

## 論文の内容の要旨

論文題目 卵胞液中の酸化ストレスが受精卵に及ぼす影響の検討

氏名 寺尾 宏美

**目的：**近年の日本では、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。晩婚化が少子化の一因とされているが、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を明らかにするため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。

**方法：**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（Assisted reproductive technology）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。卵胞液から卵子卵丘複合体を回収し、裸化处理を行った後、細胞質内精子注入法（Intracytoplasmic sperm injection：ICSI）で受精させた。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。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。受精の状態は、2 つの前核（Pronucleus：PN）の確認をもって正常な受精とした。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。初期胚はグレード 1～3（Veeck 分類による）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。卵子を回収した後の卵胞液を採取して酸化ストレスと抗酸化能を分析した。酸化ストレスと抗酸化能の測定はフリーラジカル選択評価器（FREE Carriro Duo; Diacron International srl, Grosseto, Italy）および Diacron-reactive oxygen metabolites：d-ROM / Biological antioxidant potential marker：BAP キット（FREE Carriro Duo; Diacron International srl, Grosseto, Italy）を使って測定した。また、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。

**結果：**対象患者の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。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。酸化ストレスはd-ROMテストで測定し、抗酸化能はBAPテストで測定した。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。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の違いを検討し、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。

受精状態とd-ROMとBAPの関係を分析し、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 ( $P < 0.0001$ )。BAPは正常な受精群は $2392.72 \pm 537.77 \mu\text{mol/L}$ 、異常な受精群は $2394.92 \pm 654.03 \mu\text{mol/L}$ であり有意差は認めなかった ( $P = 0.98$ )。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 ( $P = 0.0023$ )。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 ( $P = 0.0002$ )。5日目の胚では、d-ROM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 ( $P = 0.0431$ )。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 ( $P = 0.0083$ )。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日目の初期胚では、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日目の胚では、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 (胚盤胞 ( $P < 0.0001$ ))。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。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。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、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。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。

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の間に相関関係がみとめられた。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。

**結論：**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。