

内部細胞塊の緩みにより、一絨毛二羊膜性双生児が発生することがある

【要旨】

<目的>一絨毛二羊膜性双胎化の発生における内細胞塊 (ICM) のグレードとその形態的構成との関係を検討すること。

デザイン レトロスペクティブな胚のコホート研究。

セッティング 民間の体外受精クリニック。

<患者> 8,435 例の凍結融解単胚盤胞移植とホルモン補充療法を評価した。このコホートには 71 個の胚盤胞とその ICM をタイムラプス写真で観察した。

<介入> タイムラプス撮影により観察された ICM の形態変化をレトロスペクティブに解析した。

<主な評価項目> ICM 内のゆるみをタイムラプス撮影により観察し評価した。また、緩みのプロセスに関与する細胞数も評価した。これらのパラメータは、一卵性双生児になるタイプと相関していた。

<結果>ICMのグレードが高い(A)胚盤胞を移植した場合のM-D双胎率は0.38%(3/796)であったが、グレードが低い(B、C)胚盤胞を移植した場合は1.38%(34/2,463)と有意に高い値を示した。71個の凍結融解胚盤胞を移植し、タイムラプス撮影を行ったところ、二絨毛膜二羊膜双胎が2個、一絨毛膜二羊膜双胎が1個あった。一絨毛膜二羊膜双胎1例の胚を注意深く観察したところ、少なくとも8個の細胞が脱コンパクションされ、ICMが緩んだ外観になっていることが判明した。他の胚盤胞のICMにはこのような脱コンパクションは認められなかった。

<結論>M-D双胎の発生は、脱コンパクションされたICMを含む胚盤胞を除外することにより回避できる可能性がある。

【導入】

生殖補助医療(ART)において、自然発生率と比較して有意に高い確率で一卵性双生児が発生することは一般的な概念である。一卵性双生児には、一絨毛二羊膜性双生児(M-D)、一絨毛一羊膜性双生児(M-M)、二絨毛二羊膜性双生児(D-D)の3つのバリエーションがある。一絨毛二羊膜性双胎は胎盤を共有しているため、双胎間輸血のリスクがあり、成長不良や胎児死亡の原因となる。胎盤と羊水嚢を共有する一絨毛膜一羊二系双胎は、一卵性双胎妊娠の1~2%と稀であるが、臍帯絡みの危険性があるためリスクが高い。一卵性D-D双胎のリスクはまだ十分に解明されていないが、二卵性D-D双胎は一卵性M-D、M-M双胎と比較して産科的リスクが低いことが知られている。二卵性D-D双胎のメカニズムや要因は確立されているが、一卵性M-D、M-M、D-D双胎のメカニズムについてはほとんど分かっていない。一卵性双生児を誘発するいくつかの要因が提案されているが、D-D、M-D、M-Mそれぞれの相対的なリスクはまだ十分に確立されてはいない。現在、卵細胞質内精子注入法(ICSI)、孵化補助法(AH)、胚盤胞期までの延長培養など、いくつかのARTの方法について

では矛盾した報告がなされている。近年、培養液の改良により一卵性双生児率が低下しているという暗黙の了解があるのかもしれないが、一卵性双生児率は自然妊娠での発生率である約0.4%まで低下していない。

内細胞塊 (ICM) の形成とその細胞間接着についてはほとんど知られていないが、以前の研究では、カルシウム依存性の細胞間接着システムが、マウス胚の初期発生における ICM 形成と細胞表面の極性を制御していることが報告されている。また、カルシウムやマグネシウムなどの重ミネラルをキレートするエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) は、より良い胚の発生を期待し、胚培養液の補助剤として一般的に使用されている。体外で培養された胚は、以下のような場合、細胞の接着・結合が緩くなる可能性がある。EDTA を添加した培地は、EDTA を添加した培地と同じように使用することができる。本研究では、拡大・膨張胚盤胞の ICM のグレードに着目し、新たな側面から考えられる危険因子を検討した。ICM の分裂しやすさは、ICM 細胞のグレードとゆるさに関係すると考えた。このような要因によって、2 つの別々の ICM が形成され、その結果、M-D 双胎が生じる可能性があるかと仮定した。タイムラプス撮影により、そのような素因を明確に解析することができた。

