

Live birth from a blastocyst derived from a conjoined oocyte in a frozen embryo transfer cycle: a case report and a literature review

Journal of Assisted Reproduction and Genetics (2022) 39:1351–1357

凍結胚移植周期における結合卵子由来の胚盤胞からの生児誕生： 症例報告と文献レビュー

(要旨)

体外受精（IVF）における結合卵子は、利用可能なデータが極めて限られているため、疑問視されてきた。生殖補助医療（ART）計画において観察された結合卵子に関する1症例を紹介し、対応する文献のレビューを含めて、この問題について考察する。結合卵母細胞からの生児誕生はわずか3例しかなく、これは凍結胚移植周期で顕微受精（ICSI）を用いて受精された結合卵母細胞からの初の生児誕生症例である。さらに、移植前に退化した未熟卵母細胞を取り除いていない結合卵母細胞からの生児誕生が達成された初めての事例。退化した未熟卵母細胞が後の胚発達や妊娠結果に悪影響を及ぼさないことを示している。

さらに文献より結合卵母細胞の起源、発生率、安全および重要性を評価した。また、結合卵母細胞からの成熟卵母細胞がIVFやICSIによって受精され、胚の発達、その後の妊娠、そして生児誕生につながることを示す報告を確認した。

(背景)

現時点では多卵性卵胞の最も信頼できる基準は、共通の透明帯内に2つの卵母細胞が含まれること、または透明体の融合である [5]。しかし、ARTにおける結合卵子の重要性については、文献上のデータが極めて限られていることから疑問視され、その後の胚発生には使用されない可能性が極めて高い。採卵された結合卵子は、様々な文献や書籍に記載されている [6-9]。結合卵母細胞が公表されているケースは50件で、我々の知る限り生児誕生した症例は3例しか報告されていない。そのうち2例は、ICSI後の分割期の新鮮胚移植によるものである [10, 15]。その他1例は、IVF由来の凍結胚盤胞移植によるものである [16]。

(患者)

2020年10月、妻28歳と夫35歳の夫婦。女性は月経周期が規則的だが、夫は3回の検査で重度の精子運動異常が確認。経膈超音波検査で、両卵巣に10個の卵胞が見られた。月経周期の2日目に基礎ホルモン濃度が、プロラクチン（PRL）が（29.42 ng/ml）とやや高く、その他はAMH（3.67 ng/ml）、LH（5.17 mIU/ml）FSH（8.78 mIU/ml）、TS（76.17 ng/dl）、P（0.21 g/ml）、E2（43.46 pg/ml）と正常であった。

(卵巣刺激、ICSI、及び凍結保存)

重度精子運動障害からICSIとなり、卵巣刺激は、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）アンタゴニストプロトコルと組換え卵胞刺激ホルモン（150 IU、Merck Serono、ドイツ）を使用された。卵巣刺激の12日後、患者のE2は3636.83 pg/ml、LHは1.64 mIU/ml、PIは0.43 ng/ml。HCG（250 μg、Merck Serono、ドイツ）で排卵が誘発され、注射後36.5時間後に採卵が行われた。成熟した卵母細胞は10個あり、その中には結合卵母細胞も含む。卵子は同じ大きさで、1つはMII卵母細胞として現れ、もう1つは大きな空胞を持つ未熟な卵母細胞であった。透明帯領域の融合部位は形態学的に注目すべきものであり、透明帯（ZP）が不連続で明確な破損と拡大した領域があった（図1参照）。精子濃度は25百万/ml、運動率は25%で、前進運動は0%、異常形態は99.5%。すべてにICSIが行われ、ICSI後18時間の受精確認で、7個の正常受精（2PN）を示した。この中には、結合卵母細胞も含まれる。結合した受精卵は、3日目に良好な8細胞胚に分裂した（図2a）、そして5日目にGardnerの分類に従い4BBの凍結した（図2b）。正常受精胚もう2個の良好な分裂期胚も3日目に凍結された。残りの胚は、6日目に2つの低グレードの胚盤胞に到達し、凍結された。

(移植)

