

—原著—

透明帯欠損卵子がみられた症例の分析と培養成績の検討

Patient characteristics associated with zona-free oocytes and their developmental ability *in vitro*

水本 茂利*・長尾 洋三・田中 啓子・渡辺 瞳・江夏 悠介・
大塚 未砂子・吉岡 尚美・村上 貴美子・蔵本 武志

Shigetoshi Mizumoto*, Yozo Nagao, Keiko Tanaka, Hitomi Watanabe, Yusuke Enatsu,
Misako Otsuka, Naomi Yoshioka, Kimiko Murakami and Takeshi Kuramoto

蔵本ウイメンズクリニック 〒812-0013 福岡市

Kuramoto Women's Clinic, 1-1-19 Hakataeki-higashi, Hakata-Ku, Fukuoka 812-0013, Japan

要旨：生殖補助医療 (ART) において、稀に透明帯が欠損した卵子 (Zona free 卵子：ZF 卵子) が観察される。ZF 卵子は、受精・発生能を持つものの物理的に脆弱であり、その発生を未然に防ぐことが望ましい。そこで本研究では、ZF 卵子発生のリスク因子を特定することを目的とし、採卵周期に ZF 卵子がみられた症例 (ZF 群) とみられなかった症例 (対照群) の比較を行った。また、リスク因子が培養成績に及ぼす影響を検討した。ロジスティック回帰分析の結果、喫煙 (オッズ比：2.46, 95% confidence interval (CI)：1.03–5.88, $P < 0.05$) および多嚢胞性卵巣症候群：PCOS (オッズ比：2.34, 95%CI：1.14–4.81, $P < 0.01$) が ZF 卵子発生のリスク因子であること、また高齢因子の場合 ZF 卵子が発生しにくいことが判明した (オッズ比：0.37, 95%CI：0.15–0.88, $P < 0.05$)。ZF 卵子の ICSI 後生存率および胚盤胞到達率は正常卵子と比較して低かった。一方で、対照群を喫煙区および PCOS 区に分けて培養成績を比較した結果、各因子の影響はみられなかった。本研究の結果より、喫煙、PCOS、加齢によって透明帯の質的变化が起こり、ZF 卵子の発生頻度に影響を及ぼすことが示唆された。今後、さらなる検討を行うことで ZF 卵子の発生を未然に防ぎ、ART における治療成績向上に繋がると考えられる。

キーワード：透明帯、透明帯異常、Zonafree 卵子

Abstract: In human assisted reproductive technology, zona-free (ZF) oocytes are sometimes observed. Although ZF oocytes have the ability to fertilize and develop, they are physically weak. Therefore, we compared the characteristics of patients with and without ZF oocytes to identify potential risk factors, and the effect of such factors upon *in vitro* developmental ability. Logistic regression analysis showed that smoking [odds ratio (OR): 2.46, 95% confidence interval (CI): 1.03–5.88, $P < 0.05$] and polycystic ovarian syndrome [PCOS: (OR: 2.34, 95%CI: 1.14–4.81, $P < 0.01$)] were risk factors of ZF oocyte formation, whereas ZF oocytes were less likely observed in the advanced age group (OR: 0.37, 95%CI: 0.15–0.88, $P < 0.05$). Although the survival rate after ICSI and blastocyst formation rate of ZF oocytes were lower, smoking and PCOS did not affect the *in vitro* developmental potential itself. The results of this study suggest that smoking, PCOS and advanced age affect the properties of the zona pellucida and the observed frequency of ZF oocytes. Further study may improve the outcomes of assisted reproductive technology.

Key words: Zona pellucida, Abnormal zona pellucida, Zona free oocyte

(受付 2023 年 7 月 20 日 / 受理 2023 年 9 月 21 日)

別刷請求先：〒812-0013 福岡県福岡市博多区博多駅東 1-1-19

蔵本ウイメンズクリニック

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: mizumoto@kuramoto.or.jp

緒言

透明帯は卵母細胞を取り囲む細胞外マトリックスであり、ヒト卵子においては ZP1～4 の 4 種の糖タンパク質で構成されている¹⁾。生殖における様々なステップで透明帯は重要

な働きを担っており、卵巣内において顆粒膜細胞と卵母細胞間の結合を保持し、相互作用を支持するほか、表層顆粒の崩壊に伴う多精子受精の防止機能、胚発生過程において割球を保護する役割等が知られている²⁾。

