

ヒト giant oocyte のマイクロマニピュレーション
および次世代シーケンス法による
染色体解析に関する研究
(Study on chromosome analyses of human giant oocytes
by micromanipulation and next-generation sequencing)

2021年2月

麻布大学大学院 獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程

DA1702 河野 博臣

目次

| | |
|--|----|
| 要約 | 1 |
| 緒論 | 4 |
| 第 1 章 | 11 |
| マウス MII期卵母細胞における polar body (PB) および metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) のマイクロマニピュレーションおよび次世代シーケンス法を用いた染色体解析 | 11 |
| 1-1. 緒言 | 12 |
| 1-2. 材料および方法 | 13 |
| 1-3. 結果 | 14 |
| 1-4. 考察 | 15 |
| 第 2 章 | 16 |
| ヒト生殖補助医療における GOs の採卵率 | 16 |
| 2-1. 緒言 | 17 |
| 2-2. 材料および方法 | 19 |
| 2-3. 結果 | 20 |
| 2-4. 考察 | 21 |
| 第 3 章 | 22 |
| ヒト GOs の体外成熟培養 | 22 |
| 3-1. 緒言 | 23 |
| 3-2. 材料および方法 | 24 |
| 3-3. 結果 | 25 |
| 3-4. 考察 | 26 |
| 第 4 章 | 27 |
| ヒト GOs の NGS 法による染色体解析 | 27 |
| 4-1. 緒言 | 28 |
| 4-2. 材料および方法 | 29 |
| 4-3. 結果 | 30 |
| 4-4. 考察 | 31 |

| | |
|------------|----|
| 総括..... | 32 |
| 謝辞..... | 36 |
| 引用文献..... | 37 |
| 表および図..... | 43 |

要約

ヒト生殖補助医療(assisted reproductive technology: ART) は、不妊症に対する治療、癌治療後の妊孕性保全などの目的で、医療介在によって生殖活動を補助するものである。ヒト ART では卵巣からの卵採取が重要であるが、ごく稀に採卵時に通常の卵母細胞よりも直径が大きな「giant oocytes: GOs」が採取されることがある。この GOs の多くは2倍体で、受精させても染色体の数的異常胚を形成する。GOs が採卵される確率は0.12 から0.3%であり、卵巣刺激法や患者の体質に依存しないと考えられている。GOs は、通常の卵母細胞と同じ受精能を示す。また、GOs はMII期に達した際、極体 (polar body: PB) 2個および chromosome-spindle complex (CSC) 2個を有するものと、PB1個および CSC1個を有するものが存在する。GOs は受精後のその初期胚の染色体構成に異数性が生じることが報告されているが、その詳細については不明な点が多い。成熟卵母細胞のPBは減数分裂の産物で、染色体構成はCSCと相同であることから、GOsのPBの染色体解析ができれば、対応するGOの細胞質内の染色体も間接的に解析でき、受精およびその後の初期胚発生に有用な情報となりうる。染色体解析法については、染色体標本作製し、特殊な染色を施す従来法でない次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) 法による解析が最近開発され、胚の着床前診断にも適用されている。

本研究はヒト GOs における染色体解析を目的に、GOs の PB および CSC を個々にサンプリングするためのマイクロマニピュレーション法を開発し、ヒト GOs へ適用して採取ゲノムサンプルの NGS 法による染色体解析を試みた。

第1章では、マウス MII 期卵母細胞を用いて polar body (PB) および metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) のマイクロマニピュレーションおよび次世代シーケンス法を用いた染色体解析について検討した。卵母細胞における PB ゲノムおよび CSC ゲノムの正確なサンプリング技術は、本研究に非常に重要である。同一卵母細胞質内に CSC が2つ存在し、かつそれぞれの CSCs の近傍に対応する PBs を有する GO の染色体解析には、マイクロマニピュレーションを用いた PB および CSC のサンプリングが適していると考えられる。本章では、マウス卵母細胞を用いて PB および CSC を採取し、NGS 法による染色体数の解析を試みた。超低温保存マウス未受精卵を購入し、その加温卵の PB および CSC を、倒立顕微鏡下のマイクロマニピュレーションにより採取して、染色体解析に適用しうる状態で採取できるか検討した。すなわち、PB の近傍の透明帯をレーザーにて穿孔し、PB をガラスピペットで吸引採取してサンプルチューブへ移して凍結保存した。続けて CSC を倒立顕微鏡の偏光装置にて確認しながらガラス

ピペットで吸引採取し、凍結保存した。採取した PBs および CSCs を含んだサンプルチューブを株式会社アイジェノミクス・ジャパン（東京）へ送付し、NGS 法による染色体解析を依頼した。結果、マウス成熟卵母細胞 20 個に対し、全ての卵母細胞から PBs および CSCs の採取ができた。NGS 法による染色体解析成功率は、CSCs 由来染色体、PBs 由来染色体それぞれ 100% (5/5)、60% (3/5) であった。本手法で採取したマウス卵母細胞の CSCs および PBs の染色体解析は NGS 法により解析可能であった。

第 2 章では、ヒト生殖補助医療における GOs の採卵率について調査を行った。GOs はヒトを含めた哺乳類に存在することが報告されているが、ヒト ART において採取された GOs について、それらの核の状態や成熟能などの詳細な解析はされていない。そこで、ヒト ART における GOs 採卵成績および核の状態などについて、山下湘南夢クリニックの採卵成績から調べた。本章は山下湘南夢クリニック倫理審査委員会および国立国際医療研究センター倫理委員会にて承認を得て実施した。山下湘南夢クリニックの自然周期または低卵巣刺激周期の採卵成績を対象として GOs 採取率を調べた。得られた卵母細胞は倒立顕微鏡下にて観察し、核の状態（卵母細胞の成熟）および卵母細胞の細胞質の最大直径を測定し、その直径が 140 μm を超えるものを GO と判定した。採取された GOs は、文書同意が得られたものを本章の対象症例とした。結果、採卵を行った 6124 周期（クロミフェン周期：3170、レトロゾール周期：1429、自然周期：1525）において、10392 個の卵母細胞が得られ、GOs の採卵率は 0.29% (30 GOs / 10392 oocytes) であった。卵巣刺激法ごとの GO 採卵率は、クロミフェン周期、レトロゾール周期、自然周期においてそれぞれ 0.30% (20 GOs / 6606 oocytes)、0.29% (7 GOs / 2401 oocytes)、0.21% (3 GOs / 1405 oocytes) であり、卵巣刺激法による差は認められなかった ($P > 0.05$)。得られた GOs は MII 期が 53.3% (16/30)、MI 期が 20.0% (6/30)、GV 期が 26.7% (8/30) であった。

第 3 章では、ヒト GOs の体外成熟培養について検討した。未成熟の状態（GV 期もしくは MI 期）で得られた GOs は体外成熟培養を行い、その体外成熟能について調べた。採卵された MI 期および GV 期 GOs について、採卵後 37.5°C、6%CO₂、5%O₂、89%N₂ の気相でガス平衡させた oocyte maturation-medium (IVM Media KIT, Cooper Surgical, Inc. USA) を用いて 35 mm dish (AGC TECHNO GLASS, Japan) に 20 μL drop を作製し、OVOIL (Vitrolife, Sweden) で覆い、インキュベーター (ES6S, 株式会社アステック, 福岡) 内で冠細胞が付いた状態で 24 時間成熟培養を行った。成熟培養後、GOs は冠細胞を除去後、PBs および CSCs の数を倒立顕微鏡の偏光装置を用いて確認した。成熟培養成績については、2015 年 10 月 1 日から 2017 年 12 月 31 日の期間に山下湘南夢クリニックで実施された採卵において、同条件で成熟培養した通常の卵母細胞と比較した。結果、

