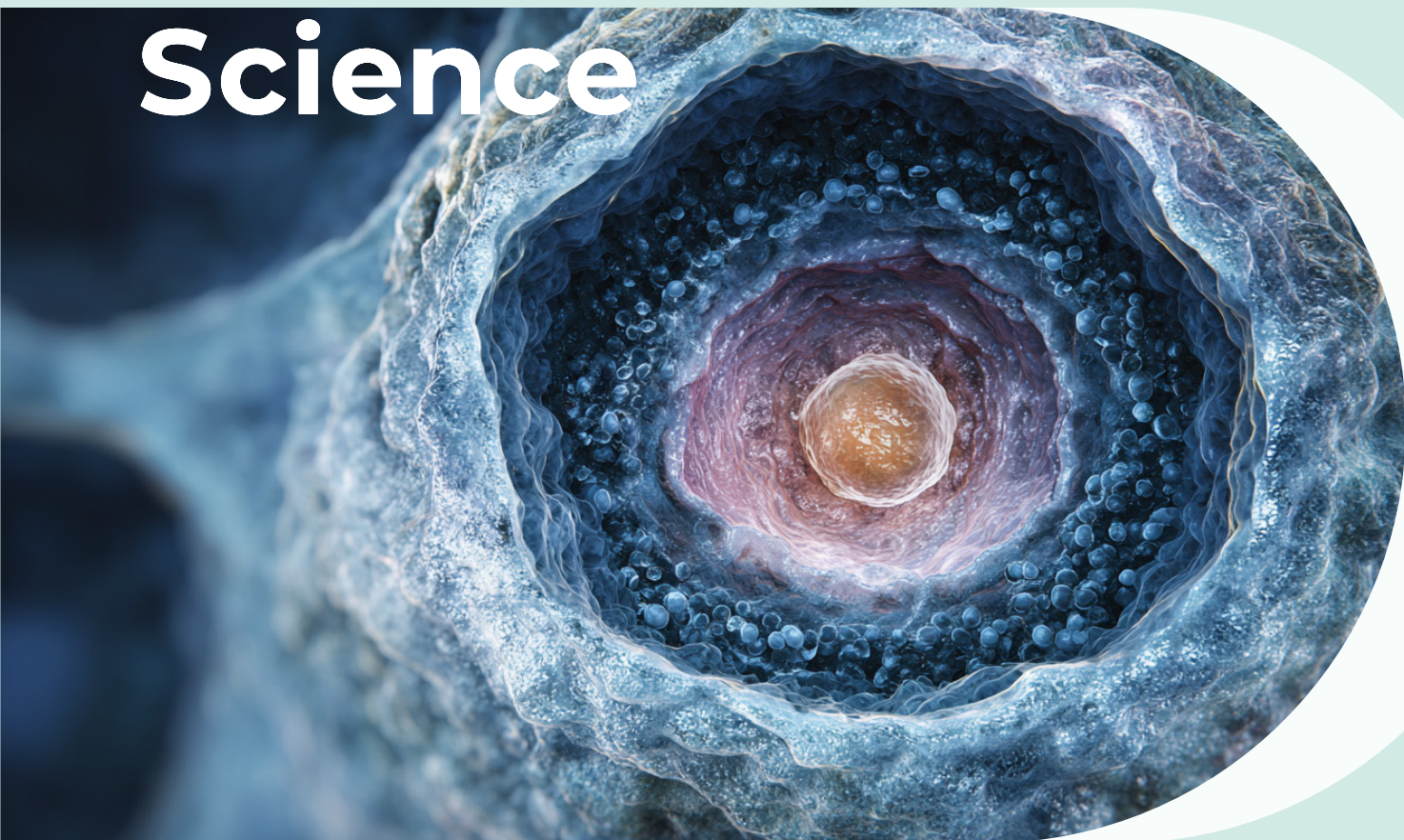


Perspectives of Reproductive Science

vol.

5



今号の表紙画像は画像生成AIを用いて制作しました。

編集会議

編集委員長 吉村やすのり^{いのち}生命の環境研究所 吉村 恭典 先生

編集委員 順天堂大学大学院医学研究科 産婦人科学 教授 河村 和弘 先生
東京医科大学病院 産科・婦人科 教授 小野 政徳 先生

特集論文

- **若い卵胞の微小環境への曝露による老化卵子の若返り**
Rejuvenation of aged oocyte through exposure to young follicular microenvironment
- **非重度男性因子による不妊症カップルに対するIVFとICSIの比較：
無作為化臨床試験**
IVF versus ICSI in patients without severe male factor infertility: a randomized clinical trial
- **反復着床不全の定義を検証**
— 11,463例から得られた未検査胚31,478個における累積出生率 —
Cumulative live birth rates of 31,478 untested embryos from 11,463 women challenge
traditional recurrent implantation failure definitions

編集委員長



Yasunori Yoshimura

吉村やすのり
生命の環境研究所
吉村 泰典 先生

編集委員



Kazuhiro Kawamura

順天堂大学大学院医学研究科
産婦人科学 教授
河村 和弘 先生

編集委員



Masanori Ono

東京医科大学病院
産科・婦人科 教授
小野 政徳 先生

老化卵子の若返り

吉村 女性の生殖機能の低下は、卵子のagingが大きく関わっています。卵巣内の卵子の数のみならず、質の低下が主たる要因と考えられております。卵子内ミトコンドリア注入、卵細胞質置換や核置換など、これまで様々な卵子の若返り法が考案されてきていますが、臨床的にみて未だ有効な治療法とはなり得ておりません。今回最初に取り上げた論文は、卵子と顆粒膜細胞間の相互依存的な関係、卵子の若返りについて検証した研究です。河村先生、まず研究方法の概略について説明していただけますか。

河村 卵子のagingには卵子を取り巻く卵胞の体細胞が重要な役割を果たしています。この役割を調べるため、高齢マウスの二次卵胞から卵子を除去し、そこに若齢マウスの二次卵胞から卵子を挿入します。また、その逆のパターン、すなわち若齢マウスの二次卵胞から卵子を除去し、そこに高齢マウスの二次卵胞から卵子を挿入して、再構成キメラ卵胞 (RCF) を作製します。これをアルギン酸ゲル内に包埋し、著者等が開発した方法で培養して様々な検証を行った研究です。

吉村 若齢マウスと高齢マウスでは顆粒膜細胞にどのような差異がみられるのでしょうか。

河村 高齢マウス由来の卵胞の顆粒膜細胞は、若齢マウス由来の卵胞の顆粒膜細胞と比べて、増殖活性を示すKi-67陽性細胞の割合が有意に低いことが分かりました。また、DNA損傷の指標である γ H2AX陽性細胞や、アポトーシスの指標である活性型カスパーゼ-3/7陽性細胞の割合が高く、細胞老化の特徴も示していました。さらに、ミトコンドリア膜電位の低下や活性酸素種 (ROS) の増加が認められ、高齢マウス由来の卵胞の顆粒膜細胞では、加齢による異常が蓄積されていることが明らかになりました。