生殖補助医療 (ART) において、採卵やピペッティング操作により、稀に透明帯が剥離・欠損した卵子 (Zona free 卵子: ZF 卵子) がみられることがある。ZF 卵子は、顕微授精を行うことで正常に受精し、割球が離散することなく発生が進行すると胚盤胞に至り³⁾、凍結融解胚移植による生児獲得例も報告されている^{4, 5)}。このように、受精および胚発生過程において透明帯の存在自体は必須ではなく、ZF 卵子は ART を受ける患者にとって透明帯が正常な卵子 (以下 Intact 卵子) と同様に貴重な資源である。しかしながら、ZF 卵子は Intact 卵子と比較して物理的に脆弱であることは否めず⁶⁾、その発生を未然に防ぐことが望ましい。

そこで本検討では、ZF 卵子が発生する要因を明らかにすることを目的として、当院において ZF 卵子が確認された症例の分析およびリスク因子が培養成績に及ぼす影響について後方視的に調査した。

対象および方法

卵巣刺激に用いた薬剤

FSH 製剤は、ゴナール皮下注ペン (メルクバイオファーマ株式会社, 東京, 日本)、フォリルモン P (富士製薬工業株式会社, 富山, 日本) を使用した。hMG 製剤は、HMG フェリング (フェリングファーマ株式会社, 東京, 日本)、HMG 注射用「F」(富士製薬工業株式会社) を使用した。GnRH アゴニストは、プセレキア点鼻薬 (富士製薬工業株式会社) を使用した。黄体ホルモン剤は、デュファストン錠 (ヴィアトリス製薬, 東京, 日本)、ルトラール (富士製薬工業)、ヒスロン錠 (協和キリン, 東京, 日本)、メトロキシプロゲステロン酢酸エステル錠 (富士製薬工業) を使用した。GnRH アンタゴニストは、セトロタイド注射用 (メルクバイオファーマ株式会社)、ガニレスト皮下注シリンジ (オルガノン株式会社, 東京, 日本)、レルミナ錠 (あすか製薬株式会社, 東京, 日本) を使用した。抗エストロゲン剤としてクロミッド錠 (富士製薬工業) を使用した。hCG 製剤は、ゴナトロピン注用 (あすか製薬株式会社)、オビドレル皮下注シリンジ (メルクバイオファーマ株式会社) を使用した。

採卵および卵丘細胞の除去

採卵は経膈エコー下で Kitazato OPU ニードル 20G (北里コーポレーション, 静岡, 日本) を用い、クックアスピレーションシステム (Cook, Indiana, USA) により吸引圧 280 mmHg で行った。得られた卵子-卵丘細胞複合体 (COCs) は洗浄の後、受精用培地 (G-IVF : Vitrolife, Gothenburg, Sweden) を用いてマルチガスインキュベーター内 (6.0%CO₂, 5.0%O₂, 湿度 100%) で培養した。COCs はリコンビナントヒアルロニダーゼ (ICSI cumulase : クーパーサージカル/オリジオ・ジャパン, 神奈川, 日本) のドロップに 30 秒浸漬

した後、G-IVF 中に 30 分静置することで大まかな卵丘細胞を自然に剥離し、残った放射冠部分は透明帯外径よりやや大きいバスツールピペットを用いて吸引・排出することで除去した。なお、ZF 卵子の多くはヒアルロニダーゼ処理の後に透明帯の損傷および剥離の兆候が確認されている。

検討 1 : ZF 卵子がみられた症例の分析

2018 年 8 月から 2022 年 3 月までに当院において採卵を実施し ICSI の適応となった症例を対象とした。卵丘細胞除去の際に ZF 卵子が確認された 23 症例を ZF 群、同期間の ZF 卵子がみられなかった 2,758 症例を対照群とし、妻年齢 (歳)、アンチミュラーリアンホルモン (AMH) 値 (ng/ml)、採卵決定時の E₂ 値 (pg/ml)、P₄ 値 (mIU/ml)、FSH 値 (mIU/ml)、LH 値 (mIU/ml)、総ゴナドトロピン投与量 (IU) の比較 (mean ± SD) を行った。

