

—原著—

# 透明帯形態異常卵の成熟判定および臨床利用

## Maturity classification and clinical application of oocytes with abnormal zona pellucida

福永 憲隆<sup>1,2\*</sup>・野老 美紀子<sup>1,2</sup>・浅田 義正<sup>1,2</sup>  
Noritaka Fukunaga<sup>1,2\*</sup>, Mikiko Tokoro<sup>1,2</sup> and Yoshimasa Asada<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>医療法人浅田レディースクリニック 〒450-0002 名古屋市

<sup>2</sup>浅田生殖医療研究所 〒486-0931 春日井市

<sup>1</sup>Asada Ladies Clinic, 5F Nagoya Building, 4-6-17 Meieki Nakamura-ku, Nagoya, Aichi 450-0002, Japan

<sup>2</sup>Asada Institute for Reproductive Medicine, 4F RENAK, 1-4 Matsushin-cho, Kasugai, Aichi 486-0931, Japan

**要旨：**卵子の成熟は第一極体の有無によって判断されるが、形態的異常によって成熟判定が妨げられる場合が存在する。当院で採卵を行った症例のなかに、透明帯の外側に突起状の形態が複数存在し、囲卵腔が極端に少ないという共通の特徴をもつ6例の経験があり、多くの卵子で極体の存在が確認できずに未成熟卵子として判断され、媒精の対象にならずにいた。そこで我々は、この6症例の卵子紡錘体と染色体を染色した結果、未成熟と判断されたなかには、MII期まで成熟している卵子が存在していることが明らかになった。この結果をもとに、紡錘体可視化装置による成熟判定を行い、得られたMII期卵子に媒精を行った結果、2前核をもつ受精卵が得られ、胚移植の結果、2症例で児を得ることに成功した。卵子の形態的異常により、成熟判定が難しい症例については判定の方法を変えることで、より多くの成熟卵子が獲得できると考えられる。

**キーワード：**卵子、透明帯、形態異常、卵子成熟、蛍光免疫染色

**Abstract:** Oocyte maturation is usually determined by the presence or absence of the first polar body, but there are cases in which maturation determination is prevented by morphological abnormality. Six cases who underwent oocyte retrieval at our clinic had common features such as indented zona pellucida and narrow perivitelline spaces. Many oocytes derived from these cases were judged immature oocytes without the presence of polar bodies, and insemination was not performed. Immunofluorescence staining of spindles and chromosomes, in some of the oocytes collected from these 6 cases that were judged to be immature, revealed that some of the oocytes had matured to the MII stage. Based on this result, oocyte maturation was determined using a spindle visualization device and insemination of MII oocytes was performed. Fertilized oocytes with two pronuclei were obtained, and after embryo transfer, two infants were successfully delivered. For cases where it is difficult to determine maturity due to morphological abnormalities of oocytes, a larger number of mature oocytes can be obtained by changing the determination method.

**Key words:** Oocyte, Zona pellucida, Morphological abnormality, Oocyte maturation, Immunofluorescence staining

### はじめに

(受付 2019年12月20日／受理 2020年1月28日)  
別刷請求先：〒450-0002 愛知県名古屋市中村区名駅4-6-17  
名古屋ビルディング5F  
医療法人浅田レディースクリニック

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: n\_fukunaga@ivf-asada.jp

卵子の核および細胞質の成熟は、生殖補助医療において、その後の媒精や胚発生の成績に影響を与える重要な因子である。排卵直前の卵子には、卵子細胞質と透明帯の間にある囲卵腔に第一減数分裂によって放出した極体が存在する。そのため、第一極体の有無は採卵後の卵子の成熟を判断する一つの基準となっている。しかしながら、卵子の形態異常

