

The developmental potential of mature oocytes derived from rescue in vitro maturation

Adi Kuperman Shani, M.D.,^{a,b} Lilach Marom Haham, M.D.,^{a,b} Hanna Balakier, Ph.D.,^a Iryna Kuznyetsova, Ph.D.,^{a,c} Siamak Bashar, Ph.D.,^a Erin N. Day, B.Sc.,^a and Clifford L. Librach, M.D.^{a,b,c,d,e,f}

^a CReATe Fertility Centre, Toronto, Ontario, Canada; ^b Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; ^c Laboratory of Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; ^d Institute of Medical Sciences, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; ^e Department of Physiology, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada; ^f Sunnybrook Research Institute, Toronto, Ontario, Canada

Abstract

目的

排卵誘発周期において採取された未熟卵子が、Rescue IVM を経て成熟した場合の発生能力を同一患者の体内で成熟した卵子と比較して評価すること

研究デザイン

後ろ向きコホート研究

対象

排卵誘発周期で未熟卵子が採取され、少なくとも 1 個の成熟卵子が Rescue IVM により得られた 182 名の患者(200 周期)

方法

排卵誘発周期において回収された未熟な胚細胞(GV/MI 期)に体外受精を行い、受精率、割球率、胚盤胞形成率、PGT-A を評価し、胚の形態運動学的パラメータと妊娠転帰を比較した。

結果

200 周期で合計 2,288 個の卵子を採取し、1,056 個(46%)が回収時点で MII 期卵として分類された。MI 期卵の 89%(333/375)と GV 期卵の 54%(292/540)が一晩で成熟し ICSI を実施した。Rescue IVM を行った未熟卵の受精率は MII と同等であった。早期割球率は Rescue IVM 卵母細胞で有意に低下していた。胚盤胞形成率は MII 期卵より低い。胚盤胞の染色体正常率は同等であった。Rescue IVM 胚は 2 細胞および 4 細胞段階での多核化率が高く、不規則な細胞分裂が増加した。Rescue IVM 胚の移植 21 回のうち、3 例が健康な生児出生した。

結論

採卵時に成熟卵子数が少ない、または成熟率が低い患者において、Rescue IVM は、同一刺激周期内で移植可能な胚盤胞を増やし、妊娠および生児誕生の機会を最大化する可能性がある。

■ Background

生殖補助医療において成熟卵子の獲得は、治療成功を予測する重要な要素の一つである。現在、卵子の成熟度の評価はクムルス・オオフォラス複合体(COC)の除去後に行われる核成熟の判定に基づいており、成熟卵子は第一減数分裂を完了し、第一極体を放出した中期 II(MII)卵子として定義され、未熟卵子は減数分裂の第一分裂前期 I(GV期)または胚性小胞崩壊後の中期 I(MI)期にあるものと定義される。細胞質の成熟は、核の成熟と同様に、卵子の発生能力を獲得するために不可欠であるが、その基盤となるメカニズムは完全には解明されておらず、細胞質成熟の完了を示す特定の形態学的指標は存在しない。排卵誘発後に採取されたすべての卵子が希望する成熟状態に達するとは限らず、採取された未熟卵子は、一般的に生殖目的には不適格とみなされ、多くの場合は廃棄される。これらの未熟卵子の体外成熟(IVM)に関する報告は多数あり、培養条件や培養時間にさまざまなバリエーションが存在するが、Rescue IVM で成熟した卵子の生殖能力については未だ明確な結論が得られていない。採卵時に成熟卵子数が少ない患者にとって、1 個でも多くの卵子や胚が得られることは、妊娠の可能性を高める要素となり、未熟卵子の有効活用は貴重な追加胚となる可能性がある。本研究の目的は、成熟率が低い、または採取できる成熟卵子の数が少ない周期において、Rescue IVM による卵子の発生能力を評価することである。

