

## 反復着床不成功

### —配偶子や胚の要因について—

大泉 News Paper No.68 (2012. 08. 01 発行)では「着床について—子宮内膜が胚を受け入れることについて—」をテーマに子宮内膜の問題についてお話ししました。現在の不妊治療において体外受精—胚移植は最後の治療手段ですが、体外受精をしても中々妊娠してくれない方がいます。その中の一部の人は何度胚移植をしても着床・妊娠してくれないで悩んでいます。今回は「着床反復不成功」について生殖医療の分野ではとても質の高い「Fertility and Sterility (Volume 97, Issue 5, Pages 1021-1027, 2012)」と言う雑誌に掲載された論文を元に話をします。

ちょっと難しいところも出てきますが、ご容赦下さい。

---

染色体異常、精子の DNA 損傷、透明帯の硬化、卵子・胚の培養条件、そして胚の発育不良は繰り返す「着床反復不成功」(以降では「RIF」と略します)の原因となっています。体外受精の技術が進歩しても、未だに繰り返して着床が不成功になってしまう方が沢山います。形態の良い(質の良い)胚を繰り返し移植しても着床しない(妊娠しない)場合に「着床反復不成功」(RIF)と定義します。2-6回の採卵をしても妊娠に至らない場合、質の良い胚を10個以上移植しても妊娠しない場合に「RIF」と称します。しかし、3回採卵して、良好な胚を移植しても巧いかなかつたなら「RIF」を疑って検査することは考えてもよいのではないのでしょうか？体外受精の技術的な進歩にもかかわらず、「RIF」は診療を行う医師や胚培養士にとっても大きな悩みとなります。子宮内へ胚が着床するためには、胚の質、適切は培養条件、子宮内膜の受容能、母体の免疫状態(胚を受け入れるために子宮内は免疫学的に寛容な状態になる必要があります)などが巧く働く必要があります。

「RIF」の患者さんで胚が子宮内で発育するのに影響を与える原因として現在分かっていることについてここで紹介します。そして移植に適した卵子や胚の選択技術の最近の進歩について、また、「RIF」の最近勧められている治療法についてもお話します。

---

それでは一つ一つ検討してまいります。

---

### 染色体異常

染色体の数の異常は体外受精後の「着床反復不成功」(RIF)の大きな理由の一つです。「RIF」の女性においては数の異常ではなくて、「転座、モザイク、逆位そして欠失など」の染色体の構造に異常を持つ頻度が高いことが示されています。Sternらの研究では、「RIF」の女性では2.5% (13/514)に染色体異常が認められます。その染色体異常の多くは染色体の転座(相互転座やロバートソン転座)によるもののようです。そしてそれが原因で着床します。従って、「RIF」の夫婦は染色体を調べることを考慮してもよいのかもしれませんが。(両親にこのような染色体の転座があると卵

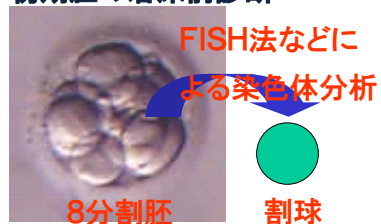
子や胚にその転座が受け継がれてしまうことがあります。そのような転座を胚が持つと流産をしてしまうことはよく知られていますが、実は流産以前に着床不全の原因にもなっている可能性が示唆されています。)

胚の染色体に数の異常があると着床率が下がり、妊娠しても流産してしまうことが多くなります。しかし、今の標準的な胚の外見の評価方法では「正常な染色体の胚」と「異常な染色体の胚」を区別することはできません。年齢が高い、習慣流産、「着床反復不成功」などの適応で着床前スクリーニング(「PGS」と略します。胚の割球を1つもしくは2つ取り出して染色体の数を調べて、染色体数が正常である胚かどうかを調べる検査)を受けた胚や卵子を調べた結果、体外受精で得た胚や卵子の多くは染色体異常がある結果着床できないことが分かりました。採卵媒精から3日後の初期胚と言われるステージ(8分割)の割球の染色体(13番染色体, 16番染色体, 18番染色体, 21番染色体, 22番染色体, X, and Y),の数をFISH法(fluorescence in-situ hybridization)で調べたところ、「RIF」の方の胚で染色体の数の異常がある確率は何と67%でした。高いですね！一方、コントロールグループ(「RIF」ではない方)の胚では36%ということですから、「RIF」の方では折角育った胚でも染色体の数の異常がある確率はとても高いものだったとPehlivanら(2)は報告しています。もう一つの研究ではCGH法(comparative genomic hybridization)と言う別の染色体の検査法を使ったものですが、やはり割球を一つ取り出して染色体を分析したところ76/126(60%)に異常を認めたと報告しています(3)。染色体の異常は一つだけではなくて、いくつかの染色体に同時に異常があつたりするようです。

