

2021/11/13 抄読会

How 1h of abstinence improves sperm quality and increases embryo euploidy rate after PGT-A: a study on 106 sibling biopsied blastocysts

1時間の禁欲がどの程度、精子の質を向上させ、PGTA後の胚の euploidy 率を高めるか：同胞の胚盤胞 106 個を対象とした研究

Abstract

目的：本研究の目的は、異なる禁欲期間（数日 vs 1 時間）が、精液所見、胚盤胞の正倍数性（euploidy）率、同胞卵子の ART における臨床結果に及ぼす影響を評価することである。

方法：本研究は、2015 年 11 月から 2018 年 12 月に実施した、22 例の着床前遺伝検査（PGT-A）サイクルを含む前向き研究である。OAT（乏精子症、精子無力症、奇形精子症症候群）の男性パートナーは、採卵日に 2 つの精液サンプルを提出した。1 つ目は数日間の禁欲後の精液サンプル、2 つ目は 1 つ目の精液サンプルから 1 時間後に射精された精液サンプル。各患者の卵子を 2 つのグループに分け、グループ 1 の卵子には最初の射精の精子を注入し（N = 121）、グループ 2 の卵子には 2 回目の射精の精子を注入した（N = 144）。アニリンブルーテストの結果、受精、胚盤胞形成、euploidy 率、臨床結果を 2 群間で比較した。

結果：精液量は、グループ 2 の精液の方が少ない結果となった。精子濃度、運動率、奇形率は両群で同等であった。合計 106 個の胚盤胞が生検され、euploidy の胚盤胞は、グループ 1（27.5%）よりもグループ 2（43.6%）の方が高かった。また、グループ 2 では成熟クロマチンの割合が高いことがわかった。

結論：禁欲期間の短い精子サンプルを使用することは、より質の高い精子を選択し、胚盤胞の異数性（aneuploidy）率を低下させる簡便な方法であると考えられる。禁欲期間の短い精液サンプルを使用することで、ART の成功率をあげられる可能性があることを確認するために、今後前向きは無作為化比較試験を行うべきである。

Introduction

生殖補助医療がうまくいかない主な原因として、女性因子があげられてきたことはよく知られている。異数性を調べるための着床前遺伝子検査（PGT-A）の意義は当初、年齢が高い女性（advanced maternal age）で最も大きいと考えられていた。次に PGT-A は、反復流産や反復着床不全の女性にも実施されるようになったが、これは、これらの女性で得られた胚に高い確率で染色体異常が観察されたためである。さらに、パートナーの精液所見が不良である女性にも適用されるようになった。

精液所見には、多くの要因が影響し、その 1 つが禁欲期間の長さである。

- ・世界保健機関 (WHO) は、精液検査の前は最低 2 日から最大 7 日までの禁欲を推奨。
- ・他のいくつかの研究では、精子量、精子濃度、および総精子数が 4~10 日間の禁欲による増加し、最初の 24 時間でより顕著な効果が得られることから、より長い禁欲期間を推奨。
- ・禁欲期間に関する研究では、短い禁欲期間 (禁欲期間は 3 日から 1 日、最大 21 日まで) で得られた精液を用いて行われた不妊治療の成績が不良であることを報告。
- ・他の研究では、わずか 24 時間の禁欲後の精液では、精子数、運動性、奇形率の改善を確認。
- ・ほぼすべての研究において、総精子数、運動率、奇形率、および寿命が禁欲期間 (3~4 日から 1 日まで様々) に影響されないとしても、射精回数が多いと精液量が減少すること、反対に、正常精子症の男性の禁欲期間が短いと、2 回目の射精では運動精子濃度が 1 回目と比べて 60% 近く減少することで一致。

男性因子不妊は、不妊原因の 2 分の 1 を占めており、乏精子症や無精子症の約 30% は、遺伝的原因に起因すると報告されている。造精機能障害には 2000 以上の遺伝子が関与していると考えられているので、これらがあまり知られていない可能性がある。精子の質が低下すると、受精率や cleavage (非等倍分割、異常卵割) 率、胚のグレードに影響を与える可能性があり、しばしば aneuploidy 率の上昇、流産、妊娠予後の悪化と相関している。

アニリンブルーテストは、精子の成熟度を評価するために用いられる染色法の一つ。ヒストンは、体細胞に存在する核タンパク質で、遺伝子発現を活性化したり、抑制したりする機能を持ち、強力なエピジェネティック制御因子として作用する。