吉村 卵胞細胞の老化が卵子のクオリティに及ぼす影響について検証するために、様々な再構成キメラ卵胞を作製していますが、その結果はどうでしたか。

河村 若齢マウス卵子を高齢マウス卵胞へ移植した場合 (YA RCF)、減数分裂による成熟が有意に低下し、紡錘体の異常や染色体の整列異常が多く認められました。さらにROSレベルの上昇と、ミトコンドリア膜電位の低下が認められました。その卵子を体外受精すると、胚盤胞形成率が低下し、老化した卵胞環境にさらされた若い卵子の発生能も低下することが示されました。

逆に、高齢マウス卵子を若齢マウス卵胞へ移植 (AY RCF) すると、培養中に死滅する再構成キメラ卵胞の割合が低下し、卵子の核成熟が若い卵子と同程度に回復しました。共焦点レーザー顕微鏡による評価では、卵子の紡錘体異常および染色体の整列異常が有意に減少しました。また、体外受精による試験では胚盤胞形成率が向上しました。さらに、胚盤胞のサイズや総細胞数が有意に増加し、内細胞塊を示すOCT4陽性細胞数が増加しました。

さらに、AY RCF由来の卵子を用いた体外受精胚移植試験では、若齢マウス由来の卵子と若齢マウス卵胞を再構成し (YY RCF)、受精させ胚移植した場合の生児出生率 (46%) には劣るものの、高齢マウス由来の卵子と高齢マウス卵胞を再構成し (AA RCF)、受精させた場合よりも有意に高い (約3.5倍) 生児出生率を示しました。



吉村 老化卵子を用いた実験で、卵子-顆粒膜細胞間の構造に変化がみられていますが、どのような変化ですか。

河村 Transzonal projection (TZP) と呼ばれる卵子と顆粒膜細胞間の相互作用を媒介する構造があり、このTZPを介して顆粒膜細胞から発育中の卵子に必須栄養素と代謝物が供給されます。この実験では、再構成キメラ卵胞を作製すると3時間以内に機能的なTZPが再形成されることを明らかにしています。これまで、TZPの量は卵胞の老化中に減少することが知られており、AY RCFでは、AA RCFに比べ、TZP形成の改善が示されました。この変化が、卵子の質の向上に関係している可能性が示唆されました。

吉村 再構成キメラ卵胞における卵子の遺伝子発現に違いはありますか。

小野 今回の再構成キメラ卵胞を用いた実験では、若い卵胞環境に移植された老化卵子 (AY 群) と、老化卵胞環境に留まった老化卵子 (AA 群) で、遺伝子発現に違いが観察されました。

RNA-seq 解析において、YY 群 (若い卵子 + 若い卵胞) と AA 群 (老化卵子 + 老化卵胞) の比較で 1,774 遺伝子の発現が有意に異なっていました。そして AY 群の遺伝子発現は、AA 群よりも YY 群に近似していました。つまり、若い卵胞環境に置かれることで老化卵子の遺伝子発現が部分的に「若返り」を示したことになります。若い卵胞環境に置かれることで機能的に回復した経路として、エストロゲンシグナル、Ras シグナル、ヌクレオチド除去修復 (DNA 修復関連)、代謝・ミトコンドリア関連があげられました。これらは卵子発育や染色体安定性に関連する経路であり、卵子発生能の改善に関与していると考えられます。

吉村 卵子のミトコンドリア機能や減数分裂に与える影響について説明してもらえますか。

小野 ミトコンドリアにおける ATP 産生量は AA 群で低下していましたが、AY 群では回復しました。また、AA 群の卵子ではミトコンドリアが不均一に凝集する「クラスター状」の分布を認めました。これは老化卵子の特徴として知られています。一方、AY 群では、ミトコンドリアは細胞質全体に均一な分布を示し、YY 群に近いパターンを再現しました。さらに、JC-1 や TMRM を用いた解析により、AY 群の卵子では膜電位が改善しミトコンドリアの機能が高まっていることが確認されました。また、AA 群の卵子では ROS の蓄積が顕著でしたが、AY 群では ROS レベルが有意に低下し、酸化ストレスの低減も認められました。

AA 群では、減数分裂中に染色体の不整列や紡錘体の異常が頻繁に認められましたが、AY 群ではこれらの異常が有意に減少していました。また、AA 群では染色体の接着を保つコヒーシン (Rec8) の減少が確認されましたが、AY 群では Rec8 が部分的に回復しており、染色体の早期分離のリスクが低減しました。さらに、キネトコア-微小管結合において、AA 群では誤った結合 (merotelic, lateral, unattached) が多く観察されましたが、AY 群では正しい結合が増え、誤った結合が有意に減少しました。

吉村 河村先生、この研究成果の臨床的意義についてはいかがでしょうか。

河村 論文では、若い顆粒膜細胞を使った若い卵胞環境の再構築といった細胞治療により、高齢患者の卵子の質改善の可能性について言及しています。しかし、自家移植を想定した場合、iPS 細胞から若い顆粒膜細胞を作製することは理論的に可能ですが、倫理的・安全性ハードルはかなり高いと考えられます。一方、他家移植を想定した場合、顆粒膜細胞をどのように準備するかが課題となります。

老化には個人差があり、比較的若い女性でも卵巣の老化が進んでいる可能性があるため、卵胞の顆粒膜細胞を用いて卵子の老化を間接的に評価できれば、非侵襲的な評価が可能となるため、臨床での応用が期待されます。

吉村 小野先生はいかがですか。

小野 この研究の臨床的意義は、1) 卵子の質低下は一部可逆的であるという新しい視点を提供したこと、2) 将来的に細胞療法や人工卵胞環境を用いた生殖医療の開発につながることで、3) 高齢不妊症に対する生殖医療の治療成績改善に貢献する可能性があること、にあると考えます。

吉村 老化した卵子の遺伝子発現が顆粒膜細胞により変わりが得ることが直接的に示された点で、非常に面白い論文だと思いました。

IVFとICSIの差

吉村 現在実施されている生殖補助医療においては、3分の2ほどの治療周期でICSIが採用されています。2つ目に取り上げた論文は、非重度男性因子による不妊症カップルにおけるICSIとconventional IVFを比較した多施設共同試験です。河村先生、研究対象ならびに方法を説明していただけませんか。

