



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	体外受精における使用済み胚培養液の組成と胚発育の関係に関する研究
Author(s)	八木, 亜希子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(保健科学)
Dissertation Number	甲第12375号
Issue Date	2016-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12375
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62480
Type	doctoral thesis
File Information	Akiko_Yagi.pdf



学 位 論 文

体外受精における使用済み胚培養液の組成と胚発育の関係に関する研究

八木 亜希子

北海道大学大学院保健科学院
保健科学専攻保健科学コース

2016年度

目次

略語一覧	3
第 1 章 生殖補助医療 (assisted reproductive technology ; ART) について	4
1-1 要約	5
1-2 緒言	5
1-3 ART の歴史	6
1-4 ART の実際	6
1-5 ART の課題	9
1-6 結論	10
1-7 参考文献	10
第 2 章 液体クロマトグラフィー高分解能質量分析を用いた胚培養後の使用済み培養液の脂肪酸解析	13
2-1 要約	14
2-2 緒言	14
2-3 対象と方法	15
2-4 結果	20
2-5 考察	34
2-6 結論	36
2-7 参考文献	37
謝辞	41

略語一覧

ART : assisted reproductive technology、生殖補助医療

EIC : extracted ion chromatogram、抽出イオンクロマトグラム

FFA : free fatty acid、遊離脂肪酸

HPLC または LC : high-performance liquid chromatography、
高速液体クロマトグラフィー

HRMS : high resolution mass spectrometry、高分解能質量分析

IVF : *in vitro* fertilization、体外受精

MS : mass spectrometry、質量分析

MS² : 一次プロダクトイオンスペクトル (MS² スペクトル)

RT : retention time、保持時間

TIC : total ion chromatogram、トータルイオンクロマトグラム

FFA 8:0、カプリル酸

FFA 10:0、カプリン酸

FFA 12:0、ラウリン酸

FFA 14:0、ミリスチン酸

FFA 16:0、パルミチン酸

FFA 16:1、パルミトレイン酸

FFA 18:0、ステアリン酸

FFA 18:1、オレイン酸

FFA 18:2、リノール酸

FFA 18:3、 α -リノレン酸

FFA 20:1、エイコセン酸

FFA 20:4、アラキドン酸

FFA 20:5 (EPA)、エイコサペンタエン酸

FFA 22:6 (DHA)、ドコサヘキサエン酸

第 1 章

生殖補助医療（assisted reproductive technology ; ART）について

1-1 要約

日本では、女性のライフスタイルの変化や社会進出に伴い晩婚化が進んでいる。女性の年齢は妊孕性に大きく負の影響をもたらすため、不妊治療患者は増加している。本章では、不妊症に関する歴史や治療方法などの概要をまとめ、第2章で述べる本研究の背景と目的について詳述する。

1-2 緒言

日本産科婦人科学会では、生殖年齢の男女が妊娠を希望し、一般的に1年間避妊することなく通常の性交を継続的に行っているにもかかわらず、妊娠の成立をみない場合を不妊症の定義としている（なお、妊娠のために医学的介入が必要な場合は期間を問わない）。従来、2年間とされていた不妊期間は平成27年8月に1年間へと短縮された。変更の経緯として、海外の諸機関（World Health Organization ; WHO、American Society for Reproductive Medicine ; ASRM、European Society of Human Reproduction and Embryology ; ESHRE）の不妊の定義が1年の不妊期間としていることが挙げられる。加えて、日本において女性の妊娠する年齢が上昇する中で、不妊症の定義の変更により、女性がより早期に適切な不妊治療を受けることを期待したものである[1]。

一般的に、排卵日近くに性生活を持った場合、約15～30%の確率で妊娠する。カップルの6～8組に1組が不妊症の定義に当てはまると言われている。なお、女性の年齢が上昇するに伴い妊孕性が低下するため、不妊に悩むカップルの割合は増加する。不妊の原因には、女性側、男性側、女性と男性両方、男女ともに明確な不妊原因が認められない原因不明の場合もある。表1に示す通り、女性側の不妊原因としては卵管因子、子宮因子、排卵因子、免疫因子、頸管因子、子宮内膜症が挙げられる。卵管因子、排卵因子、男性因子は頻度が高く、不妊症の3大原因と言われている[2]。

表 1. 不妊原因の分類

性別	因子名	具体例
女性	卵管因子	卵管狭窄、卵管閉鎖、癒着など
	子宮因子	子宮奇形、子宮筋腫、子宮内膜ポリープなど
	排卵因子	視床下部-下垂体無月経、多嚢胞性卵巣症候群、早発卵巣不全、高齢など
	免疫因子	抗精子抗体など
	頸管因子	子宮頸管炎など
	子宮内膜症	
男性	男性因子	乏精子症、精子無力症、無精子症、勃起障害、逆行性射精など

不妊のリスク因子として、女性側では月経異常、性感染症・骨盤腹膜炎、子宮筋腫、子宮内膜症があり、男性側では幼少期のヘルニア手術や停留睾丸手術、おたふく風邪などによる睾丸炎の既往、成人期の糖尿病がある[2]。

不妊治療には、不妊原因に対する治療、タイミング療法、人工授精を行う一般不妊治療と体外で配偶子や受精卵の操作を行う生殖補助医療（assisted reproductive technology ; ART）に大別される。

1-3 ARTの歴史

1978年にイギリスでEdwardsとSteptoeが卵管因子の不妊カップルに体外受精(*in vitro fertilization* : IVF)を行い、世界初の“試験管”ベビーの出生に成功した[3]。日本では、1983年に東北大学で鈴木雅洲らが日本初の体外受精に成功した[4]。1984年には、Zeilmakerらによりヒト胚の凍結・融解胚移植の技術を用いて初の児が出生した[5]。1992年になると、PalermoらによりICSI (intracytoplasmic sperm injection : 卵細胞質内精子注入法)が開発され[6]、乏精子症や精子無力症などの男性因子の不妊患者も挙児を得ることが可能となった。また、射出精液中に精子を認めない無精子症の患者であっても、精巣組織から精子を回収するTESE (testicular sperm extraction)により精子が得られれば、ICSIにより不妊治療を実施できる。このように、ARTにおける高度な技術は次々と開発され、不妊症患者に大きな福音をもたらしている。

最近では、ARTと遺伝医学が融合した発生遺伝医学が登場し、着床前スクリーニング (preimplantation genetic screening ; PGS) が倫理的な問題を抱えている。この技術はIVFで得られた胚の一部を採取し、染色体構造異常や異数性を診断することを目指すとしている。PGSで胚に異常を認めた場合、対象の胚は胚移植を行わず廃棄される。また、ドナー獲得を目的としたHLAタイピングや男女産み分けに利用される場合がある。そのため、日本では優生思想や倫理面に配慮し、日本産科婦人科学会が着床前診断に関する倫理見解を公表して実施を規制している[7]。

1-4 ARTの実際

10個前後の成熟卵子を得ることを目的として、前周期から今周期にかけて女性に調節卵巣刺激を行う(図1)。採卵の35時間前にヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin ; hCG) もしくはGnRH agonistを投与し、経膈超音波ガイド下に卵胞を穿刺して採卵を実施する。卵子は、卵丘細胞・卵子複合体の状態で回収される。採卵当日、男性は採精し精液を採取する(採卵当日に採精できない場合は、事前に精子を凍結保存しておく方法もある)。採卵後、卵丘細胞・卵子複合体は6%CO₂、5%O₂、89%N₂気相下にて4~5時間の前培養を行い、通常の体外受精 (conventional-IVF ; C-IVF) もしくは顕微授精 (ICSI) によって媒精を実施する。C-IVFは卵丘細胞・卵子

複合体と調整した精子と一緒に培養する方法で体外に取り出してはいるが、より自然に近い状態での受精方法となる。そのため、精子側の因子がより重要となり、精液所見正常の患者が対象である。媒精濃度は、通常 5~10 万/mL である（図 2）。一方、ICSI は卵丘細胞・卵子複合体にヒアルロニダーゼ処理を行って卵丘細胞を除去後、顕微鏡下で成熟卵子の卵細胞質内に不動化した精子 1 個を注入する方法である（図 2）。

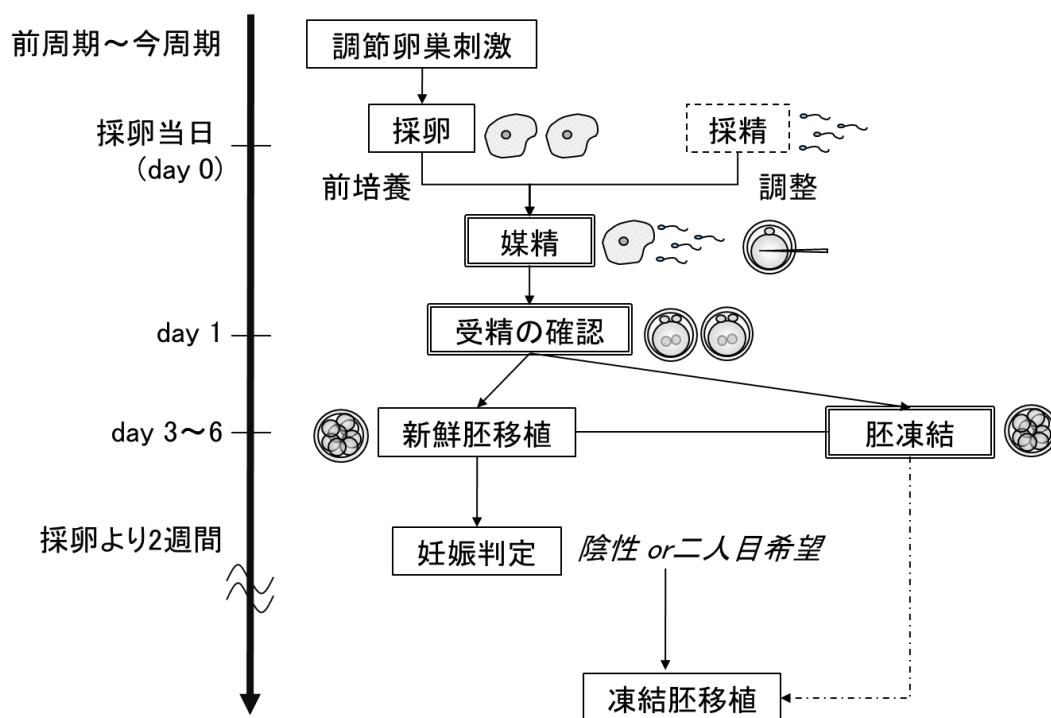


図 1. ART の流れ

（実線枠は女性、点線枠は男性の治療、二重線枠は体外での操作）



ウェルの中央に5-6個の卵丘細胞卵子複合体を入れて調整した運動精子を5-10万/mLで媒精

卵丘細胞を除去した成熟卵子に不動化した精子を顕微鏡下で注入

図 2. ダブルディッシュを用いた C-IVF（左）と ICSI（右）の模式図

媒精から約 18 時間後に受精の確認を行う。雌雄の前核を認めた受精卵（胚）は、培養液のドロップを作製しミネラルオイルで覆ったディッシュを用いるマイクロドロップ法（図 3）で個別に培養する。胚はオートクリン作用を有していると考えられており、大容量の培養液を用いた培養より小容量の培養液で培養した方が良好な発育が得られる[8]。そのため、多くの IVF 施設でマイクロドロップ法による培養が行われている。ミネラルオイルで培養液を被覆することで、インキュベーター外での胚操作の際、培養液の pH と浸透圧の上昇を抑え、温度の低下を防ぐ効果がある。胚は順調に発育した場合、培養 2 日目で 4 細胞、培養 3 日目で 8 細胞、培養 4 日目で桑実胚、培養 5～6 日目で胚盤胞になる（図 4）。胚移植は培養 2～6 日目に行われ、子宮内膜に着床する時期は培養 6～7 日目である。