本研究の目的は、禁欲期間が ART における精液所見、胚盤胞の euploidy 率、および臨床結果に及ぼす影響を評価することであった。

Materials and methods

Study population

2015 年 11 月から 2018 年 12 月まで、22 組のカップルがこの前向き研究に登録された。

そのうち 14 人は過去に ART での治療不成功の経験があり、8 人は初めての治療。

男性パートナーは全員 OAT で、そのうち 14 人は重度の OAT であった。遺伝的異常のあるカップルは研究対象から除外。

Table 1 Study population

Male mean age	FSH	LH	MALE BMI	Female mean age	FEMALE BMI
39.9 ± 7.0	8.9 ± 6.6	4.4 ± 2.3	24.6 ± 2.8	36.2 ± 4.3	22.7 ± 2.0

FSH, mean value of follicle-stimulating hormone in male; LH, mean value of luteinizing hormone in male; MALE BMI, body mass index in male partners; FEMALE BMI, body mass index in female partners.

PGT-A の適応は、男性不妊症 (N=13) と高齢の母体 (N=9) であった。

Sperm processing(精子処理)

採卵日には、WHO の推奨通り、2~7 日間の禁欲後に 1 回目の精液が提出された。採取された精液は WHO2010 に基づいて分析。形態学的評価は、精液サンプル 10 μ l を洗浄後、塗抹標本を固定し、精子の頭部、頸部、尾部の発色異常を評価：

正常な精子では、頭部は滑らかで規則的な縁を持ち、楕円形であること、頸部は薄く規則的で頭部と同じ大きさであること、尾部は頸部よりも薄く均一で、長さは約 45 μ m であること。

総精子量は、ファルコン型ピペットを用いて評価され、2 本に分けて緩衝洗浄液を加えた後遠心分離を行った。10ml はアニリンブルー (AB) 染色に使用し、残りの部分は ICSI に使用。1 回目の射精から 1 時間後に 2 回目の射精を行い、同様に処理した。

Ovarian stimulation and laboratory procedures 卵巣刺激と手順

卵巣刺激プロトコールは、卵巣予備能と AMH の値に応じて、FSH(Gonal F)と GnRH アゴニストまたはアンタゴニストを使用して行った。hCG(10000 IU) 投与から 38 時間後に ICSI を実施。重度の OAT の場合、ICSI に最適な精子を選択するために、精液サンプルをミネラルオイル下で皿に塗り、63 倍の倍率で観察した。各患者の卵子を 2 つのグループに均等に分けた。グループ 1 の卵子 (N=121) は、2~7 日間の禁欲後に採取した射精液を注入した。グループ 2 は、1 回目の射精の 1 時間後に採精した精液を注入した卵子を対象とした (N=144)。胚培養は、標準またはタイムラプスインキュベーターを用いて行い、培養 3 日目に、すべての発育中の胚に対してアシステッドハッチングを行った。培養 5 日目、6 日目、7 日目に胚盤胞が完全に膨張した時点で生検を行い、4~6 個の細胞を採取した。DNA は全ゲノム増幅 (WGA) で増幅され、次世代シーケンス (NGS) で解析した。生検した胚盤胞は、生検後 1 時間以内にガラス化し、単一凍結胚移植は、自然周期(軽度の刺激も含む)で行い、euploidy 胚盤胞は、融解後 2 時間以内に移植した。

Aniline blue assay

精子のクロマチンの成熟度は、AB 染色 (Sigma®, Germany) を用いて評価した。AB 染色試験では、精子を 3 つのカテゴリーに分けた：

intense (濃い色：頭部全体が濃い青色に着色)、intermediate (中間色：マクロソーム後の領域が濃い色に着色)、pale (淡色：頭部全体が非常に薄い色に着色) の 3 種類。

各サンプルから最低100個の精子を評価し、アニリンブルー陽性頭部（濃色および中間色）の割合を算出することで、未熟なクロマチンを持つ精子の割合を決定した。

統計解析は、スチューデントのt検定および $p \leq 0.05$ のレベル2乗検定を用いて行った。値は $\text{mean} \pm \text{SD}$ で表した。

Ethical approval

本研究は、ヘルシンキ宣言に示された原則に基づいて実施された。ヨーロッパ・ホスピタルの内部倫理委員会の承認を得た後、研究に参加したすべての個人からインフォームド・コンセントを得た。

Results

精子濃度、運動性、奇形率は、2群間に有意な差は見られなかったが、グループ2における精液量は有意に低かった ($p = 0.0002$) (Student's *t* test)。