河村 本研究では、以前にcIVFまたはICSI治療を受けたことがなく、BMIが18~35kg/m²の18~42歳の女性と、男性パートナーの精子調整後の前進運動精子が200万個以上でcIVFによる受精条件を満たしているカップル、または同条件のドナー精子を用いた治療を対象としています。主な除外基準は、4cmを超える卵巣嚢腫、肝疾患または腎疾患、コントロールされていない甲状腺疾患、子宮内膜症ステージ3~4、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症、または糖尿病や心血管疾患などのその他の重度の合併症を有する女性です。研究方法は、デンマークの6つの公立大学病院で実施された非盲検多施設ランダム化比較試験になります。主要評価項目は1年以上の治療期間における累積生児出生率です。





吉村 結果はどうでしたか。

河村 2019年11月から2022年12月の間に824組が登録されました。このうち414組がICSI群に、410組がcIVF群に排卵誘発後にランダムに割り付けられました。ランダム化直後に2組が同意を撤回し、アウトカムは、ICSI群414組とcIVF群408組を対象としたITT解析と、ICSI群388組とcIVF群378組を対象としたper-protocol解析の両方を用いて評価されました。per-protocol解析では、卵子採取日に予想外に精子数が少なかった方、誤ってICSIではなくcIVFを受けた方、卵子が採取されなかった方が除外されています。

ITT解析の結果、累積生児出生率はICSI群で43.2%、cIVF群で47.3%であり、リスク比は0.91 (95%CI 0.79-1.06) でした。また、per-protocol解析でも同様の結果が得られました。二次解析では、32歳以下の若年女性と正常卵巢予備能（採卵卵子数10～15個）の女性において、cIVFと比較してICSIがマイナスの影響を与えることが示されました。

吉村 この結果から、どのようなことが言えるのでしょうか。

河村 この結果は、ICSIが累積生児出生率を改善しないことを示しています。正常または重度ではない精子質低下患者に対してはcIVFが第一選択治療であることを支持するものであり、ICSIは重度の男性因子不妊症にのみ適用すべきとしています。しかしながら、患者、医師、評価者いずれも割り付けについて非盲検であり、パフォーマンスバイアスの可能性は否定できません。

反復着床不全

吉村 生殖医療において、依然として着床不全の病態については不明な点も多く、子宮側と卵子側の双方の因子が関与していると考えられています。最後の論文は、反復着床不全の定義について検証したものです。まず、小野先生、研究デザインについて説明していただけますか。

小野 この研究は、ベルギーのアントワープ大学病院における大規模な後方視的コホート解析です。2010年から2022年までに実施されたIVF/ICSIのうち、PGT-Aや卵子提供、代理母などを除いた症例が対象で、最終的に11,463人、19,378周期、合計31,478回の胚移植が解析されました。解析にはカプランマイヤー法を用い、治療中断によるバイアスを補正するため逆

確率重み付け法 (IPW) が併用されています。

吉村 結果についてはいかがですか。

小野 累積出生率 (cLBR) は胚移植回数が増えるごとに上昇し、3回の胚盤胞移植後には約51%、6回では約68%、10回では78%に達しました。注目すべきは、cLBRの頭打ちがみられず、繰り返すごとに上昇が続いた点です。ただし年齢の影響は大きく、35歳未満では4回の胚移植で約69%に到達する一方、38-40歳では43%、41歳以上では20%以下と低下を認めました。また、胚の形態、卵巢刺激に対する反応、胚盤胞形成率も重要な規定因子であることが示されました。

吉村 この研究成果を、今後の実地臨床にどのように生かすことができるでしょうか。

小野 従来「3回連続不成功で反復着床不全」という固定的な定義が広く用いられてきましたが、本研究はそうした一律の基準に疑問を投げかけています。むしろ「累積出生率60%」といった指標を閾値に、年齢や胚質を加味した個別評価を行うことが現実的だと思われます。繰り返しの胚移植後でも妊娠・出産の可能性は十分残されているため、カウンセリングで「希望を持って治療継続する意義がある」と伝える根拠となります。

吉村 河村先生はいかがですか。

河村 この研究成果をそのまま受け入れると、PGT-A未実施の胚盤胞でも移植回数を増やせば、反復着床不全に対する介入治療をしなくても妊娠するということになってしまいます。しかし、結果を全ての患者に適用するのは早計な判断と考えます。特に、移植胚盤胞数を増やすことができない早発卵巢不全患者やがん生殖の患者などでは、異なった治療戦略が必要となります。また、この研究は後方視的研究であり、交絡因子の影響、特に子宮の異常に関する因子のデータ化・層別解析が十分ではないため、解釈に限界がある点にも注意が必要です。

吉村 本日はお二人の先生方から大変有益なお話を伺うことができました。お忙しいところご参集賜りましてありがとうございます。



若い卵胞の微小環境への曝露による老化卵子の若返り

Rejuvenation of aged oocyte through exposure to young follicular microenvironment
Wang H, et al. Nat Aging. 2024; 4(9): 1194-1210.

Point

3D再構成キメラ卵胞 (Reconstituted chimeric follicle, RCF) 培養法により、Transzonal projection (TZP) を介した卵子-顆粒膜細胞間の適切なコミュニケーションを再現し、卵胞細胞の老化が卵子に与える影響について評価した。

卵子を除去した卵胞に別の卵子を移植する方法により、老化した卵胞内で培養された若い卵子は減数分裂による成熟と発生能が阻害されたが、若い卵胞内で培養された老化卵子は、体外受精および胚移植後の成熟率、胚盤胞形成および出生率において有意な改善が示された。この老化卵子の若返りは、卵胞の顆粒膜細胞との相互作用の強化、トランスクリプトームおよびメタボロームのリモデリング、ミトコンドリア機能の改善および正確な染色体分配に関連していた。これらの知見は、女性の不妊治療における卵胞細胞ベースの治療法の可能性を示している。

学術的背景

女性の生殖老化は、卵子の量と発生能の低下が関係しており、原因のひとつとして栄養と調節因子の供給によって卵子の成長と発育を支える、卵胞の老化が考えられている。卵子と卵胞の

顆粒膜細胞が相互依存的な関係にあることは以前より知られているが、両者の老化が及ぼす影響について理解するには、それぞれの老化状態を変化させるアプローチが必要となる。

結果

●加齢による卵胞細胞の老化

高齢マウス (14~15ヵ月齢) 卵胞の顆粒膜細胞が、若齢マウス (2~3ヵ月齢) 卵胞の顆粒膜細胞よりも老化の特徴を示すか検証した。増殖活性を示すKi-67陽性細胞の割合は、若齢マウスの卵胞と比較し、高齢マウスの卵胞で有意に低かった。また、高齢マウスの卵胞細胞は、DNA損傷の指標である γ H2AX陽性細胞や、アポトーシスの指標である活性型カスパーゼ-3/7陽性細胞の割合が高く、老化の特徴を示した。さらに、高齢マウスの卵胞細胞は、若齢マウスの卵胞細胞に比べてミトコンドリア膜電位が低下し、活性酸素種 (ROS) が増加していた。これらの結果は、加齢に伴い卵胞細胞は異常を蓄積することを示している。