MI 期で得られた 6 個の GOs は成熟培養により全てが成熟し、通常卵の成熟率 89.4% (2079/2326) と差は認められなかった ($P>0.05$)。成熟した GOs のうち PB を 2 つ有する GOs が 83.3% (5/6)、そのうち CSC を 2 つ有するものは 80.0% (4/5) であった。GV 期で得られた 8 個の GOs のうち、7 個について成熟培養を行い、71.4% (5/7) が成熟し、通常卵の成熟率 65.1% (829/1274) と差は認められなかった ($P>0.05$)。成熟した 5 個の GOs は全て PB を 2 つ有しており、そのうち CSC を 2 つ有するものは 4 個であった。本検討の結果、未成熟で得られた GOs の成熟率は、通常卵と比較して差が認められないこと ($P>0.05$)、成熟した GOs は 80% 以上の割合で PB を 2 つ有することが示された。

第 4 章では、ヒト GOs の NGS 法による染色体解析について検討を行った。ヒト GOs からマイクロマニピュレーションで PBs および CSCs を採取し、NGS 法による染色体解析を試みた。採卵時に成熟しており PB および CSC を 2 つずつ有する GOs をガラス化保存・加温し、本検討に使用した。偏光顕微鏡にて CSC の位置をそれぞれ確認し、片方の PB 近傍に穿孔し、ガラスピペットで PB を吸引採取し凍結保存した。続けて、採取した PB の近傍に位置する CSC をピペットで吸引採取し、サンプルチューブへ移して凍結保存した。1 組の PB、CSC を採取した後、残りの PB、CSC についても、同様の手順で採取し、凍結保存を行った。2 つの PB、CSC を採取した後、透明帯を完全に除去して cytoplasm をサンプルチューブに移して凍結保存した。サンプルチューブは株式会社アイジェノミクス・ジャパン (東京) へ送付し、NGS 法による染色体解析を依頼した。結果、GOs 4 個の、合計 8 個の PBs について全ての採取に成功 (8/8, 100%) した。また、合計 8 個の CSCs については 7 個の採取に成功 (7/8, 87.5%) した。3 個の GOs の PBs および CSCs を NGS 法により解析した結果、全ての採取サンプルに染色体異数性が確認された。本検討により、PB および CSC をマイクロマニピュレーションにて直接採取し、NGS 法により染色体解析ができることが示された。

以上のことから、本研究で確立したマイクロマニピュレーション (および NGS 法) を適用してヒト GOs の PBs および CSCs の染色体解析ができることが示された。また、CSC と近接する PB の染色体数的異常は相補的であった。従ってヒト GOs については、胚移植に用いる配偶子の対象からは除外するべきであると考えられた。

緒論

1. 生殖補助医療

生殖補助医療(Assisted Reproductive Technology: ART) は、不妊症に対する治療、癌治療後の妊孕性保全などの目的で、医療介在によって生殖活動を補助する「体外受精」、「顕微授精」、「胚移植」および「生殖関連の組織・細胞の超低温保存」などの技術を適切に適用するものである。1978年に Steptoe と Edwards によって世界初の体外受精・胚移植 (IVF-ET) 児、ルイズ・ブラウンさんが誕生して以来 [1]、1980年にはオーストラリアの Lopata ら、続いてアメリカの Jones らにより相次いで IVF ベビーの誕生が報告されている [2]。日本では 1983年に鈴木ら [3] が国内初の IVF-ET 児誕生を報告して以来、ART は難治性と言われてきた多くの不妊症患者へ多大な貢献をしてきた (日本産科婦人科学会, 2016)。日本産科婦人科学会の統計では、2015年に ART で出生した児は 51,001 人であり、同年の出生数は 1,005,677 人であるため、日本における出生の 20 人に 1 人が ART 由来児である [4]。

2. 卵巣刺激

ART では卵巣からの卵子獲得が重要である。単一排卵機序であるヒトでは 1 回の排卵に向けて数十個の卵胞が発育するが、follicles stimulating hormone (FSH) やインヒビンなどの調節により、月経周期の 5~6 日目には 1 個の主席卵胞のみが発育を継続し、残りは閉鎖卵胞となる [5]。ART は体内のホルモン環境によって自然に育つ卵子を利用する自然周期法から始まった。しかしながら、成熟卵胞数が少ないこと、内因性 luteinizing hormone (LH) サージを把握するために数時間おきに採尿・LH 濃度を測定する必要があったこと、移植胚数が少ないことに起因して周期当たりの妊娠率が低率であったことなどから、排卵時期をコントロールでき、良質の卵を多く得られる卵巣刺激法が開発されてきた。調節卵巣刺激法 (controlled ovarian stimulation: COS) には、ゴナドトロピン放出ホルモン (gonadotropin releasing hormone: GnRH) の誘導体である GnRH agonist と FSH、human menopausal gonadotropin (hMG) の併用が行われるショート法 [6]、ロング法 [7]、または GnRH antagonist を併用する方法 [8]がある。COS には、採卵当たりの卵子獲得数が多く採卵スケジュールのコントロールができる利点がある [6]。しかしながら、COS では hMG を筋肉注射する必要性から、患者の連日入院が不可欠である。さらに、副作用として卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome: OHSS) のリスクを含んでおり [9]、良好胚が得られたとしても、卵巣刺激による黄体機能不全、OHSS のリスクのため卵巣刺激を行った周期での胚移植が難しいということが問題となる。

3. 低刺激周期法

自然周期法および COS に伴うデメリットを軽減する方法として、クロミフェン (clomiphene citrate: CC) に少量の hMG を併用するクロミフェン周期をはじめとした低卵巣刺激法 (minimal ovarian stimulation: MOS) がある。月経 3 日目から CC を服用し、主席卵胞の直径が 18~20mm に達し、血中エストラジオールが 250~350 pg/mL であり、かつ内因性 LH サージが起きていない状態で GnRH アンタゴニストの点鼻を行い、卵成熟を促す。GnRH アンタゴニストのフレアアップ効果を用いて卵成熟を促すことができるため、OHSS の引き金となりやすいヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotrophin: hCG) 製剤の使用を避けることができ、採卵周期での胚移植が可能である。CC の服用による懸念される子宮内膜の菲薄化については、hMG の投与により増加した卵胞に由来するエストラジオールがある程度補正するため、極端に子宮内膜が薄くなることは少ない [10]。一方、GnRH アンタゴニストによるダウンレギュレーションを起こさないため、体内の LH サージが引き起こされる可能性がある。このため、採卵の段階で排卵が終了し、卵が回収できない場合がある。自然周期および低刺激周期採卵は、周期を空けることなく採卵することも可能であるが、COS と比較して発育卵胞の数が少ないため、当然ながら採卵周期当たりの獲得される卵の数は少ない。

