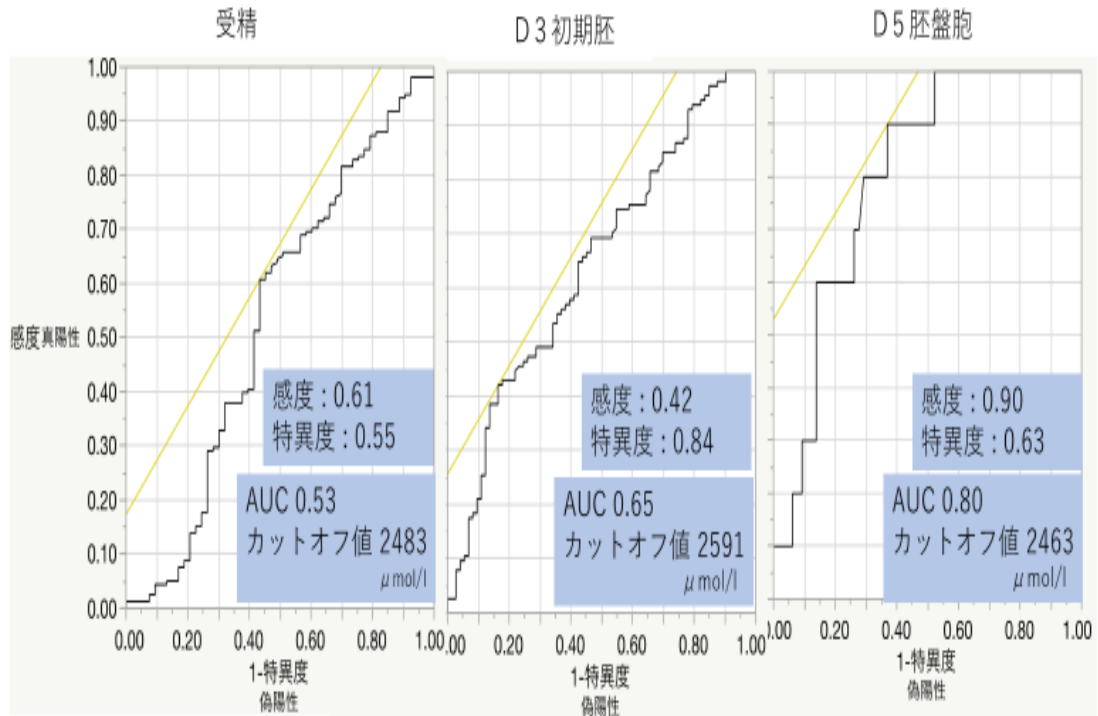
d-ROM については正常受精のカットオフ値は 400 U.CARR、AUC 0.81、D3 の良好初期胚のカットオフ値は 464 U.CARR、AUC 0.64、D5 の良好胚盤胞のカットオフ値は 391 U.CARR、AUC 0.68 であった。