Table 2 Semen parameters according to WHO 2010 in fresh ejaculate

	VOL.	CONC.	MOTILITY	MOT. A	MOT. B	MOT. C	MORPH.
Group 1	3.1 ± 1.4	2.2 ± 3.2	10.4% ± 13.4	0.6% ± 1.5	4.9% ± 9.2	4.0% ± 4.0	1.4% ± 0.6
Group 2	1.8 ± 1.2	2.5 ± 4.3	11.2% ± 13.9	0.5% ± 1.5	5.7% ± 10.0	5.0% ± 6.0	1.4% ± 0.6
<i>p</i>	<i>0.0002</i>	0.794	0.846	0.826	0.783	0.945	1

Group 1 = 2–5 days of abstinence, Group 2 = 1 h of abstinence. VOL, semen volume; CONC, sperm concentration; MOT. A, progressive spermatozoa; MOT. B, slow motility sp.; MOT. C, non-progressive; MORPH, morphology. Entries in italics mean the results are statistically significant

アニリンブルーテスト後に得られたすべての値は、統計的に有意であった。

採卵した卵子は350個で、そのうち265個がICSI可能な成熟精子であった。グループ1とグループ2では、それぞれ121個と144個にICSIを実施し、受精率はそれぞれ75.2% (N=91) と76.4% (N=110) であった(11)。

Table 3 Semen parameters according to WHO 2010 after treatment and AB staining test

	CONC.	MOTILITY	MOT. A	MOT. B	MOT. C	INTENSE	INTER.	PALE
Group 1	2.0 ± 3.0	30.0% ± 23.1	2.1% ± 4.4	18.7% ± 17.5	9.1% ± 5.2	58.3% ± 1.3	12.1% ± 1.7	29.6% ± 2.3
Group 2	2.4 ± 4.2	29.4% ± 26	3.4% ± 8.0	17.3% ± 15.8	8.8% ± 5.8	35.6% ± 1.6	10.4% ± 2.1	54.0% ± 1.8
<i>p</i>	0.718	0.935	0.507	0.782	0.857	0.0001	0.005	0.0001

Group 1 = 2-5 days of abstinence, Group 2 = 1 h of abstinence. CONC, sperm concentration; MOT. A, progressive spermatozoa; MOT. B, slow motility sp.; MOT. C, non-progressive; INTENSE, darkly colored spermatozoa; INTER, darkly colored in the post-acrosomal region; PALE, lightly colored spermatozoa. Entries in italics mean the results are statistically significant

Table 4 Fertilization and results after trophectoderm biopsy

	2PN/Injected	Blastocyst rate	Day 5	Day 6	Day 7	Euploid	Mosaic	Aneuploid	NR
Group 1	91/121 (75.2%)	51 (56.1%)	22 (43.1%)	21 (41.2%)	8 (15.7%)	14 (27.5%)	7 (13.7%)	28 (54.9%)	2 (3.9%)
Group 2	110/144 (76.4%)	55 (50.0%)	26 (47.3%)	18 (32.7%)	11 (20.0%)	24 (43.6%)	8 (14.6%)	23 (41.8%)	0
<i>p</i>	0.411	0.198	0.337	0.188	0.288	0.043	0.454	0.092	

Group 1 = 2-5 days of abstinence, Group 2 = 1 h of abstinence. 2PN/Injected = correctly fertilized oocytes; Day 5 = blastocysts formed on day 5; Day 6 = blastocysts formed on day 6; Day 7 = blastocysts formed on day 7; NR = blastocysts with no result after NGS. Entries in italics mean the results are statistically significant

胚盤胞の形成時期については、両群で有意な差は認められなかった。

グループ1とグループ2のaneuploidy率は54.9% (N=28) と41.8% (N=23) で、モザイク胚の胚盤胞は2群でそれぞれ13.7%(N=7)と14.6%(N=8)であった。グループ2ではeuploidy率が43.6%(N=24)と高い確率で認められたが、グループ1では、euploidy率は27.5% (N=14) しかなかった (p=0.043)。

計21例の凍結胚移植が行われ、グループ1で7例、グループ2で14例であった。臨床妊娠率はそれぞれの群で、28.6% (N=2)、64.3% (N=9) (p=0.080)、着床率はそれぞれ28.6% (N=2)、64.3% (N=9) (p=0.080) で、全例で出産、健康な生児を得た。

Discussion

これまで禁欲期間が精液所見に与える影響について多くの議論がなされてきた。

これまで検討された男性集団には、正常精子症や無精子症の男性、または精液中のDNA断片化が変化している患者が含まれ、禁欲期間は1-8日から射精後の2時間までであった。

最初の射精から30~40分後または60分後の2回目の射精に関して、不妊症またはOAT男性に注目した研究はわずかしかない。

すべての研究において、2回目の射精では精液量が減少することが明らかになっており、我々の研究でも、同様の関係を認めた。

ほとんどの研究では、禁欲期間が短い精液では、総精子数と前進運動精子率の増加が示されたが、我々の研究では、グループ2では、高速運動精子の割合が増加したものの、2群間では、濃度と運動性に差はなかった。OAT男性を対象とした他の研究では、軽度のOAT患者も含まれていたが、本研究で登録された男性はすべて重度のOATであり、男性不妊症のためART治療を繰り返した経験があった。