4. Poor responder と排卵誘発

体外受精において COS を行った場合に反応不良が予測される患者は Poor responder (POR) とされる [11]。欧州ヒト生殖医学会 (European Society of Human Reproduction and Embryology: ESHRE) による POR の診断基準 (Bologna criteria) では、①女性 40 歳以上または他の POR リスク因子、②FSH150 単位以上の調節卵巣刺激で採卵数 3 個以下、③抗ミュラー管ホルモン値 0.5~1.1 ng/mL 未満または月経 3 日目の胞状卵胞数 5~7 未満、のうち 2 つ以上の要件を満たすもの、または②を 2 回以上満たすものが POR と診断されている [12]。治療が難しいとされてきた POR の治療では、40 歳以下の患者を対象とした場合、採卵数こそ少ないものの移植当たりの妊娠率は通常の症例と比較して差がないとされている [13]。加えて、自然周期は胚移植段階まで到達すれば、妊娠率は COS により複数の卵を採取するよりも同等か良い成績となっている。これらの背景から、卵巣の反応性が低くなった高齢患者が多い日本の ART においては、自然周期や CC による排卵誘発周期が治療法として有効であると考えられ、高齢患者の排卵誘発法として高い頻度で選択されている [14]。

5. Giant oocytes

日本における生殖補助医療の適用では自然周期もしくは低刺激周期にて採卵を行うことが多い。その際、「卵巣刺激」等を経た生殖補助医療の適用において通常の卵母細胞よりも直径が 1.4 倍程大きな「giant oocytes (GOs)」が採取されることがある。これまでの報告では、ヒト GOs は 2 倍体 (もしくはそれ以上の倍数体) で、受精させても染色体の数的異常胚を形成する [15-19]。採卵される確率は採卵数の内 0.12~0.3% であり、卵巣刺激法や患者の体質に依存するものではないと考えられている [15, 17, 18, 20]。GOs は採卵時の状態として卵核胞 (germinal vesicle: GV) 期、metaphase I (MI) 期、metaphase II (MII) 期が認められ、成熟過程および受精後の発生過程は通常の卵母細胞と同じ挙動を示す [15]。この GOs は MII 期に達した際、polar body (PB) 2 個と metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) 2 個を有するものと、PB 1 個と CSC 1 個を有するものが報告されている [15, 18]。常染色体数および性染色体数の解析結果から、現在では前者の CSC は 2 つの haploid、後者は 1 つの diploid であると考えられている [18]。GOs は受精させた場合、前者では 3 前核、後者では 2 前核が多く認められる。しかしながら GOs に由来する胚は、たとえ 2 前核形成胚が得られ、胚盤胞に到達したとしても、それは染色体の数的異常を有している [15]。さらに、染色体標本による解析結果では、数的異常のみならず、欠失、重複、acentric fragment のような染色体構造異常も認められている [18]。このように、GOs は染色体構成に異数性が生じることが報告されているが、その詳細については不明な点が多い。このことから、PB や細胞質中の CSC を対象として、GOs の染色体解析をすることができれば、卵形成、受精およびその後の初期胚発生に有用な情報となりうる。

6. Preimplantation genetic screening: PGS

IVF-ET 由来児の遺伝子疾患を防ぐ方法の一つとして、移植候補胚の遺伝情報を移植前に診断する着床前遺伝子診断 (preimplantation genetic diagnosis: PGD) がある。国内における PGD の適用は、「重篤な遺伝性疾患児を出産する可能性のある遺伝子変異ならびに染色体異常を保因する場合、および均衡型染色体構造異常に起因すると考えられる習慣性流産 (反復流産を含む) に限られる」患者であり、日本産科婦人科学会倫理委員会で承認を得られた場合のみ、臨床研究として容認されている [21]。近年、PGD は着床前検査 (preimplantation genetic testing: PGT) と用語を統一され、着床前スクリーニングである染色体異数性検査 (PGT for aneuploidy: PGT-A) と、着床前遺伝子診断である単一遺伝子欠損検査 (PGT for monogenic/single gene defects: PGT-M) および染色体構造異常検査 (PGT for chromosomal structural rearrangements: PGT-SR) に分類されている [22]。これらの染色体解析に使用する細胞は、PB、分割期胚、胚盤胞期胚となるが、分割期

胚の細胞生検は、その処置胚の着床・継続妊娠率を有意に低下させる可能性が指摘されていることから [23]、海外では PGT-A は主に胚盤胞期胚が対象となっている。胚盤胞期胚における PGT-A は、特に 35 歳以上の患者について胚移植当たりの妊娠継続率を改善するとされている [24]。しかし、この手法ではモザイク胚である可能性を考慮し、一度に 5~10 個の栄養外胚葉 (trophectoderm: TE) を採取することが基本手技となっている。

7. 次世代シーケンス法

近年、遺伝子解析関連技術が大きく進展し、中でも 2005 年頃から使用されるようになってきた次世代シーケンス (next-generation sequencing: NGS) 法は、現在 DNA シーケンスの主流の方法となっている [25]。PGT-A では、バイオプシーした数個の細胞から抽出した DNA を解析する必要がある。PGT-A の染色体異数性検査には蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization: FISH) 法や比較ゲノムハイブリダイゼーション (array comparative genomic hybridization: array cGH) 法が使用されてきたが、検査対象胚がモザイクの状態になることも含め、高い異数性検出精度を持つ次世代シーケンス法 [26] の登場により、NGS 法が PGT-A の中心的な解析手法となっている。現在、検出結果の解析に十数万例の検査結果をベースとした人工知能 (Artificial intelligence: AI) を利用する PGT-AiSM (Cooper Surgical, Inc. USA) が開発され、移植可能胚の評価精度がより一層向上することになると考えられる。NGS 法は、細胞から取り出した DNA に由来する短い DNA 断片を大量に増幅し、標準配列にマッピングすることで、どの染色体のどの位置に由来する断片であるのかを調べる。特に、胚由来の少数の細胞に由来する DNA を解析する必要があるため、全ゲノム増幅が不可欠である。次世代シーケンス法では、まずベースとなるデバイスに数百万個のくぼみ (ウェル) がある半導体チップを用いる。そのウェルの一つ一つの中で DNA の伸長が行われるが、伸長時に水素イオンが放出されることから、水素イオン濃度の変化を各ウェルの下部にあるセンサーで電気信号として読み取ることで塩基配列を決定する。各シグナルからベースコールを行い、連続して信号を読み取ることで伸長された DNA 配列を読み取ることができる。読み取る長さは 200 ベースぐらいであるが、これがウェル毎にベースコールされて DNA 配列が決定されることになるため、最終的には数百万ベースのデータ量となる。そして、リファレンスデータへ解読された DNA 配列をマッピングすることで、2 コピーのラインを平均相対値として全染色体に対する異数性を評価する。なお、次世代シーケンス法は平均相対値として染色体の不均衡を検出するものであるため、特定の遺伝子を検出するものではなく、ゲノム情報を得るためのものではない。NGS 法で利用される配列情報は、ヒト全ゲノムの配列の 1.25%

程度であり、遺伝子変異などの解析には不十分である。つまり、NGS 法による染色体解析はヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 [27] に規定される個人の遺伝情報には当たらないとされている。なお、本研究の遂行には院内設置倫理審査委員会および院外機関の臨床研究審査委員会の承認を受け、ヒトゲノム・遺伝子解析研究の倫理指針に準じて実施した。さらに、NGS 法は染色体特異的な配列を検出できることから、解析の対象となる細胞の細胞周期を問わない利点がある。なお、PGT-A 用の解析キットは、イルミナ社を始めとした各メーカーから様々な工夫をされた製品が提供されており、解析するソフトウェアもメーカーおよび検体解析業者毎に特徴が異なる。