●卵胞の発育を促進する3D培養法の確立

マウス卵巢から二次卵胞を単離し、アルギン酸-再構成基底膜相互浸透ネットワークハイドロゲル内に包埋して培養した (図1A)。この方法により卵胞の形態が維持された状態で成長し、胞状期に到達することが可能となった (図1B)。この培養法で発育した卵子は、体内で発育した卵子と同等の大きさ、成熟率、および受精後の胚盤胞形成能を示し、卵子のトランスクリプトームについても体内で発育した場合と類似していた。これらの結果から、この3D培養法は体内環境をおおむね再現し、卵子の成長と発育を支えることが示された。

高齢マウス (14~17ヵ月齢) の卵胞は若齢マウス (2~3ヵ月齢)

の卵胞よりも発育が遅く、閉鎖卵胞の割合が高いことが確認された (図1C~E)。

●再構成キメラ卵胞の作製

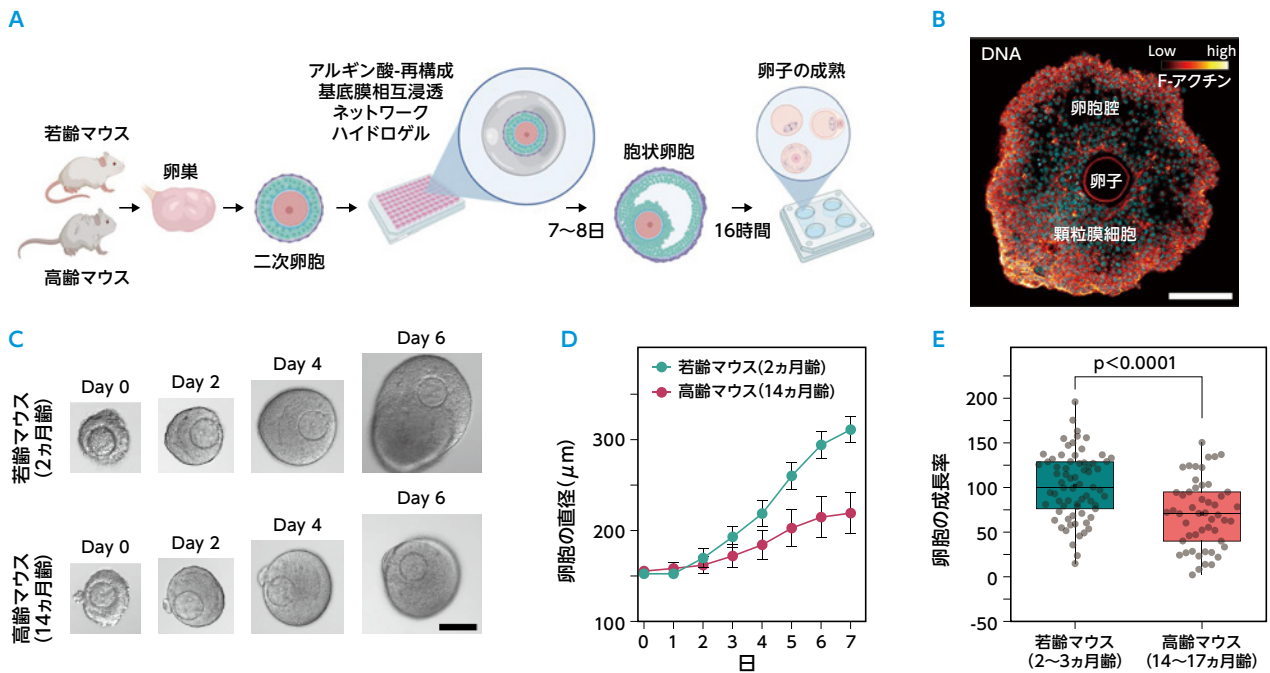
卵胞細胞の老化が卵子の質に及ぼす影響について調べるために、若齢マウス卵子 (Y) を高齢マウス卵胞 (A) へ移植した再構成キメラ卵胞 (YA RCF) と、対照として若齢マウス卵子 (Y) を若齢マウス卵胞 (Y) に移植した再構成キメラ卵胞 (YY RCF) を作製した (図2A,B)。YA RCFの卵子は、減数分裂による成熟が有意に低下し (図2C)、未処置若齢マウスの卵子やYY RCFの卵子と比較し、紡錘体の異常や染色体の整列異常が頻繁に認められた (図2D~F)。

YA RCFの卵子は、未処置若齢マウスの卵子やYY RCFの卵子に比べてROSレベルが高く、ミトコンドリア膜電位が低下していた。体外受精後の胚盤胞形成率も未処置若齢マウスの卵子やYY RCFの卵子より低く、老化卵胞が若い卵子の発育を損なうことが示された (図2G)。