禁欲が精液所見に及ぼす影響を研究している研究者の大部分は、精子のDNAの断片化と生存率を評価し、禁欲期間に関連した違いに言及しなかった。我々の研究デザインでは、精子濃度が非常に低かったため、それらのパラメータを評価することはできなかった。精子のDNAの完全性だけは、AB染色を用いて成熟クロマチンの割合で評価した。非常に短い禁欲期間（1時間）の後に得られた射精では、成熟したクロマチンの割合が増加していることを検出した。これまでの研究では、禁欲期間の短い精液ではこのパラメータが減少することが明らかになっているが、その場合の射精は18~24時間以上の禁欲期間後に採取されていた。クロマチンの成熟度とICSIの結果（72時間までの受精と胚の発育）との間に相関関係があることが、今回の研究で確認された。

今回の研究で注目された禁欲期間が短いグループでeuploidの胚盤胞が有意に多く得られたことは、1時間の禁欲後の射精では、正常なプロタミンを持つ精子クロマチンの割合が高いことで説明できる。

禁欲期間の差による精液所見のほとんどすべての違いは、精巣上体の通過時間の違いで説明できる。

精液の量が減少した理由は、最初の採精後の前立腺および精液腺の回復時間が短かったためと考えられる。尾部精巣上体の約50%の精子が射精に利用されるので、多くの研究で観察された精子濃度の低下は、精子が尾部および精管に到達するまでの時間が短いことに起因すると考えられる。

精子の運動性の評価は難しいが、精巣上体の通過時には、精子と精巣上体分泌物との間で相互作用が起こり、鞭毛の動きや精子の運動性に影響を与え、精子細胞は受精能力を確保すると考えられる。その際「運動性阻害因子」の存在が仮定されており、その濃度は頻繁に射精すると濃度が低下する。

禁欲期間は精巣上体での貯蔵時間と移動時間を変化させるため、精子の動態に影響を与える可能性があることは明らかである。我々の研究では、前進運動精子の有意な増加は認

められなかったが、高速運動精子の割合が高いことが観察された。

短期間の禁欲により、死細胞の濃度が低下し、精巣上体に貯蔵される時間が減り、顆粒球が発生させる活性酸素（ROS）の有害な影響を受けることが減ると考えられる。酸化ストレスへの曝露が減ると、結果的に精子のクロマチンの完全性が向上する。

配偶子形成期に起こるエピジェネティックな現象には、DNAメチル化の除去、修飾、維持がある。精子のDNAメチル化は、受精と胚の初期細胞分裂に不可欠であるが、OAT男性ではこれが変化している可能性がある。

いくつかの研究では、臨床的な妊娠率や流産における「男性因子」の重要性が指摘されており、男性不妊のカップルにおけるART治療の不成功は、胚盤胞で検出されたエピジェネティックな障害に起因する可能性があることが知られている。最近の多くの研究では、様々な遺伝子（USP8、TEX11、DMRT1、NR5A1）が関与しており、OATや無精子症の男性では、euploidの胚盤胞を移植しても着床に至らないことが明らかになっている。

Conclusions

本研究は、禁欲期間が精液パラメータに及ぼす影響を評価するために実施した。禁欲期間がARTの結果に与える影響を調べるために、兄弟卵子をモデルとして使用した。登録された症例数は少なかったものの、兄弟卵子を使用することで、胚の由来によるバイアスを減らして結果を確認することができた。

我々の結果と過去の研究によると、最初の射精を行った直後に次の射精を行うことは、治療効果を最適化するための有効な戦略であるという点で一致しており、短期間の禁欲後の射精によって、精液所見が改善されることでARTの成績を向上させ、ICSIをIVFで代替することさえ可能であると示唆している。

これらの結果から、不妊治療の前に、精子の質を向上させるために、性行為を控えることに実際のメリットがあるのかどうかという疑問も生じる。

今回の研究では、2回の射精を行うことで、OAT患者の精液所見を比較し、PGT-Aサイクルの結果をeuploidy率と臨床結果の観点から評価することができた。禁欲1時間の精液を使用したところ、euploidy率の上昇が見られた。この結果は、症例数を増やして確認する必要がある。今回と同様の結果が確認された場合、将来の日常的な臨床診療では、重度のOAT患者に対して1時間の禁欲後に1回の精液採取を行うことを想定している。