により、正確に成熟を判断することが難しいケースが存在する。形態異常は、卵子の細胞質内または細胞質外の異常に分けられ、細胞質内としては cytoplasmic granulation (CLCG)<sup>1)</sup>, smooth endoplasmic reticulum clusters (sERC)<sup>2)</sup>, aggregates of tubular smooth endoplasmic reticulum (aSERT)<sup>3)</sup> などが報告されている。一方、細胞質外としては、極体、囲卵腔、極体などの形態異常が含まれ、透明帯についてはその厚みや形態が受精や発生に与える影響が報告されている<sup>4-7)</sup>。特に、透明帯の形態異常によって卵子の成熟判定が難しいケースとして、ギザギザした形状の透明帯をもつ卵子があり<sup>8, 9)</sup>、この特徴としては、採卵したすべての卵子が同様の透明帯形態異常を示し、囲卵腔が極端に小さく、それにより第一極体が確認できず成熟判定が難しい。当院においても、これまでに同様の症例を6例確認しており、そのうち3症例については、通常の顕微鏡観察では採卵した卵子をすべて未熟と判断され、媒精に至ることができなかった。そこで本検討では、それら透明帯に形態異常がみられた卵子の成熟を蛍光免疫染色によって確認し、症例にあった

卵子成熟判定方法の確立とそれら卵子の受精率および出産率について検討を行った。

## 対象と方法

### 対象症例

本検討は、透明帯に特徴的な形態異常が見られた6症例を対象とした(表1: 症例1-6)。それら6症例の卵子は次の3つの形態的特徴があった。1. 透明帯と卵子細胞質が密接しており囲卵腔がない。2. 囲卵腔がないために極体の存在が確認しづらい。3. 透明帯がトゲトゲした形状や層になっているような形状であり厚さが均一でないことが多い(図1上段)。これらの症例では、複数回の採卵を行っても同じような特徴を持つ卵子が得られることを確認している。対照群として、透明帯に形態異常が見られない症例4症例を選別し検討に用いた(表1: 症例7-10, 図1下段)。

### 卵子細胞質および囲卵腔面積の算出と統計解析

透明帯に形態異常がみられた6症例の卵子では、採卵した

表1 対象症例の患者背景

症例	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
透明帯形態異常	あり	あり	あり	あり	あり	あり	なし	なし	なし	なし
採卵時年齢(歳)	36	27	35	33	39	28	36	36	35	36
AMH (ng/mL)	2.92	6.78	0.59	3.46	1.38	7.49	8.82	1.38	2.37	6.50
前周期基礎値FSH (mIU/mL)	6.4	5.3	5.5	7.8	6.8	7.8	7.4	6.5	7.5	5.4
前周期基礎値LH (mIU/mL)	2.8	2.7	1.4	10.8	2.5	6.1	4.3	7.4	4.4	5.4
BMI	19.7	20.6	18.3	19	21.1	21.9	20.6	17.2	16.9	19.0
妊娠歴	1	0	0	0	2	0	1	2	3	1
出産歴	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1