2021年1月に融解した分割期胚2個を3日目にレーザーを使用して透明帯に20ミリの穴が開けた。その後5日目に、1個胚盤胞段階に到達し、5BCと評価され(図2c)、もう1個の胚は分割期で停止。

胚移植の日に、夫婦には結合卵母細胞由来した胚盤胞に関するすべての情報が伝えられたが、彼らは依然として5BCと評価されたもう1個の胚と共に融解および移植を希望した(図2c、d)。結合卵母細胞由来の胚の透明帯はレーザーを使用して非薄したが、移植前に壊死した未熟卵母細胞は取り除かれなかった(図2d)。

移植時、子宮内膜の厚さは9.3mm。ホルモン補充周期。

移植後14日目に陽性の β -hCG値が検出された(1788.69mIU/ml)。胚移植後28日目に、2つの妊娠嚢と胎児の心拍が確認された。双子の女の子がそれぞれ1600gと1700gの体重で、31週間の妊娠週に帝王切開で出産。明らかな異常はなし。双子のアプガースコアは出生後1分と5分でどちらも9-9。2人の乳児は、それぞれ2200gと2400gの体重で、新生児科での20日間の観察入院後に退院し、その時点で健康指標が正常でした。さらに、出生後100日後のフォローアップを行い、それぞれ5000gと5400gの体重があった。

(考察)

我々の報告は、ICSI後の凍結胚移植周期で得られた結合卵母細胞由来の胚盤胞からの初めての生児誕生である。さらに退化した未熟な卵母細胞を取り除かずに結合卵母細胞の生児誕生が初めて達成された。