8. マイクロマニピュレーション

マイクロマニピュレーションは、核移植や intracytoplasmic sperm injection (ICSI) など、その目的に応じて先端を加工したガラスピペットを利用して、倒立顕微鏡に設置されたマイクロマニピュレーターで細胞などを操作する技術である。ART におけるマニピュレーション技術は、受精の過程において精子の卵透明帯通過を補助する zona drilling、partial zona dissection (PZD) のような透明帯開孔法 [28]、囲卵腔内精子注入法 (sub zonal insemination: SUZI) [29]、精子を卵子細胞質内に注入する ICSI [30] と、主に男性不妊の治療技術として発展を遂げてきた。2016 年度の日本国内における ART 周期数では、ICSI (161,262 周期) が IVF (94,566 周期) を大幅に上回っており [31]、不妊治療においてマイクロマニピュレーションは不可欠の技術となっている。また、受精障害ではない患者の微量の卵細胞質を重度受精障害患者の卵細胞質へ注入することで受精・挙児に成功 [32] するなど、マイクロマニピュレーションは受精現象の解明にも大きな貢献をしている。

先に述べた PGT-A における細胞生検には、透明帯穿孔と細胞採取の手技が必須である。透明帯穿孔の手法には酸性タイロード法、レーザー法、PZD 法がある。酸性タイロード法は、pH2.5 の強酸性液を透明帯に吹き付けて融解・穿孔する手法であるが、透明帯の状態により吹き付ける量の調整が必要であることや、酸性タイロードによる細胞の損傷に気を付ける必要がある。レーザー法は専用の高価な装置が必要であるが、高精度で穿孔位置を調節できる。PZD 法は PIEZO マイクロマニピュレーターやガラス針を使用して透明帯を物理的に穿孔する方法であるが、マニピュレーション操作技術の習得が前提となる。細胞採取法は内径 20~30 μm の生検用ガラスピペットを用い、マイクロマニピュレーション操作により採取する方法が代表的である。PB、割球は細胞を直接ガラスピペットで吸引・採取するが、胚盤胞期胚の TE をターゲットとする場合、レーザー法やフリック法等物理的な手法を併用し、細胞をちぎり取る必要がある。

9. 本研究の目的

山下湘南夢クリニックでは卵巣に対する過剰な負担を避けるために低刺激周期採卵を行っており、患者あたりの平均採卵数は2個である。さらに40歳を超える高齢患者では、排卵誘発剤を用いた過排卵処置を行っても反応性が悪く、自然周期で採卵を行う場合も少なくない。一方、採卵時にGOが得られた患者の半数以上は、当該採卵周期でGOが1個のみしか得られず、その周期の治療がキャンセルされている。生殖医療は患者年齢すなわち時間との戦いであり、GOが治療へ有効利用できるならば、多くの不妊患者に福音をもたらすものと考えられる。GOがCSCを2つ有するものであった場合、それぞれの核型の正常性が検証できれば、CSCを1個摘出することなどで、将来的に治療に利用できる可能性が考えられる。このことを検証するため、はじめにCSCを2つ有するGOにおいて、それぞれの染色体の数的正常性を解析することが必要であると考えられる。単一細胞における染色体解析にNGS法を用いた報告は既にあり、精子のようにごく小さな細胞においても染色体異常の検出に成功している [33]。MII期GOにおける2つのCSCの染色体数を個別に確認することができれば、GOsは体外受精・胚生産の遺伝資源として利用しうるかを検証できる可能性がある。

本研究はヒトGOsにおける染色体数を詳細に検討することを目的に、日本の不妊治療専門クリニックにおけるGOsの採取率、採取GOsの成熟率を調べた。また、未成熟なGOsについては体外成熟培養を試みた。そしてヒトGOsの染色体解析について、各々のPBゲノムおよびCSCゲノムを個々にサンプリングするためのマイクロマニピュレーション法を、マウス卵母細胞を用いて開発した。このマイクロマニピュレーション法をヒトGOsへ適用し、採取ゲノムサンプルの次世代シーケンス法による解析を試みた。

第 1 章

マウス MII期卵母細胞における polar body (PB) および
metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) のマイクロ
マニピュレーションおよび次世代シーケンス法を用いた染
色体解析

1-1. 緒言

染色体数の検査で代表的な手法が染色体標本作製である [34, 35]。染色体標本の作製では、低張液で水分を含ませた細胞をスライドガラス上で破裂させて固定する。全ての染色体が識別可能な状態でスライド上に固定できない可能性があるため、染色体標本の作製は複数の細胞を一度に処理することが有効であり、併せて技術的な熟練が必要である。本研究の対象である GO は、一つの卵母細胞の細胞質の中に **metaphase II CSC** が 2 つ存在する。この特徴から、スライドガラス上で細胞を破裂させた場合、2 つの **metaphase II CSC** に由来する染色体が混ざってしまう可能性が考えられる。このため、GO から得られる染色体解析結果について、2 つのうちどちらの **metaphase II CSC** に由来するのかをトレースする場合、染色体標本作製の手技が結果に影響を及ぼす可能性が高くなると考えられる。一方、**metaphase II CSC** の採取は、マイクロマニピュレーターを用いてガラスピペットで吸引する手法がある。マウス等実験動物の核移植で使用される手法であるが、偏光顕微鏡下で紡錘体を目視で確認しつつガラスピペットで吸引することで **metaphase II CSC** を摘出できる。PB ゲノムおよび **metaphase II CSC** ゲノムの正確なサンプリング技術は、本検討に必要不可欠である。このことから、同一細胞質内に **metaphase II CSC** が 2 つ存在し、かつそれぞれの CSC の近傍にそれぞれ PB を有する GO の解析には、マイクロマニピュレーションを用いたサンプリング手法が適していると考えられる。従って本検討では Zhang らの手法 [36] を参考にし、マウス卵を用いて **metaphase II CSC** および PB を採取し、NGS 法による染色体数の解析を試みた。

1-2. 材料および方法

超低温保存マウス未受精卵 (C57BL/6J; アーク・リソース株式会社) を購入し、その加温卵の PB ゲノムおよび CSC ゲノムを、顕微操作により染色体検査に適用しうる状態で採取できるか検討した。37.0°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂ の気相でガス平衡させた M16 medium (Sigma-Aldrich, Japan) に、cytochalasin B を 5 µg/mL となるように添加した。Cytochalasin B 添加 M16 medium を用いて 35 mm dish (AGC TECHNO GLASS, Japan) に 20 µL drop を作製し、OVOIL (Vitrolife, Sweden) で覆い、マウス MII期卵母細胞をインキュベーター (ES6S, 株式会社アステック, 福岡) 内で 10 分間培養した。Manipulation 用 medium には、Quinn's advantage medium with HEPES (Cooper Surgical, Inc. USA) に Plasma protein fraction (PPF) 10%および cytochalasin B を 5 µg/mL となるように添加したものを使用した [36]。ガラスボトム dish (P50G-0-30-F.I/H, Mat Tek Corporation, USA) に Manipulation 用 medium 10 µL drop を複数作製し、ピペット洗浄用として 10% Polyvinylpyrrolidone (PVP, Kitazato Corporation, Japan) 1 µL drop を複数作製し、Manipulation 用 dish を作製した。Cytochalasin B 添加 M16 medium で 10 分間培養を行ったマウス MII期卵母細胞を manipulation 用 dish に移し、PB の近傍に赤外線ダイオードレーザーで幅 20 µm 程度穿孔した。倒立顕微鏡下 (IX-73, Olympus corporation, Tokyo, Japan) にて PB を内径 20 µm のガラスピペット (PRIME TECH LTD, Ibaraki, Japan) で吸引し、2 µL の phosphate buffered saline (PBS) (-) を入れた polymerase chain reaction (PCR) 用チューブ (Bioplastics, Landgraaf, Netherlands) に移し、-30°Cのフリーザーで凍結保存した。続けて、MII期卵母細胞の CSC を偏光顕微鏡 (IX-73-SLICSI, Olympus corporation Japan) にて確認し、内径 20 µm のガラスピペットで吸引して PCR チューブに移し、PB と同様に凍結保存した。一連の操作の流れについては、Figure 1 に示した。採取したマウス metaphase II CSC および極体は株式会社アイジェノミクス・ジャパンへ送付し、NGS 法による解析を依頼した。なお、この NGS 解析のプロトコルは以下の通りであった。