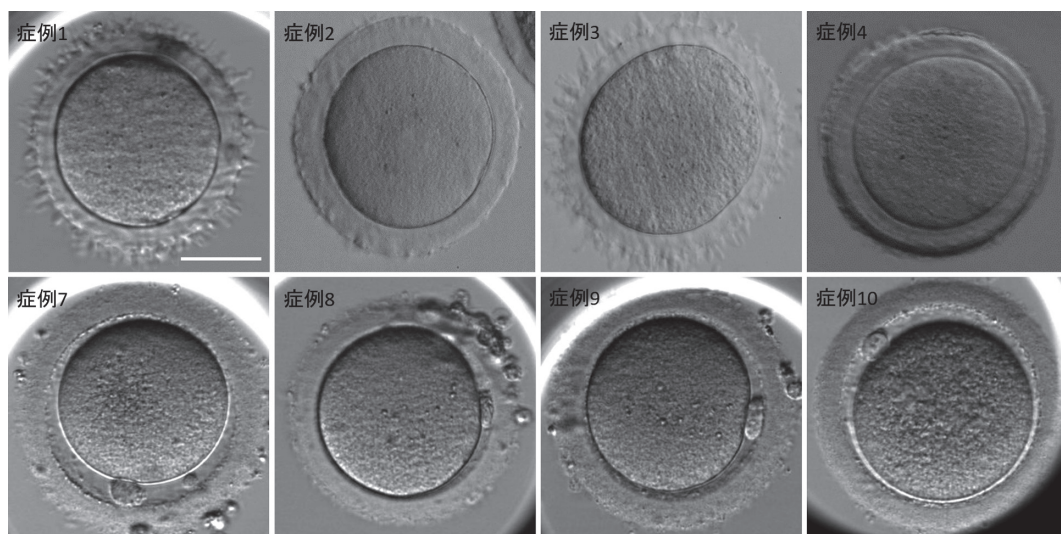


図1 透明帯形態異常を示す症例の卵子

透明帯形態異常を示す4症例および形態異常を示さなかった(対照群)4症例の卵子画像を示す。上の症例1-4が透明帯形態異常を示した症例。下の症例7-10が透明帯形態異常を示さなかった症例。Scale barは50 μmを示す。

すべての卵子が同様の透明帯形態異常を示し、囲卵腔がなく、卵子細胞質が透明帯の内側に接している状態であることが多い。これらの卵子では、一般的な卵子と比較して卵子細胞質が大きいのか、または囲卵腔が小さいのかを検討するために、卵子細胞質および囲卵腔の面積を画像解析により算出した。面積の比較には、透明帯に形態異常がみられた6症例のうち、媒精を行ったすべての卵子の画像が得られた症例2、症例3、症例4および症例6の卵子画像81枚と、同じ時期に採卵を行い透明帯に形態異常がみられなかった4症例の卵子画像69枚を用いた。面積の算出には画像解析ソフトであるImageJを用いた<sup>10)</sup>。スケールバーとともに撮影した卵子画像によってスケールを設定した後、卵子細胞質および透明帯内部をArea Selection ToolsのPolygon selectionsで囲い、それぞれの面積を算出した。統計解析には統計解析ソフトRを用い<sup>11)</sup>、2群間の比較はMann-Whitney U testで行った。

#### 蛍光免疫染色

透明帯に形態異常がみられた6症例のうち4症例(症例1-4)については、採卵後および追加培養後の観察で未成熟と判断され廃棄対象となり、研究利用へ同意を得た未成熟卵子を用いて蛍光免疫染色を行った。卵子を4%パラフォルムアルデヒドで固定した後、0.2% TritonX-100を含む3% BSA-PBSで透過した。一次抗体には紡錘体を染色する $\alpha$ -tubulin 抗体(#2125, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA)、二次抗体にはAlexa Fluor 488付加anti-rabbit IgG 抗体(A11034, Thermo Fisher, Massachusetts, USA)を使用した。一次抗体は3% BSA-PBSで1,000倍希釈し4℃で一晩、二次抗体は3% BSA-PBSで1,000倍希釈し室温で1時間反応させた。抗体反応の後、DAPI (10236276001, Sigma-Aldrich, Missouri, USA)により染色体の染色を行った。観察はスピニングディスク式共焦点レーザー顕微鏡(CV1000, Yokogawa Electric, Tokyo, Japan)で行った。CV1000 Software ver. 1.06 (Yokogawa Electric)の操作下において、405および488 nmの波長、40倍対物レンズ(UPlanSApo40x, NA = 1.25)を用いて、2.0  $\mu$ m間隔で71枚撮影した。

#### 研究倫理

本検討は当院の倫理委員会の承認を得た後、日本産科婦人科学会の研究登録後に行った。

### 結 果

#### 患者背景

対象とした10症例の患者背景として、採卵時年齢、AMH、前周期基礎値FSH、前周期基礎値LH、BMI、当院治療前の妊娠歴および出産歴を調べた(表1)。症例1から症例6が透明帯形態異常を示した症例、症例7から症例10が透明帯形態異常を示さなかった症例を示す。症例2、3、4および6については、いずれも妊娠歴および出産歴はなかった。症

表2 蛍光免疫染色による卵子成熟判定結果

症例	1	2	3	4
染色卵子数	26	5	18	16
MII卵子数 (%)	1 (3.8)	3 (60.0)	8 (44.4)	3 (18.8)