さらに私たちは文献をレビューして、生殖医療における結合卵母細胞の起源、発生率、安全性、および意義を評価した。

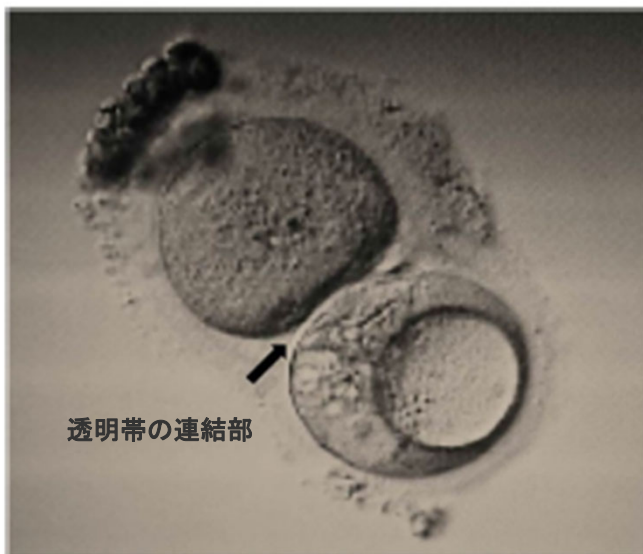


図1

1対の結合卵母細胞は、双卵卵胞から生じ、成熟卵母細胞(MII)と大きな空胞を含む未熟卵母細胞が含まれる。

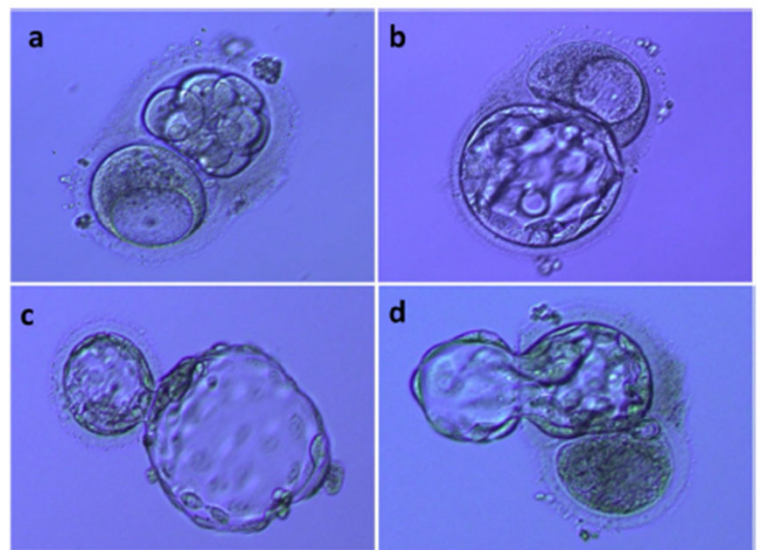


図2

- a 結合卵母細胞から良好な8細胞胚(ICSI後3日目)
- b 結合卵母細胞から良好な拡張胚盤胞(4BB)(5日目)
- c 1つの分離した卵母細胞から胚盤胞(5BC)
- d 結合卵母細胞から孵化した状態と付着している変性した未熟卵母細胞

Table 1 Cases of conjoined oocytes in previous and current studies

Maturity of gametes		Zona structure at junction	Fertilization		Fertilization method	Further development	References
Oocyte 1	Oocyte 2		Oocyte 1	Oocyte 2			
MII ²	GV	Own but connected zona	2PN	–	ICSI	Blastocyst and ET, live birth	[15]
MII ²	MII ²	Common intact single layer	2PN	–	IVF	Blastocyst, frozen-thawed and ET, live birth	[16]
MII ²	MII ²	Own but connected zona	2PN	2PN	ICSI	Blastocyst and ET, live birth	[10]
MII ²	?	A modified, discontinuous structure(see text)	2PN	–	ICSI	Blastocyst, frozen-thawed and ET, live birth	Present report
MII ²	MII ²	Own but connected zona	2PN	2PN	IVF	Cleavage and ET, no pregnancy	[11]
MII ²	?	Common intact single layer	2PN	–	IVF	Cleavage and ET, no pregnancy	[12]
MII ²	GV	Common intact single layer	2PN	–	IVF	Cleavage and ET, no pregnancy	[5]
MII ²	GV	Own but connected zona	2PN	–	ICSI	Cleavage and ET, no pregnancy	[7]
MI	MI	Common intact single layer	–	–	–	–	[16]
MII ²	MI	Common intact single layer	2PN	–	IVF	Blastocyst, cryopreservation	
MII ²	GV	Common intact single layer	2PN	–	ICSI	Blastocyst, cryopreservation	[17]
MII ²	GV	Own but connected zona	2PN	–	ICSI	Cleavage, cryopreservation	[13]
MI	Atresia	Own but connected zona	–	–	–	–	
MII ²	GV	Common intact single layer	2PN	–	IVF	Frozen for analysis at blastocyst stage	[22]
GV	GV	Common intact single layer	–	–	–	–	[5]
MII	GV	Common intact single layer	–	–	–	–	
MII ²	GV	Thin or not present	3PN	–	IVF	–	
GV	GV	Common intact single layer	–	–	–	–	
MII ²	GV	Common intact single layer	2PN	–	ICSI	Cleavage, no ET	[18]
MII ²	GV	Common intact single layer	2PN	–	ICSI	Fixed for analysis after cleavage	
MII	GV	Common intact single layer	?	?	?	?	[8]
MII ²	GV	Common intact single layer	2PN	–	ICSI	Blastocyst, no ET	[19]
MII	GV	Own but connected zona	?	?	?	?	[20]
GV	?	Thin or not present	?	?	?	?	
GV	GV	A discontinuous structure	–	–	–	–	[7]
MII	GV	Common intact single layer	–	–	–	–	
MII ²	MII ²	Common intact single layer	2PN	2PN	ICSI	Fertilized but did not developed into embryos	[14]
MII ²	GV	Common intact single layer	2PN	–	ICSI	Cleavage, no ET	
MII	MII	Within a common ZP	–	–	–	–	
MII ²	MI	Common intact single layer	2PN	–	ICSI	Cleavage, no ET	
MII ² (16)	GV (16)	Own but connected zona; Common intact single layer;	2PN (6)	–	IVF	Cleavage (4), arrest; Blastocyst (2), cryopreservation	[21]
MI (2)	GV (2)	Within a common ZP	–	–	–	–	
MI	MI		–	–	–	–	
GV	GV		–	–	–	–	
MII	GV	Common intact single layer	–	–	–	Fixed for analysis	[6]