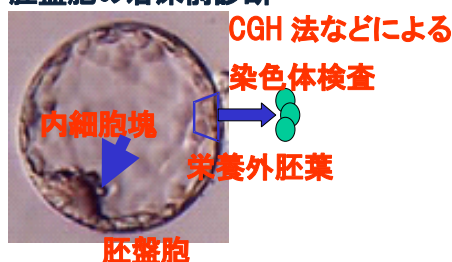
着床前スクリーニングを行っても着床率や出産率を改善させないことは明らかになっています。

着床前スクリーニングが巧いかない理由は以下のようなものです。媒精3日目の胚では8割球位に分割していますが、そこから1つもしくは2つの割球を取り出します。その操作が胚全体にはストレスになっていることが考えられます。もう一つは取り出した割球をFISH法という方法で目的とする染色体の数を評価しますが、判定が難しいことがあります。そして調べることでできる染色体は4-5個くらいです。染色体は常染色体がペアで22組(44本)と性染色体が2本(女性ならXX、男性ならXY)の計46本あります。FISH法ではその内の数ペアしか調べられないことになりまして、調べた染色体は正常でも他の染色体に異常がある可能性も否定できません。そして、調べた割球は正常でも、8つの割球の内の他の割球の染色体が正常であるとは限りません。正常な染色体を持った割球と異常な染色体を持った割球が混在することがあるからです。これをモザイクと言います。モザイクがあると、検査では正常染色体と判断された胚が移植されてしまうことになりまして、そのような理由で初期胚(媒精から2-3日目の胚を初期胚と言います)を用いた着床前スクリーニングは巧いかないようです。つまり検査の方法(FISH法)と検査の時期(初期胚)に問題があるようです。

### 初期胚の着床前診断



### 胚盤胞の着床前診断



一方、最近急速に発展している **Comparative genomic hybridization array 法**(CGH マイクロアレイ)や **single nucleotide polymorphisms 法**(SNP)による検査が導入されれば染色体が正常かどうかをより正確に把握できるかもしれませぬ。

では染色体の異常はどのように起こるのでしょうか？

細胞が分裂する前に染色体は複製されて、それが分裂した細胞に綺麗に半分に分かれなくてはなりません。しかし、「RIF」の卵子では細胞に何らかの異常があり、細胞分裂をコントロールする遺伝子が正常に働かなくて、染色体の複製・分離が失敗してしまうことが原因と考えられています。

「RIF」のカップルの精子を調べてみると染色体異常を持っている確率が高いようです。ご主人の染色体は正常でも作られる精子に染色体の異常が起こるのですね。精子に奇形(形が異常な精子が多い方)が多い方では着床率(妊娠率)が低くなることが分かっています。「RIF」の方では精子の性染色体(X, Y)が一本多くなっていることが多いと報告されています(4)。

また、精子のDNAが損傷していると妊娠率が下がることが分かっています。更に、精子のDNAが損傷していると流産率が高くなります。

以上のように、卵子と精子のどちらの染色体異常も「着床反復不成功」の大きな原因と考えられます。

---

## 透明帯の硬化

哺乳類の卵子は透明帯という殻に包まれています。透明帯は糖タンパク、炭水化物、そして透明帯に特異的なタンパクで構成されています。透明帯は精子の接着、先体反応の惹起、そして精子と卵子の融合を促進します。透明帯は精子が卵子に侵入すると通常は固くなり、他の精子が侵入することを防ぎ、受精卵・胚を守り、胚が卵管を移動を促します。透明帯は分割期胚の段階では内細胞塊(将来胎児になる細胞の集まりを「内細胞塊」と呼びます)を守ってくれます。拡張胚盤胞の時期になると透明帯は削られて薄くなりやがて孵化(ふか)をして着床を可能にします。胚盤胞期になると胚は膨張すると同時に胚自身から、あるいは子宮から溶解素が出されて孵化が起こります。胚盤胞が膨張しても透明帯が破れないということになると孵化ができなくなり、着床不全になります。培養液の中で長時間培養していると正常な孵化を受けることができなくなる可能性があり、それが着床不全の一因になるのではないかと推察されています。