■ Materials and Methods

研究対象とデザイン

施設：カナダ・トロントの CReATe Fertility Centre

デザイン：後ろ向きコホート研究

期間：2019 年 1 月から 2021 年 4 月

対象：IVF 周期のうち Rescue IVM によって少なくとも 1 個の成熟卵が得られ、顕微授精に使用された、18-45 歳の女性で、MII 卵の割合が 50%以下、または採卵された MII 卵の総数が 6 個以下、または成熟率が 50%-70%と境界値であり、過去に成熟率が低かった、または受精率が低かった症例

除外基準：Rescue IVM を行った未熟卵が 1 つも成熟しなかった周期、ドナー卵を使用した症例および外科的に回収された精子を使用した症例

卵巣刺激、トリガー、および採卵

卵巣刺激：hMG 単独または、FSH 製剤との併用

下垂体抑制：GnRH アゴニストまたは GnRH アンタゴニストを使用

最終卵子成熟のトリガーは超音波検査において直径 18mm 以上の主席卵胞が少なくとも 2 個確認された日に実施した。

トリガー：hCG 単独、リユープロリド単独、2 つの併用

採卵はトリガー投与 36 時間後に経膈超音波ガイド下で実施した。超音波で確認できる直径 12mm 以上のすべての卵胞を吸引した。

体外受精ラボプロトコル

採卵後約 1-3 時間以内に、COC をヒアルロニダーゼ溶液に曝露して剥離し、核成熟状態を評価し、MII に分類された卵子は顕微授精を実施した。未熟卵は、Sage 1 step™ 培地に、FSH 75 IU/mL および LH 75 IU/mL を添加し、一晚培養した。採卵後 17-24 時間以内に MII に達した卵子はそれぞれ ICSI を実施した。すべての ICSI 後の卵子は、個別培養トリガスインキュベーターを使用した。ICSI 後 16-18 時間で受精を評価した。正常受精は 2 つの極体と 2 つの前核が確認されたもの、異常受精は 1 つの前核または 3 つの前核が認められたものと定義した。胚の分割は前核確認後 48 時間後に評価した。採卵数が極端に少ない場合や胚の質が低い場合は、Day 3 で移植または凍結保存した。

胚盤胞の形態評価：Day 5~6 に Gardner 分類を用いて分類

良好胚盤胞：ICM および TE のグレードが AA, AB, BA, BB (胚盤胞の拡張度も評価したがグレードには含めず。)

モルフォキネティクス

合計 117/172 個(68%)の培養された胚が、タイムラプス型の EmbryoScope インキュベーター内で胚盤胞段階まで培養され、残りの胚は K-System インキュベーターで培養された。

胚発生に関するパラメータ：

tPNf (前核消失の時間)：前核が視認できなくなった時点

t2, t3, t4, t5：2細胞期、3細胞期、4細胞期、5細胞期への分裂時間

AZC (異常接合子分裂)：最初の有糸分裂で(1~3個)細胞の異常分裂

tSB (胚盤胞化の開始時間)：胚腔が最初に確認された時点

tB (完全な胚盤胞形成の時間)：胚盤胞が完全に形成された時点

第一分裂時間 (t2-tPNf)

第二分裂時間 (t3-t2)

第三細胞周期 (t5-t3)

3細胞から4細胞への分裂の同期性 (t4-t3)

さらに、2細胞期(MN2)および4細胞期(MN4)における多核(Multinucleated, MN)割球の存在についても記録した。

着床前胚異数性検査 (PGT-A)

TE生検の実施は主治医の助言と患者の希望に基づき事前に決定した。AA~CCのすべての生存可能な胚盤胞を生検対象とした。レーザー補助TE生検は、拡張胚盤胞(Day 5~6)の段階で実施した。