²Mature oocyte was attempted for fertilization. ?—not indicated. *GV*, germinal vesicle; *MI*, metaphase I; *MII*, metaphase II; *PN*, pronuclei; *ET*, embryo transfer. ()—Figures in the brackets represented the number of oocytes and embryos. Bold terms highlighted pregnancy outcomes

(双卵性卵胞の起源と発生率)

卵巣の組織学的調査において、多卵性卵胞は動物や人間を含むさまざまな生物で見つまっている(24)。Gougeonら(2)は、18歳から52歳までの女性の117人の卵巣生検の結果を研究し、これらの成人女性の98%で多卵性卵胞と多核卵母細胞が見られ、その大部分(97.1%)が双卵性であることを報告した。多卵性卵胞の相対頻度は年齢に依存しないことが報告され、0.06%から2.44%の間で変動することが示された。一方、Dandekarら(3)251回の腹腔鏡による採卵の結果を公表し、卵母細胞を含む卵胞の24%が多卵性であることを報告した。ただし、これらの卵母細胞の一部が異なる卵胞から起源している可能性も否定できない。したがって、本報告は真の双卵性を最も確実に示す指標として結合卵母細胞に焦点を当てている。結合卵母細胞の形成に最も可能性が高く受け入れられているのは、初期の卵胞形成過程で顆粒細胞によって2つの個々の生殖細胞が分離されないこと。その結果、透明帯融合のパターンは、2つの生殖細胞の間の距離に依存する可能性がある。それぞれの卵母細胞の成長と透明帯形成は、共通で単層透明帯を共有する2つの卵母細胞、または各々が個別の透明帯を持ちながら特定の領域で結合した2つの卵母細胞、または非常に薄いまたは欠落している透明帯を持ちながらも変形した不連続な構造を持つ2つの卵母細胞など、さまざまな透明帯融合パターンにつながる。これらの結合卵母細胞の3つの透明帯融合パターンでの生児が報告されています。これは、さまざまな透明帯融合パターンが受精、胚発達、および妊娠結果に悪影響を及ぼさないことを示す。

(結合卵母細胞の安全性)

現在、双卵性卵胞は病的現象ではなく、自然の多型性を表すことが十分に文書化されている。双卵性卵胞が排卵する確率は非常に低いため、発生率が低い。しかしゴナドトロピンによる誘発が、人間のARTにおいて双卵性卵胞の発生率を増加させる報告もあるが(21、26)、その基礎となるメカニズムを示す証拠はない。

多くの施設で結合卵母細胞の現象が遭遇された可能性があるということは想像できるが、ART治療中に回収されたこれらの結合卵母細胞を受精、その後の胚発生および胚移植に使用すべきかどうかについては広く議論されている。結合卵母細胞はデータは限られているが双子妊娠、キメラ、モザイク、四倍体、およびテラトーマに関連している可能性が指摘されている(11)。Yasmin Magdiによって初めて健康な双子妊娠が報告され、結合した胚盤胞の移植後に起こったものであり(10)、成熟した2つの結合卵母細胞が二卵性双子妊娠の原因となる可能性を支持する証拠を示している。四倍体、キメラ、およびテラトーマの出現には、2つの結合した卵母細胞の受精、細胞の交換、または2つの発生中の胚の融合が必要とされる。ただし、この考えを支持する明確な証拠が不足しています。孵化胚盤胞の群培養により、2つの独立した胚が結合する可能性もある。ただし、これはおおよそ1500個の胚に1回の割合で発生すると報告されている。さらに、単に結合した透明帯領域が存在する場合、前述の透明帯の局所的な溶解が仮定されなければならない。したがって、結合卵母細胞から発展した2つの胚の融合が起こる確率も非常に低いと推測される。

表1を見ると、結合卵母細胞は通常非同期に成熟しており、結合卵母細胞の1つは未熟。

未熟な卵母細胞は一般的に発達停止を示す一方、成熟した卵母細胞は受精される可能性がある。Safranら[18]は、FISHを使用して結合卵母細胞の1対を分析し、各卵母細胞が、その成熟段階に対応した染色体構成を持つと結論付けた。