●若い卵胞の環境は老化卵子の成熟および発生能を改善

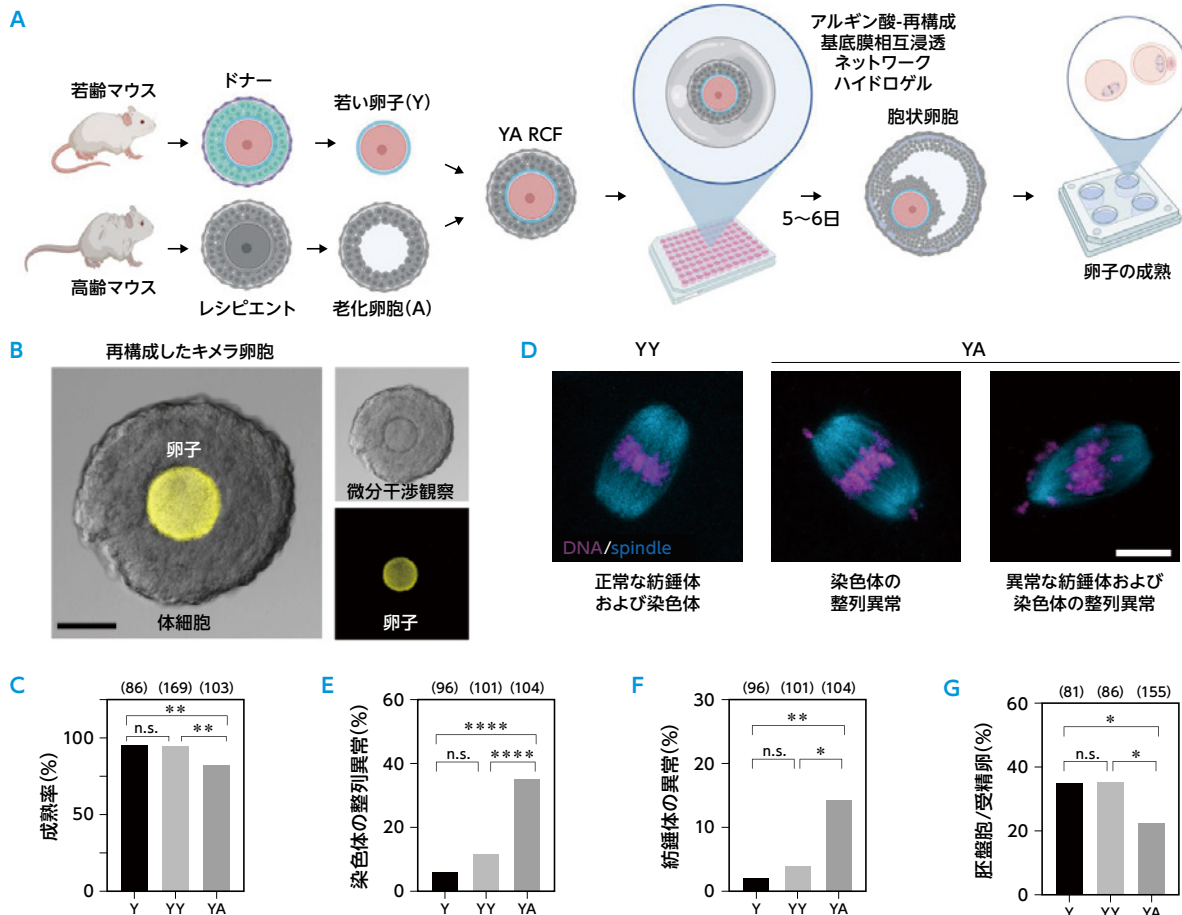
老化卵子は若い卵胞内で培養することで死滅する割合が低下し、減数分裂による成熟がYY RCFの卵子と同程度まで回復した。共焦点レーザー顕微鏡による評価では、AY RCFの卵子はAA RCFの卵子と比べて、紡錘体の異常や染色体の整列異常の

図1 3D ex vivo卵胞培養システムによる卵胞の発育



(A) 3D ex vivo卵胞培養システムの模式図。(B) ファロイジン(F-アクチン)とDAPI(DNA)で染色した3D ex vivo培養の卵胞。スケールバー、100 μm。(C) 3D ex vivo培養卵胞の連続画像。スケールバー、100 μm。(D) 卵胞の直径変化。若齢マウス(n=18)と高齢マウス(n=18)。データは平均±標準誤差で示した。(E) 7日間培養した卵胞の成長率。若齢マウス(n=69)、高齢マウス(n=51)。対応のない両側t検定。

図2 老化した卵胞の環境は若い卵胞の質と発生能を損なう



(A) 老化した卵胞に若い卵胞を移植するRCFシステムの模式図。(B) mTmGマウス由来の卵胞(疑似的に黄色で表示)と野生型マウス由来の卵胞(非蛍光)を用いたRCFの画像。スケールバー、50 μm。(C) 卵胞成熟率の比較。n.s. 有意差なし。(D) YY RCFおよびYA RCFのMII卵胞における減数分裂紡錘体および染色体。スケールバー、10 μm。(E) 卵胞における染色体の整列異常。(F) 卵胞における紡錘体の異常。(G) 体外受精後の胚盤胞形成率。C~Gは若齢マウス(2ヵ月齢)および高齢マウス(14ヵ月齢)を用いた。CおよびE~GはFisherの直接確率検定(両側)を行い、括弧内は卵胞数を示す。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.0001$ 、すべてのデータは3回以上の独立した実験より得られたものである。

頻度が有意に低下していた。AA RCFの卵子は、YY RCFの卵子に比べて体外受精による胚盤胞形成率が低いが、AY RCFの卵子では有意に改善した。さらに、AY RCFの胚盤胞のサイズや総細胞数は、AA RCFの胚盤胞よりも有意に増加していた。

AY RCFの卵子は、AA RCFの卵子や未処置高齢マウスの卵子に比べて、出生率が約3.5倍高かったが、YY RCFの卵子よりは低かった。未処置高齢マウスの卵子とAA RCFの卵子を比較した結果、ROSレベル、成熟率、紡錘体の異常や染色体の整列異常の頻度、胚盤胞形成率、胚盤胞サイズのいずれにおいても有意差は認められなかった。以上の結果は、若い卵胞の環境が老化卵子の質と発生能を部分的に回復させることを示している。

● AY RCFではAA RCFよりもTZPの形成が増加 ……………

TZPは卵子-顆粒膜細胞間の相互作用を媒介する構造であり、顆粒膜細胞から卵子へ必須の栄養や代謝物が供給される経路である。RCF内でのTZP再形成を観察するため、mTmGトランスジェニックマウス由来の卵胞（赤色蛍光を発する）に卵子を移植した結果、卵子と接触する突起の先端にN-カドヘリンが存在することが確認された。また、Calcein AM（ギャップ結合透過性蛍光色素）で前処理した卵胞に卵子を移植したところ、卵子内にも蛍光が検出された。この色素移行はギャップ結合阻害剤により阻害された。これらの結果は、RCF内の顆粒膜細胞がTZPを伸ばして卵子表面に到達し、卵子と卵胞のコミュニケーションが再構成されていることを示している。

YA RCFではYY RCFと比較し、卵子の周囲長あたりのTZP数が少なく、老化した顆粒膜細胞におけるTZP形成能の低下が認められた。AY RCFではAA RCFや未処置高齢マウスよりもTZP密度が有意に高かった。AY RCFにおけるTZP形成の改善は、若い顆粒膜細胞が老化卵子の発育をより良く支えることを示している。

● RCFにおける卵子のトランスクリプトーム

および代謝のリモデリング ……………

YY、AY、AA RCFの卵子について単一卵子RNAシーケンスを実施した。YY RCFの卵子とAA RCFの卵子の間で合計1,774個の遺伝子に発現レベルの違いが確認され、そのうち1,116個が発現上昇、658個が発現低下を認めた。AA RCFの卵子で発現低下を認めた遺伝子群は、タンパク質のエピジェネティック修飾や細胞間コミュニケーションに関連していた。一方、発現上昇を認めた遺伝子群は、代謝プロセスやミトコンドリア機能に関連していた。AY RCFの卵子における遺伝子発現パターンは、AA RCFの卵子よりも、YY RCFの卵子に近い特徴を示した。また、AA RCFの卵子で影響を受けていた経路のうち、エストロゲンシグナル、Rasシグナル、ヌクレオチド除去修復経路など、卵子の

発育や品質管理に関連する経路がAY RCFの卵子では回復している可能性がGSEAによって示された。さらに、LC-MS/MSベースのメタボローム解析では136種類の代謝産物が同定され、34種類でYY、AY、AA RCFの卵子に有意差がみられた。