胚移植

移植する胚は胚のグレードとPGT-Aの結果に基づいて決定した。

初期胚移植は、新鮮胚または凍結胚のいずれかで実施した。

胚盤胞はすべてガラス化保存され、その後ホルモン補充周期または自然周期のいずれかで凍結融解胚移植を移植した。

妊娠の確認：胚移植12日後に血清 β -hCGレベルを測定し妊娠を確認した。

評価項目

・主要評価項目

受精率、分割率、胚盤胞形成率、生検を行った胚盤胞の異数性評価

・副次評価項目

良好胚盤胞率、モルフォキネティクス、臨床転帰

■ Results

全体として200回の排卵誘発周期を実施した182名の患者から、合計2,288個の卵子が採取され、研究の基準を満たした。

患者の平均年齢は 37 ± 4 歳(範囲: 25~45歳)であった。

不妊治療の適応疾患は、25.8%が卵巣予備能低下、17.6%が男性因子であった。35名の患者は2つ以上の診断を併せ持っていた。69.5%の患者がデュアルトリガーを使用した。トリガー実施日の平均卵胞数(15mm以上)は 9.4 ± 5.9 個(95%信頼区間: 8.5~10.2)であった。

・卵胞の成熟状態

1,056個(46%)の卵子がMII卵と分類された(1周期あたり平均 5.7 ± 1.6 個)。375個(16%)がMI卵子、688個(30%)がGV卵子であった。変性または過熟により169個の卵子が廃棄された。MI卵子はすべてRescue IVMのため夜間培養を実施した。GV卵子については、採取時にすでに高い割合のMIIおよびMI卵子が得られた場合、Rescue IVMの対象とはならず、最終的に540個のGV卵子がRescue IVMのため培養された。Rescue IVMの結果、MI卵子の89%、GV卵子の54%がMIIへ成熟しICSIを実施した。1つもMII卵子が得られなかった10周期は除外された。

・受精および胚発生(TABLE 1：R 胚と成熟卵の受精率と早期分割率の比較)
 Rescue IVM によって成熟した卵子の受精率はそれぞれの MII 卵子と同等であった。異常受精率についても、Rescue IVM 卵と MII 卵の間に有意な差は見られなかった($p > 0.05$)。しかし早期分割率は Rescue IVM 胚で有意に低下していた。全体として、200 周期のうち 172 周期(86%)が胚盤胞まで培養された。得られた胚盤胞数は R-GV 由来：52 個、R-MI 由来：66 個、MII 由来：382 個であった。42 周期では MII 胚盤胞が得られず、そのうち 17 周期では Rescue IVM 胚盤胞が唯一の移植または PGT-A 対象であった。

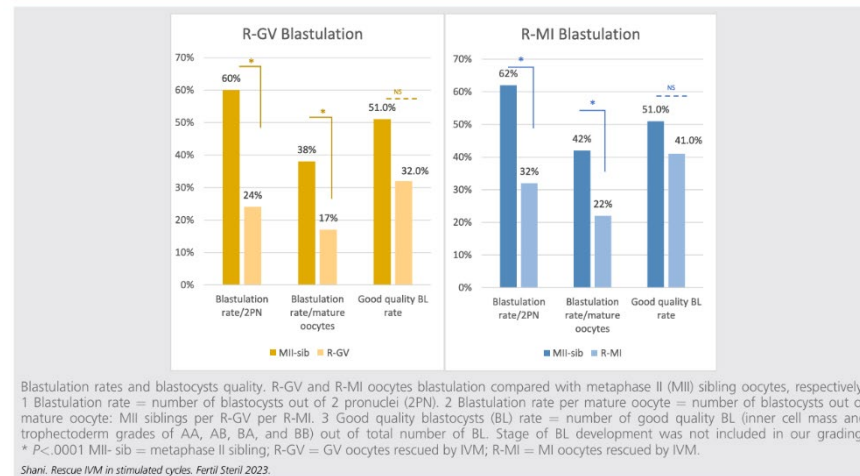
TABLE 1

	MII siblings for GV		R-GV		MII siblings for MI		R-MI	
	n	Rate ± SD (%)	n	Rate ± SD (%)	n	Rate ± SD (%)	n	Rate ± SD (%)
ICSI of matured oocytes (N)	759		285		881		323	
Fertilization rate 2PN	0.63 ± 0.29 (469)		0.66 ± 0.38 (188)		0.66 ± 0.28 (564)		0.71 ± 0.37 (226)	
Rate ± SD (N)								
Abnormal fertilization rate (1PN + 3PN)	0.09 ± 0.18 (70)		0.06 ± 0.18 (21)		0.08 ± 0.18 (85)		0.10 ± 0.25 (34)	
Rate ± SD (N)								
D3 (>4 cells) rate ^a	0.95 ± 0.28 (432)		0.8 ± 0.42 (149)		0.92 ± 0.195 (466)		0.80 ± 0.35 (171)	
Rate ± SD (N)								