初期卵母細胞への精子の浸透とその後の受精は、哺乳類において非常に珍しい現象であり、定期的にはLT/Sv系統のマウスでのみ起こるようである[31]。馬[32]、キツネ[33]、犬[34]のような3種の哺乳動物では、精子の浸透は、卵母細胞が第2減数分裂の中期に成熟するまで起こらないことが実際にはある。Bradenら[36]は、第1減数分裂のアナフェーズの前に精子によって浸透された卵母細胞は、通常、適切な「透明帯反応」を開始する能力を持たないと報告した。しかし、異なる2つの精子が関与しており、定義上1つの受精卵から起こるためここでは「モザイク」という用語は適用できません。Rosenbusch[30]は文献をレビューし、現在利用可能なデータが結合卵母細胞が四倍体、キメラ、またはモザイクを生じさせる役割を支持していないと結論づけた。さらに、Gougeon[2]は、良性の嚢胞性奇形腫の起源は双卵性卵胞の存在と関連していないと示唆した。なぜなら、双卵性卵胞はすべての年齢で見られる一方、良性の嚢胞性奇形腫は若い女性に特有である。これらの報告は、双卵性卵胞が卵性双生児を生じる上で役割を果たすかもしれないが、結合卵母細胞が遺伝的異常の大部分に責任を持っているわけではないことを示唆している。

(結合卵子の意義)

文献をレビューし、結合卵母細胞の重要性を評価した。FISHによって分析された1対の結合卵母細胞から、成熟した卵母細胞が正常な単一の二倍体 (MII) 卵母細胞であり、染色体バランスのとれた胚の発育につながる可能性があることが示された[18]。表1より、過去と現在の報告では、結合卵母細胞からの39個のMII卵母細胞が受精を試みられ、そのうち27個が正常受精 (2PN) をした。25個の2PN受精卵が胚発育し、その中には11個の胚盤胞と14個の分裂期胚が含まれている。しかし、他の通常発育した胚が存在するため、結合卵母細胞からの胚移植の成功率は低い可能性がある。

本研究では、初めてICSIを用いた凍結胚移植周期で結合卵母細胞から得られた胚盤胞の生児誕生を報告している。

残念ながら、他の4つの報告では、結合卵母細胞から得られたこれらの分割期胚がどれも移植されなかったと報告されている[5, 7, 11, 12]。Jiaoら[21]は、結合卵母細胞を持つ18人の患者の特性を分析し、通常の卵母細胞と結合卵母細胞の間で分割率やD3良好胚率に有意な差がないことを報告した。これは、培養が結合卵母細胞から発生した分裂期胚の選択をさらに最適化できることを示している。結合卵母細胞に含まれる成熟卵母細胞は、通常のIVFまたはICSIによって受精され、その後の胚発育の可能性があるかと結論づけられている。これらは胚盤胞培養を推奨されている。

他の通常発育した胚は最初に移植され、結合卵母細胞は凍結されるべきである。正常形態受精卵から良好胚が発生しない場合、結合卵母細胞から生じた良好胚は、患者の同意を得て新鮮または凍結胚移植周期で移植を試みることができる。

(結果)

過去の報告では、結合卵母細胞の非同期成熟が明らかになっている (表1)。胚移植前の未熟な卵母細胞をどのように扱うかが広く懸念されている。透明帯の融合により、胚が拡張したり孵化する能力を損なう可能性がある。以前の2つの報告では、未熟な卵母細胞を移植前にレーザーを使用して結合卵母細胞から取り除き、生児誕生が推奨されている[15, 16]。

Cumminsら[15]は、結合卵母細胞の未熟な卵母細胞が3日目にレーザーで除去と報告した。Yanoら[16]は、連結卵母細胞の未受精の退行した卵母細胞を取り除いた後、胚移植前に透明帯を薄くするためにレーザーが使用されたと報告した。