また、ZF 卵子の発生と卵丘細胞除去を実施した術者および患者背景の関係性について調査を行った。ZF 卵子の有無を目的変数として、検討期間に卵丘細胞除去を実施した術者 9 名 (A ~ I とする) について単変量回帰分析を実施した。患者背景として、妻年齢 (歳)、AMH 値、喫煙の有無、BMI (kg/ml)、不妊期間 (年)、治療回数、採卵数 (個)、不妊原因、卵巣刺激法との関係性についてロジスティック回帰分析を行った。不妊原因は、高齢 (40 歳以上)、子宮内膜症、受精障害、男性因子、多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS)、卵巣予備能低下、卵管因子、原因不明の 8 項目、卵巣刺激方法は、アンタゴニスト法、低刺激法、Progestin primed ovarian stimulation (以下 PPOS 法) の 3 項目を対象とし、単変量回帰分析により $P < 0.2$ であった因子について多変量回帰分析を行った。

検討 2 : ZF 群ならびに ZF 卵子の培養成績

胚はタイムラプスインキュベーター (EmbryoScope+ : Vitrolife) を使用し、G-1/G-2 PLUS 培地 (Vitrolife) を用いて 6.0%CO₂, 5.0%O₂, 無加湿条件下で培養した。

卵成熟率、ICSI 後生存率、正常受精率、培養 6 日目までの胚盤胞到達率、良好胚盤胞率 (胚盤胞あたり) について、①対照群と ZF 群、②ZF 群における Intact 卵子と ZF 卵子、③対照群と Intact 卵子に分けて比較を行った。良好胚盤胞はガードナー分類⁷⁾ 3BB 以上と定義し、ZF 卵子由来胚盤胞の拡張率は元サイズから判断した。

なお、人為的卵子活性化実施症例、外科的な精子採取法 (TESE, MESA) を実施した症例および高度乏精子症例は本検討から除外した。また、ZF 卵子は剥離した透明帯の内部あるいは卵子に付着した第一極体の存在を確認し、偏光顕微鏡 (Oosight Imaging System : エア・ブラウン株式会社, 東京, 日本) を用いた観察により明瞭な紡錘体を認めたもの (図 1) を ICSI に使用した。

検討 3 : ZF 卵子発生のリスク因子が培養成績に及ぼす影響

検討 1 において ZF 卵子発生のリスク因子と判明した項目 (PCOS, 喫煙) が ICSI の成績に及ぼす影響について検討を

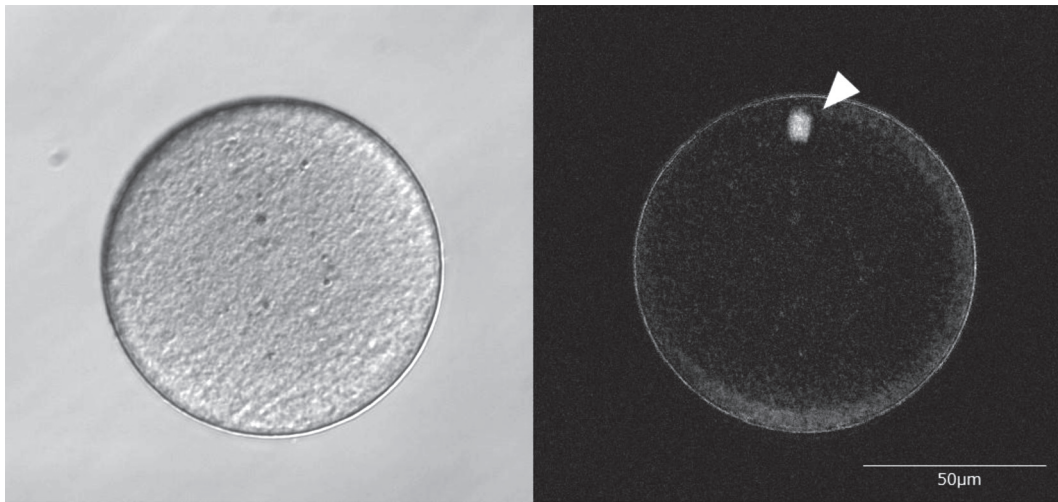


図1 Zona free卵子 (明視野：左, Oosight Imaging Systemによる観察：右, 矢頭は紡錘体を示す)

表1 Zona free卵子がみられた症例 (ZF群) と対照群における年齢・ホルモン値・総ゴナドトロピン (Gn) 投与量

	対照群	ZF群	P値
年齢 (歳)	39.1 ± 4.6	37.3 ± 5.6	<0.05
AMH*値 (ng/ml) †	2.31 ± 2.8	3.52 ± 3.9	<0.05
E2値 (pg/ml) †	2,115.2 ± 1,707.3	2,433.8 ± 1,961.4	0.161
P4値 (mIU/ml) †	1.12 ± 2.1	1.64 ± 4.0	0.260
FSH値 (mIU/ml) †	15.3 ± 7.1	14.4 ± 6.3	0.474
LH値 (mIU/ml) †	5.25 ± 6.2	4.42 ± 3.5	0.153
総Gn投与量 (IU)	2,542.5 ± 1,041.8	1,885.9 ± 1,035.9	0.095

* : Anti-Müllerian hormone, † : 採卵決定時の値, 値はmean ± SD.