【材料と方法】

2011年1月から2014年12月までに、単一の不妊治療クリニックにおいて、臨床妊娠（胎嚢）に至ったホルモン療法（HT）と単一融解胚移植を含むすべての治療サイクルを、後方視的に評価した。また、2013年6月から2014年12月までの、タイムラプス顕微鏡 (Embryo Scope) による胚盤胞の ICM 観察についても、後方視的に解析した。本研究は後方視的な研究であること、また、被験者を匿名で診察したことから、施設審査委員会の承認は不要であった。

<一卵性双生児の評価>

一卵性双生児の確認するため、6-7週と8-9週の2回、膈超音波を行った。これらの胎児は、胎児心拍 (FHB) が検出される前に観察されることもある。分割した羊膜の間が見える場合は M-D とし、分割膜がない場合は M-M とした。胎嚢が2つ観察された場合は、D-D とした。今回は、胎嚢と FHB が検出された場合の ICM の形態について解析した。

<体外受精および顕微授精の手順>

卵子回収サイクルでは、患者は標準的な GnRH アゴニスト/FSH プロトコルまたはアンタゴニスト/FSH プロトコルを用いて刺激された。排卵誘発は、2番目の先行卵胞の直径が18mmを超えたときに行われた。超音波ガイド下経膈卵子採取は35-36時間後に行われた。体外受精の検査手順は以下の通りである。採卵後、卵子をミネラルオイル (Irvine Scientific) で覆った Universal IVF Medium (Origio a/s) 中に入れた。卵子は3-5時間後に一般体外受精を行った。精液のパラメータに応じて、媒精または顕微授精を行った。受精から約18時間後に受精チェックを行い、得られた接合体を10%ヒト血清アルブミン (HSA) 入りグローバル培地 (LifeGlobal) に入れ、5日目までそのままの状態での保存した。1~4個の胚をミ

ネラルオイルで覆った 50mL の培養液滴に入れて集団培養した。凍結融解した胚盤胞を移植する 3 日前に、ほとんどの患者 (90%) に対して子宮内膜 ET の刺激を行った。胚培養上清のグローバル培地は -20°C で保存した。胚盤胞および胚培養上清は移植周期まで凍結保存した。胚盤胞の構成を評価するために、Gardner 胚盤胞等級法を用いた。胚盤胞の等級付けは、2.5 年間の研修を受けた経験豊富な胚培養士 17 名のうち 1 名が評価した。胚盤胞のグレード評価は、融解後約 2~3 時間後に行われる ET の 1~2 時間前に終了した。

<ホルモン補充と移植>

試験サイクルでは、経皮吸収型 E2 製剤 (Estraderm M: キッセイ薬品) と HT 用膾 P 座薬 (Utrogestan: セントラル・アポテック・パルフェーマリー) を併用した。子宮内膜の準備は HR 周期の 2 日目に開始し、ステップアップ方式で行った (2.16-4.32 mg)。P 座薬 (600mg/日) は 15 日目に開始された。凍結融解した胚盤胞 1 個を AH し、HR 周期 20 日目に移植した。ほとんどの胚盤胞にアシストハッチングが行われた (90% 以上)。患者の希望に応じ、患者・胚培養士と慎重に相談の上、実施した。M-D 双胎化率に関しては、AH を行った胚 (1.06%、35/3,311) と行わなかった胚 (0.75%、1/134) に有意差はなかった。レーザーショット (ZILOS-tk Laser, Hamilton Thorne, Inc) で透明帯の 4 分の 1 を AH するケースがほとんどで、2 分の 1 を AH するケースはごくわずかであった。すべての症例で AH にレーザーが使用された。胚移植は IVF カテーテル (フジ・システムズ) を用いて経頸管的に行われた。患者自身の胚を発育させた胚培養上清を融解し、HT 周期の 17 日目に子宮腔内に注入した。上清注入は IVF カテーテルを用いて経皮的に子宮腔内に行った。胚培養上清を 20mL 充填したカテーテルを子宮腔内に挿入し、カテーテル先端が子宮底より約 1cm の位置で上清を放出した。