例1は1回の妊娠歴、症例5は2回の妊娠歴および1回の出産歴があった。6症例の平均年齢は33歳であり、その他患者背景に共通点や特筆すべき項目は見当たらなかった。

#### 卵子細胞質および囲卵腔面積の比較

卵子細胞質の面積は、透明帯の形態が異常な卵子で10,498.07  $\mu$ m<sup>2</sup>、正常な卵子では10,540.26  $\mu$ m<sup>2</sup>であり差は見られなかった(図2,  $P = 0.943$ )。一方、囲卵腔の面積は、透明帯の形態が異常な卵子で10,848.70  $\mu$ m<sup>2</sup>、正常な卵子では12,843.44  $\mu$ m<sup>2</sup>であり有意な差がみられた(図2,  $P < 0.01$ )。それぞれの数値は中央値を示す。

#### 蛍光免疫染色による卵子成熟判定

対象とした6症例のうち、4症例(症例1-4)については採卵後極体が確認できず、未成熟卵子と判断され廃棄が決定した卵子について蛍光免疫染色を行った。染色を行った卵子のうち、卵子細胞質内に紡錘体に囲まれた染色体が存在するが、囲卵腔に染色体を含む極体が存在しないものをMI期卵子、一方、卵核胞卵子細胞質内に紡錘体に囲まれた染色体が存在し、囲卵腔に染色体を含む極体が存在した卵子をMII期卵子と判断した(図3)。その結果、症例1では3.8% (1/26)、症例2では60.0% (3/5)、症例3では44.4% (8/18)、症例4では18.8% (3/16)の卵子がMII期卵子であった(表2)。

#### Oosight imaging system (OIS) による紡錘体観察と媒精後の正常受精率

蛍光免疫染色による結果、これまで未成熟と判断されていた卵子の中に成熟卵子が存在していることが明らかになったことから、当院ではそれ以降媒精方針を変更し、対象症例は蛍光免疫染色ではなくOISによる紡錘体の観察を行うこととした。方針変更後の紡錘体の観察結果と受精後の前核形成率を表3に示す。OISによる観察の結果、症例2では採卵卵子数あたりの紡錘体可視であった卵子が88.2% (15/17)、症例3では73.7% (14/19)、症例4では80.0% (12/15)で紡錘体の存在が確認できた。2前核形成率は顕微授精では、症例2で50.0% (8/16)、症例3で52.6% (10/19)、症例4で69.2% (9/13)、症例5で71.4% (5/7)、症例6で100% (21/21)であった。症例5および6については、体外受精による媒精も行ったが、いずれも受精卵を得ることができなかった(症例5: 0% (0/3)、症例6: 0% (0/6))。症例1は方針変更前に当院における治療を終了したため除外した。