行った。高齢因子がZF卵子の発生頻度に関係することから39歳以下の症例に限定し、対照群の症例を、喫煙区、PCOS区、対照区（その他）に分けて培養成績を比較した。なお、喫煙区およびPCOS区に重複する5症例は本検討から除外した。

統計解析

ホルモン値等、連続変数の統計解析にはMann-WhitneyのU検定を用いた。培養成績の統計解析には χ^2 検定を用いた。ロジスティック回帰分析は前述（検討1）の通り実施した。なお、それぞれの項目について多重共線性は認められなかった（分散拡大係数：1.09～1.66）。本研究では $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。統計ソフトはEZRバージョン2.7-1を使用した。

倫理的配慮

本研究は、蔵本ウイメンズクリニック院内倫理委員会の承認（承認番号：18009）を受け、ホームページ上に研究概要を掲示したうえで実施している。

結果

検討1：ZF卵子がみられた症例の分析

対照群における妻年齢は 39.1 ± 4.6 歳、ZF群は 37.3 ± 5.6 歳であり、ZF群が有意に若かった（ $P < 0.05$ ）。また、対照群におけるAMH値は 2.31 ± 2.8 ng/ml、ZF群は 3.52 ± 3.9 ng/mlであり、ZF群が有意に高かった（ $P < 0.05$ ）。対照群およびZF群における採卵決定時のE2値（ $2,115.2 \pm 1,707.3$ vs $2,433.8 \pm 1,961.4$ pg/ml）、P4値（ 1.12 ± 2.1 vs 1.64 ± 4.0 mIU/ml）、FSH値（ 15.3 ± 7.1 vs 14.4 ± 6.3 mIU/ml）、LH値（ 5.25 ± 6.2 vs 4.42 ± 3.5 mIU/ml）、および総ゴナドトロピン投与量（ $2,542.5 \pm 1,041.8$ vs $1,885.9 \pm 1,035.9$ IU）は各群に差はみられなかった（表1）。

ZF卵子の発生と卵丘細胞除去を実施した術者の関係性については、頻度に多少の差はみられるものの（オッズ比：2.37～0.34）統計的に有意な差は確認されなかった（表2）。一方、患者背景については、喫煙（オッズ比：2.46, 95% confidence interval (CI)：1.03-5.88, $P < 0.05$ ）およびPCOS（オッズ比：2.34, 95%CI：1.14-4.81, $P < 0.01$ ）が

ZF 卵子発生リスク因子であること、また高齢因子においてZF 卵子が発生しにくいことが判明した (オッズ比: 0.37, 95%CI: 0.15-0.88, $P < 0.05$: 表3).

検討2: ZF 群ならびにZF 卵子の培養成績 (表4)

①対照群とZF 群の比較

対照群ならびにZF 群における卵成熟率は78.4% vs 80.5%, ICSI後生存率は87.9% vs 86.3%, 正常受精率は70.1% vs 72.1%, 胚盤胞到達率は65.1% vs 68.1%であり, それぞれ差はみられなかった. 良好胚盤胞率は55.4% vs 67.9%であり, ZF 群における良好胚盤胞率が対照群と比較して有意に高かった ($P < 0.05$).

②ZF 群におけるIntact卵子とZF 卵子の比較

Intact卵子ならびにZF 卵子におけるICSI後生存率は88.6% vs 70.8%であり, ZF 卵子と比較してIntact卵子が有意に高かった ($P < 0.05$). 正常受精率は74.1% vs 58.3%であり差はみられなかった. 胚盤胞到達率は71.4% vs 42.9%でありZF 卵子と比較してIntact卵子が有意に高かった ($P < 0.05$). 良好胚盤胞率は65.3% vs 100.0%であり差がみられなかった.

③対照群とIntact卵子の比較

対照群ならびにIntact卵子における, ICSI後生存率は87.9% vs 88.6%, 正常受精率は70.1% vs 74.1%, 胚盤胞到達率は65.1% vs 71.4%, 良好胚盤胞率は55.4% vs 65.3%でありそれぞれ差はみられなかった.