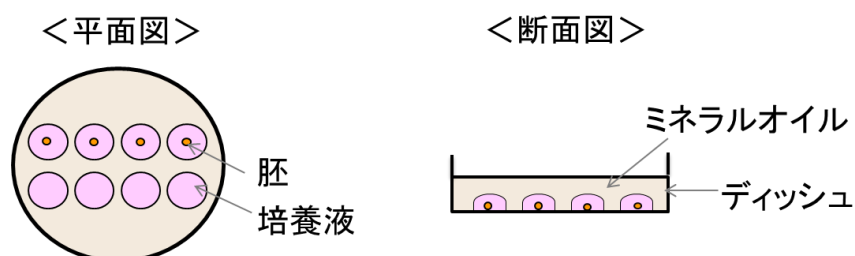


図 3. マイクロドロップ法による胚培養（模式図）

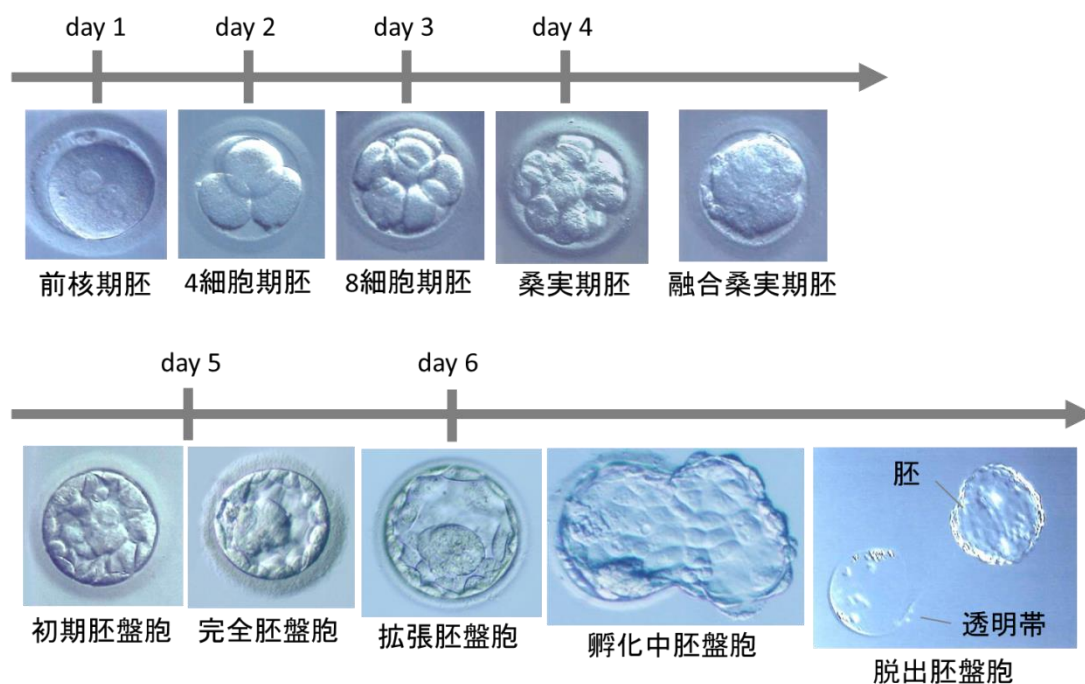


図 4. ヒト胚の発育過程

卵巣の反応が良く、採卵された卵子が多数の場合は、妊娠により症状が悪化する卵巣過剰刺激症候群を予防するために全胚凍結を行う。新鮮胚移植を行う場合は、子宮内膜を着床しやすい状態にするために薬物を投与し黄体期管理を行う。全胚凍結の場合は、次周期以降に薬物投与による内膜調整後に凍結胚移植を行う。胚を凍結保存しておくことによって、良好胚が得られれば一度の採卵で複数回の胚移植を実施できる（図 1）。余剰胚凍結があれば、新鮮胚移植で妊娠が成立しなかった場合や、第二子希望の場合においても凍結胚移植が実施可能である。凍結技術の進歩により、凍結胚移植は新鮮胚移植と同等、もしくは同等以上の成績が得られている[9]。

1-5 ART の課題

日本において 2013 年に ART で出生した児は 42,554 人と報告されており、全出生児の 24.5 人に 1 人（4.1%）が体外受精児である[9]。また、2013 年までに 38 万人以上の体外受精児が出生しているが、胚移植あたりの妊娠率は 28.7%と低値に留まっている[9]。妊娠しない原因の多くは、胚の染色体異常であり、女性の年齢と共に染色体異常の割合も増加する。そのため、年々、日本での ART 実施件数は増加している。ART における体外培養では、胚は光の曝露、温度、pH、浸透圧、酸素濃度の変化など種々の負荷がかかっている。そのため、培養液の改良[10–12]、培養中の酸素濃度の減少[13,14]により、胚盤胞率は改善されてきた。最近では、タイムラプス型インキュベーターの開発[15]により、胚を外に出さなくても観察できるようになった。しかし、費用対効果の面では十分な成績が得られているとは言えない。挙児を希望する患者のために、妊娠率の向上が望まれる。

ART による副作用の一つに、複数個の胚を子宮に移植することで起こる多胎妊娠が挙げられる。多胎妊娠は、早産や流産あるいは妊娠中毒症などの合併症の発症と児の周産期死亡や罹患率を上昇させる[16–18]。特に、周産期死亡率は胎児の数に比例して高くなる。多胎妊娠を予防するためには単一胚移植が効果的であるが、移植あたりの妊娠率を高めるために、依然として複数胚の移植が実施されている。多胎妊娠を予防するためには移植個数を制限する必要がある、日本産科婦人科学会では 1996 年に「胚移植個数は原則 3 個以内」との見解を発表した。しかし、3 個以内の胚移植であっても 2%前後に品胎妊娠が成立すると言われていることから、2008 年に「胚移植個数は原則として単一、35 歳以上の女性、または 2 回以上続けて妊娠不成立であった女性などについては 2 個移植を許容する」と改正した[19]。妊娠率を低下させないためには、最も良好な胚を選別し単一胚移植を行う必要がある。

現在では、一般的に形態的な胚発育評価方法が IVF で使われているが、これらの方法は良好胚の選別において、満足できる結果が得られていない[20]。また、胚培養士による観察者間や観察者内での精度や正確性の問題も指摘されている[21,22]。形態的評価方

法で複数の胚が同様のグレードの場合、着床する最も良質な胚の選別に苦慮する。そのような場合において、胚発育と関連し補完的な生化学情報を提供しうるバイオマーカーが必要とされる。

1-6 結論

1978年に最初の体外受精児が誕生してから、ARTによって全世界では500万人以上の児が出生していると推計されている[23]。日本だけでなく世界においても、ARTの需要は今後も高まる見込みである。不妊症患者に大きな恩恵をもたらしているARTだが、成功率の低さを改善することが継続した課題となっている。

胚移植あたりの妊娠率を高めるためには、現在用いられている形態学的評価以外の評価方法の導入が必要である。本研究では、胚発育と関連するバイオマーカーの検出を目的として、使用済みの胚培養液の脂肪酸解析を行ったので、その結果を第2章に詳述する。

1-7 参考文献

- [1] 日本産科婦人科学会, 不妊の定義の変更について,
http://www.jsog.or.jp/news/html/announce_20150902.html.
- [2] 日本生殖医学会, 不妊症Q&A, http://www.jsrm.or.jp/public/funinsho_qa01.html.
- [3] P.C. Steptoe, R.G. Edwards, Birth after the reimplantation of a human embryo, *Lancet*. 12 (1978) 366.
- [4] 鈴木雅洲, 星 和彦, 星 合晃, 斎藤 晃, 桃野耕太郎, 森良一郎, 京野広一, 対木 章, 今泉英明, 長池文康, 上原茂樹, 永沼孝子, 広瀬洋子, 体外受精・胚移植により受精・着床に成功した卵管性不妊症の一例, *日本不妊学会雑誌*. 28 (1983) 439–443.
- [5] G.H. Zeilmaker, A.T. Alberda, I. van Gent, C.M. Rijkmans, A.C. Drogendijk, Two pregnancies following transfer of intact frozen-thawed embryos., *Fertil Steril*. 42 (1984) 293–296.
- [6] G. Palermo, H. Joris, P. Devroey, A.C. Van Steirteghem, Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte, *The Lancet*. 340 (1992) 17–18.
- [7] 日本産科婦人科学会, 着床前診断に関する見解,
http://www.jsog.or.jp/ethic/chakushouzen_20150620.html.
- [8] M. Lane, D.K. Gardner, Effect of incubation volume and embryo density on the development and viability of mouse embryos in vitro, *7* (1992) 558–562.
- [9] 齊藤英和, 平成26年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告 (2013年分の体外受

- 精・胚移植等の臨床実施成績および2015年7月における登録施設名), 日産婦誌. 67 (2015) 2077–2121.
- [10] P. Quinn, J.F. Kerin, G.M. Warnes, Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid, *Fertility and Sterility*. 44 (1985) 493–498.
 - [11] D.K. Gardner, M. Lane, Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF?, *Human Reproduction Update*. 3 (1997) 367–382.
 - [12] J.D. Biggers, Thoughts on embryo culture conditions, *Reproductive BioMedicine Online*. 4 (2001) 30–38.
 - [13] B. Kovacic, M.C. Sajko, V. Vlaisavljević, A prospective, randomized trial on the effect of atmospheric versus reduced oxygen concentration on the outcome of intracytoplasmic sperm injection cycles., *Fertility and Sterility*. 94 (2010) 511–9.
 - [14] U. Waldenström, A.B. Engström, D. Hellberg, S. Nilsson, Low-oxygen compared with high-oxygen atmosphere in blastocyst culture, a prospective randomized study, *Fertility and Sterility*. 91 (2009) 2461–2465.
 - [15] M. Meseguer, I. Rubio, M. Cruz, N. Basile, J. Marcos, A. Requena, Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study, *Fertility and Sterility*. 98 (2012) 1481–1489.e10.
 - [16] A.T. Kjellberg, P. Carlsson, C. Bergh, Randomized single versus double embryo transfer: obstetric and paediatric outcome and a cost-effectiveness analysis, 21 (2006) 210–216.
 - [17] J.G. Bromer, E. Seli, Assessment of embryo viability in assisted reproductive technology: shortcomings of current approaches and the emerging role of metabolomics., *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 20 (2008) 234–41.
 - [18] B. Källén, O. Finnstro, A. Lindam, E. Nilsson, K. Nygren, P.O. Olausson, Trends in delivery and neonatal outcome after in vitro fertilization in Sweden: data for 25 years, 25 (2010) 1026–1034.
 - [19] 日本産科婦人科学会, 生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解, http://www.jsog.or.jp/ethic/H20_4_tataininshin.html.
 - [20] R. Singh, K.D. Sinclair, Metabolomics: Approaches to assessing oocyte and embryo quality, *Theriogenology*. 68 (2007) S56–S62.
 - [21] A.E. Baxter Bendus, J.F. Mayer, S.K. Shipley, W.H. Catherino, Interobserver and intraobserver variation in day 3 embryo grading, *Fertility and Sterility*. 86 (2006) 1608–1615.

- [22] G. Paternot, J. Devroe, S. Debrock, T.M. D'Hooghe, C. Spiessens, Intra- and inter-observer analysis in the morphological assessment of early-stage embryos., *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E.* 7 (2009) 105.
- [23] ESHRE,
<https://www.eshre.eu/press-room/press-releases/press-releases-eshre-2012/5-million-babies.aspx>.

第 2 章

液体クロマトグラフィー高分解能質量分析を用いた 胚培養後の使用済み培養液の脂肪酸解析

(論文掲載済み：Clinica Chimica Acta. Vol.456, 2016, pp.100-106)

2-1 要約

本研究の目的は、体外受精において廃棄される使用済みの胚培養液を用いて、新たな胚選別方法としての可能性を検証することである。液体クロマトグラフィー高分解能質量分析 (Liquid chromatography-high resolution mass spectrometry ; LC-HRMS) を用いて、不妊治療患者 15 症例の胚培養後の培養液の脂肪酸解析を行った。必須脂肪酸であるドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid ; DHA) の変化率の減少は、胚発育と相関する結果が得られた。

2-2 緒言

生体試料の分離のために、ガスクロマトグラフィー (gas chromatography ; GC) と高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography ; HPLC または LC) が広く使われている。GC は分析対象物質の気化が必要なため、熱安定性物質だけに適用できる。また、GC は前処理として、メチル化のような時間のかかる面倒な誘導体化が必要である。対照的に、HPLC はほとんどの場合で誘導体化を必要としない。HPLC や質量分析 (mass spectrometry ; MS) または LC と MS を接続した分析法である LC/MS は、機器の進歩と LC/MS の応用範囲の広がりによって臨床化学の分野で広く普及している。高分解能質量分析 (high resolution mass spectrometry ; HRMS) は、血清や細胞や培養液のような複雑なマトリックスである試料でも、正確な質量測定を行うことによって分子の構造を決定することができる優れた方法である。LC と HRMS の組合せまたは LC-HRMS は、分析物を一度の測定で広範囲にわたって解析することで、高感度で網羅的、定性的、半定量的な分析を提供することができる。LC-HRMS は、胚発育に関して正確で網羅的な情報を得ることで ART における妊娠率を改善する強力なツールとなりうる。本研究の目的は、IVF で得られた胚培養液において、ヒト胚の発育と遊離脂肪酸の変化の関係を検討することである。