図 33 BAP における受精・初期胚・胚盤胞でのカットオフ値



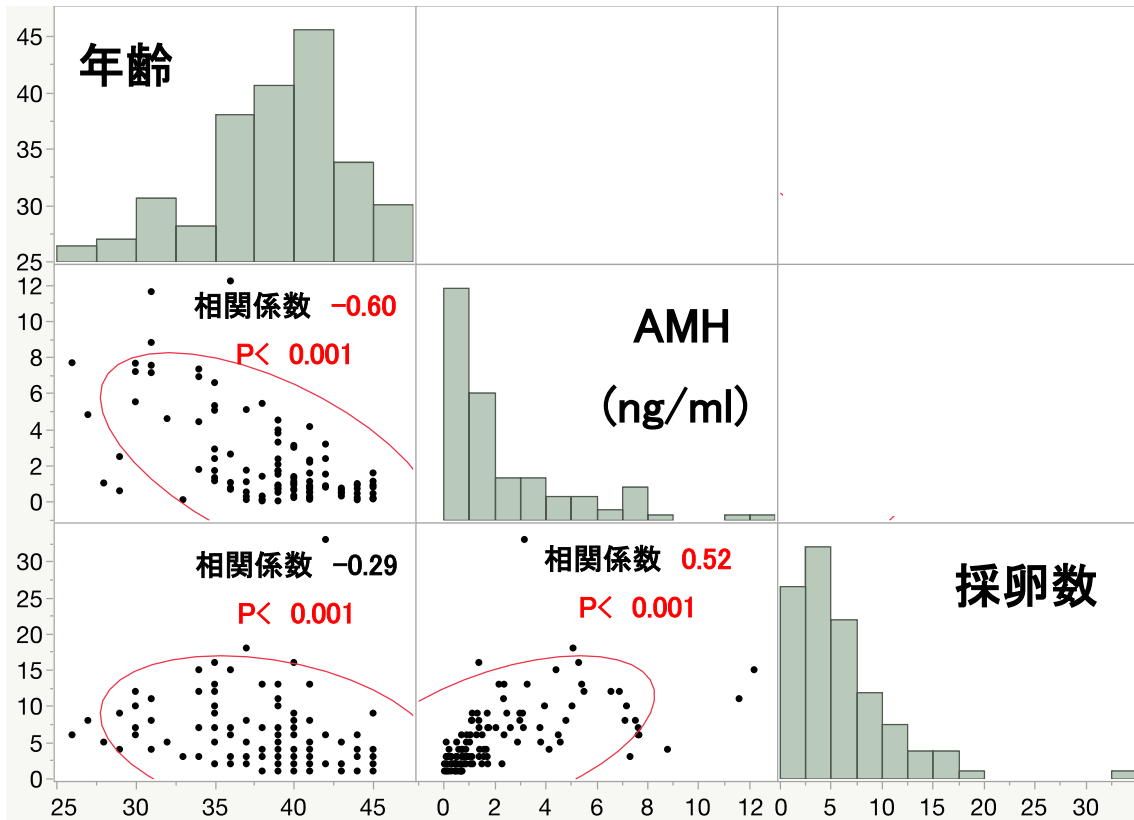
BAP については正常受精のカットオフ値は 2483  $\mu\text{mol/L}$ 、AUC 0.53、D3 の良好初期胚のカットオフ値は 2591  $\mu\text{mol/L}$ 、AUC 0.65、D5 の良好胚盤胞のカットオフ値は 2463  $\mu\text{mol/L}$ 、AUC 0.80 であった。

図 34 OSI における受精・初期胚・胚盤胞でのカットオフ値



OSI については正常受精のカットオフ値は 16.64、AUC 0.73、D3 の良好初期胚のカットオフ値は 18.32、AUC 0.71、D5 の良好胚盤胞のカットオフ値は 14.25、AUC 0.83 であった。