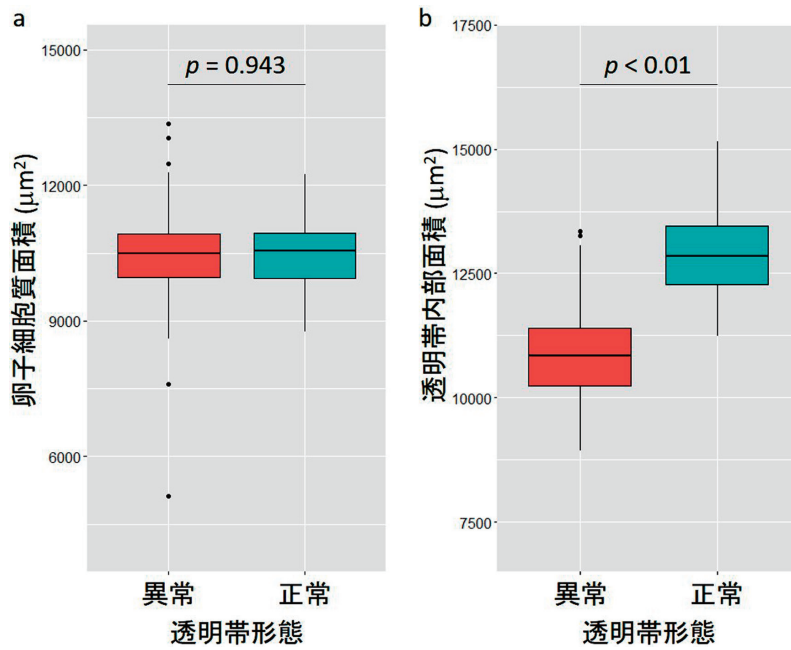


図2 卵子細胞質面積および透明帯内部面積の比較  
透明帯形態異常を示す卵子と正常な形態の卵子について卵子細胞質面積(a)と透明帯内部の面積(b)を比較したグラフ。赤色のバーが透明帯形態異常を示した卵子の値、青色のバーが正常な形態の卵子の値を示す。

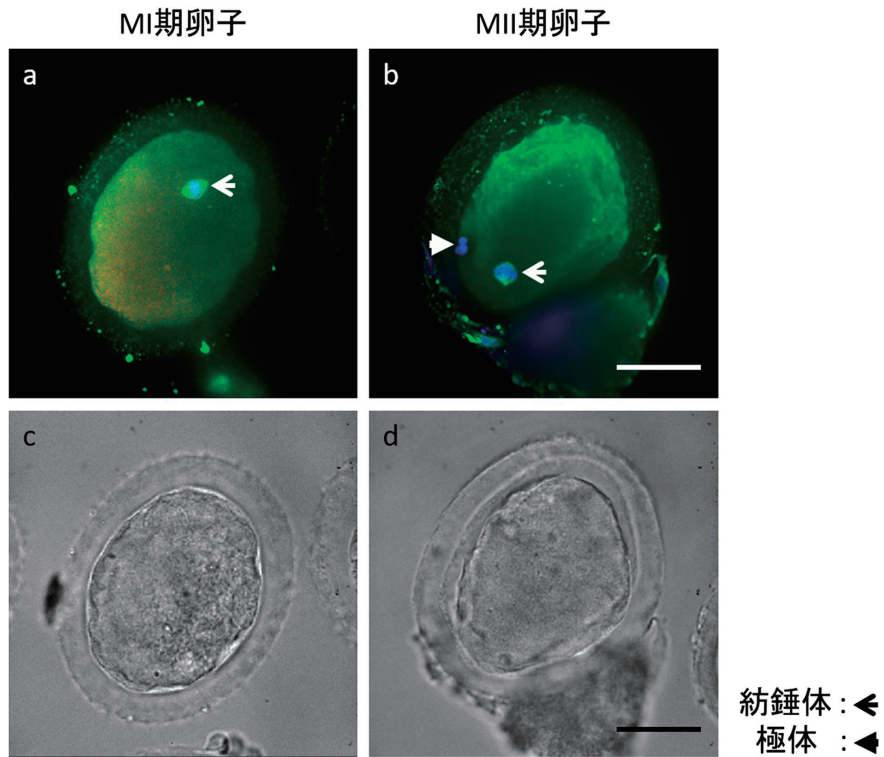


図3 蛍光免疫染色による卵子染色像  
緑色が紡錘体で青色が染色体を示す。左の卵子には細胞質内に紡錘体(矢じり)に囲まれた染色体(矢頭)が1か所存在したことからMI期卵子判定した。右の卵子には細胞質内に紡錘体に囲まれた染色体が1か所と、围卵腔に極体を示す染色体が存在したことからMII期卵子と判定した。aおよびbは蛍光免疫染色像、cおよびdは明視野像。Scale barは50 μmを示す。

表3 Oosight imaging system (OIS) による紡錘体観察結果と媒精後の前核形成結果

症例	2	3	4	5	6
採卵周期数	2	8	2	1	1
採卵卵子数	17	19	15	15	32
紡錘体可視卵子数 (%)	15 (88.2)	14 (73.7)	12 (80.0)	—	—
ICSI 供試数	16	19	13	7	21
ICSI 後2前核形成数 (%)	8 (50.0)	10 (52.6)	9 (69.2)	5 (71.4)	21 (100)
C-IVF 供試数	—	—	—	3	6
C-IVF 後2前核形成数 (%)	—	—	—	0 (0)	0 (0)