バイオマーカーの測定のために使われるサンプルは、患者への負担がなく胚に対して侵襲性がない状態で得られなければならない。患者や胚に対して非侵襲性のサンプルとして、採卵時に回収でき卵子を回収後に廃棄される卵胞液がある。卵胞液を利用して、遊離脂肪酸[1,2]、タンパク質[3]、アミノ酸、糖、脂質などの代謝物[4-7]を分析して、卵子の発育能力や胚の生存能力を予測できたという報告がある。通常、採卵時は15 mL程度の容量のスピッツに卵胞液を吸引するため、複数の卵胞液が1本のスピッツに混在する。卵胞液と卵子の発育をトレースするためには、卵胞ごとに卵子を回収し培養する必要がある。そのため、卵胞液をサンプルとして使用することは、採卵操作だけでなく、その後の培養や媒精操作が煩雑になる欠点がある。

一方、胚培養に使用した培養液も非侵襲性のサンプルとして挙げられる。これは、胚培養が終了した後に廃棄される試料である。マイクロドロップ法で胚を個別に培養すれ

ば、簡単に使用済みの培養液と胚の発育をトレースすることができる。これらの点から、使用済みの培養液は最も優れた非侵襲性のサンプルと言える。現在までに、使用済み培養液の潜在的バイオマーカーがいくつか報告されている。顕微蛍光測光法やプロトン核磁気共鳴 (^1H -nuclear magnetic resonance ; ^1H -NMR) を用いてのピルビン酸、グルコース、乳酸の代謝[8–13]や、蛍光標識 HPLC や ^1H -NMR によるアミノ酸解析[14,15]、さらにはラマン分光法や近赤外線分光法 (near-infrared spectroscopy ; NIRS) によるメタボロミクスの報告がある[16–19]。また、他にもいくつかの潜在的バイオマーカーと技術が報告されている[20]。しかし、我々の知る限りにおいて LC-HRMS を使用している論文はなかった。

本研究で我々はヒト体外受精において、LC-HRMS を用いた使用済み胚培養液中の脂肪酸に関するメタボローム解析へのアプローチを行った。

2-3 対象と方法

2-3-1 試薬

LC/MS グレードのメタノール、アセトニトリル、蒸留水は関東化学株式会社（東京、日本）、酢酸アンモニウム、カプリル酸（オクタン酸、FFA 8:0）、カプリン酸（デカン酸、FFA 10:0）は和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入した。ラウリン酸（ドデカン酸、FFA 12:0）、ミリスチン酸（テトラデカン酸、FFA 14:0）、パルミチン酸（ヘキサデカン酸、FFA 16:0）、ステアリン酸（オクタデカン酸、FFA 18:0）は東京化成工業株式会社（東京、日本）から購入した。オレイン酸（(Z)-オクタデカ-9-エン酸、FFA 18:1）、リノール酸（(9Z,12Z)-オクタデカ-9,12-ジエン酸、FFA 18:2）、 α -リノレン酸（(9Z,12Z,15Z)-オクタデカ-9,12,15-トリエン酸、FFA 18:3）、エイコセン酸（(Z)-イコサ-11-エン酸、FFA 20:1）、アラキドン酸（(5Z,8Z,11Z,14Z)-イコサ-5,8,11,14-テトラエン酸、FFA 20:4）、エイコサペンタエン酸（(5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-イコサ-5,8,11,14,17-ペンタエン酸、FFA 20:5 または EPA）、ドコサヘキサエン酸（(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-ドコサ-4,7,10,13,16,19-ヘキサエン酸、FFA 22:6 または DHA）はシグマアルドリッチ（セントルイス、ミズーリ州、アメリカ）から購入した。

2-3-2 機器

クロマトグラフィーの分析は送液ポンプ (LC-20AD)、オートサンプラ (SIL-20A)、カラムオーブン (CTO-20A) を搭載した HPLC Prominence（島津製作所、京都）で行った。高分解能質量分析は、Surveyor MS ポンプとオートサンプラを接続した LTQ Orbitrap XL 質量分析計（サーモフィッシャー・サイエンティフィック社、ウォルサム、マサチューセッツ州、アメリカ）を使用した。

2-3-3 分析条件

HPLC : Surveyor MS ポンプ仕様

カラム	: Hypersil Gold C8, 1.9 μ m, 2.1 mm x 50 mm (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社)
移動相	: A 液=10 mM 酢酸アンモニウム水 B 液=アセトニトリル 初期の溶媒濃度 (A/B : 50/50) を 2 分間維持し、2 分から 5 分まで直線的に転換させ (A/B : 1/99)、5 分から 20 分まで溶媒濃度 (A/B : 1/99) を維持した。そして 22 分までに直線的に転換させ (A/B : 50/50)、さらに 25 分まで溶媒比を維持して平衡化させた。 FFA 8:0 (カプリル酸)、FFA 10:0 (カプリン酸) の追加解析では、 (A/B : 80/20) を 2 分間維持し、2 分から 16 分まで直線的に転換させ (A/B : 1/99)、16 分から 20 分まで溶媒濃度 (A/B : 1/99) を維持した。そして 22 分までに直線的に転換させ (A/B : 80/20)、さらに 28 分まで溶媒比を維持して平衡化させた。
注入量	: 10 μ L
移動相流量	: 0.2 mL/min
カラム温度	: 40°C

MS : LTQ Orbitrap XL

イオン源	
ESI スプレー電流	: - 2,500 V,
キャピラリー温度	: 330°C
FT-MS	
測定 m/z 範囲	: 135~900
分解能	: 60,000
質量確度	: 5.0 ppm
極性	: ネガティブイオンモード
CID 電圧	: 35 V

なお、FFA 22:6 (DHA) に関しては強度が小さかったため、MS² の解析をプロダクトイオンスキャンで行った。

2-3-4 サンプル回収

神谷レディースクリニック（札幌、日本）にて IVF を受けた女性 27～44 歳（平均年齢±標準偏差：35.3±4.9 歳）の 15 組の不妊症カップルを対象とした（表 1）。年齢や不妊原因に偏りは認められなかった。これらのカップルから受精卵培養後の廃棄される培養液の解析に関する研究へ参加することの同意を得た。本研究は、神谷レディースクリニック（承認番号 10）及び北海道大学大学院保健科学研究院（承認番号 14-4）の倫理委員会の承認を得て行った。

表 2. 不妊患者のプロフィールと使用済み培養液のサンプル数の内訳

体外受精 患者No.	年齢(歳)	不妊原因	使用済み培養液のサンプル数	
			良好発育胚由来	不良発育胚由来
1	29	卵管	4	0
2	37	男性	1	2
3	33	原因不明	4	1
4	31	原因不明	2	2
5	42	男性、排卵	1	3
6	41	排卵	2	1
7	38	排卵	1	2
8	34	排卵	4	2
9	36	卵管	1	1
10	44	排卵	3	3
11	38	男性、排卵	1	2
12	33	男性	1	1
13	27	男性	4	1
14	37	原因不明	1	1
15	29	排卵、免疫	2	1
Total	-	-	32	23

症例ごとに最適の調節卵巣刺激プロトコールを行った。IVF で得られた受精卵 55 個を 35 mm ペトリディッシュ (Falcon 1008、ベクトン・ディッキンソン、フランクリン・レイクス、ニュー・ジャージー州、アメリカ) を使用し、ミネラルオイル (FertiCult™ Mineral Oil、FertiPro NV、ベールネム、ベルギー) で覆われた 20 μ L の培養液ドロップ (Continuous Single Culture™ Complete、アーバイン・サイエンティフィック、サンタアナ、カリフォルニア州、アメリカ) で個別に 6 日間培養した。公表されている培養液の組成を表 2 に示す。対照として、各培養ディッシュに胚を含まないドロップを作製し、コントロールと名付けた。胚を培養した使用済みの培養液はサンプルと名付けた。培養終了後に、コントロール培養液とサンプル培養液をピペッティング操作で 1.5 mL プラスチックチューブ (Thermo Scientific™ Snap Cap Low Retention Microcentrifuge Tubes、サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) に回収し、- 80°C で保管した。サンプルは、添加物がない状態で少なくとも 3 ヶ月保管しても問題なかった。

サンプル培養液は、培養されていた胚の形態学的評価から良好胚盤胞になった良好発育群と胚盤胞に育たなかった不良発育群に分類した。良好胚盤胞の定義は Gardner 分類[21]を用いて、培養 5 日目では B2 以上または 3BC 以上、培養 6 日目では 4BC 以上の胚とした。本研究に使用した 15 症例 55 個のサンプル培養液の内訳は、良好発育群 32 個と不良発育群 23 個であった (表 1)。

- 80°C で保管していたコントロール培養液とサンプル培養液 (20 μ L) を一晩凍結乾燥処理による濃縮後にメタノール 80 μ L で溶解した。その後、フィルター (Cosmonice Filter S 0.45 μ m、ナカライテスク、京都、日本) でろ過し、LC-HRMS のための試料とした。すべてのアッセイは、二重盲検法による一重測定を行った。試料は症例ごとにナンバリングし、最初にコントロール培養液、次に対応するサンプル培養液を測定した。そのため、胚の発育に関してはランダム測定であった。

表 3. 使用した培養液 (Continuous Single Culture™ Complete) の組成

分類	組成	分類	組成
無機塩類	Calcium Chloride	非必須 アミノ酸	Alanine
	Magnesium Sulfate		Asparagine
	Potassium Chloride		Aspartic Acid
	Potassium Phosphate		Glutamic Acid
	Sodium Chloride		Glycine
必須 アミノ酸	Arginine		Proline
	Cystine		Serine
	Histidine	その他アミノ酸	Alanyl-Glutamine
	Isoleucine	その他	Sodium Bicarbonate
	Leucine		Sodium Citrate
	Lysine		Glucose
	Methionine		Sodium Lactate
	Phenylalanine		EDTA
	Threonine		Sodium Pyruvate
	Tryptophan		Gentamaicin
	Tyrosine		Phenol Red
	Valine		HSA (5mg/ml)

2-3-5 データ処理

Qual Browser 2.0 software (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) を用いて、標品、コントロール培養液、及び胚培養後の使用済み培養液に含まれる脂肪酸の元素組成 (element composition)、理論的質量 (theoretical mass)、保持時間 (retention time ; RT)、質量確度 (mass accuracy) を解析し、各脂肪酸のエリア面積を計算した。主要脂肪酸の変化率は以下の式で求めた。

変化率 (%) = (使用済み培養液のエリア面積の値 - コントロール培養液のエリア面積の値) / コントロール培養液のエリア面積の値 × 100

SIEVE™ 2.0 (サーモフィッシャー・サイエンティフィック社) と Human Metabolome Database (HMDB, <http://www.hmdb.ca>) を用い、網羅的な解析を行ってスペクトルリストを作成した。

2-3-6 統計解析

主要脂肪酸である FFA 16:0 (パルミチン酸)、FFA 18:1 (オレイン酸)、FFA 18:2 (リ

ノール酸)、FFA 18:3 (α -リノレン酸)、FFA 20:4 (アラキドン酸)、FFA 22:6 (DHA) の統計的有意差はスチューデントの t 検定によって検討した。 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

2-4 結果

2-4-1 脂肪酸の同定

コントロール培養液とサンプル培養液 (良好発育胚と不良発育胚) のトータルイオンクロマトグラム (total ion chromatogram; TIC) の典型例を図 1 に示す。FFA 20:5 (EPA) は、全ての試料において検出限界以下であった。13 種の脂肪酸、すなわち FFA 8:0 (カプリル酸)、FFA 10:0 (カプリン酸)、FFA 12:0 (ラウリン酸)、FFA 14:0 (ミリスチン酸)、FFA 16:0 (パルミチン酸)、FFA 16:1 (パルミトレイン酸)、FFA 18:0 (ステアリン酸)、FFA 18:1 (オレイン酸)、FFA 18:2 (リノール酸)、FFA 18:3 (α -リノレン酸)、FFA 20:1 (エイコセン酸)、FFA 20:4 (アラキドン酸)、FFA 22:6 (DHA) が $[M-H]^-$ で観測された。しかし、FFA 18:0 (ステアリン酸) は、ブランクでも検出されたので解析から除外した。図 1 に示すように、すべてのイオンを検出する TIC では脂肪酸のピークは小さく、脂肪酸以外の成分の干渉により量的変動を評価するに至らなかった。そこで、脂肪酸の理論的な分子量に基づいて選択的に脂肪酸を検出できる抽出イオンクロマトグラム (extracted ion chromatogram ; EIC) を用いたところ、良好なクロマトグラムを得ることができた。

表 3 に同条件で検出された使用済み培養液のスペクトルリストを示す。 m/z 303.2332 では FFA 20:4 (アラキドン酸) 以外に 2 種類の蛋白同化ステロイド、アラキドン酸の位置異性体などが検出された。 m/z 279.2328 では FFA 18:2 (リノール酸) 以外に、多数の共役リノール酸が候補化合物として検出された。MS では多数の候補化合物が検出され、脂肪酸を同定できなかった。そこで、標品の RT と MS² を比較して脂肪酸の同定を行った。