● 若い卵胞は老化卵子のミトコンドリア機能を改善 ……………

AA RCFの卵子ではATP産生が低下していたが、AY RCFの卵子ではATP産生がほぼ回復していた。AA RCFの卵子ではミトコンドリアが不均一で、クラスター状に分布していた。一方、AY RCFの卵子ではミトコンドリアがより均一に分布し、YY RCFの卵子に近いパターンを示した。また、AY RCFではミトコンドリア膜電位も大きく回復し、ROSレベルもAA RCFに比べて低下していた。

● AY RCFにおける減数分裂時の染色体分配の改善 ……………

AA RCFの卵子ではYY RCFの卵子に比べ、染色体の異数性や姉妹染色分体の早期分離の頻度が高かった。しかし、AY RCFでは染色体の異数性が有意に低下し、姉妹染色分体の早期分離も減少傾向を示した。減数分裂におけるコヒーシサブユニットRec8の染色体上におけるシグナル強度を測定したところ、AA RCFではYYより有意に低下していたが、AY RCFではAAよりも有意に高かった。

まとめ

若い卵胞の環境が、老化卵子の成熟効率を回復し、その後の胚発生と生児出生率を高める可能性がある。

Keyword

Transzonal projection (TZP)

卵子と顆粒膜細胞／卵丘細胞のコミュニケーション能力を担い、アクチンを基盤とした突起を介して、ギャップ結合を通じ多くの必須栄養素や代謝前駆物質を供給する。

mTmGトランスジェニックマウス

細胞膜局在性の赤色蛍光タンパクを発現するマウスで、生きた細胞のイメージングに用いられる。

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

特定の遺伝子群を遺伝子セット (Gene Set) として準備しておき、増加または減少した遺伝子群が、どの遺伝子セットに多く含まれているかを調べる解析方法。

コヒーシン

染色体の均等分配に必須のタンパク質複合体で、その機能不全は不妊と関連すると考えられている。

非重度男性因子による不妊症カップルに対するIVFとICSIの比較：無作為化臨床試験

IVF versus ICSI in patients without severe male factor infertility: a randomized clinical trial
Berntsen S, et al. Nat Med. 2025; 31(6): 1939-1948.

Point

非重度男性因子による不妊症カップルにおいて、ICSIはconventional IVFに対して累積生児出生率の有意な改善を示さなかった。

非重度男性因子による不妊症カップルに対するICSIについて議論が続いている。デンマークの公立大学病院6施設において、非重度男性因子による不妊症カップル824組を対象に、conventional IVF (cIVF) に対するICSIの優位性を、多施設共同非盲検無作為化比較試験で調査した。Intention-to-treat (ITT) 解析における累積生児出生率は、ICSI群が43.2%、cIVF群が47.3% (相対リスク=0.91、95%CI 0.79, 1.06、 $p=0.24$) で、ICSI群が累積生児出生率を改善しないことが示された。この結果は、非重度男性因子による不妊症カップルに対して、cIVFが第一選択治療であることを支持している。

学術的背景

現在、生殖補助医療全体の3分の2でICSIが行われているが、これはICSIが重度の男性因子による不妊症カップル以外にも広く行われていることを示している。ICSIは、精子数や運動率の低下による受精困難を克服する生殖補助医療として有効性が確立されている。一方で、非重度男性因子による不妊症カップルに対してcIVFよりICSIが有益なのか、明確なエビデンスはないのが現状である。Perspectives of Reproductive Science vol.3では、アジアで実施された非重度男性因子による不妊症カップルでのICSIとcIVFの出生率を比較し、ICSIに改善が認められな

かったことを紹介した。非重度男性因子による不妊症カップルへのICSIは、cIVFに比べ金銭的負担が大きくなることもあり、再考を促す報告が続いている。本研究は、欧州の日常診療を反映した精子の質が正常あるいは重度でない低下を呈する、またはドナー精子を使用する不妊症カップルを対象とした大規模無作為化臨床試験である。不妊治療を適切に評価する累積生児出生率を主要評価指標とし、cIVFに対するICSIの優位性を高い頑健性のもと比較した。

結果

2019年11月29日から2022年12月14日の間に、デンマークの公立大学病院6施設において、初めて不妊治療 (ICSIまたはcIVF) を受ける非重度男性因子による不妊症カップル824組が、本臨床試験に参加した。無作為化後に同意を撤回した2組を除いた822組で解析を行い、男性パートナーの精子を使用した参加者は、ICSI群が73.2%、cIVF群が71.1%であった (表1)。

ITT解析における主要評価項目 (累積生児出生率) は、ICSI群が43.2%、cIVF群が47.3% (相対リスク=0.91、95%CI 0.79, 1.06、 $p=0.24$) で、cIVFに対するICSIの優位性は認められなかった (表2)。採取された卵子1個あたりの受精率 (2前核胚数) は、ICSI群が53.5%、cIVF群が58.1% ($p \leq 0.001$) で、ICSI群はcIVF群よりも大幅に低かった。完全受精障害は、ICSI群では20例 (4.8%) に、cIVF群では15例 (3.7%) に発生した。治験計画を厳密に遵守した症例を対象としたper-protocol解析での累積生児出生率は、ICSI群が43.0%、cIVF群が49.2% ($p=0.09$) で、

ITT解析と同様にICSIの優位性は認められなかった。複数の出生児を有する被験者と初回胚移植後の出生率は、どちらもcIVFに比べ、ICSIで有意に低かった。

2次解析において、若年女性 (32歳以下) ではICSIがマイナスの影響を及ぼす可能性が示された (図)。若年女性がICSIを行った場合、9組に1組の割合で出生児が減少する可能性が示された。cIVFによる利点として精子の自然淘汰の関与が考えられた。一方、卵巣反応が低い女性では、ICSIが卵子の質の低下を補い有益である可能性が示された。

表1 患者背景 (ITT解析)

		ICSI群 (414組)	cIVF群 (408組)
平均年齢 (標準偏差)	女性	33.0歳 (4.6)	33.5歳 (4.4)
	男性	34.2歳 (5.7)	34.6歳 (6.0)
男性パートナーの精子を使用した参加者、n (%)		303 (73.2)	290 (71.1)
ドナー精子を使用した参加者、n (%)		111 (26.8)	118 (28.9)
採卵当日の精子サンプル			
正常なWHO精液基準値*の男性パートナー、n (%)		210/289 (72.7)	207/274 (75.5)
*精液量、総精子数、精子濃度、総運動能に関する下限基準値に準拠 (WHO第6版)			