---

## 胚の培養と胚移植の技術

体外受精の成否には質の高い標準化された培養液を使うことがとても重要です。培養環境が適切でないと「RIF」の原因になります。培養液の中に有害な化合物が入っていると胚の発育が障害されることは Gardner DK,らが報告しています。浸透圧、pH測定なども大切になります。着床不全の中には、胚の良好な発育には独自の特別な培養条件が必要となる場合があります。着床率を上げるには移植する胚の質や発育する能力にかかっています。また胚移植

の技術は着床の成否に影響を与えるようです。子宮が収縮したり、移植用のカテーテルの先端に血液や粘液が付着していたり、子宮内膜を傷つけたりすると移植が不成功に終わることと関係しています。

## 染色体異常

「RIF」の患者さんの胚の染色体異常の可能性が高いということを考えると、両親の染色体を調べることは原因検索の一つとして考えていいのではないのでしょうか？染色体の数が正常な胚を選択すれば妊娠率を上げるであろうという考え方から、PGSも過去10年に欧米では頻繁に行われるようになりました。PGSは未受精卵の段階もしくは受精が確認できた段階(まだ分割していない)で極体の一つあるいは二つ取り出して染色体検査をする方法と分割期胚(2-3日目)の割球を1つあるいは2つ取り出して調べる方法、および胚盤胞の段階で数個の細胞(栄養外胚葉)を取り出して調べる方法があります。

極体は卵子由来のもので、極体は卵子(母親)側の染色体を調べることになります。卵子が放出した染色体ですから卵子自体の染色体を間接的に調べるわけです。つまり、23本有るべき染色体が極体である染色体がなくなっていれば、卵子にはその染色体が2本残ってしまっていることになりますし、ある染色体が2本あれば、卵子ではその染色体がなくなっていることとなります。極体生検の直前にMIIへの卵子の成熟が完了したばかりであれば、極体生検によって卵子の紡錘体にダメージをおこしてしまう可能性が示唆されます。染色体の数の異常があるかないかを着床前にスクリーニングするのに、現在では分割期胚の割球生検が最も頻繁に行われています。しかし、分割期胚は染色体のモザイク(8つある割球のいくつかに染色体異常が混在してある状態をモザイクといいます)が出やすい時期に当たります。胚盤胞期胚の細胞を数個生検して染色体の検査をする方が、分割期胚の生検よりも染色体の数の異常は少なくなります。と言うのは、分割期胚でモザイクがある胚は結局染色体異常の胚になることが多く、胚盤胞まで育たないで発育停止してしまうと考えられるからです。

FISH法と言われる染色体分析方法を使ったPGSが「RIF」の患者さんの着床率を上げると初期の研究は期待したのですが、最近のより信頼のおける無作為試験ではその期待は明らかになりませんでした。Blockeel(5)の無作為試験では、3日目の胚(初期胚)の割球を取り出してFISH法で13, 16, 18, 21, 22番目の染色体とX, and Y性染色体を調べました。なぜ、23組ある染色体のうちで、これらの染色体を調べるかと言いますと、これらの染色体異常では妊娠することができるのですが、多くは流産になってしまうからです。(13番、18番、21番染色体の異常は出生までに至ることができる場合があるだけでなく、21番染色体が1本多い21トリソミーでは普通に生活することができます。)それ以外の染色体の異常では外見上胚移植に適さないくらいの質の良くない胚になり、移植しても妊娠することができません。その研究結果ですが、PGSを行って正常と判定された胚を移植した場合の出生率は21%、検査を行わないで移植前の胚の外見で選択した場合の出生率は39%と、**何と出生率はPGSを行わない方が高くなりました**。そして流産率は両群間で有意な差はなかったという結果でした。そして最近のメタアナリシスでは**高齢女性と「着床反復不成功」においてPGSは体外受精胚移植での出生率を有意に下げているとしております**(6)。