表2 卵丘細胞除去の術者とZona free 卵子発生との関係性

術者	オッズ比	95%CI*下限	95%CI*上限	P値
A	2.06	0.49	8.71	0.375
B	0.94	0.39	2.30	0.898
C	0.34	0.08	1.41	0.080
D	1.57	0.55	4.49	0.430
E	0.95	0.13	7.04	0.961
F	0.83	0.20	3.47	0.778
G	0.81	0.28	2.33	0.693
H	0.68	0.24	1.95	0.456
I	2.37	0.82	6.82	0.142

*: confidence interval.

検討3: ZF 卵子発生リスク因子が培養成績に及ぼす影響 (表5)

対照区, 喫煙区, PCOS区における, 卵成熟率 (それぞれ78.2%, 79.7%, 76.7%), ICSI後生存率 (87.7%, 90.1%, 88.2%), 正常受精率 (70.0%, 73.7%, 73.6%), 胚盤胞到達率 (66.7%, 65.5%, 70.0%), 良好胚盤胞率 (57.9%, 59.7%, 57.8%) に差はみられなかった.

考 察

本検討では, ZF 卵子が発生する要因を明らかにすることを目的として, そのリスク因子を特定するとともに, 体外発生成能に及ぼす影響について調査した.

表3 Zona free 卵子の発生と患者背景の関係性

因子	粗オッズ比	95%CI*下限	95%CI*上限	P値	調整オッズ比	95%CI*下限	95%CI*上限	P値	
患者背景									
年齢 (歳)	0.92	0.87	0.98	0.006	0.96	0.90	1.04	0.320	
AMH 値 (ng/ml)	1.08	1.01	1.15	0.046	1.01	0.91	1.11	0.853	
喫煙あり	2.45	1.03	5.83	0.069	2.46	1.03	5.88	<0.05	
BMI (kg/m ²)	0.95	0.87	1.03	0.197	0.94	0.86	1.03	0.176	
不妊期間 (年)	0.94	0.83	1.07	0.349	-	-	-	-	
治療回数	0.98	0.92	1.05	0.538	-	-	-	-	
採卵数	1.02	0.98	1.05	0.391	-	-	-	-	
不妊原因									
高齢	0.32	0.14	0.75	0.003	0.37	0.15	0.88	<0.05	
子宮内膜症	1.22	0.61	2.47	0.580	-	-	-	-	
受精障害	0.83	0.33	2.10	0.684	-	-	-	-	
男性因子	1.03	0.57	1.86	0.922	-	-	-	-	
PCOS**	2.79	1.38	5.66	0.010	2.34	1.14	4.81	<0.01	
卵巣予備能低下	0.87	0.49	1.54	0.626	-	-	-	-	
卵管因子	1.26	0.63	2.55	0.525	-	-	-	-	
不明	0.92	0.22	3.83	0.909	-	-	-	-	
卵巣刺激方法									
アンタゴニスト法	1.21	0.635	2.30	0.569	-	-	-	-	
低刺激	0.93	0.522	1.65	0.799	-	-	-	-	
PPOS 法***	1.24	0.642	2.40	0.526	-	-	-	-	

*: confidence interval, **: 多嚢胞性卵巣症候群, ***: Progestin primed ovarian stimulation.

表4 ZF症例およびZF卵子の培養成績

	対照群		ZF群*						P値		
			Intact卵子**		ZF卵子***		対照群 vs ZF群	Intact卵子 vs ZF卵子	対照群 vs Intact卵子		
症例数	2,758	23									
採卵数	19,863	236									
成熟卵数	15,567	78.4%	190	80.5%	166	-	24	-	0.427	-	-
生存卵数	13,684	87.9%	164	86.3%	147	88.6%	17	70.8%	0.504	<0.05	0.798
正常受精数	10,917	70.1%	137	72.1%	123	74.1%	14	58.3%	0.554	0.107	0.266
培養胚数	8,535		119		105		14				
胚盤胞数	5,560	65.1%	81	68.1%	75	71.4%	6	42.9%	0.506	<0.05	0.178
良好胚盤胞数 [†]	3,081	55.4%	55	67.9%	49	65.3%	6	100.0%	<0.05	0.080	0.085

*: Zona free 卵子が確認された症例, **: ZF群における透明帯正常卵子, ***: ZF群における透明帯欠損卵子, †: 胚盤胞あたりの値.