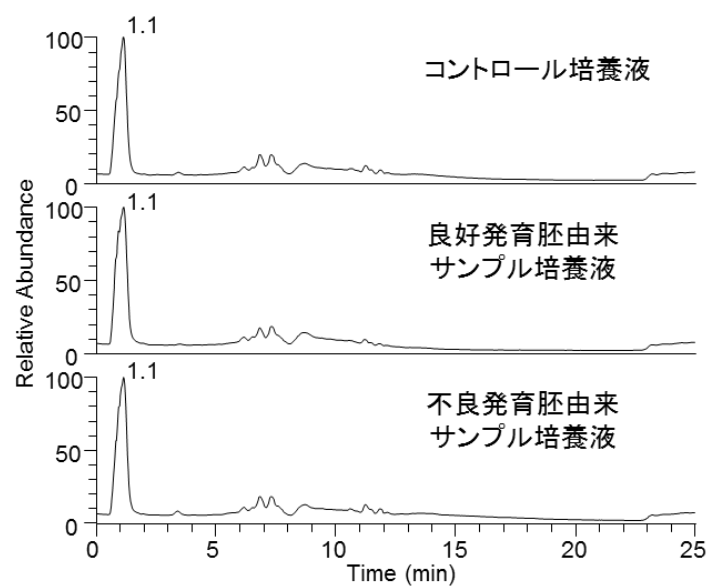


図 5. TIC の典型例

(上段：コントロール培養液、中段：良好発育胚由来のサンプル培養液、
下段：不良発育胚由来のサンプル培養液)

表 4. 使用済み培養液におけるスペクトルリスト

<i>m/z</i>	RT	Fomula	候補化合物
303.2332	5.7		drostanolone
			Mesterolone
			Arachidonic acid (アラキドン酸)
			17-Hydroxykauran-18-al
			(8 <i>Z</i> ,11 <i>Z</i> ,14 <i>Z</i> ,17 <i>Z</i>)-8,11,14,17-Icosatetraenoic acid
			(3α,5β,9β,10α)-Pimara-8(14),15-diene-3,9-diol
			Kaur-15-ene-7,18-diol
			Pimara-8(14),15-diene-3,12-diol
			(2 <i>Z</i>)-3-Methyl-5-(5,5,8a-trimethyl-2-methylenedecahydro-1-naphthalenyl)-2-pentenoic acid
			1,4a-Dimethyl-6-methylene-5-(3-methyl-5-oxopentyl)decahydro-1-naphthalenecarbaldehyde
			(2 <i>Z</i>)-3-Methyl-5-(2,5,5,8a-tetramethyl-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1-naphthalenyl)-2-pentenoic acid
279.2328	5.9	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	Linalyl caprylate
			Linoleic acid (リノール酸)
			Rumenic acid
			9 <i>E</i> ,12 <i>E</i> -octadecadienoic acid
			(9 <i>E</i> ,11 <i>E</i>)-9,11-Octadecadienoic acid
			5-Octadecynoic acid
			10 <i>E</i> ,12 <i>Z</i> -octadecadienoic acid
			9,15-Octadecadienoic acid
			Ethyl (2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i>)-2,4-hexadecadienoate
377.2368	6.7	C ₁₄ H ₃₄ N ₈ P _{1[32]} S ₁	Methyl 14-acetoxy-5-hydroxy-5,9-dimethyltetracyclo[11.2.1.0~1,10~.0~4,9~]hexadecane-14-carboxylate

n-3 脂肪酸の代表例として、FFA 22:6 (DHA) の標品、コントロール培養液、サンプル培養液の TIC、EIC をそれぞれ、図 2A、2B、2C に示す。いずれも FFA 22:6 (DHA) の計算精密質量の m/z 327.2330 ($[M-H]^-$) の対称的な単一ピークを RT 5.5 分に観察した (図 2A、2B、2C)。各々のマススペクトル (MS) の $[M-H]^-$ は、 m/z 327.2324 - 327.2333 で計算精密質量と一致していた (図 2A'、2B' と 2C')。各々の一次プロダクトイオンスペクトル (MS²) ではプロダクトイオンとして、 $[M-H-COO]^-$ に一致する m/z 283.2 のベースピークと、 $[M-H-H_2O]^-$ に一致する m/z 309.0 または 309.2 の小さなピークを示した (図 2A''、2B''、2C'')。これらの結果から、FFA 22:6 (DHA) を同定した。

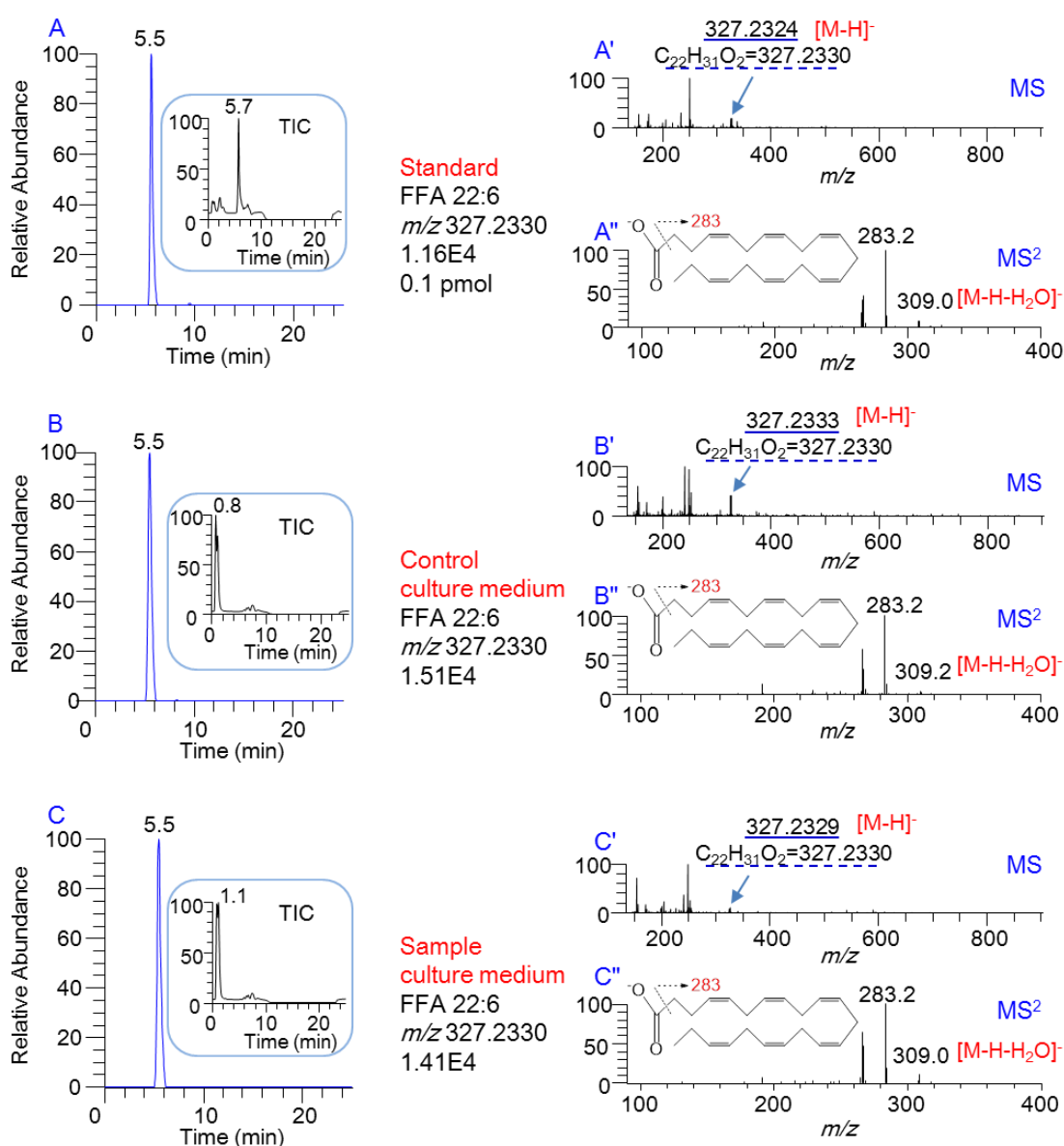


図 6. FFA 22:6 (DHA) の標品 (A)、コントロール培養液 (B)、サンプル培養液 (C) の TIC、EIC とそれぞれに対応する MS と MS² スペクトル

n-6 脂肪酸の代表例として、FFA 20:4 (アラキドン酸) の同定を同様の方法で行った (図 3)。FFA 20:4 (アラキドン酸) の標品、コントロール培養液、サンプル培養液の TIC、EIC をそれぞれ図 3A、3B、3C に示す。FFA 20:4 (アラキドン酸) の計算精密質量である m/z 303.2330 ($[M-H]^-$) のシャープな単一ピークを RT 6.0 分にそれぞれ観察した (図 3A、3B および 3C)。各々の MS スペクトルの $[M-H]^-$ は、すべて m/z 303.2324 で計算精密質量と一致していた (図 3A'、3B'、3C')。さらに、各々の MS² スペクトルでは、 $[M-H-COO]^-$ に一致する m/z 259.3 のベースピークと、 $[M-H-H_2O]^-$ に一致する m/z 285.2 または 285.3 の小さなピークを示した (図 3A''、3B''、3C'')。

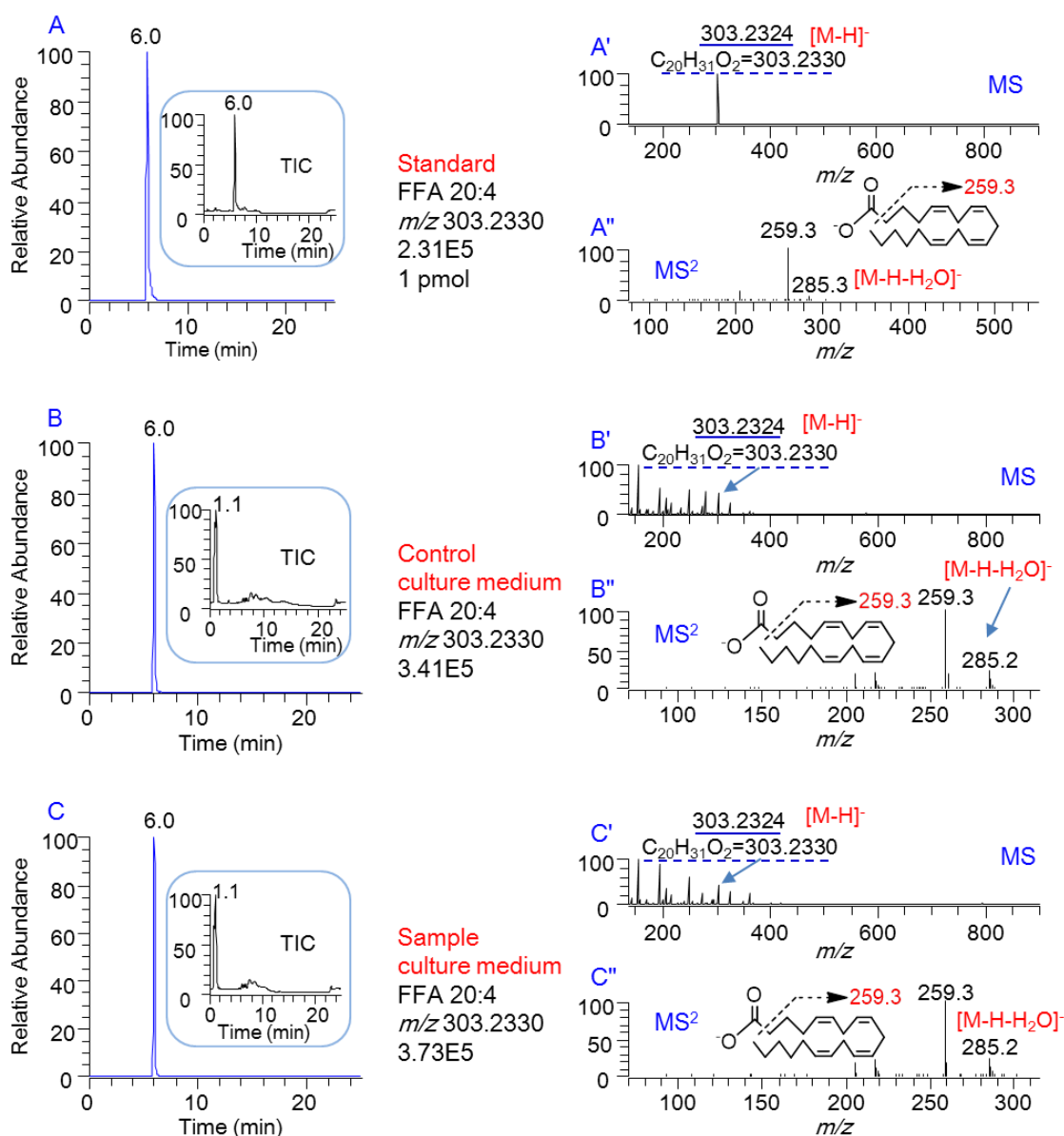


図 7. FFA 20:4 (アラキドン酸) の標品 (A)、コントロール培養液 (B)、サンプル培養液 (C) の TIC、EIC とそれぞれに対応する MS と MS² スペクトル