<タイムラプス>

2013 年 6 月から 2014 年 12 月まで EmbryoScope Time-lapse system (Vitrolife 社) を用いてタイムラプス撮影を行った。タイムラプス画像は 15 分ごとに、7 つの焦点面で自動的に撮影された。ICM の構成に変化があった場合は、7 つの焦点面すべてで ICM の形態を評価することにより、レトロスペクティブに解析した。本研究では、タイムラプスの効果の評価するために、卵子が 4 個以上得られた 30 歳から 40 歳の患者に限定して撮影を行った。ICM の緩みは、タイムラプスシステムで観察された、緊密にグループ化した細胞を含んでいた ICM に、その後緩く配列した細胞が 5 個以上存在することと定義された。

<統計解析>

χ^2 検定を用いた。P<.05 を統計的に有意とした。

【結果】

凍結融解した単胚盤胞は合計 8,435 個であった。研究期間中に HT を用いた移植が行われ、3,445 人 (40.8%) の臨床妊娠を達成した。これらの臨床妊娠のうち一卵性双生児は 80 例 (2.32%) であった。M-D、M-M、D-D 双胎はそれぞれ 36 (1.04%)、3 (0.09%)、39 (1.13%)

であった。一卵性三つ子も 2 例 (0.06%) で確認された (表 1)。D-D 双胎における性別不一致は、凍結融解単胚盤胞移植の HT 周期における単胚移植と自然妊娠の組み合わせであると仮定し、本研究では 2 例の D-D 双胎で確認された。HT を用いた凍結融解単胚盤胞移植からの 2 つの FHB 発生率は、M-D 双胎の方が D-D 双胎より有意に高かった ($P < .001$)。双子出生率も D-D 双胎に比べ M-D 双胎で有意に高かった ($P = .0017$) (表 1)。

Gardner 胚盤胞グレード評価法を用いて胚盤胞のグレードを評価し、M-D 双胎率を分析した。高グレード胚盤胞 ($\geq 3BB$) を移植した場合の M-D 双胎率は 0.87% (17/1,958) であったが、低グレード胚盤胞 ($< 3BB$) を移植した場合は 1.48% (20/1,349) となった ($P = .11$)。また、高グレードの ICM (グレード A) を含む胚盤胞を移植した場合の M-D 双胎率は 0.38% (3/796) であったが、低グレードの ICM (グレード B および C) を含む胚盤胞を移植した場合は 1.38% (34/2,463) となった ($P = .033$) (表 2)。

凍結融解した胚盤胞 (71 個) をタイムラプス顕微鏡で観察後移植した。hCG、GC、FHB 陽性率はそれぞれ 74.2% (52/71)、63.4% (45/71)、57.7% (41/71) であった。FHB 陽性の 41 周期のうち、36 例が産出、4 例が流産、1 例とクリニックが音信不通となった。また、D-D 双胎が 2 例、M-D が 1 例記録された。

さらに、タイムラプス顕微鏡で注意深く観察していた胚盤胞群に M-D 双胎が誕生した。この双子を生んだ胚盤胞の ICM には、少なくとも 8 個の脱力細胞が発生していた (Fig.1)。他の 66 個の胚盤胞の ICM ではこのような脱細胞は観察されなかった。残りの 4 個の胚盤胞では、ICM が不鮮明で、ICM 内の細胞の緩みは検出されなかった。