この研究は、未熟な退行した卵母細胞を取り除かず結合卵母細胞の生児誕生の初の報告であり、未熟な退行した卵母細胞が後続の胚発育や妊娠結果に悪影響を与えないことを示す。ただし、凍結保存によって透明帯硬化が引き起こされ、胚の孵化困難を引き起こす可能性がある[37]。レーザー補助孵化 (LAH) はこの問題を克服できる[38]。

そのためLAHは内細胞塊に近い場所で施行し、未熟な退行した卵母細胞を移植前に保持することを推奨する。

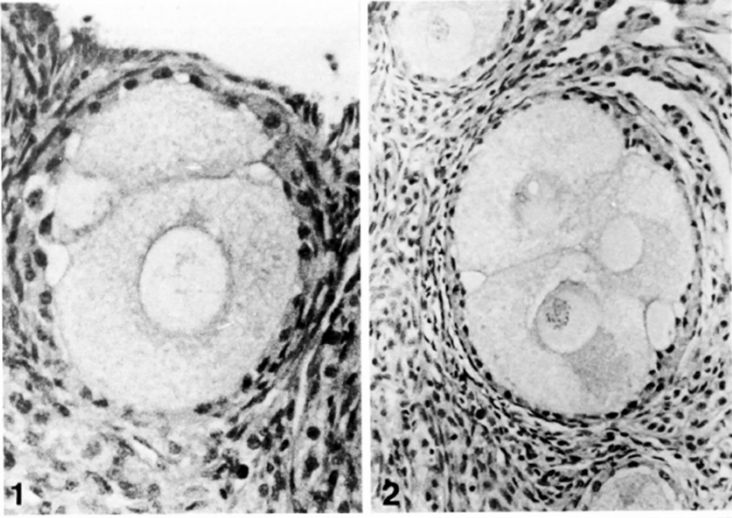
公表された過去および現在の報告からの結果を考慮すると、結合卵母細胞からの成熟卵母細胞は通常のIVFまたはICSIによって受精され、胚の発育、その後の妊娠、そして生児誕生につながることを示す。

文献を見直すことにより、結合卵母細胞から発生した分割期胚の選択をさらに最適化し、妊娠結果に有益であることが分かった。

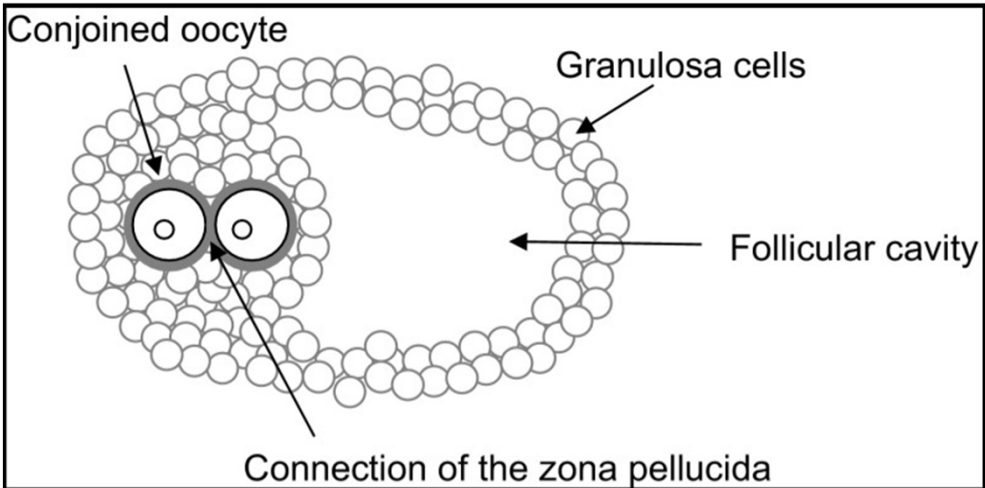
通常発育した他の胚は最初に移植され、結合卵母細胞から発生した胚は凍結されるべきである。

卵子の正常な形態から良好な胚が発生しない場合、結合卵母細胞から生じた良好胚は、患者の同意を得て移植を試みることができる。

補足資料



Polyovular follicle
多卵性卵胞



Binovular follicle
双卵性卵胞