TESTING METHODOLOGY: The PGT-A test is conducted by using the Ion ReproSeqPPGS KIT (Next Generation Sequencing) for 24 chromosomes aneuploidy screening (Thermo Fisher Scientific, USA). The Kit/assay is performed on the Ion ChefPand Ion S5 System instruments (Thermo Fisher Scientific, Inc, MA, USA). Data analysis is performed with Ion Reporter software, which aligns the reads using the last human genome build (hg19) (Thermo Fisher Scientific, USA) (Report preimplantation genetic testing for aneuploidy, Igenomix Japan K.K.) (株式会社アイジェノミクス・ジャパン Report より引用)

1-3. 結果

ガラス化・加温したマウス MII期卵母細胞を 20 個使用し、内径 20 μm のガラスピペットを用いて、倒立顕微鏡下で PB のサンプリング (Fig. 2)、偏光顕微鏡下で metaphase II CSC のサンプリングを行った (Fig. 3)。透明帯をレーザーで穿孔し、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の cytochalasin B 添加培養液中で顕微操作をすることで、安定したサンプリングが可能であり、マウス MII期卵母細胞 20 個全ての metaphase II CSC および PB の採取ができた。ガラス化・加温したマウス MII期卵母細胞の PB は小さく萎縮したものや、細胞膜が破損して粘性を持つもの (Fig. 4) があり、状態によっては回収に難渋するサンプルが認められた。細胞膜が破損し、粘性のある PB サンプルの回収においては、PVP を用いてガラスピペットの洗浄を行うことで操作を安定させることができた。しかしながら、ゲノムの保存性が疑わしかったことから、本検討において検査対象から除外した。サンプリングを行ったマウス卵 5 個の MII期卵母細胞の CSCs および PBs を株式会社アイジェノミクス・ジャパンに解析を依頼した結果、解析成功率は metaphase II CSC、PB 由来染色体においてそれぞれ 100% (5/5)、60% (3/5) であった (Fig. 5)。PB について、#2 および #3 においてゲノムの増幅が確認されず、染色体の倍数性について検討することができなかった。また、解析を実施した cytoplasm においては、全てのサンプル (5/5, 100%) でゲノム増幅は確認されなかった。

1-4. 考察

本検討の結果、マイクロマニピュレーションにより採取した超低温保存マウス卵母細胞の **metaphase II CSC** および **PB** 由来染色体は、NGS 法による解析が可能であることが示された。全ゲノム増幅の過程で増幅が確認できなかった **PB** 由来ゲノムサンプル (Fig. 5, no.2 および no.3) は、通常よりも萎縮した **PB** に由来するものであったため、細胞膜の損傷の有無についてははっきりと視認することができなかった。従って、サンプリング時に **PB** ゲノムは既に損なわれていたものと考えられた。**PB** 由来ゲノムは、**CSC** 由来ゲノムと比較して保存性が低い可能性があり、ヒト **GO** の解析においては、**PB** の細胞膜がしっかりと保存されているサンプルを選定する必要があると考えられた。本検討に使用した超低温保存マウス **MII**期卵母細胞は融解時に **PB** がシュリンクしているものが散見されたが、臨床において超低温保存ヒト **MII**期卵の加温後に **PB** が破損しているケースはほとんど観察されない。極体生検は、卵に由来する遺伝子や染色体の異常の検出に有効であると報告されており [37]、ヒトとマウスの **PB** の性状が異なることが予想される。理論上、**PB** の染色体数は **CSC** と相補的であるため、特に高齢患者においては、**IVF-ET** において染色体異数性を有する胚の移植を避けることができる点で有用であるとされている [38, 39]。しかしながら、凍結融解操作の過程が **PB** ゲノムの保存性に及ぼす影響について調べた報告は見当たらなかった。このため、マウスの極体生検に限定した場合、萎縮した **PB** からは目的のゲノムが得られない可能性が考えられた。

第2章

ヒト生殖補助医療における GOs の採卵率

2-1. 緒言

GOs (giant ova, giant egg) はヒトを含めた哺乳類や無脊椎動物にも存在することが報告されている [19]。無脊椎動物の giant ova は単核が 2 個、あるいは通常の倍の大きさの核を 1 つ有している。Sea urchin (ウニ) では giant ova が受精した場合、二重奇形 (double monsters) あるいは大きな一つの幼生が生じる。Anuran (カエル) の giant egg は 3 倍体のカエルへ発生することが報告されている [16]。このように giant egg は種々の哺乳類でも報告されているが [19]、成熟・発生についての報告は少ない。排卵した卵母細胞における GOs の割合については、チャイニーズハムスターでは 0.4-0.5%、ラット、マウスでは 0.1%、ウサギでは 0.5% と報告されており、動物種により差がある。GOs の存在が報告され始めた当初、GOs は受精した場合に多前核を形成することは知られていたが、多精子受精によるものであると考えられていた [40]。

GOs が発生する要因については、1 つの卵胞に複数の卵母細胞が含まれる binovular follicles (多卵性卵胞) の存在から以下の推測がなされている。二卵性の結合卵の場合、2 個の卵母細胞の透明帯同士が結合した状態 (卵母細胞の細胞質はそれぞれ独立している)、あるいは 1 つの透明帯の中で 2 個の卵母細胞が融合した状態 (こちらが本研究対象である GOs) のいずれかの状態で存在する。臨床においては、一人の患者で採卵時に複数個の卵母細胞が得られ、その中に GOs が含まれていたとしても、同一周期に得られた他の卵母細胞において遺伝的正常性が確認されている [20]。binovular follicles に関する最初の Review [19] が公表された 2012 年、透明帯が結合した卵母細胞において、透明帯を介して独立したそれぞれの卵細胞質に精子を注入して作成した胚の移植において妊娠例は得られていなかったが、2016 年に初めて妊娠例が報告された [41]。このことから、透明帯同士が結合した卵母細胞の場合、児へ成長するために必要な卵母細胞としての正常性が保存されている可能性があることが明らかとなった。一方、GO 由来胚の妊娠例はこれまでに 1 例も報告されていない。binovular follicles の存在が確認された哺乳類については、ヒト、イヌ、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、ブタ、アカゲザルが報告されている。ヒトでは binovular follicles の 97.1% は二卵性、2.5% は三卵性、0.4% はそれ以上である [42] と報告されている。binovular follicles の形成には、①多核卵が分裂した、②いくつかの卵胞が融合した、③性索で卵原細胞が分裂しなかった、のいずれかである可能性があり [42]、ほぼ②、③であろうと推測されている [43, 44]。GOs の形成については、2 個の卵原細胞が融合したか、前駆細胞の細胞分裂途中で原始卵胞が形成されたかのいずれかであると推測されている [45]。これは GOs の細胞質体積が大きくなることが根拠となっている。自然周期で生じた GOs を含む卵胞は、排卵されずに閉鎖へ向かうと考えられており、Chinese hamster の試験において詳細