【考察】

本研究では、高グレードに分類される ICM を含む胚盤胞は MD 双胎の発生率が低いことが判明した。しかし、この知見は、胚盤胞のグレードが一般的に高齢者より若年者の方が高いことから、若年層が M-D 双胎のリスクを有するとする他の論文 (17-19) と一致しない (20)。これは、高齢者の M-D 胚は染色体異常が多く、臨床妊娠に至る前に流産してしまうことを示す知見と関連している可能性がある。

我々の経時的データは、"ICM の緩み"が ICM の分裂を誘発する危険因子の一つであり、それが M-D 双胎を引き起こす可能性があることを示している。一般的に、高グレードの ICM はより大きく、よりタイトであるため、タイムラプスのデータは ICM グレードのデータと一致する。M-D 双胎の発生率は、タイムラプス観察で確認されたように、緩んだ ICM を含む胚の移植を避けることによって減少させることができる。さらに、このような観察により、拡張胚盤胞において、単一の ICM が 2 つまたは 3 つの ICM に分裂していることが検出される。しかし、M-D 双胎の発生率は 1%程度であり、タイムラプスのデータに限られてい

るため、これらの知見を確認するためには、多施設研究が必要である。

M-M、M-D、一卵性双生児 D-D はそれぞれ原因が異なる可能性があり、素因や危険因子を個別に調査する必要がある。我々のデータでは、一卵性 M-D 双生児は一卵性 D-D 双生児に比べ、胎児数の減少がなく出生率が高いことが示された。これは、ICM が分裂する割合が多いためと考えられる。緩んだ ICM がほぼ同じ大きさの 2 つの ICM に分裂することもあれば、孵化の過程で細胞塊が大きさの異なる 2 つの ICM に分裂することもあり (3)、AH が行われるとより頻繁に起こる可能性がある。また、以前に報告されたように、凍結融解の過程で胚盤胞全体の分裂が起こる可能性もある (21)。一卵性 D-D 双生児の原因として考えられる AH 法については、さらなる研究が必要である。また、凍結融解した単胚盤胞を移植して二卵性双胎となった場合、当初は二卵性双胎かどうかの判別が困難な場合がある (例：凍結融解胚盤胞と自然妊娠胚の移植で、双子の性別が同じ) ので、二卵性双胎に関する我々のデータには限界があり、さらなる検討が必要である。興味深いことに、男性-男性 M-D 双子の割合は女性-女性双子よりも多く、これは Knopman らによる以前の報告 (17) と一致した。M-D 双胎とは対照的に、凍結融解単胚盤胞移植と HT を組み合わせた我々の研究では、男-男の一卵性双胎の割合は女-女双胎よりも低かった。

一絨毛膜一羊膜双胎は、着床後に発生するため、AH や ICSI などの機械的透明帯操作との関連性は低いと思われる。しかし、ART では ICM が分裂しやすく、その結果 M-D 双胎となる可能性があるため、今後も注意が必要である。

今回の報告は、凍結融解単胚盤胞移植と HT を併用した症例が最も多く含まれている。2007 年に日本産科婦人科学会で単胚移植が推奨され、胚盤胞のガラス固化が確立され生存率が高いことから、凍結融解単胚移植は本邦における今後の ART の主流となる可能性がある。今後は、一卵性双生児の発生を抑えるために、凍結保存技術や AH 法のさらなる向上、培養法の改良に注力することが重要であると思われる。

結論として、M-D 双胎化の発生を抑制できる可能性がある。ICM の緩みが見られる胚盤胞の移植を避けることで減少させることができる。このような形態学的変化は経時的観察で容易に確認できるため、この仮説を支持するためには、さらなる前向きな研究が必要である。また、正確な顕微鏡観察により、拡大した胚盤胞において ICM が 2 つまたは 3 つに分裂していることを検出できる可能性がある。