飽和脂肪酸の代表例として、FFA 16:0（パルミチン酸）の同定を同様の方法で行った（図 4）。飽和脂肪酸においても、良好な EIC、MS スペクトル及び MS² スペクトルを得ることができた。

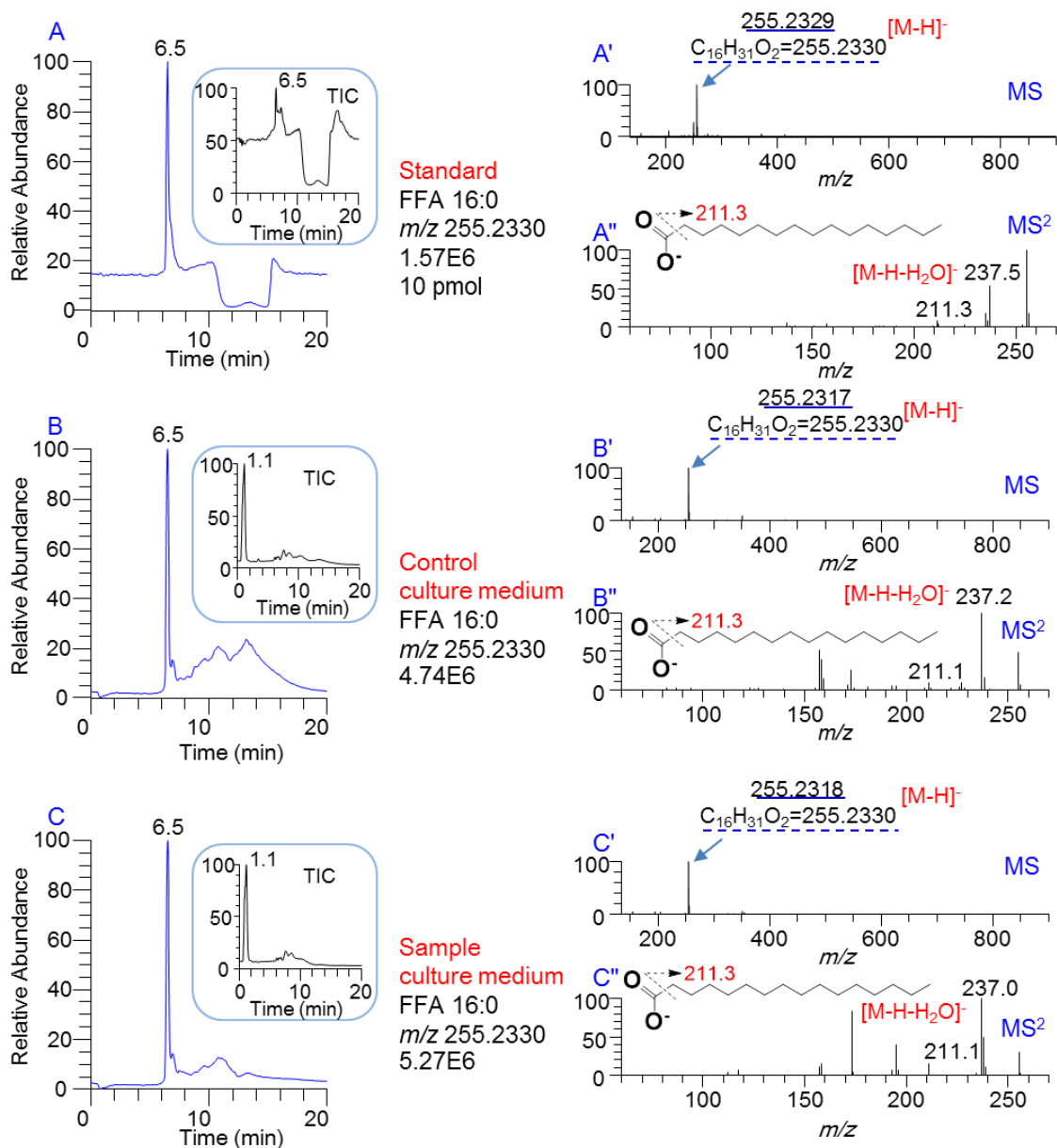


図 8. FFA 16:0（パルミチン酸）の標品 (A)、コントロール培養液 (B)、サンプル培養液 (C) の TIC、EIC とそれぞれに対応する MS と MS² スペクトル

同様の方法を用いて、サンプル培養液の脂肪酸の EIC を描出し RT 比較を行った (図 5)。脂肪酸の数に比例して RT は長くなり、不飽和結合の数に比例して、RT が短くなっていることが確認できた。しかし、中鎖脂肪酸の FFA 8:0 (カプリル酸)、FFA 10:0 (カプリン酸) の RT は短く (図 5B、5C)、本測定条件では同定が不十分であった。そこで、移動相の条件を変えて追加測定を行った。

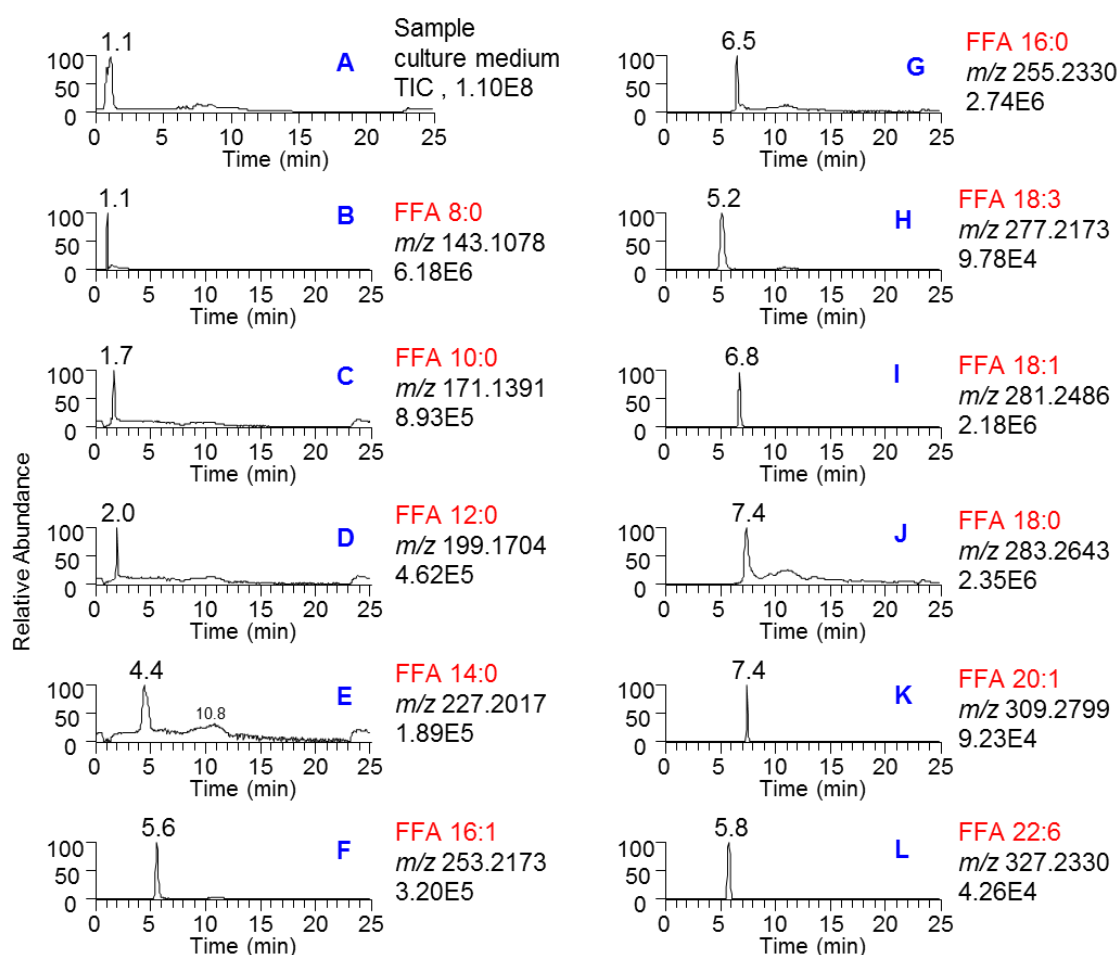


図 9. サンプル培養液における各脂肪酸の EIC (同一の測定条件)

FFA 8:0 (カプリル酸) と FFA 10:0 (カプリン酸) の同定を行った結果をそれぞれ図 6 と図 7 に示す。測定条件を変更したことで、RT が長くなり良好な EIC、MS スペクトル及び MS² スペクトルが得られた。このことから、培養液中には中鎖脂肪酸も存在することが確認できた。

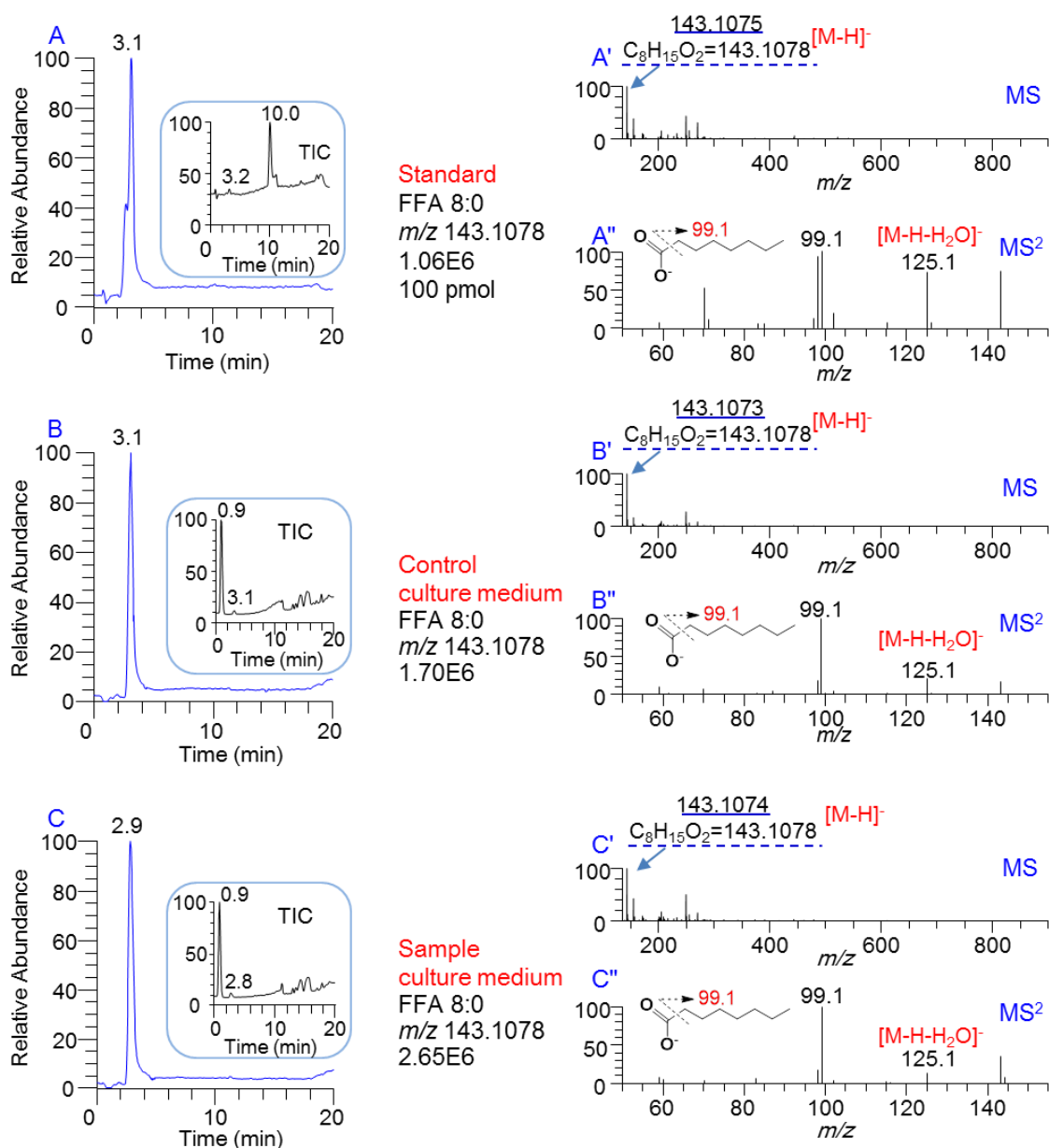


図 10. FFA 8:0 (カプリル酸) の標品 (A)、コントロール培養液 (B)、サンプル培養液 (C) の TIC、EIC とそれぞれに対応する MS と MS² スペクトル