に報告されている [16]。Funaki らは、GOs を含む卵胞は通常の卵胞と比べると排卵に至らない傾向があること、外因性の性腺刺激ホルモンの投与が **selective mechanism** に異常を起こす可能性を報告している [16]。実際に、卵巣刺激を行うヒト生殖補助医療にて GOs の報告がなされており、Balakier ら [15]は GOs が得られた患者群では、エストラジオールレベルが有意に高くなることを報告している。一方、Machtinger らはこれを否定しており [20]、卵巣刺激が GOs の採卵率に及ぼす影響については不明な点が多い。

そこで、ヒト生殖補助医療における GOs の採卵率を調査する目的で、山下湘南夢クリニックにおける GOs の採卵成績および核の状態などを調べた。

2-2. 材料および方法

本検討は 2015 年 10 月に開催された山下湘南夢クリニック倫理審査委員会 (Reference number: YSYC-07) および 2020 年 1 月に開催された国立国際医療研究センター倫理委員会 (Reference number: 3370) にて承認を得た後に実施した。解析対象の GOs は山下湘南夢クリニックにおいて自然周期または低卵巣刺激周期にて採卵を行い採取されたものとした。なお、対象症例はすべて同意説明文書により GOs の研究用提供への同意が得られている。自然周期採卵では、主席卵胞径が 15-18mm かつ血漿エストラジオール (E₂) 値が約 250 pg/ml に到達したことを確認し、最終卵子成熟を酢酸ブセレリン点鼻噴霧で誘導し、34 時間後に採卵を行った。低卵巣刺激周期では、酢酸クロミフェン (Clomid®: Fuji Pharma Co., Ltd., Japan) またはアロマターゼ阻害剤 (Letrozole: Nichi-Iko Pharma Co., Ltd., Japan) を月経 3 日目より 5 日間内服し、月経 7-8 日目の血漿 E₂ 値および FSH 値と発育卵胞径とその個数によりリコンビナント卵胞刺激ホルモン (recombinant follicle stimulating hormone: rFSH) 製剤 (Gonalef® 75: Merck Biopharma Co., Ltd., Japan) を追加で皮下注射により投与した。主席卵胞径が 18 mm 以上になった時点で、血漿 E₂ 値、黄体化ホルモン (LH)、黄体ホルモン (P4) を測定し、十分な卵胞発育と LH surge の未発来を確認後、酢酸ブセレリン (BUSERECUR: Fuji Pharma Co., Ltd., Japan) の点鼻噴霧により卵子の最終成熟を誘導し、その 34 時間後に採卵を行った。採卵は、経膈超音波ガイド下、21 ゲージ採卵針 (Kitazato biopharma, Japan) を用いて行った。採卵で得られた卵は、冠状細胞を残した上で卵丘細胞をカットし、倒立顕微鏡下にて観察し、成熟度およびサイズの判定を行った。サイズについては、細胞質の直径が 140 μm を超えるものを GO と判定した [15]。

2-3. 結果

2015年10月から2017年12月までの間に計30個のGOが得られた (Fig. 6)。2015年10月から2017年12月までに採卵を行った6124周期 (クロミフェン周期: 3170、レトロゾール周期: 1429、自然周期: 1525) において、10392個の卵が得られた。GOの採卵率は30/10392 (0.29%) であった。GOが得られた周期の卵巣刺激法はクロミフェン周期、レトロゾール周期、自然周期においてそれぞれ20周期 (20 GOs/6606 oocytes, 0.30%)、7周期 (7 GOs/2401 oocytes, 0.29%)、3周期 (3 GOs/1405 oocytes, 0.21%) であった。1例において、異なる周期 (自然周期およびクロミフェン周期) で2個のGOが得られた。得られたGOの採卵時成熟度はMII期が53.3% (16/30)、MI期が20.0% (6/30)、GV期が26.7% (8/30)であった。

2-4. 考察

ヒト GOs が採卵される確率は採卵数の内 0.12~0.3%であり、卵巣刺激法や患者の体質に依存するものではないと報告されている [15, 17, 18, 20]。山下湘南夢クリニックにおける GOs の採卵率は 0.29%であり、既報との差は認められなかった。また、クロミフェン周期、レトロゾール周期、自然周期における GOs の採卵率はそれぞれ 0.30%、0.29%、0.21%であり、既報と同様に卵巣刺激法による差は認められなかった。1名の患者において自然周期およびクロミフェン周期でそれぞれ1個ずつGOが得られた。また、今回の解析対象範囲には含まれていないが、2018年11月までの期間において合計3名の患者から異なる周期で複数のGOsが得られた。このことから、体質または遺伝背景としてGOsが得られやすい患者が存在する可能性は否定できないと考えられた。しかしながら、現段階の例数では、症例数が少ないこと、患者ごとの卵巣刺激法や採卵回数にばらつきが大きいため、臨床におけるGOsの採卵率の集計を引き続き実施し、検証する必要があると考えられた。

第3章

ヒト GOs の体外成熟培養

3-1. 緒言

第一減数分裂前期で細胞周期を停止している GV 期卵子は、卵胞の発育に伴い減数分裂を再開し、第二減数分裂中期 (metaphase II stage: MII) の状態で受精を待つ。通常の GV 期卵は、その卵細胞質内に 1 個の GV を保有している。しかしながら、これまでに報告されているヒト GV 期 GOs では、全例で同一細胞質内に 2 個の GV が認められている。一方で、MII期へ成熟する過程には 2 つの PB 放出パターンがあることが明らかとなっている。①binucleate の状態が維持されていれば、2 つの haploid の PB を放出し、2 つに分かれた haploid の核を有する卵となる。この場合、受精後は haploid の雌性前核が 2 個、雄性前核が 1 個の 3 前核胚を形成する。②2 つの haploid の核が成熟の過程で結合して diploid となった場合、1 つの diploid の PB が放出され、卵の核も diploid となる。この場合、受精後は diploid の雌性前核が 1 個、雄性前核が 1 個の 2 前核胚となる。従って、前核の数で核型の正常性を判定することはできず、卵自体のサイズを測定することが、triploid の異常胚を除去する上で重要であるとされている [46]。これまでの報告では、MII期における PB 放出パターンが①、②のどちらに偏るか、検討した報告は少ない。また、未成熟の状態で作られた GOs の MII期への成熟率については詳細な報告がなされていない。このことから本章の目的として、GOs の MII期への成熟率、PB 放出パターンおよび未成熟 GOs の体外成熟培養による MII期への成熟率および PB 放出パターンを確認する目的で検討を行った。本検討では、第 2 章で採卵された GOs について解析し、未成熟の状態で作られた GOs については成熟培養を行った後に解析を行った。