初期胚の割球をFISH法で行うPGSがうまくいかない理由には、この手技的難しさ、FISH法の精度の限界、そして胚のモザイクがあるからであると言われてしています。FISH法では先ほどお示しましたように、一つの割球において一度に

数組の染色体しか調べることができません。一つの割球を調べても残ったすべての割球が正常であるとは言い切れないのが現実です(モザイク)。

アメリカ生殖医療学会(7)、ヨーロッパ生殖医療学会(8)、そしてイギリス不妊学会(9)は高齢女性、「着床反復不成功」の患者さん、そして習慣流産の患者さんにおいて PGS は生児を得るための有効な手段ではないと結論づけました。

しかし!

FISH 法による PGS の限界を打ち破る別の分析方法が開発されつつあります。CGH 法や SNP(single nucleotide Polymorphism)法などの手法を使う染色体分析方法です。更に、CGH マイクロアレイ法では FISH 法では検出できなかった染色体の異常も検出できます。CGH マイクロアレイ法は従来の CGH 法に比べて簡単、迅速で自動化されているという利点があります。そして卵子のみならず、極体でも染色体異常が正確に調べられます。

SNP 法は遺伝子すべての DNA の塩基配列を調べることができます。SNP マイクロアレイでは染色体の数の分析に加えて遺伝子多型も調べられます。しかし、この方法の欠点は正確性に欠けることと費用がかさむところにあります。将来は CGH や SNP マイクロアレイ法は PGS-FISH にとって代わるようになるでしょう。しかし、「着床反復不成功」において着床率を上げる効果があるのかどうかを十分に検討してから、臨床で使われるようにならなければなりません。

## 孵化補助

透明帯が厚くて硬いと胚が孵化して着床できなくなる危惧があります。胚が分割するなかで透明帯が薄くなっていくと着床しやすくなるという報告があります。そのような訳で透明帯を人工的に開放することが提唱されました。Cohen らは透明帯の一部に穴を開けると着床率が高くなると報告しました。一般に体外受精胚移植の際に卵巣を刺激して(過排卵刺激)たくさんの卵胞を育てて多くの卵子を獲得しようとしませんが、この過排卵刺激をすることにより、卵巣からホルモン(黄体ホルモン)が排卵の前から産生されるようになります。そうすると子宮の内膜の黄体化は、自然の排卵に比べて1-2日早く進んでしまいます。実は胚の日齢と子宮内膜の日齢がぴったり合っていないと内膜は胚を受け入れてくれません(「着床の扉」ですね、これは前回お話ししました)。透明帯を人工的に一部でも開放すると胚は早く孵化してくれますから、内膜の日齢より遅れてしまうことを補ってくれるわけです。透明帯を開放することにより培養液からの栄養が胚に届きやすくなり、胚の発育を促し、胚盤胞形成を促進します。そして透明帯を代謝産物や成長因子が通過するチャンネルの役目を果たしてくれます。孵化補助の方法には機械的に透明帯を開放(穴を開ける)するか、酵素や化学物質を使って透明帯を開放する方法があります。

「RIF」の患者さんに孵化補助を行うことの有効性は賛否両論です。最近の研究では一部の「RIF」には効果が期待できると報告されています。Stein らの報告では 38 歳以上の「RIF」の患者さんでは孵化補助は有効であった報告しています。同様に、Peterrsen らはレーザーを使って透明帯を薄くすることにより「RIF」の患者さんで着床率が上昇したが、1 度の胚移植を失敗した人では次に孵化補助を行っても効果が認められなかった、つまり「RIF」にのみ有効であったと報告しています。最近のメタナナリシス(761 人の患者さんを対象にした 5 つの研究をまとめた結果)では「RIF」の新鮮胚移植において孵化補助は妊娠率の向上に効果があったと結論しています(relative risk=1.73)。しかし、対照を規定しないと孵化補助が妊娠率を向上させる効果は認められなかったようです。そして年齢が進んだ人に対する効