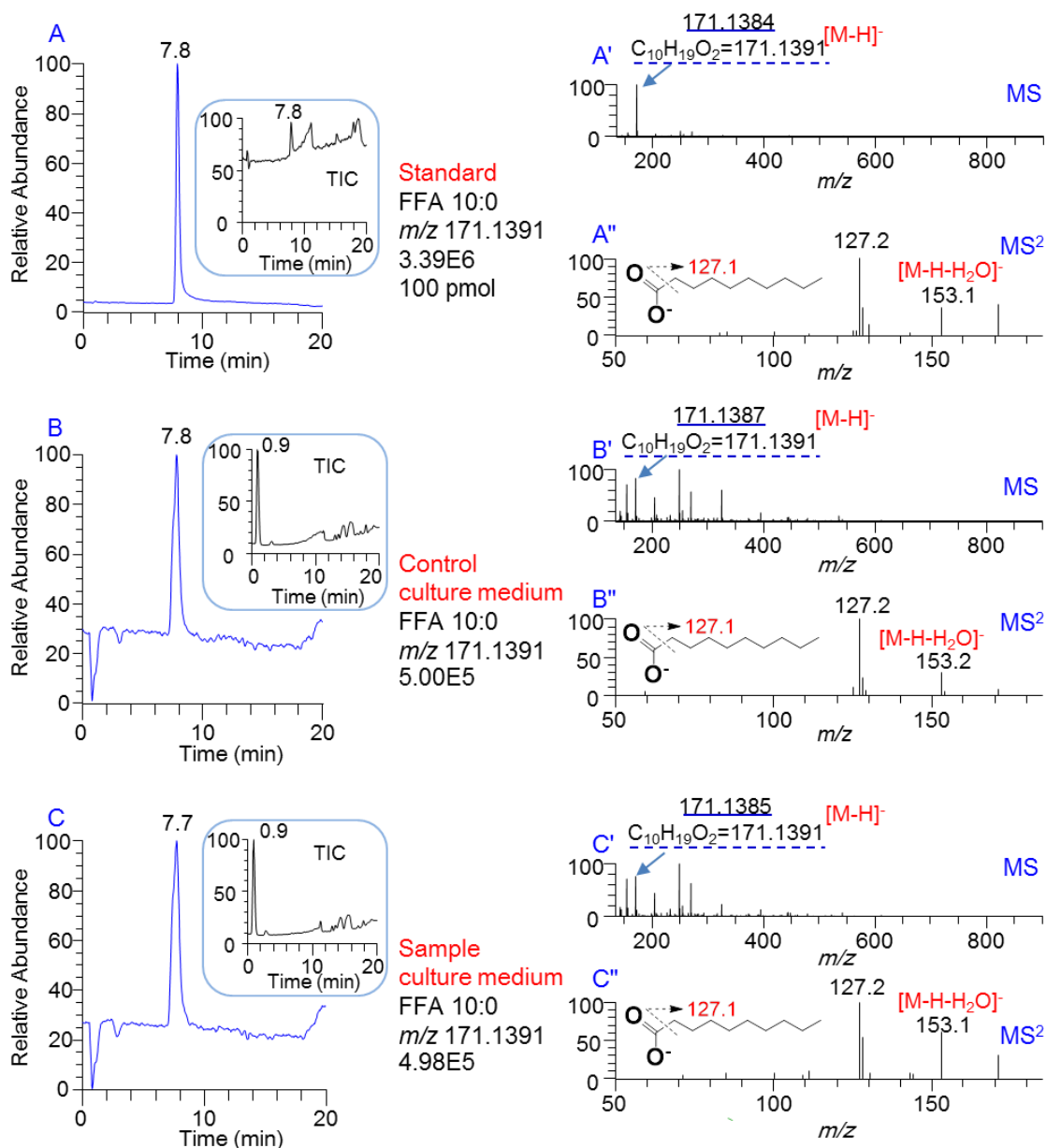


図 11. FFA 10:0 (カプリン酸) の標品 (A)、コントロール培養液 (B)、サンプル培養液 (C) の TIC、EIC とそれぞれに対応する MS と MS² スペクトル

コントロール培養液とサンプル培養液において、残りの脂肪酸の同定は以下の 3 つの基準を用いて同様に行った：(1) EIC での RT の一致、(2) MS スペクトルでの ± 5 ppm 以内の質量確度、(3) MS² スペクトルでの同一の断片化パターン。これらの基準を満たし、同定された脂肪酸の結果を表 4 に示す。しかし、例外的に FFA 18:3 (α -リノレン酸) と FFA 20:1 (エイコセン酸) は低濃度のために、(3) の基準を利用できなかった。それゆえ、FFA 18:3 (α -リノレン酸) と FFA 20:1 (エイコセン酸) は、(1) と (2) の基準のみで同定したが、Orbitrap 質量分析計では ± 5 ppm の範囲内の質量確度であれば 95%以上の確率で一致するので問題ない結果である[22]。また、FFA 16:1 (パルミトレイン酸) は標品との RT の比較ができなかったことと、MS² スペクトルにおいて $[M-H-H_2O]^-$ に一致するプロダクトイオンが得られなかったことから、(2) の基準のみで同定した。

FFA 18:0 (ステアリン酸) だけは溶媒のみのブランクでも検出され、ブランクはコントロール培養液より高い値を示すことがあった。過去の論文[23, 24]で報告されているように、我々は検出された FFA 18:0 (ステアリン酸) は、研究において使われたフィルターやピペットチップのようないくつかのプラスチック消耗品から、一部汚染されたと結論付けた。従って、FFA 18:0 (ステアリン酸) は今回の統計解析から除外した。FFA 20:5 (EPA) に関しては、どの分析試料からも検出されなかった。

表 5. LC-HRMS で同定された脂肪酸の質量分析のイオン特性

Molecular Species	Element Composition	Theoretical mass	Standard FFAs				FFAs in culture media								
			[M-H] ⁻ <i>(m/z)</i>	Retention Time (min)	[M-H] ⁻ <i>(m/z)</i>	Mass Accuracy (ppm)	Product ions <i>(m/z)</i>	Control				Sample			
								Retention Time (min)	[M-H] ⁻ <i>(m/z)</i>	Mass Accuracy (ppm)	Product ions <i>(m/z)</i>	Retention Time (min)	[M-H] ⁻ <i>(m/z)</i>	Mass Accuracy (ppm)	Product ions <i>(m/z)</i>
FFA 8:0 Caprylic acid	C ₈ H ₁₅ O ₂ ⁻	143.1078	3.1	143.1075	-1.70	99.1, 125.1	3.1	143.1073	-3.30	99.1, 125.1	2.9	143.1074	-3.17	99.1, 125.1	
FFA10:0 Capric acid	C ₁₀ H ₁₉ O ₂ ⁻	171.1391	7.8	171.1384	-3.64	127.2, 153.1	7.8	171.1387	-2.30	127.2, 153.2	7.7	171.1385	-2.94	127.2, 153.1	
FFA12:0 Lauric acid	C ₁₂ H ₂₃ O ₂ ⁻	199.1704	2.1	199.1700	-1.72	155.2, 181.2	2.0	199.1699	-2.18	155.2, 181.2	1.9	199.1698	-2.78	155.3, 181.2	
FFA14:0 Myristic acid	C ₁₄ H ₂₇ O ₂ ⁻	227.2017	4.5	227.2017	0.12	183.3, 209.3	4.5	227.2010	-3.05	183.2, 209.3	4.5	227.2011	-2.52	183.2, 209.3	
FFA 16:0 Palmitic acid	C ₁₆ H ₃₁ O ₂ ⁻	255.2330	6.5	255.2329	-0.37	211.3, 237.5	6.5	255.2317	-4.95	211.1, 237.2	6.5	255.2318	-4.60	211.1, 237.0	
FFA16:1 Palmitoleic acid	C ₁₆ H ₂₉ O ₂ ⁻	253.2173	—	—	—	—	5.6	253.2166	-2.98	209.1	5.6	253.2164	-3.45	209.2	
FFA 18:1 Oleic acid	C ₁₈ H ₃₃ O ₂ ⁻	281.2486	6.8	281.2475	-4.03	237.3, 263.3	6.8	281.2480	-2.18	237.1, 263.3	6.8	281.2481	-1.76	237.3, 263.4	
FFA 18:2 Linoleic acid	C ₁₈ H ₃₁ O ₂ ⁻	279.2330	6.0	279.2325	-1.70	235.2, 261.3	6.1	279.2321	-3.00	235.3, 261.3	6.1	279.2325	-1.59	235.4, 261.2	
FFA 18:3 α-Linolenic acid	C ₁₈ H ₂₉ O ₂ ⁻	277.2173	5.2	277.2167	-2.03	233.3, 259.3	5.2	277.2163	-3.69	Not detected*	5.2	277.2167	-2.14	Not detected*	
FFA20:1 Eicosenoic acid	C ₂₀ H ₃₇ O ₂ ⁻	309.2799	7.4	309.2791	-2.47	265.3, 291.3	7.5	309.2794	-1.47	Not detected*	7.5	309.2796	-0.89	Not detected*	
FFA 20:4 Arachidonic acid	C ₂₀ H ₃₁ O ₂ ⁻	303.2330	6.0	303.2324	-1.76	259.3, 285.3	6.0	303.2324	-1.76	259.3, 285.2	6.0	303.2324	-1.76	259.3, 285.2	
FFA 22:6 Docosahexaenoic acid	C ₂₂ H ₃₁ O ₂ ⁻	327.2330	5.5	327.2324	-1.55	283.2, 309.0	5.5	327.2333	0.94	283.2, 309.2	5.5	327.2329	-0.24	283.2, 309.0	

*Identification of FFA was established in the MS spectra at >95% accuracy using the criterion consisting of the consistency in retention time and the mass accuracy within ±5.00 ppm (22).

2-4-2 妥当性検証

必須脂肪酸を中心とした主要な 6 種類の脂肪酸に関して、妥当性を検証するために変動係数 (CV) を測定した。コントロール培養液とサンプル培養液の日内変動 (n=10) と日間変動 (n=5、3 日間) を調べた結果を表 5 に示す。いずれにおいても、LC-HRMS による脂肪酸測定は良好な再現性を示す結果となった。

表 6. 各脂肪酸別試料の日内変動と日間変動の結果

脂肪酸		日内変動 (%) n=10		日間変動 (%) n=5, 3日間	
		コントロール 培養液	サンプル 培養液	コントロール 培養液	サンプル 培養液
非必須	FFA 16:0 パルミチン酸	2.3	1.8	3.8	3.3
	FFA 18:1 オレイン酸	2.4	1.6	2.4	1.4
必須	FFA 18:2 リノール酸	1.4	0.7	4.8	4.3
	FFA 18:3 α -リノレン酸	2.3	1.2	5.1	4.1
	FFA 20:4 アラキドン酸	2.2	1.1	8.5	6.0
	FFA 22:6 DHA	4.7	1.9	5.0	4.3

2-4-3 脂肪酸の変化率

本研究において、表 4 のコントロール培養液で示したように、FFA 20:5 (EPA) を除いて胚培養に用いる培養液には最初から脂肪酸が含まれていた。必須脂肪酸を中心として主要な 6 種類の脂肪酸の変化率を胚発育別に求めた (図 8)。FFA 22:6 (DHA) の変化率は良好発育群で不良発育群に比べて低い値だった ($p<0.05$)。他の必須脂肪酸、つまり FFA 18:2 (リノール酸)、FFA 18:3 (α -リノレン酸)、FFA 20:4 (アラキドン酸) の良好発育群の変化率は、不良発育群のそれらより低い傾向にあったが、統計学的有意差はなかった。非必須脂肪酸である FFA 16:0 (パルミチン酸) と FFA 18:1 (オレイン酸) の変化率の違いは、両群間で認められなかった。