表5 Zona free 卵子発生リスク因子が培養成績に及ぼす影響

	対照区		喫煙区		P値**	PCOS*区		P値**
症例数	1,016		57			162		
採卵数	9,752		669			2,863		
成熟卵数	7,627	78.2%	533	79.7%	0.374	2,196	76.7%	0.087
生存卵数	6,692	87.7%	480	90.1%	0.113	1,937	88.2%	0.556
正常受精数	5,338	70.0%	393	73.7%	0.266	1,617	73.6%	0.327
培養胚数	4,550		345			1,483		
胚盤胞数	3,035	66.7%	226	65.5%	0.640	1,038	70.0%	0.078
良好胚盤胞数 [†]	1,758	57.9%	135	59.7%	0.594	600	57.8%	0.945

*: 多嚢胞性卵巣症候群, **: 対照区との比較, †: 胚盤胞あたり.

ZF 卵子の発生において、卵丘細胞除去を実施した術者の影響はみられなかった(表2)。一方でZF症例は、対照症例と比較して有意に患者年齢が若く、AMH値が高かった(表1)。また、ロジスティック回帰分析の結果(表3)、患者年齢やAMH値自体はZF卵子発生リスク因子とはならないものの、不妊原因が高齢である症例においてZF卵子が発生しにくく(オッズ比: 0.37)、PCOSにおいて発生しやすいなど(オッズ比: 2.34)、間接的に影響が確認された。また、喫煙もZF卵子発生リスク因子となることが判明した(オッズ比: 2.46)。これらの結果から、ZF卵子の発生は、加齢、PCOS、喫煙により透明帯の質的な変化が起こったことに起因すると考えられる。

加齢に伴い未受精卵子の透明帯は肥厚化^{8,9)}、胚の透明帯は硬化することが知られている⁸⁾。高齢因子においてZF卵子が発生しにくい理由として、本来IVFにおける低受精¹⁰⁾等の原因となるこれらの特徴が、結果的に透明帯の損傷を防いだと考えられる。また、PCOSは様々な病態を示す不妊原因であり¹¹⁾、ZP4遺伝子変異しているケースも報告されている¹²⁾。近年、ZP4遺伝子の変異は、ZP1~3が変異した場合¹³⁾と同様に透明帯の非薄化や脆弱性に繋がることが明らかになっている¹⁴⁾。

喫煙は種々の疾病に加えて不妊の原因になることが広く

知られている¹⁵⁾。喫煙は、血中FSH値の上昇¹⁶⁾ならびにインヒビンB値低下¹⁷⁾により、卵巣機能低下に繋がり、採卵決定時の高FSH値と透明帯異常(褐色の透明帯)の関係性¹⁸⁾、性成熟前のインヒビンB値が低いマウスは透明帯が薄いことなどが報告されている¹⁹⁾。一方で、透明帯の厚みとFSH値は関係しないという相反する結果も報告されており²⁰⁾、本検討においてもZF症例と対照症例の間にFSH値の違いはみられなかった(表1)。透明帯の脆弱性は、ホルモン値そのものの影響ではなく、卵巣機能の低下(低さ)に伴う各種タンパク質・遺伝子発現の変動によるものであると考えられる。また、ZP¹⁾およびインヒビン²¹⁾はともに糖タンパク質であり、共通の抑制機構が影響している可能性も考えられる。マウスにタバコ煙の抽出物(CSE)を経口投与すると、酸化ストレス等に応答するグルタチオンS-トランスフェラーゼの卵巣での発現が低下すること²²⁾、また培養下の肺胞上皮細胞にCSE処理することで細胞膜の分子ポンプであるP-糖タンパクの働きを阻害することがそれぞれ報告されている²³⁾。

本研究では、ZF卵子においてICSI後生存率・胚盤胞到達率が低い傾向にあった(表4)。ZF卵子発生リスク因子である喫煙およびPCOS自体は培養成績に影響を及ぼさなかったことから、この結果はZF卵子特有のものであると考

えられる。ZF卵子はピペット等に卵細胞膜が直接触れるため、物理的ダメージを受けやすいことは想像に難くない。一方で、ダメージに耐え得る卵子が選別された結果、ZF卵子における良好胚盤胞率が高くなったと考えられる。また、透明帯を欠損した状況そのものが胚発生に好影響であった可能性も否めない。近年、割球と透明帯間の架橋構造(perivitelline threads)が胚質不良の原因となることから²⁴⁾、成績改善を目的として透明帯を人為的に除去する手法が試みられている^{24, 25)}。本検討におけるZF卵子は、裸化時点で透明帯を欠損しているためperivitelline threadsの存在は確認できていないが、卵子によっては人為的除去と同様の効果が得られた可能性が考えられる。