図 母親の年齢と累積生児出生率およびリスク差

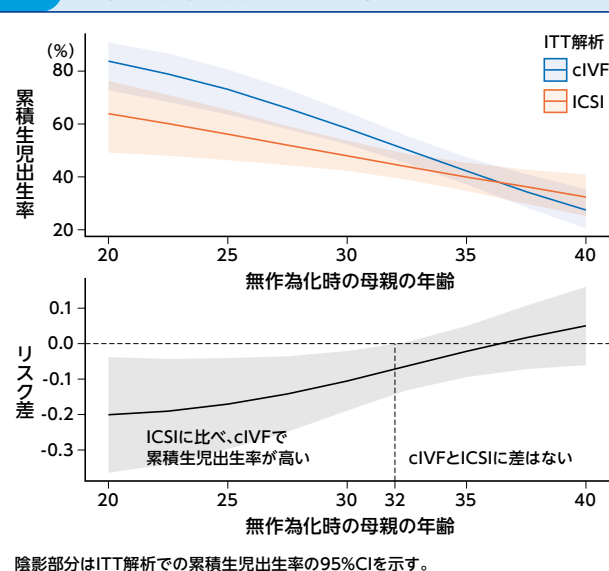


表2 臨床アウトカムの結果 (ITT解析)

	ICSI群 (414組)	cIVF群 (408組)	相対リスク (95%CI)	p値
累積生児出生率、n (%)	179 (43.2)	193 (47.3)	0.91 (0.79, 1.06)	0.24
複数の出生児を有する被験者、n (%)	7 (1.7)	16 (3.9)	0.43 (0.17, 1.00)	0.06
初回胚移植後の出生率、n (%)	110 (26.6)	129 (31.6)	0.84 (0.68, 1.04)	0.11
2前核胚数、n (%)	1,940/3,628 (53.5)	1,983/3,412 (58.1)	0.92 (0.88, 0.96)	≤0.001
完全受精障害率、n (%)	20 (4.8)	15 (3.7)	1.29 (0.68, 2.54)	0.44

試験概要

試験デザイン	多施設共同非盲検無作為化比較試験
対象患者	過去にcIVFまたはICSI治療を受けたことがなく、BMIが18~35kg/m ² の18~42歳女性で、男性パートナーの精子が密度勾配遠心分離後に前進運動精子200万個を含む、またはドナー精子を使用する不妊症のカップル
主な除外基準	臨床試験への参加同意が得られなかったカップル、重度の合併症 (4cmを超える卵巣嚢胞、肝疾患または腎疾患、制御不能な甲状腺疾患、子宮内膜症ステージ3~4、低ゴナドトロピン性性腺機能低下症、または糖尿病や心血管疾患などのその他の重度の合併症を含む) を有する女性、およびドナー卵子または凍結卵子を使用しているカップルなど
プロトコール	不妊治療の手順は確立された慣行に準拠し、卵巣刺激、経腔超音波、排卵誘発、人工授精 (ICSIまたはcIVF)、胚培養、黄体期サポート、胚移植および凍結保存を行った。採卵当日、射精液中の全精子および運動精子の濃度を評価した。密度勾配遠心分離後の前進運動精子数が200万個を下回った場合は、割り付けに関係なくICSIを実施した。卵子への人工授精は、治療実施施設で定められた手順に従い、無作為化に基づいてICSIまたはcIVFを実施した。cIVF群では、0.1~0.3×10 ⁶ 個/mLの前進運動精子を含む精液を卵子に人工授精した。5日目に単一胚盤胞移植を実施した。余剰胚盤胞は5~6日目にガラス化して保存した。受精卵移植後11~16日目に血清妊娠検査、妊娠7~9週目に経腔超音波検査を実施し妊娠継続を確認した。
臨床アウトカム	主要評価項目は、累積生児出生率 [生殖補助医療周期 (胚移植および凍結融解胚移植を含む) 完了後に少なくとも1人の生児出生] 副次評価項目は、最初の胚移植後の出生率、複数の出生児を有する被験者の数、2前核胚数、完全受精障害率など
統計解析	ベースライン特性および臨床アウトカムの統計解析は、連続変数およびカテゴリ変数に基づいてStudent t検定、Mann-Whitney U検定あるいはχ ² 検定を用いて評価した。p値が0.05未満の場合、統計的に有意とみなした。

まとめ

本研究では、非重度男性因子による不妊症カップルにおいて、cIVFに比べICSIは累積生児出生率の有意な改善を示さなかった。過去のエビデンスと合わせ、非重度男性因子による不妊症

カップルに対するICSIの日常的な使用は、再考の必要がある。安全で簡便であり、卵子と精子の両方に優しく費用対効果に優れているcIVFが推奨される。

反復着床不全の定義を検証

—11,463例から得られた未検査胚31,478個における累積出生率—

Cumulative live birth rates of 31,478 untested embryos from 11,463 women challenge traditional recurrent implantation failure definitions

Dhaenens L, et al. Hum Reprod. 2025; 40(5): 818-833.

Point

PGT-A未検査胚でも、複数回の胚移植で累積出生率(cLBR)が上昇することが示された。

11,463例をコホートとする後ろ向き研究で、cLBRはPGT-A未検査胚の移植回数に合わせて上昇し、逆確率重み付け(IPW)の結果、cLBRは胚盤胞移植6回目で68.3%、10回目で78.0%に達した。cLBRは卵巣反応、胚盤胞形成率との相関が認められた。

PGT-A: 着床前胚染色体異数性検査

学術的背景

ART(生殖補助医療)における成功率は上昇しているものの、着床不全は依然として根強い課題である。最近の研究から、5回の正倍数体胚盤胞移植後にcLBRが98%に達したと報告があり、ほとんどの着床不全は子宮内膜由来ではなく胚由来である可能性が示唆されている。しかし、これらの知見をPGT-A未検査の

患者に外挿できるかは不明である。理論モデルでは、年齢別正倍数体胚盤胞率に基づいて累積着床率が推定されているが、リアルワールドデータは限られている。本研究では、PGT-A未検査胚の連続移植後のLBRを評価し、cLBRがプラトーに達する臨界的な胚移植回数が存在するかを調べた。

結果

対象は平均年齢 33.9 ± 5.0 歳、36歳超が32.5%、40歳超が11.4%であった。主な不妊原因は、男性因子(42%)と原因不明(24%)で、採卵数10個、移植胚2個(各々中央値)であった。合計31,478回の胚移植から、11,566件の生化学的妊娠が確認され、7,604件の出生が得られた。

● 移植回数とLBR

移植回数の増加に伴いLBRは低下する傾向がみられた。移植あたりの平均LBRは分割期胚で21.0%(新鮮胚20.6%、凍結融解胚22.4%)、胚盤胞で25.7%(新鮮胚29.5%、凍結融解胚23.1%)であった。

cLBR50%に達する連続胚移植の回数は、分割期胚で5回(95%CI: 5-5)、胚盤胞で3回(95%CI: 3-3)であった。特に36歳超で胚盤胞は分割期胚より早く出生が得られる傾向がみられた(胚盤胞で6回[95%CI: 5-6]、分割期胚で11回[95%CI: 10-NA])。