果も認められませんでした。しかし、このメタアナリシスはサンプル数が少なく生産率や流産率に対しては結論が出せませんでした(10)。

---

## 共胚培養

適切な培養条件は良好な胚発育には欠くことができず、そして培養環境が好ましくないために着床不全になってしまう可能性があります。共培養(胚と何らかの細胞と一緒に培養することにより、その細胞からでる成長ホルモンなどが胚の発育に好影響をもたらす可能性を示唆しています。)は胚の培養環境を改善するための手段として開発されました。初期胚から胚盤胞のステージまで発育できるようすることが目的です。共培養をすることにより、卵や胚に栄養、成長ホルモン、サイトカインなどのような胚形成を促進する因子を分泌して与えてくれる、また活性酸素や有害物質を取り除いてくれることによって好ましい効果をもたらすことが期待されます。

卵管や子宮内膜の細胞、顆粒膜細胞と卵子や胚と一緒に共培養をするなど多くのタイプの細胞が使われますが、子宮内膜との共培養が最も有望であるようです。Jayot ら(11)は着床不全の患者さんにヒト内膜の細胞と胚を共培養を行うことにより、前回の胚移植での妊娠率が8%であったのに、共培養を行った胚では妊娠率は21%に上昇したと報告しています。同様に、Spandorfer ら(12)は自分の内膜細胞との共培養で着床不全の患者さんの胚の質と妊娠率が有意に改善したと報告しています。しかし、共培養の有用性については反対意見もあります。ほとんどの不妊治療の施設では共培養は導入されていません。

---

## 胚盤胞移植

胚盤胞移植は「RIF」の患者さんの着床率、妊娠率を向上させる戦略として勧められています。ヒトでは桑実胚から胚盤胞の時期、つまり通常受精から5日目に子宮内腔にたどり着きますから、胚盤胞を子宮内に移植することは、初期胚(2-3日目の胚、通常はまだ卵管の中を移動しています)を子宮内に移植するよりもより生理的です。初期胚に比べてより着床の可能性の高い良い胚の選択ができること、そして子宮内膜も受け入れやすくなるのが胚盤胞移植のメリットです。Levitasらは「RIF」の患者さんで胚盤胞移植は初期胚(2-3日目の胚)に比べて有意に高い着床率が得られることを報告しています。Guerifらは高い出産率が得られることも報告しています。

---

## 過排卵刺激法

卵巣刺激法によって胚の質や発育が改善するという報告がいくつかなされています。アンタゴニスト法はアゴニスト法で着床不全であった既往を持つ患者さんの妊娠の成功率を上げることが示されている。この研究の報告者はできた胚盤胞の質が良くなるのが最も影響していると提唱しています。自然周期も着床不全の患者さんの着床率を改善すると期待されています。「RIF」の患者さんに対する自然周期や未熟卵子の培養(IVM)の試みが報告されていますが、どの方法が有効で勧められるのかについてはまだランダム化試験が不足している。

---

## 配偶子卵管内移植

配偶子を卵管内に移植することによって本来の自然な環境で初期胚は成長し、より生理的に子宮内に移送されます。子宮頸部が狭く細くなっている胚移植用のカテーテルは入らずに技術的に移植が困難なことがあります。配偶子卵管内移植はそのような問題を解決してくれます。着床不全に対して配偶子卵管内移植は有効でやるとの報告がありました。その後の無作為メタアナライシスでは配偶子卵管内移植の有用性は確かめられませんでした。配偶子卵管内移植は異所性妊娠(子宮外妊娠)のリスクが高くなる傾向にあるようです。そのような理由から最近では配偶子卵管内移植はほとんどの施設で行われなくなりました。

---

## 胚移植のテクニック

細かいことまで気を配った胚移植の技術は妊娠成立にはとても大切です。内膜を傷つけないこと、頸管粘液をよく取り除いて頸管粘液が子宮の中に押し込まれないようにすること、清潔な操作をすることが大切です。また、子宮の収縮が起こらないようにすべての操作を優しく行うことにより着床率が上がります。いくつかの工夫が提案されています。膀胱に尿を十分ためること、超音波で子宮を見ながら移植を行うこと、柔らかい移植用のカテーテルを使うことなどは着床率を上げるようです。一方、移植の後にベットで安静にすることは着床率を上げることにはならないようです。