本検討の結果、PCOSおよび喫煙がZF卵子発生のリスク因子であるという結果が得られた。しかしながら、あくまで当院のICSI実施症例に限定した検討であり、ART症例全体を表した結果ではない。検討期間における当院のconventional-IVF手技はオーバーナイト法(17～19時間媒精)を採用しており、ZF卵子が含まれている場合であっても翌日に変性卵として判定されていた可能性が否めないため、調査対象から除外している。また、本検討においてPCOS症例を病態ごとに分けることが困難であり、喫煙者が治療中に禁煙していたかの追跡も不十分であったことから、それぞれ一纏めとして取り扱っている。本検討において、PCOS区および喫煙区の培養成績に対照区との差がみられなかったことは、この点が影響していると考えられる。喫煙が透明帯の性状に及ぼす影響に関して、若齢マウスでは透明帯が薄くなる²⁶⁾一方、ヒト卵子においては厚くなる²⁰⁾という相反する結果も存在する。透明帯はZP1～4それぞれの働きを持った層構造で成り立っており¹⁾、適正な厚みを形成している。透明帯の厚さ(薄さ)と強度の関係性についても慎重に考えるべきである。

本検討では、ZF卵子発生に関するリスク因子の一旦を明らかにした。しかしながら、上述のように多くのリミテーションが存在するため、他施設を含めて調査範囲を広げ、症例数を増やすとともに、病態やホルモン値、生活習慣、透明帯の厚みや強度等を考慮した検討を行う必要がある。今後、さらに詳細な結果が得られることでZF卵子の発生を未然に防ぎ、ARTの治療成績向上に貢献できると考えられる。

文 献

- 1) Lefèvre, L., Conner, S.J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I.A., Monk, M., Hughes, D.C. and Barratt, C.L.R. (2004): Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Hum. Reprod.*, 19, 1580–1586.
- 2) 長谷川明子 (2017) : 透明帯の構造と機能. 日本卵子学会編, 生殖補助医療 (ART) 胚培養の理論と実際. pp106–111, 近代出版.
- 3) Ding, J., Rana, N. and Dmowski, W.P. (1999): Intracytoplasmic sperm injection into zona-free human oocytes results in normal fertilization and blastocyst development. *Hum. Reprod.*, 14, 476–478.
- 4) Ueno, S., Bodri, D., Uchiyama, K., Okimura, T., Okuno, T., Kobayashi, T. and Kato, K. (2014): Developmental potential of zona pellucida-free oocytes obtained following mild in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 102, 1602–1607.
- 5) Shu, Y., Peng, W. and Zhang, J. (2010): Pregnancy and live birth following the transfer of vitrified-warmed blastocysts derived from zona- and corona-cell-free oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 21, 527–532.
- 6) 辻 暖永・竹内基子・小沼よしみ・北坂浩也・福永憲隆・浅田義正 (2018) : ヒト zona-free 胚に適した融解法ならびに培養法の検討. *受精着床誌*, 35, 249–254.
- 7) Gardner, D.K. and Schoolcraft, W.B. (1999): In-vitro culture of human blastocysts. In: *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond 1999* (Jansen, R. and Mortimer, D., eds.) pp.378–388 Parthenon Press, London.
- 8) Kilani, S.S., Cooke, S., Kan A.K. and Chapman, M.G. (2006): Do age and extended culture affect the architecture of the zona pellucida of human oocytes and embryos? *Zygote*, 14, 39–44.
- 9) Nawroth, F., Müller, P., Wolf, D. and Sudik, R. (2001): Is the Zona pellucida thickness of metaphase-II oocytes in an IVF/ICSI program influenced by the patient's age? *Gynecol. Obstet. Invest.*, 52, 55–59.
- 10) Bertrand, E., Bergh, M.V. and Englert, Y. (1995): Fertilization and early embryology: Does zona pellucida thickness influence the fertilization rate? *Hum. Reprod.*, 10, 1189–1193.
- 11) Yin, B., Hao, H., Wei, D., Song, X., Xie, J. and Zhang, C. (2015): Patients with polycystic ovary syndrome have successful embryo arrest. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8, 6247–6251.
- 12) Meczekalski, B., Nawrot, R., Nowak, W., Czyzyk, A., Kedzia, H. and Gozdziacka-Jozefiak, A. (2015): Study on the zona pellucida 4 (ZP4) gene sequence and its expression in the ovaries of patients with polycystic ovary syndrome. *J. Endocrinol. Invest.*, 38, 791–797.
- 13) Zhou, Z., Ni, C., Wu, L., Chen, B., Xu, Y., Zhang, Z., Mu, J., Li, B., Yan, Z., Fu, J., Wang, W., Zhao, L., Dong, J., Sun, X., Kuang, Y., Sang, Q. and Wang, L. (2019): Novel mutations in ZP1, ZP2, and ZP3 cause female infertility due to abnormal zona pellucida formation. *Hum. Genet.*, 138, 327–337.
- 14) Wei, X., Li, Y., Liu, Q., Liu, W., Yan, X., Zhu, X., Zhou, D., Tian, Y., Zhang, F., Li, N. and Lu, Z. (2022): Mutations in ZP4 are associated with abnormal zona pellucida and female infertility. *J. Clin. Pathol.*, 75, 201–204.
- 15) Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. (2018): Smoking and infertility: a committee opinion. *Fertil. Steril.*, 110, 611–618.
- 16) Windham, G.C., Mitchell, P., Anderson, M. and Lasley, B.L. (2005): Cigarette smoking and effects on hormone function in premenopausal women. *Environ. Health Perspect.*, 113, 1285–1290.