紡錘体可視卵子数の割合は採卵卵子数を母数とした。  
前核形成の割合は各媒精供試数を母数とした。

表4 胚移植後の成績

症例	2	3	4	5	6
Day3 移植 (周期)	3	4	3	2	0
胚盤胞期移植 (周期)	4	2	0	0	3
胎嚢確認数 (%)	1 (14.3)	4 (66.7)	0 (0)	0 (0)	2 (66.7)
出生児数 (%)	1 (14.3)	0 (0) <sup>※1</sup>	0 (0)	0 (0)	1 (33.3) <sup>※2</sup>

胎嚢確認および出生児の割合は、Day3 および胚盤胞移植周期数の合計を母数とした。

#### 透明帯形態異常卵子由来胚の移植結果

得られた胚は凍結融解後、ホルモン補充療法による子宮内膜調整にあわせて、Day3 または胚盤胞期で移植を行った。その結果、症例4 および5 では複数回の移植を行ってもGSを確認することができなかったが、症例2、3 および6 では胎嚢確認ができ、さらに症例2 および6 では児を得ることができた (症例3はGS確認後良好として転院した後報告なし<sup>※1</sup>、また症例6は2周期目の移植を行い現在妊娠継続中のため出生児数を1とした<sup>※2</sup>、表4)。得られた児についてはいずれも出生時に先天性異常は確認されていない。表4の胎嚢確認および出生児の割合は、Day3 および胚盤胞移植周期数の合計を母数とした。

#### 考 察

本検討により、透明帯の形態異常により囲卵腔が極端に少なく、第一極体が観察できずに未成熟と判断されていた卵子のなかには成熟卵子が存在することが明らかになった。さらに、それら卵子由来の胚を移植することで児を得ることに成功した。

透明帯の形態異常を示す6症例は、卵子の形態は似ているものの、ホルモン値や治療歴などの記録している限りの患者背景では共通点を見つけることができず、どのような原因によって透明帯の形態異常が起きたのかは不明である。一般的な形態を示す卵子の透明帯は小胞が多く存在する均一な構造であるが、本検討の対象となった6症例と同様形態を示す透明帯は、密度の異なる2層になっていることが電子顕微鏡による観察で明らかになっている<sup>9)</sup>。外側の層には突起と大きく窪んだ領域があり、内側の層には細胞の残骸が多く存在し、それにより一部では透明帯が押し広げられ厚

い層を形成している。また、同様の形態異常を示す卵子では、一般的な形態を示す卵子より透明帯が薄く、卵子細胞質から透明帯内側までの距離が短いと報告されている<sup>8)</sup>。本検討において透明帯形態異常を示す卵子では、囲卵腔の面積が一般的な形態を示す卵子よりも小さいという結果を示している。これは、残存している細胞が透明帯を厚くしたことで、囲卵腔が小さくなったものと考えられる。

透明帯の形態異常を示す卵子をOISによって観察することにより、およそ80%の卵子で紡錘体を観察することができた (表3)。一方、蛍光免疫染色により紡錘体と極体を観察し、MII期卵子と判断した卵子は3.8–60.0%とOISでの観察結果と比較して低い値になった (表2)。また、OISで紡錘体を観察した症例の2前核形成率は50.0–69.2%であり (表3)、およそ半数は前核が形成されなかった、もしくは多前核が形成された。これらの結果より、OISで紡錘体が観察できた卵子のなかにはMII期卵子だけでなくMI期卵子も含まれており、これらの卵子が異常受精卵子となっている可能性が考えられる。また、媒精方針の変更後、極体の確認およびOISによる卵子成熟判定を行っても、MIまたはMIIと判断が難しい卵子については顕微授精による媒精を行ったため、媒精した卵子のおよそ半数で前核が形成されなかった、または多前核形成されたと考えられる。