3-2. 材料および方法

37.5°C、6%CO₂、5%O₂、89%N₂ の気相でガス平衡させた oocyte maturation-medium (IVM Media KIT, Cooper Surgical, Inc. USA)を用いて 35 mm dish (AGC TECHNO GLASS, Japan) に 20 μL drop を作製し、OVOIL (Vitrolife, Sweden) で覆い、その中で冠状細胞が付いた状態でインキュベーター (ES6S, 株式会社アステック, 福岡) 内で 24 時間成熟培養を行った。MII 期で採卵された GOs および成熟培養を行った GOs は、ヒアルロニダーゼ (Cooper Surgical, Inc. USA) により冠状細胞を除去後、PB および CSC の数を偏光顕微鏡 (IX-73-SLICSI, Olympus Corporation, Japan) を用いて確認したのち、Vitrification kit (VT601, VT602, Cryotop®, Kitazato Corporation, Japan) を用いた vitrification 法 [47] により凍結を行った。成熟培養の成績については、2015 年 10 月 1 日から 2017 年 12 月 31 日の期間に山下湘南夢クリニックで実施された採卵において、MI 期および GV 期で得られ、同条件で成熟培養した通常の卵をコントロール区として比較を行った。

3-3. 結果

MII期で得られたGOsにおいて、PBを2個有するGOsは13個(81.25%)、PBを1個有するGOsは3個(18.75%)であった。PBを2個有するGOsのうち、CSCを2つ有するGOsは12個(92.3%)、CSCを1つ有するGOsは1個(7.7%, #4)であった(Fig. 7, Table 1)。PBを1個有する3個のGOにおいては、CSCが1個のみ確認された(Table 1, #7, #9, #13)。

MI期で得られた6個のGOsは成熟培養を行い、その全て(6/6, 100%)が成熟した(Table 2)。成熟時のGOsの状態については、詳細をTable 3. に示した。採卵時MIで得られた通常卵の成熟率は89.4%(2079/2326)であり、有意差は認められなかった($P=0.8572$)。成熟したGOsのうちPBを2つ有するGOsが5個、そのうちCSCを2つ有するものは4個であった(Table 3, #1, #2, #3, #4, #5)。PBを1個有するGOが1個であり(Table 3, #6)、CSCは偏光顕微鏡下にて確認できなかった。

GV期で得られた8個のGOsのうち、7個について成熟培養を行い、5個(71.4%, 5/7)が成熟した(Table 4)。成熟時のGOsの状態については、詳細をTable 5 に示した。採卵時GV期で得られた通常卵の成熟率は65.1%(829/1274)であり、有意差は認められなかった($P=1.0000$)。2個のGOsについてはGV期のまま成熟をしなかった(Table 5, #1, #5)。1個のGOについては、患者と連絡が取れず、本研究への使用に同意が得られなかったことから成熟培養をせずに廃棄となった(Table 5, #7)。

3-4. 考察

採卵時 MI 期および GV 期であった GOs の MII 期への成熟率については、通常の卵成熟培養における MII 期への成熟率と差は認められなかった ($P > 0.05$)。従って、細胞質体積が PB の放出へ及ぼす影響は低い可能性が考えられた。本検討において、採卵時 MI 期で得られた 1 個の GO において、PB 放出後の卵細胞質内に CSC が確認されなかった (Table 3, #6)。CSC は細胞質との光の屈折率の違いから、偏光顕微鏡で可視化することが可能である。通常の採卵で得られた MII 期卵の、偏光顕微鏡による CSC 可視化率は 76.9% (130/169) であり、さらに CSC が認められない卵においては、前核形成が確認されることもあるが、胚盤胞まで到達した胚は認められなかったと報告されている [48]。その他の GOs については偏光顕微鏡下で CSC が明瞭に確認されているため、CSC が観察されなかった GO については、GOs 特有の細胞質体積などの理由ではなく、CSC 形成の異常など、当該 GO 固有の要因によるものであると考えられた。

第4章

ヒト GOs の NGS 法による染色体解析

4-1. 緒言

受精前の MII 期ヒト GOs (MII で得られたもの、GV、MI を成熟させて MII にしたもの) の染色体標本による解析結果では、確認された PB の数によって以下の報告がなされている [18]。まず、PB が 2 個認められた GOs の核型については、23, X/23, X, acentric fragment (ace)., 23, X/22, X, -G 等、倍数性以外にも染色体の本数異常が確認されている。次に PB が 1 個認められた GOs の核型は、44, XX, 2ace., 47, XX, +G chromatid (cht) 等、こちらも倍数性以外にも染色体本数の異常が認められている。さらに、受精後 PB2 個、前核 2 個が認められた GO 由来胚の解析では 69, XXX., 23, X/46, XX., 23, X/23, X, chromosome break (chrb) と雌性核の倍数性、雄性核の正常性が検出できた例、倍数性以外にも染色体本数に異常が認められた例が確認されている。MI 期 GOs については、チャイニーズハムスターを用いた以下の報告がなされている [16]。チャイニーズハムスターの MI 期 GOs においては、染色体標本作製の結果、22 bivalents (tetrads) が認められ、正常な chiasma 形成が確認されている。このことから MI 期 GOs では CSC が一つのみが形成され、その中に 2 倍量の染色体が収まっていたのだらうと推測されている。しかしながら、GOs 染色体の数的異常に関するこれまでの報告は主に受精後の胚を解析対象としたものであり、GOs そのものを解析した報告は少ない。また、GOs を解析した報告も染色体標本を手法として用いていることから、2 つの CSCs が 1 つの細胞質内に存在する GOs の解析精度が低くなる可能性が考えられる。GOs が保有する 2 つの metaphase II CSC の内、一つでも正常な染色体数がそろっているのであれば、異常な CSC を取り除くなど処置を施すことで倍数性を正常に保つことができ、生殖補助医療の配偶子として利用できると考えられる。このため、2 つの CSCs それぞれの詳細な染色体解析を行うことは、GOs のレスキューを考える上で十分な価値があると考えられる。

これらのことから、本章では実際に臨床で得られ、患者の善意により提供されたヒト GOs において、染色体の数的異常を確認することを目的とし、2 つの CSCs および対応する 2 つの PB をサンプリングし、NGS 法による染色体解析を試みた。