GV = germinal vesicles; ICSI = intracytoplasmic sperm injection; 1PN = one pronucleus; 3PN = 3 pronuclei; MI = metaphase I; MII = metaphase II; SD = standard deviation; R-GV = GV oocytes rescued by IVM; R-MI = MI oocytes rescued by IVM; R-oocytes = either GV and/or MI oocytes rescued by IVM.
^a Cleavage rate per number of 2PN
^b Paired analyses were performed separately for each type of R-oocyte vs. its MII-sibling control.
 Shani. Rescue IVM in stimulated cycles. Fertil Steril 2023.

・胚盤胞形成率(Figure 1)
 Rescue IVM 胚盤胞の形成率は、成熟卵子あたりも受精卵あたりも MII 胚盤胞と比較して有意に低下していた。ただし、Rescue IVM による胚盤胞はそれぞれ 1 周期あたり平均 0.5 ± 0.87 個、 0.53 ± 0.73 個の追加の胚盤胞を提供していた。良好胚盤胞の割合 (AA, AB, BA, BB グレード) は、R-GV 胚盤胞：32%、R-MI 胚盤胞：41%、MII 胚盤胞：約 51%であり、統計的な有意差はなかった。

FIGURE 1



・着床前遺伝学的検査(Figure 2：胚盤胞の染色体倍数性の比較)
 285 個の MII 胚盤胞および 86 個の Rescue IVM 胚盤胞(R-GV：39 個、R-MI：47 個)が TE 生検および PGT-A 解析を受けた。この検査対象の患者の平均年齢は 36.93 歳であり、全体の研究集団とほぼ同じであった。PGT-A の結果、R-GV 胚盤胞の 38%、R-MI 胚盤胞の 42.5%がユープロイドであり、Rescue IVM 胚盤胞と MII 胚盤胞の正常倍数体率に有意な差はなかった。アネプロイドやモザイク率にも有意な差は見られなかった。

・モルフォキネティクス評価 (Figure 3)
 169 個の R-GV 胚のうち 95 個、207 個の R-MI 胚のうち 126 個、MII 胚 277 個の形態運動学的パラメータが示されている。Rescue IVM 胚は、MII 胚と比較して、第 1・第 2 有糸分裂の持続時間が有意に延長していた。また Rescue IVM 胚は、MII 胚よりも

有意に早く胚盤胞形成を開始したが完全胚盤胞の形成時間においては有意差は見られなかった。Rescue IVM 胚は、2細胞期および4細胞期で有意に高い多核化を示し、異常接合子分裂（AZC）の頻度も高かった。

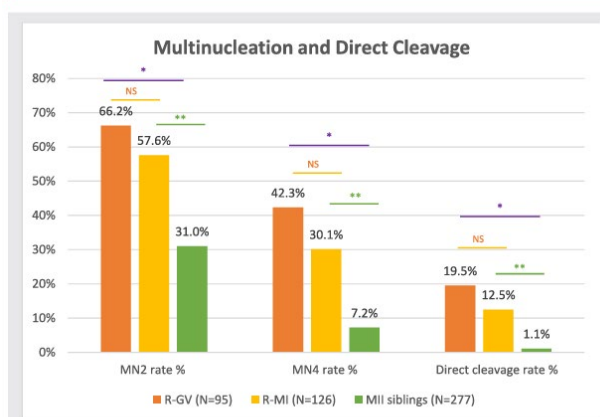
FIGURE 2



Ploidy in rescue in vitro maturation vs. metaphase II (MII)-sibling blastocysts (BLs). Percentage, preimplantation genetic testing for aneuploidy results for BLs from MII sibling vs. R-germinal vesicles BLs (20 cycles) and MII siblings vs. R-metaphase I (MI) BLs (34 cycles). $P < .05$ was considered statistically significant. NS = not significant; R-GV = GV oocytes rescued by IVM; R-MI = MI oocytes rescued by IVM.