透明帯形態異常を示した卵子由来の胚をDay3または胚盤胞期で移植した結果、5症例のうち2症例で児を得ることができた (表4)。症例3–5では得られず、症例1では児が得られたもののその割合は14.3%と高くはない。これまでの報告では、透明帯の構造異常については明らかにされているが<sup>8, 9)</sup>、卵子細胞質の構造や成熟については、一般的な構造の卵子と比較はされていない。本検討で明らかになった2前

核形成率や出生児率から、これらの卵子では透明帯だけでなく、卵子細胞質にも質の違いがあることが予想される。

しかしながら、形態異常を示す卵子のなかには成熟卵子が存在し、さらに妊娠および出産に至る胚も存在することが明らかになっている。これらの形態異常を示す卵子では、第一極体の確認が難しいため、未成熟な卵子に媒精をしてしまう場合も考えられる。媒精前の卵子は困卵腔が極端に狭い状態であるが、媒精後数時間経過した第二極体放出時期になると卵子細胞質が収縮し、それまで観察しづかった第一極体も観察できるようになる(補足図1)。これにより、第一および第二極体の放出を確認することで、より正確に受精卵の選別ができると考えられる。また、媒精後の前核期において正確に2前核を示す受精卵を選別することも重要である。

このような形態異常卵子しか得られない症例においては、紡錘体や極体の観察方法を変更するなどの工夫により、一つでも多くの成熟卵子を得ることが必要と考えられる。

#### 文 献

- 1) Serhal, P., Ranieri, D., Kinis, A., Marchant, S., Davies, M. and Khadum, I. (1997): Oocyte morphology predicts outcome of intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod. (Oxford, England)*, 12, 1267–1270.
- 2) Otsuki, J., Okada, A., Morimoto, K., Nagai, Y. and Kubo, H. (2004): The relationship between pregnancy outcome and smooth endoplasmic reticulum clusters in MII human oocytes. *Hum. Reprod.*, 19, 1591–1597.
- 3) Sá, R., Cunha, M., Silva, J., Luís, A., Oliveira, C., da Silva, J.T., Barros, A. and Sousa, M. (2011): Ultrastructure of tubular smooth endoplasmic reticulum aggregates in human metaphase II oocytes and clinical implications. *Fertil. Steril.*, 96, 143–149.
- 4) Rienzi, L., Vajta, G. and Ubaldi, F. (2010): Predictive value of oocyte morphology in human IVF: a systematic review of the literature. *Hum. Reprod. Update*, 17, 34–45.
- 5) Alikani, M., Palermo, G., Adler, A., Bertoil, M., Blake, M. and Cohen, J. (1995): Intracytoplasmic sperm injection in dysmorphic human oocytes. *Zygote*, 3, 283–288.
- 6) Rienzi, L., Ubaldi, F.M., Iacobelli, M., Minasi, M.G., Romano, S., Ferrero, S., Sapienza, F., Baroni, E., Litwicka, K. and Greco, E. (2008): Significance of metaphase II human oocyte morphology on ICSI outcome. *Fertil. Steril.*, 90, 1692–1700.
- 7) Ebner, T., Balaban, B., Moser, M., Shebl, O., Urman, B., Ata, B. and Tews, G. (2010): Automatic user-independent zona pellucida imaging at the oocyte stage allows for the prediction of preimplantation development. *Fertil. Steril.*, 94, 913–920.
- 8) Shi, S.L., Yao, G.D., Jin, H.X., Song, W.Y., Zhang, F.L., Yang, H.Y. and Sun, Y.P. (2016): Correlation between morphological abnormalities in the human oocyte zona pellucida, fertilization failure and embryonic development. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 9, 260–267.
- 9) Sousa, M., da Silva, J.T., Silva, J., Cunha, M., Viana, P., Oliveira, E., Sa, R., Soares, C., Oliveira, C. and Barros, A. (2015): Embryological, clinical and ultrastructural study of human oocytes presenting indented zona pellucida. *Zygote*, 23, 145–157.
- 10) Schneider, C.A., Rasband, W.S. and Eliceiri, K.W. (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 9, 671.
- 11) Team, R.C. (2013): R: a language and environment for statistical computing.