● IPW法によるcLBR

移植後に治療を中止する患者は、治療を継続する患者と比較してLBRが異なる可能性があると仮定し、cLBRをより正確に予測するために、全患者が最大数の胚移植を完了したように補正

するIPW法を用いた。対象は選択バイアスを最小化するため、完全な記録を持つ単一胚盤胞移植の患者に限定した。比較として、治療を中断した患者が継続した患者と同等のLBRを持つと仮定した楽観的仮説および治療を中断した患者は出生を得られないとする保守的仮説による解析も行った。その結果、IPW法で推定されたcLBRは、保守的仮説と楽観的仮説の間に位置したが、楽観的仮説に酷似していた(図1)。cLBRは胚盤胞移植3回目で51.1%(95%CI: 49.2-53.0%)、6回目で68.3%(95%CI: 64.6-72.0%)、10回目で78.0%(95%CI: 69.5-86.5%)と増加し、胚移植回数においてプラトーは確立しなかった。

年齢層別解析では、高齢になるにつれて、より多くの胚盤胞が必要であることが示された。cLBR50%を達成できた移植回数は、35歳未満で2回、35-37歳で3回、38-40歳で5回であった(図2)。

卵巣反応別では、過剰反応群および正常反応群は2回、低反応群および不良反応群は4回の連続した移植後にcLBR50%に達した。また胚盤胞形成率は卵巣反応と年齢に影響される。若年層や正常・過剰反応群では胚盤胞形成率が高めに安定しているが、年齢が上昇したり卵巣反応が低下したりすると、胚盤胞形成率は低下した。特に低反応群や高齢群では、採卵数が増えても胚盤胞形成率は改善されないことが示された。

図1 IPW法および保守的/楽観的仮説を用いたcLBR

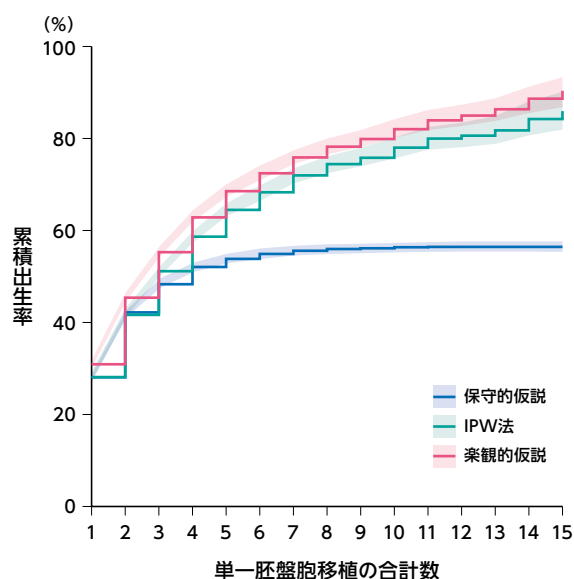
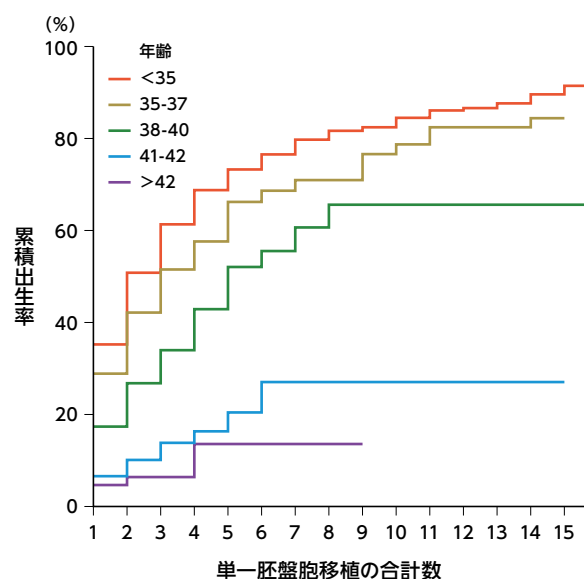


図2 IPW法を用いたcLBRの年齢層別解析



試験概要

試験デザイン	単一施設、非介入後ろ向きコホート研究
対象患者	2010年1月から2022年12月にIVF/ICSIを施行した11,463例(19,378周期、胚移植31,478回)。2回以上で2個以上の胚移植を行ったカップルのみを分析に含めた。
主な除外基準	PGT、卵子提供、代理出産、または分割期胚と胚盤胞期胚の混合移植
プロトコール	下垂体機能を抑制後、150-300IUのゴナドトロピンを連日投与し、卵胞径が17-20mmに達したら排卵を誘起した。移植条件として分割期胚では4細胞以上かつフラグメンテーションが30%未満であること、胚盤胞では、GardnerとSchoolcraftの分類に基づき評価された。移植は初期には分割期胚が主流であったが段階的に胚盤胞移植へ移行し、2016年以降は全て5日目移植を行った。また、移植後は黄体期管理を行った。
臨床アウトカム	出生率
統計解析	ロジスティック回帰分析(年齢、胚の質およびステージで調整)により、2回目以降の胚移植におけるLBRに対する過去の移植胚数の予測モデルを構築した。登録された診断がある症例については感度分析を行いモデルに診断を追加した。 cLBRは、出生までの移植胚数をカプランマイヤー法で分析した。治療継続を従属変数とし、時間変動共変量(年齢、治療開始年、胚のステージ、採卵数、および妊娠検査陽性記録)および時間不変共変量(主要な不妊症診断)を独立変数として、ロジスティック回帰を用いて重みの分母を計算した。楽観的仮説は、出生がなくその後の治療に戻らなかった女性を打ち切りとした。保守的仮説は、治療を中断した女性には出生を達成しなかったと仮定し、打ち切りとしなかった。逆確率重み付け(IPW)を用いたカプランマイヤー法では、打ち切りデータによる潜在的なバイアスを考慮して調整した。さらにIPW分析は年齢、卵巣反応、胚盤胞形成率で層別化した。最終的に外れ値の影響を防ぐために99パーセンタイルで切り捨てた。
研究の限界	後ろ向き研究デザインによるものであり、回帰分析では潜在的な交絡因子について調整したが残余交絡が持続する可能性がある。

まとめ

反復着床不全であっても、複数回の胚移植を通じて出生を得る可能性が示された。cLBRに影響を与える要因として年齢、胚の質、卵巣反応、および胚盤胞形成率があり、これらを考慮して治療に取り組む必要がある。

Keyword

IPW 分析

治療継続患者だけのデータ解析では過大評価される可能性がある。IPW分析では治療継続患者に「重み」をつけて解析し、治療中断による選択バイアスを補正することで、全員が治療を継続した場合のcLBRを推定した。