Shani. Rescue IVM in stimulated cycles. Fertil Steril 2023.

FIGURE 3



Multinucleation and AZC MN2, MN4 = multinucleated blastomeres at 2- and 4-cell stages, respectively; AZC = abnormal zygote cleavage, meaning direct cleavage of zygotes from one to 3 to 4 cells. Percentage of embryo MN and AZC in rescue in vitro maturation and control groups. $P < .05$ was considered statistically significant. Non paired analysis. * R-GV zygotes vs. MII zygotes. $P < .0001$ ** R-MI zygotes vs. MII zygotes. $P < .0001$ NS = not significant; R-GV = GV oocytes rescued by IVM; R-MI = MI oocytes rescued by IVM.

Shani. Rescue IVM in stimulated cycles. Fertil Steril 2023.

・臨床成績

本研究期間中、18名の患者が合計20回のRescue IVM胚の移植を受け、7件の妊娠（5件の継続妊娠、3件の生児出産）が確認された。

■Discussion

本研究の結果、Rescue IVM胚は発生能力が低下していることが確認された。その理由としては2つ挙げられている。

① 核成熟と細胞質成熟の非同期性

卵胞内では成熟を抑制する微小環境が存在し卵子とクムルス細胞の相互作用によって成熟が制御されているが、Rescue IVMではこの抑制環境から卵子が急激に解放されるため、減数分裂が自発的に進行し、核の成熟が完了する。しかし、細胞質の成熟はより複雑なプロセスを伴い、核成熟と同じ速度で進行しない可能性がある。クムルス細胞との相互作用が早期に失われることで、ミトコンドリア機能の低下、細胞骨格の不安定化、紡錘体形成異常といった細胞質成熟の欠陥が発生しやすくなる。この影響が、Rescue IVM胚におけるAZC、多核化、胚盤胞形成率の低下の原因と考えられる。

② 体外環境による影響

Rescue IVMで培養される卵子は、すでにゴナドトロピンの影響を受けた後の卵胞から採取されており、さらに排卵誘発剤による刺激を受けた状態にある。このような条件下でも未熟卵子が採取される場合、本来の発生能力が低い卵子である可能性や成熟の遅れによる細胞内ストレスの増加が考えられる。

本研究の結果では、Rescue IVM胚はMII胚と比較して有意に胚盤胞形成率が低下していたが、得られた胚盤胞の染色体正常性は同等であった。これは、Rescue IVM胚の一部は発生能力が低下するものの、適切に成熟すれば正常な発生過程をたどることができる可能性を示唆している。

本研究の強み

1. Rescue IVM 胚の PGT-A データを含む最大規模の解析を実施した
2. 各患者の MII 胚と Rescue IVM 胚を直接比較するペアード解析を採用し個体差を考慮した

本研究の限界

1. 対象患者が成熟率の低い特定の集団に限定されており、一般的な IVF 患者への適用にはさらなる検討が必要
2. Rescue IVM 胚の移植回数が限られており長期的な妊娠成績の評価が困難
3. Rescue IVM の成熟成功率が低い周期は解析から除外されており、全体の成功率には影響している可能性がある

■ Conclusions

Rescue IVM は成熟卵子数が少ない患者において、追加の胚盤胞を提供し、移植可能な選択肢を増やす可能性があることが示された。胚盤胞形成率は低下していたが、得られた胚盤胞のユープロイドの割合は MII 胚と同等であった。したがって、Rescue IVM は成熟卵子数の少ない患者にとって重要な選択肢となり得るが、PGT-A による選別プロセスが不可欠である。