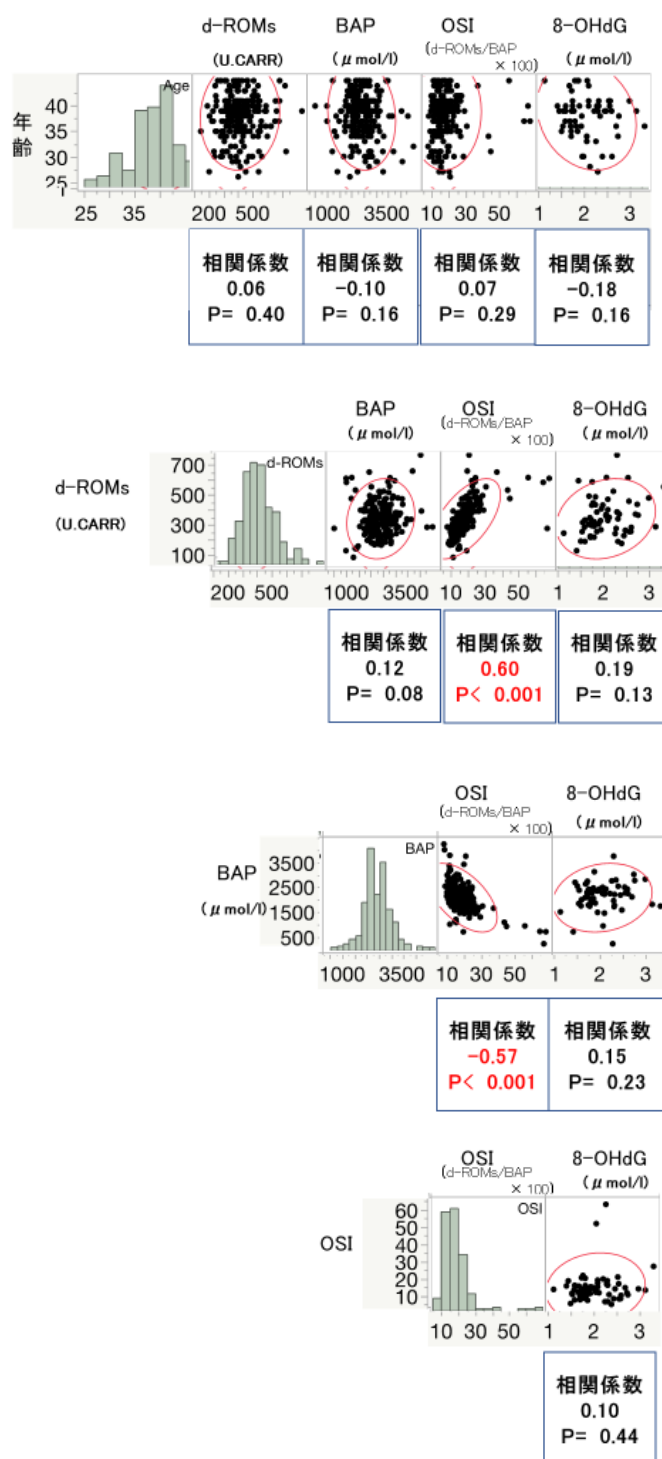
図 35 年齢と AMH、採卵数の相関



年齢との相関を検討したところ、既報と一致して、年齢、AMH、および収集された卵子の数の間に相関関係がみとめられた。AMH および採卵総卵子数は、年齢の増加に伴い減少した (P < 0.001)。

ヒストグラムは各値を示した患者数を示す。散布図の上の楕円は 95% の二変量正規確率楕円を示す。

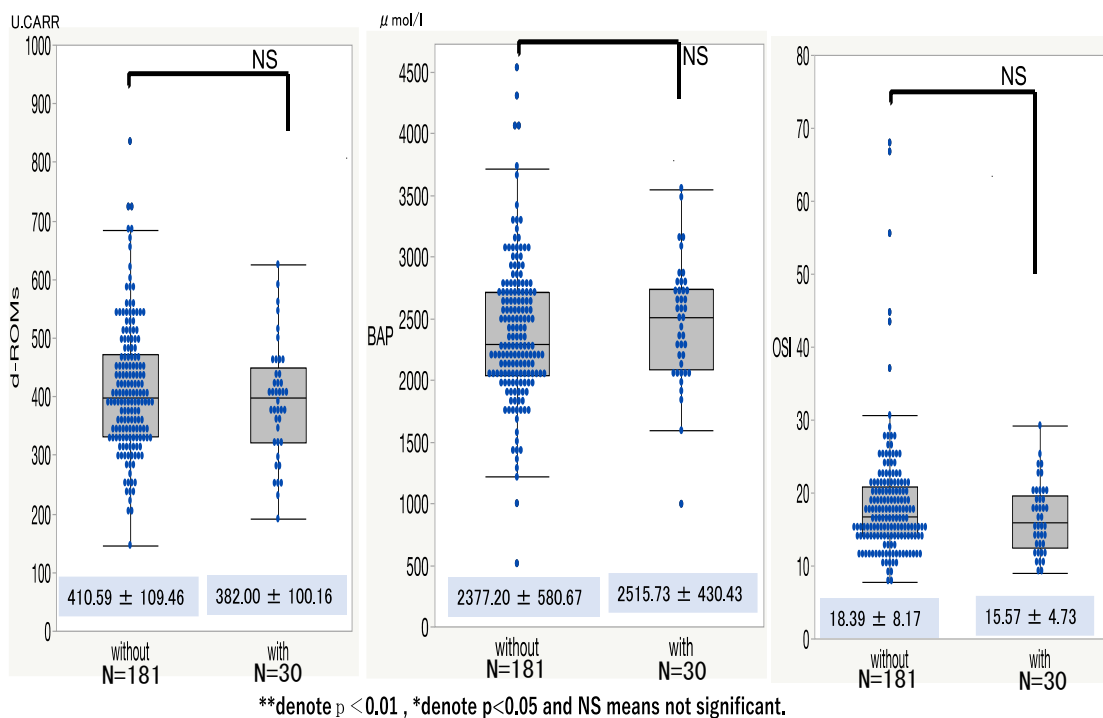
図 36 年齢と酸化ストレスの相関



年齢と d-ROM、BAP と OSI の相関は認めなかった。OSI と d-ROM は相関係数 0.60 ( $P < 0.001$ ) で正の相関、OSI と BAP は  $-0.57$  ( $P < 0.001$ ) で負の相関を認めた。ヒストグラムは各値を示した患者数を示す。散布図の上の楕円は 95% の二変量正規確率楕円を示す。

図 37 卵巣子宮内膜症性嚢胞の有無での

酸化ストレス・抗酸化力・OSI の検討



卵巣子宮内膜症性嚢胞の合併症のある患者 20 人の 30 個の卵胞液とない患者の卵胞液で測定した d-ROM、BAP と OSI を比較し、有意差は認められなかった。

箱ひげ図のひげの上端は最大値、箱の上端は第三四分位、箱の中央の線は中央値、箱の下端は第一四分位、ひげの下端は最小値を示す。