---

## 細胞質移植

細胞質の中には卵子や初期胚の生存や発達にとって重要なものが含まれています。Cohenらは「RIF」の患者さんの成熟した卵子に、提供卵子の細胞質の移植を試みて、胚の質が改善したことを報告しました。妊孕能のある提供卵子の細胞質を移植することで出産に至った数例を報告しました。細胞質を移植することで細胞の自然死をコントロールする因子を調節し、機能が低下してしまったミトコンドリアを補うことによって細胞が元気になるのではないかと推察されます。しかし、移植された細胞質には mRNA、タンパク、ミトコンドリアが含まれています。特にミトコンドリアに異常があった場合にそれが遺伝してしまう可能性があります。また、実験段階ですから、臨床に適應されるには更なる検討が必要です。

---

## 胚評価の新しい方法

移植や凍結に適した胚を選ぶために現在は形態学的に判定していますが、かなり熟練を要します。胚の評価に新しい方法が開発されています。time-lapse imagingは胚の発育の状況を観察するための強力な方法です。胚を観察するためにはincubator(培養器)から胚の入った皿を出してカメラの元に移動させなければなりませんが、EmbryoScopeはincubatorの中にカメラが装着されているので培養環境を損なうことなく胚の発育を観察できるようになりました。しかし、費用が高価であること、従来の培養方法に比べて準備に時間がかかることが問題です。

胚が育っている培養環境を調べて、胚の活力を評価する方法があります。卵胞液の代謝産物の分析はそれぞれの卵子の成熟能や発育能について重要な情報を与えてくれます。培養液中の酸素・ピルビン酸・糖の消費量の測定する方法やアミノ酸の利用率は胚盤胞まで発育してくれるかどうかを評価するにはよい方法です。その他さまざまな代謝産物を調べることでより胚を質を評価することにより、より質の良い胚を選択することが研究されています。特に酸化ストレスを評価することにより妊娠率が高くなることが報告されています。

---

## 結論

---

治療方法や培養技術はかなり進歩したにも関わらず、着床不全は未だ患者さんにとってはとても辛い状況であるだけでなく、医療従事者にとって困難な挑戦であります。染色体異常や胚発育の不良は着床不全の主な原因であることがお分かりいただけただけでしょうか。CGHアレイやSNP解析などの技術を取り入れれば染色体のスクリーニングがより正確にできるようになるでしょう。透明帯が硬くなってしまふ一部の患者さんでは孵化補助は有効な手段かもしれません。適切な培養環境や胚盤胞の移植は着床不全の方の着床率(妊娠率)を上げるでしょう。タイムラプスイメージング(胚の分割を時間を追って観察記録するカメラ)やメタボレート(胚の代謝産物を解析する方法)などを使ってより良好な胚を選択すると着床率も上がるでしょう。そして今上げた実証されている方法のみが治療に取り入れられるように努力はつきません。

---



### 参考文献

- (1) Fertility and Sterility Volume 97, Issue 5 , Pages 1021-1027, May 2012
- (2) Pehlivan T, et al. Impact of preimplantation genetic diagnosis on IVF outcome in implantation failure patients. *Reprod Biomed Online*. 2003;6:232–237
- (3) Voullaire, et.al. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Mol Hum Reprod*. 2002;8:1035–1041
- (4) Rubio, et.al. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. *Hum Reprod*. 2001;16:2084–2092
- (5) Blockeel, et.al. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online*. 2008;17:848–854
- (6) Mastenbroek S,et.al. Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs. *Hum Reprod Update*. 2011;17:454–466
- (7) Harper J, et.al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium steering committee. *Hum Reprod*. 2010;25:821–823
- (8) Anderson RA. Pickering S. The current status of preimplantation genetic screening: British Fertility Society Policy and Practice Guidelines. *Hum Fertil (Camb)*. 2008;11:71–75
- (9) The Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology, Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertil Steril*. 2008;90:S136–S143
- (10) Martins WP, et.al. Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Reprod Update*. 2011;17:438–453
- (11) Jayot S,et.al. Coculture of embryos on homologous endometrial cells in patients with repeated failures of implantation. *Fertil Steril*. 1995;63:109–114
- (12) Spandorfer SD,et.al. Autologous endometrial coculture in patients with IVF failure: outcome of the first 1,030 cases. *J Reprod Med*. 2004;49:463–467

文責 根岸