- 17) Waylen, A.L., Jones, G.L. and Ledger, W.L. (2010): Effect of cigarette smoking upon reproductive hormones in women of reproductive age: a retrospective analysis *Reprod. Biomed. Online*, 20, 861–865.
- 18) Xu, H., Deng, K., Luo, Q., Chen, J., Zhang, X., Wang, X., Diao, H. and Zhang, C. (2016): High serum FSH is associated with brown oocyte formation and a lower pregnancy rate in human IVF practice. *Cell. Physiol. Biochem.*, 39, 677–684.
- 19) Kusuhara, A., Babayev, E., Zhou, L.T., Singh, V.P., Gerton, J.L. and Duncan, F.E. (2021): Immature follicular origins and disrupted oocyte growth pathways contribute to decreased gamete quality during reproductive juvenescence in mice. *Front. Cell Dev. Biol.*, 9, 693742.
- 20) Shiloh, H., Lahav-Baratz, H., Koifman, H., Ishai, D., Bidder, D., Weiner-Meganz, Z. and Dirnfeld, M. (2004): The impact of cigarette smoking on zona pellucida thickness of oocytes and embryos prior to transfer into the uterine cavity. *Hum. Reprod.*, 19, 157–159.
- 21) 大場 崇・岡村 均 (2011) : 単一排卵機序. 森 崇英 総編集, 麻生武志・香山浩二・石塚文平・小西郁生・苛原 稔・佐々木裕之・岡村 均・佐藤英明・久保春海・野瀬俊明 分担編集, 柴原浩章・角田幸雄・島田昌之 編集幹事, 卵子学, pp.477–483, 京都大学学術出版会.
- 22) Mai, Z., Lei, M., Yu, B., Du, H. and Liu, J. (2014): The effects of cigarette smoke extract on ovulation, oocyte morphology and ovarian gene expression in mice. *PLoS One*, 9, e95945.
- 23) Takano, M., Naka, R., Sasaki, Y., Nishimoto, S. and Yumoto, R. (2016): Effect of cigarette smoke extract on P-glycoprotein function in primary cultured and newly developed alveolar epithelial cells. *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, 31, 417–424.
- 24) Yumoto, K., Shimura, T. and Mio, Y. (2020): Removing the zona pellucida can decrease cytoplasmic fragmentations in human embryos: a pilot study using 3PN embryos and time-lapse cinematography. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 37, 1349–1354.
- 25) 和田麻美子・平山和宏・藤井 調・伊勢田千裕・船木那津美・千葉幹子・赤石一幸・谷川原真吾・星 和彦 (2023) : 体外受精反復不成功のため人為的透明帯除去を実施することで形態良好胚が得られ, 生児を獲得できた1例. *臨床婦人科産科*, 77, 429–433.
- 26) Camlin, N.J., Sobinoff, A.P., Sutherland, J.M., Beckett, E.L., Jarnicki, A.G., Vanders, R.L., Hansbro, P.M., McLaughlin, E.A. and Holt, J.E. (2016): Maternal smoke exposure impairs the long-term fertility of female offspring in a murine model. *Biol. Reprod.*, 39, 1–12.