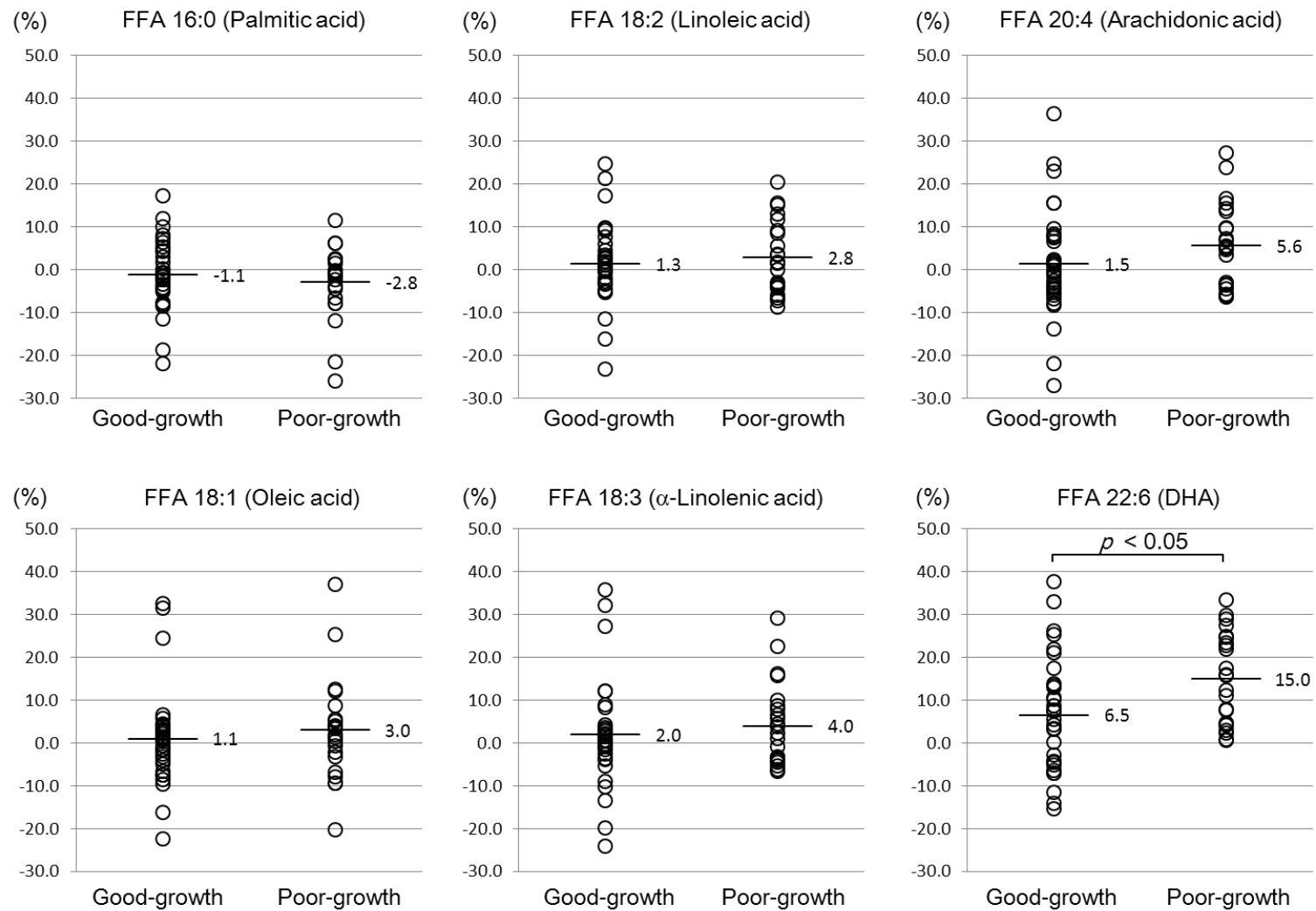


図 12. 良好胚/不良胚の脂肪酸の変化率（各図の数値は変化率の平均値）

2-4-4 FFA 22:6 (DHA) の変化率と転帰

良好胚群 (n=32) における FFA 22:6 (DHA) の変化率と転帰の結果を表 6 に示す。変化率がマイナスの群では、1 個のみが胚移植に用いられ妊娠継続となった。プラスの群では 8 個の胚が移植され、3 例が妊娠継続、5 例は妊娠に至らなかった。23 個の胚は、凍結保存中のため未使用である。FFA 22:6 (DHA) の変化率の減少と着床との関係に關しては、サンプルが少なく不明である。

表 7. 良好胚群の FFA 22:6 (DHA) の変化率と転帰

変化率(%)	ステージ	胚評価	転帰
-15.4	D5	4BC	未使用
-14.1	D5	4BB	未使用
-11.6	D5	3BC	未使用
-7.0	D5	3BB	未使用
-7.0	D5	4BB	未使用
-6.3	D6	4BC	未使用
-5.1	D5	4BA	未使用
-4.5	D5	B2	未使用
-4.4	D5	B2	未使用
-4.3	D5	4AB	妊娠継続
-2.8	D5	4BB	未使用
0.1	D5	4BB	未使用
3.3	D5	4AB	妊娠せず
3.4	D5	4BB	妊娠せず
4.3	D5	4BC	未使用
5.6	D5	4BB	未使用
7.3	D5	B2	未使用
7.7	D5	4BA	未使用
7.7	D5	3BB	未使用
8.7	D5	4BC	未使用
10.2	D5	5BA	妊娠せず
10.6	D5	4BC	未使用
13.1	D5	4BC	妊娠継続
13.4	D5	4BA	妊娠継続
13.8	D5	3BB	未使用
17.5	D5	4BB	未使用
21.1	D5	4BB	妊娠せず
22.0	D5	4BC	未使用
25.3	D5	4BB	妊娠せず
26.2	D5	4BB	妊娠継続
33.1	D6	4BA	未使用
37.7	D5	4BB	未使用

2-5 考察

我々は、IVF の妊娠率を改善するために、胚培養に影響を及ぼす要因としてマイクロドロップディッシュに使用するミネラルオイルの品質や培養液の酸化還元電位・アミノ酸代謝について研究を行ってきた。しかし、妊娠率を改善する方法を導くには至らなかった。本研究では、使用済みの胚培養液を用いて FFA 22:6 (DHA) の変化率と胚発育に相関があることを見出した。また、他の必須脂肪酸に関しても相関があるかもしれないが、統計的に有意な差は認められなかった。

脂肪酸は、必須脂肪酸と非必須脂肪酸に分類される。必須脂肪酸は体内で合成することができないため、食物を通して取り込む必要がある。IVF での着床前の胚において、培養液は必須脂肪酸の唯一の供給源である。本研究において、良好発育群は形態学的評価による良好胚盤胞と定義した。1 つの細胞から胚盤胞 (200–300 細胞) へと発育する過程で、胚はその細胞膜を作るために、相当量の脂質を必要とする。このことは、良好発育群の FFA 22:6 (DHA) において認められた、より大きな減少を説明できるかもしれない (図 8)。対照的に、非必須脂肪酸である FFA 16:0 (パルミチン酸) と FFA 18:1 (オレイン酸) では、FFA 22:6 (DHA) で見られたような統計学的に有意な差はなかった。そして、これは非必須脂肪酸が胚盤胞期の胚で合成されることを示すものである (図 8)。

FFA 22:6 (DHA) は、22 個の炭素鎖と 6 個の *cis* 二重結合を持つ n-3 脂肪酸である。IVF を受けた女性において、妊娠前に食事によって多価不飽和脂肪酸を摂取した場合の影響に関する前方視的研究では、n-3 脂肪酸を多く摂取すると胚の形態が改善されたと報告されている[25]。これは、FFA 22:6 (DHA) と FFA 18:3 (α -リノレン酸) とで顕著であり、FFA 18:3 (α -リノレン酸) は FFA 22:6 (DHA) の前駆体の 1 つである。加えて、Haggarty らは着床前のヒト胚の胚盤胞期で ^{13}C 標識飽和脂肪酸の取り込みがほとんどなかったのに対し、 ^{13}C 標識 FFA 18:2 (リノール酸) を積極的に取り込むと報告した[26]。細胞膜の流動性は、主にリン脂質を構成する脂肪酸の不飽和度に依存するので、FFA 22:6 (DHA) の高い不飽和度は細胞膜の流動性に大きく寄与すると言える[27]。膜リン脂質に取り入れられた不飽和脂肪酸による膜流動性の維持は、膜の統合性と細胞成長に極めて重要であると報告されている[28]。胚は細胞分裂を繰り返し発育する過程で、FFA 22:6 (DHA) を取り込んだ可能性が考えられる。FFA 22:6 (DHA) の変化率と着床との関係については、今後も調査が必要である。

生殖の初期段階で、脂肪酸は卵子の成熟や胚の着床に関与することが報告されている[29–31]。多価不飽和脂肪酸は、エンドサイトーシス/エキソサイトーシスの調節や、イオンチャンネル調節、遺伝子発現調節など、胚における重要なプロセスに関与することが知られている[32]。FFA 20:4 (アラキドン酸) はプロスタグランジン、ロイコトリエン、トロンボキサンなどのエイコサノイドの合成に利用され、これらは様々な生理活性を発

揮する。近年では、FFA 20:5 (EPA) や FFA 22:6 (DHA) 由来のエイコサノイドが知られ、抗炎症に働くことが知られている[33]。胚の発生におけるこれらの脂質メディエーターの役割は今後の研究課題である。

本研究で使用した培養液には、予めヒト血清アルブミン (human serum albumin : HSA) が 5 mg/ml の濃度で添加された状態で市販されている (表 2)。製品情報には培養液の成分として遊離脂肪酸は記載されていないが、検出された培養液中の脂肪酸は HSA に結合していたと考えられる。脂肪酸は血液中でアルブミンと結合して存在しており、アルブミンから脂肪酸を完全に除去するためには有機溶媒を用いてアルブミンを徹底的に洗浄する必要がある。培養液に添加された HSA がどのような洗浄操作を経てきたかは不明であるが、今回の実験で検出した脂肪酸は微量であったことから、HSA に恐らく偶発的に残留していた脂肪酸を検出したものと考えられる。

HSA 製造の際、ウィルスを不活化するための熱処理前に、安定化剤として FFA 8:0 (カプリル酸) が添加されている[34]。FFA 8:0 (カプリル酸) が胚培養液中に高濃度で存在する時、マウスの胚発生が阻害されたと報告されている[35, 36]。一方、ピルビン酸やグルコースを欠く培養液中においては、低濃度の FFA 8:0 (カプリル酸) はマウス胚のエネルギー源となるという報告もある[37]。今回、我々は必須脂肪酸と胚発育の関係に注目して、6 つの主要な脂肪酸の変化率を求めた。そのため、FFA 8:0 (カプリル酸) を含む中鎖脂肪酸やその他の脂肪酸に関しては、定性解析するに留まった。今後、これらの脂肪酸と胚発育の関係を調査する必要がある。

図 9 に LC-HRMS を補助的に使用した IVF プロトコルの概略を示す。このプロトコルにおいて、メタボロミクス的なアプローチは形態学的に同程度のグレードの胚が複数あった場合、胚移植のために一つの胚を選別することに苦慮する胚培養士に補完的な情報を与えることができる。メタボロミクスを用いたグレード評価はまだ導入されていないが、LC-HRMS はそのようなシステムを構築するための強力なツールとなる可能性がある。これには脂肪酸、アミノ酸、グルコースおよび他の代謝産物[8-13]を含むかもしれない。このアプローチの大きな長所は、顕微鏡下の胚評価のような個人の技術と関係なく、胚培養士が胚の高感度で網羅的な代謝情報を得られることである。

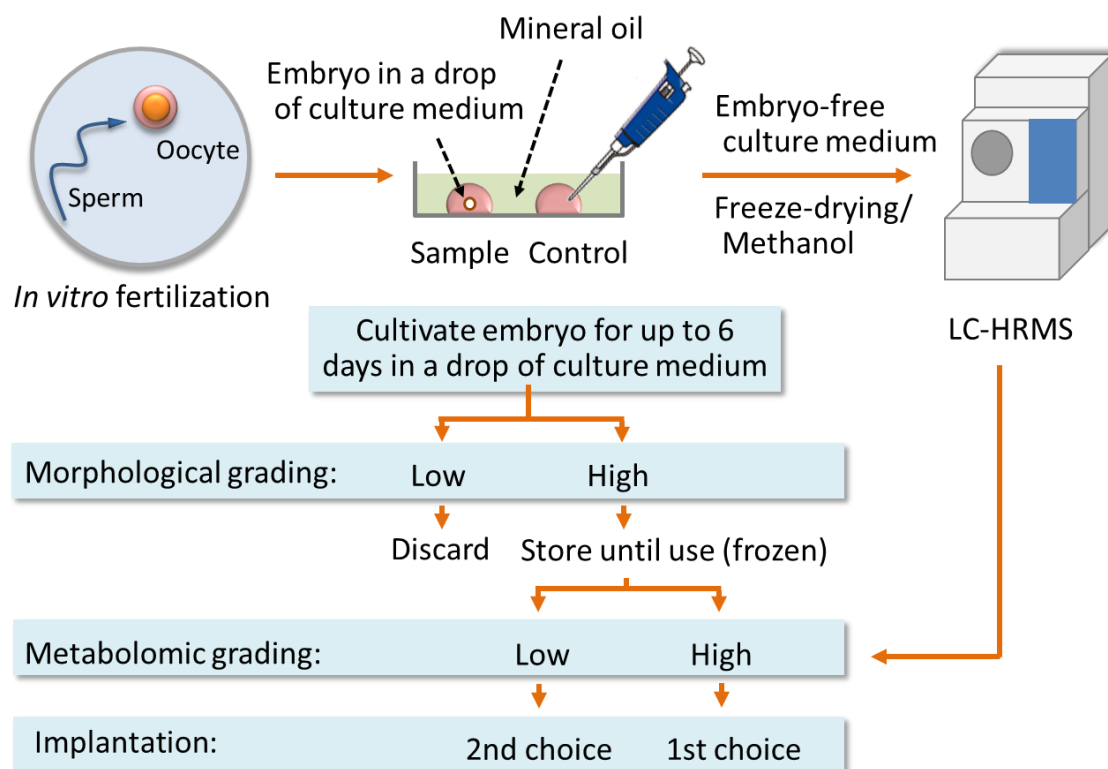


図 13. LC-HRMS を用いた胚選別方法のプロトコール

本研究の主な限界は、サンプルの数が少ないことである。今回の結果を確認するためには、多数のサンプルでさらなる研究が必要である。また、本研究の方法論的な限界は、今回使用した LC-HRMS が半定量的な特性であるということである。今後、本結果を検証するために、内部標準品を用いることで厳密に定量 LC-MS/MS を使って研究を実施する必要がある。しかし、我々は本研究において、培養液中の脂肪酸濃度ではなく、相対的な変化率を求めた。それゆえ、本法の半定量的な特性は本研究の質を下げることなく、むしろ簡便であるという付加価値が加わる。将来的に改善されるべきもう一つの問題は、本法に関する精度管理用の試薬を作製することである。

加えて、我々は本研究において FFA 18:0 (ステアリン酸) が恐らくプラスチック消耗品から溶出したことを確認した。FFA 18:0 (ステアリン酸) だけでなく FFA 16:0 (パルミチン酸) もまた、一般的に可塑剤として用いられるため、研究室では汚染の可能性を考慮し、対応策を検討することが必要である[23, 24]。LC-HRMS は、分析に影響を及ぼす微量の汚染物質を検出する可能性があるほど感度が高い。そのため、ブランク中に汚染物質が存在しないことを、それぞれのアッセイで確認する必要がある。

2-6 結論

IVF において使用済み胚培養液中の FFA 22:6 (DHA) の変化率の減少は、胚の良好

な発育を示唆する可能性がある。LC-HRMS を使って考案されたメタボロミクスのアプローチは、非侵襲的な胚評価のための強力なツールとなるかもしれない。

2-7 参考文献

- [1] E.S. Jungheim, G.A. MacOnes, R.R. Odem, B.W. Patterson, S.E. Lanzendorf, V.S. Ratts, et al., Associations between free fatty acids, cumulus oocyte complex morphology and ovarian function during in vitro fertilization, *Fertility and Sterility*. 95 (2011) 1970–1974.
- [2] A. O’Gorman, M. Wallace, E. Cottell, M.J. Gibney, F.M. McAuliffe, M. Wingfield, et al., Metabolic profiling of human follicular fluid identifies potential biomarkers of oocyte developmental competence., *Reproduction*. 146 (2013) 389–395.
- [3] Y.T. Wu, L. Tang, J. Cai, X.E. Lu, J. Xu, X.M. Zhu, et al., High bone morphogenetic protein-15 level in follicular fluid is associated with high quality oocyte and subsequent embryonic development, *Human Reproduction*. 22 (2007) 1526–1531.
- [4] B. Berker, C. Kaya, R. Aytac, H. Satioglu, Homocysteine concentrations in follicular fluid are associated with poor oocyte and embryo qualities in polycystic ovary syndrome patients undergoing assisted reproduction, *Human Reproduction*. 24 (2009) 2293–2302.
- [5] A. Revelli, L. Delle Piane, S. Casano, E. Molinari, M. Massobrio, P. Rinaudo, Follicular fluid content and oocyte quality: from single biochemical markers to metabolomics., *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*. 7 (2009) 40.
- [6] E. Pinero-Sagredo, S. Nunes, M.J. de Los Santos, B. Celda, V. Esteve, NMR metabolic profile of human follicular fluid, *NMR in Biomedicine*. 23 (2010) 485–495.
- [7] M. Wallace, E. Cottell, M.J. Gibney, F.M. McAuliffe, M. Wingfield, L. Brennan, An investigation into the relationship between the metabolic profile of follicular fluid, oocyte developmental potential, and implantation outcome, *Fertility and Sterility*. 97 (2012) 1078–1084.
- [8] K. Hardy, M.A.K. Hooper, A.H. Handyside, A.J. Rutherford, R.M. Winston, H.J. Leese, Non-invasive measurement of glucose and pyruvate uptake by individual human oocytes and preimplantation embryos., *Human Reproduction*. 4 (1989) 188–191.

- [9] A.L. Gott, K. Hardy, R.M. Winston, H.J. Leese, Non-invasive measurement of pyruvate and glucose uptake and lactate production by single human preimplantation embryos., *Human Reproduction*. 5 (1990) 104–108.
- [10] J. Conaghan, A.H. Handyside, R.M. Winston, H.J. Leese, Effects of pyruvate and glucose on the development of human preimplantation embryos in vitro., *Journal of Reproduction and Fertility*. 99 (1993) 87–95.
- [11] J. Conaghan, K. Hardy, A.H. Handyside, R.M. Winston, H.J. Leese, Selection criteria for human embryo transfer: a comparison of pyruvate uptake and morphology., *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 10 (1993) 21–30.
- [12] K. Turner, K.L. Martin, B.J. Woodward, E.A. Lenton, H.J. Leese, Comparison of pyruvate uptake by embryos derived from conception and non-conception natural cycles., *Human Reproduction*. 9 (1994) 2362–2366.
- [13] D.K. Gardner, M. Lane, J. Stevens, W.B. Schoolcraft, Noninvasive assessment of human embryo nutrient consumption as a measure of developmental potential, *Fertility and Sterility*. 76 (2001) 1175–1180.
- [14] D.R. Brison, F.D. Houghton, D. Falconer, S.A. Roberts, J. Hawkhead, P.G. Humpherson, et al., Identification of viable embryos in IVF by non-invasive measurement of amino acid turnover, *Human Reproduction*. 19 (2004) 2319–2324.
- [15] E. Seli, L. Botros, D. Sakkas, D.H. Burns, Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using proton nuclear magnetic resonance correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization, *Fertility and Sterility*. 90 (2008) 2183–2189.
- [16] E. Seli, D. Sakkas, R. Scott, S.C. Kwok, S.M. Rosendahl, D.H. Burns, Noninvasive metabolomic profiling of embryo culture media using Raman and near-infrared spectroscopy correlates with reproductive potential of embryos in women undergoing in vitro fertilization, *Fertility and Sterility*. 88 (2007) 1350–1357.
- [17] R. Scott, E. Seli, K. Miller, D. Sakkas, K. Scott, D.H. Burns, Noninvasive metabolomic profiling of human embryo culture media using Raman spectroscopy predicts embryonic reproductive potential: a prospective blinded pilot study, *Fertility and Sterility*. 90 (2008) 77–83.
- [18] C.G. Vergouw, L.L. Botros, P. Roos, J.W. Lens, R. Schats, P.G. a Hompes, et al., Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess

- embryo viability: A novel, non-invasive method for embryo selection, *Human Reproduction*. 23 (2008) 1499–1504.
- [19] C.G. Vergouw, D.C. Kieslinger, E.H. Kosteljik, L.L. Botros, R. Schats, P.G. Hompes, et al., Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: A randomized controlled trial, *Human Reproduction*. 27 (2012) 2304–2311.
 - [20] T. Rødgaard, P.M.H. Heegaard, H. Callesen, Non-invasive assessment of in-vitro embryo quality to improve transfer success, *Reproductive BioMedicine Online*. 31 (2015) 585–592.
 - [21] D.K. Gardner, M. Lane, J. Stevens, T. Schlenker, W.B. Schoolcraft, Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer, *Fertility and Sterility*. 73 (2000) 1155–1158.
 - [22] A. Makarov, E. Denisov, O. Lange, S. Horning, Dynamic range of mass accuracy in LTQ orbitrap hybrid mass spectrometer, *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*. 17 (2006) 977–982.
 - [23] T.W. Lee, S. Tumanov, S.G. Villas-Bôas, J.M. Montgomery, N.P. Birch, Chemicals eluting from disposable plastic syringes and syringe filters alter neurite growth, axogenesis and the microtubule cytoskeleton in cultured hippocampal neurons, *Journal of Neurochemistry*. 133 (2015) 53–65.
 - [24] S. Tumanov, V. Bulusu, J.J. Kamphorst, Analysis of Fatty Acid Metabolism Using Stable Isotope Tracers and Mass Spectrometry., *Methods in Enzymology*. 561 (2015) 197–217.
 - [25] F. Hammiche, M. Vujkovic, W. Wijburg, J.H.M. De Vries, N.S. MacKlon, J.S.E. Laven, et al., Increased preconception omega-3 polyunsaturated fatty acid intake improves embryo morphology, *Fertility and Sterility*. 95 (2011) 1820–1823.
 - [26] P. Haggarty, M. Wood, E. Ferguson, G. Hoad, A. Srikantharajah, E. Milne, et al., Fatty acid metabolism in human preimplantation embryos., *Human Reproduction*. 21 (2006) 766–773.
 - [27] W. Stillwell, S.R. Wassall, Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid, *Chemistry and Physics of Lipids*. 126 (2003) 1–27.
 - [28] O. Doi, F. Doi, F. Schroeder, A.W. Alberts, P.R. Vagelos, Manipulation of fatty acid composition of membrane phospholipid and its effects on cell growth in mouse LM cells, *Biochimica et Biophysica Acta*. 509 (1978) 239–250.
 - [29] S.M. Downs, J.L. Mosey, J. Klinger, Fatty acid oxidation and meiotic

- resumption in mouse oocytes, *Molecular Reproduction and Development*. 76 (2009) 844–853.
- [30] R.G. Sturmey, A. Reis, H.J. Leese, T.G. McEvoy, Role of fatty acids in energy provision during oocyte maturation and early embryo development, *Reproduction in Domestic Animals*. 44 (2009) 50–58.
 - [31] E.R. Norwitz, D.J. Schust, S.J. Fisher, Implantation and the survival of early pregnancy, *The New England Journal of Medicine*. 345 (2001) 1400–1408.
 - [32] P.J. McKeegan, R.G. Sturmey, The role of fatty acids in oocyte and early embryo development., *Reproduction, Fertility, and Development*. 24 (2011) 59–67.
 - [33] P.C. Calder, Fatty acids and in fl ammation: The cutting edge between food and pharma, *European Journal of Pharmacology*. 668 (2011) S50–S58.
 - [34] M. Anraku, Y. Tsurusaki, H. Watanabe, T. Maruyama, U. Kragh-Hansen, M. Otagiri, Stabilizing mechanisms in commercial albumin preparations: Octanoate and N-acetyl-l-tryptophanate protect human serum albumin against heat and oxidative stress, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 1702 (2004) 9–17.
 - [35] P.H. Leonard, M.C. Charlesworth, D. Ph, L. Benson, D.L. Walker, M. Sc, Variability in protein quality used for embryo culture: embryotoxicity of the stabilizer octanoic acid, *Fertility and Sterility*. 100 (2013) 544–549.
 - [36] J. Fredrickson, R. Krisher, D.E. Morbeck, The impact of the protein stabilizer octanoic acid on embryonic development and fetal growth in a murine model, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 32 (2015) 1517–1524.
 - [37] M. Yamada, K. Takanashi, T. Hamatani, A. Hirayama, H. Akutsu, T. Fukunaga, et al., A medium-chain fatty acid as an alternative energy source in mouse preimplantation development, *Scientific Reports*. 2 (2012) 930.

謝辞

本研究を実施するにあたり、直接御指導、御高閲を賜りました北海道大学大学院保健科学研究所病態解析学分野の恵 淑萍教授、同大学健康科学分野の千葉仁志教授に深く御礼申し上げます。また、本研究へと私を導いてくださいました小林清一北海道大学名誉教授・札幌保健医療大学教授に心より感謝いたします。さらに、御指導と御協力をいただいた同大学病態解析学分野の宮永賢博士研究員、同大学健康科学分野の武田晴治准教授、同大学健康科学分野のRojeet Shrestha特任助教に心より感謝申し上げます。最後に、本研究を進めるにあたり多大なる御協力、御配慮をいただきました神谷レディースクリニックの神谷博文院長、森若 治副院長ならびに培養室スタッフの皆様に深謝いたします。