4-2. 材料および方法

37.5°C、6%CO₂、5%O₂、89%N₂の気相でガス平衡させた Quinn's AdvantageTM Protein Plus Cleavage Medium (Cooper Surgical, Inc. USA) に cytochalasin B を 5 µg/mL となるように添加し、35 mm dish に 20 µl drop を必要数作成した。GO を dish に移し、インキュベーター (ES6S, 株式会社アステック, 福岡) 内で 10 分間培養した後にサンプリングを行った。Manipulation 用 medium として、Quinn's advantage medium with HEPES (Cooper Surgical, Inc. USA) に PPF 10% および cytochalasin B を 5 µg/mL となるように添加したものを使用した [36]。ガラスボトム dish に 10 µL drop を複数作成し、ピペット洗浄用として 10% Polyvinylpyrrolidone (PVP, Kitazato Corporation, Japan) で 1 µL drop を数個作成し、manipulation 用 dish を作製した。PB を 2 つ有する GOs を manipulation dish に移し、偏光顕微鏡にて CSC の位置をそれぞれ確認し、PB の近傍に赤外線ダイオードレーザーで幅 20 µm 程度穿孔した。PB を内径 20 µm のガラスピペット (PIN20-20FT, PRIME TECH LTD., Japan) で吸引し、2 µL の PBS (-) を入れた PCR チューブ (K77301, BIOplastics, Netherlands) に移し、-30°C のフリーザーで凍結保存した。続けて、PB に対応する、つまりそれぞれの PB の近傍に位置する metaphase II CSC をピペットで吸引し、PCR チューブに移し、PB と同様の手順で凍結保存した。1 組の PB、CSC を採取した後、残りの PB、CSC についても、同様の手順で採取を行った。2 つの PBs、CSCs を採取した後、透明帯にレーザーを照射することで、GOs の透明帯を完全に除去し、cytoplasm を得た。得られた cytoplasm は PBS (-) で洗浄し、PCR チューブへ移して凍結保存した。PBs、CSCs および cytoplasm の採取手順は Fig. 8 に示した。採取した PBs、CSCs および cytoplasm を株式会社アイジェノミクス・ジャパンへ送付し、NGS 法による解析を依頼した。

4-3. 結果

4-3-1. マイクロマニピュレーションによる GOs からの PBs および CSCs 採取成功率

採卵時に PB2 個、metaphase II CSC を 2 個有した状態で得られた GOs 4 個からマイクロマニピュレーションにより PBs および metaphase II CSCs 由来ゲノムのサンプリングを試みた (Fig. 9)。GOs 4 個の、合計 8 個の PBs について全ての採取に成功 (8/8, 100%) した。また、合計 8 個の metaphase II CSCs については 7 個の採取に成功 (7/8, 87.5%) した。サンプリング不成功に至った 1 個の metaphase II CSC については、採取時に細胞膜が壊れ、回収が不可能であった。

4-3-2. GOs から採取した PBs および metaphase II CSCs の NGS 法による染色体解析結果

2 つの PB、2 つの metaphase II CSCs および cytoplasm の全てのサンプリングに成功した 3 個の GOs (#3, #16, #11: 同意取得順) の PBs および metaphase II CSCs 由来ゲノムを NGS 法により解析した結果、ほぼ全てに染色体異数性が確認された (Fig 8-10)。結果の詳細は Table 6 に示した。#16 GO では、PB 1 で 5 番染色体の trisomy と CSC 1 の 5 番染色体 monosomy が認められた。また、PB 2 では 7 番染色体、14 番染色体の trisomy および 20 番染色体の monosomy が認められ、CSC 2 では 7 番染色体と 14 番染色体の monosomy および 20 番染色体の trisomy が認められた。#11 GO では PB 1 で 15 番染色体の monosomy、17 番染色体の trisomy が認められ、CSC 1 では 15 番染色体の trisomy および 1 番染色体の monosomy が認められた。また、PB 2 では 16 番染色体、19 番染色体の trisomy および 17 番染色体の monosomy が認められ、CSC 2 では 16 番染色体と 19 番染色体の monosomy および 17 番染色体の trisomy が認められた。#16 GO および #11 GO においては、採取した metaphase II CSCs ゲノムとその近傍の PBs ゲノムにおいて、異数性を呈する染色体番号に相補性が認められた。

一方、#3 GO において、PB 1 では 22 番染色体 q 腕のみに trisomy が認められ、PB 2 における 22 番染色体の monosomy が認められた。併せて、CSC 1 では 3 番染色体、5 番染色体、19 番染色体 p 腕のみに monosomy が認められ、CSC 2 では 3 番染色体の trisomy が認められた。各 GOs における cytoplasm からは DNA は検出されなかった。サンプリングにおいては、マウス卵子と比較して、ヒト GOs の PBs は細胞膜の伸展性が豊かであり、ピペットで吸引しても破損しなかった。

4-4 考察

本検討では、2個のPBs および metaphase II CSCs を有する3個のGOsにおいて、PBs および metaphase II CSCs をマイクロマニピュレーションにて直接採取し、NGS法による解析を試みた。解析に用いた3個のGOsにおけるcytoplasmからはDNAが検出されなかったため、PBゲノムおよびmetaphase II CSCゲノムは本法で高い精度で採取できることが確認された。採取したCSCおよびPBのNGS法による解析結果から、GOは染色体異数性を高頻度で有することが確認された。#16 GO および #11 GO においては、染色体の異数性は完全に相補的であったことから、染色体の不分離は第一減数分裂時に生じた可能性が高いと考えられた。#3 GO では、PB間およびCSC間に一部相補的な染色体があるように考えられるが、異数性が認められる常染色体番号にばらつきが認められた原因はわからなかった。極体生検で卵の染色体異常を検査し、出産に至った例が報告されており [49]、成熟して間もない時期であればヒトMII期卵のPBにおける染色体の保存性は比較的安定していると考えられる。しかしながら、PBは急速にフラグメンテーション化することもあり、生検時期が成熟から時間を経た場合、誤診に繋がるリスクも危惧されている [50]。#。#3 GO のサンプリング時において、CSC1に対応するPB1が既に退行等の理由で消失しており [51]、CSC2に対応したPB2が分割したため、GOの採卵時の観察ではPBが2つあるように観察されたのかもしれないが、原因についてはつきとめることができなかった。

IVF-ETにおけるヒト胚盤胞のPGT-Aでは、異常細胞がモザイクとして含まれる可能性を考慮し、5~10細胞を一度に採取、解析する方法が推奨されている [24]。本検討のNGS法による解析は、1つのGOに存在する2セットのPBおよびmetaphase II CSCに含まれる染色体を各々比較することが目的であった。このため、単一の細胞核に由来する染色体の全ゲノム増幅過程が成功するかが課題の一つであった。株式会社アイジェノミクス・ジャパンに解析を依頼したが、リード数、MAPD (median of the Absolute values of all Pairwise Differences) スコアが0.45よりも小さい値であったこと [52]、性染色体検出成功の点から、解析に必要なゲノム量が確保され、解析精度は十分であったことを株式会社アイジェノミクス・ジャパンの松岡俊樹氏 (Scientific Advisor Japan) より確認した。

総括

哺乳類の配偶子の染色体構成を把握することは、その後続く受精や発生を理解するうえで大変重要である。哺乳類の卵母細胞には、まれにその直径が大きい「giant oocytes: GOs」が認められる。これまでにその染色体構成に異数性が報告されているがその詳細については明らかになっていない。

そこで、ヒト生殖補助医療における GOs の採卵率とその成熟度について調べた。未成熟な状態で得られた GOs については体外での成熟培養を試みた。また、採取した GOs についてはガラス化保存を試み、染色体解析まで超低温保存した。GOs の polar body (PB) および細胞質内の metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) をマイクロマニピュレーションによってサンプリングする方法を、マウス卵を用いて開発し、その開発後にヒト GOs の細胞質内の CSCs を開発したマイクロマニピュレーションにてサンプリングし、NGS 法によって解析した。

GOs は染色体異数性を有する異常卵子であり [15-19]、受精させても染色体の数的異常胚を形成することから、採卵時に得られた場合は治療に用いることなく廃棄されている。異常卵子であるため治療から除外される GOs だが、特に採卵数の少ない自然周期、低刺激周期採卵を行うクリニックにおいて、異常卵子のみの獲得で当該周期の治療がキャンセルとなることは患者にとって時間的、経済的に悲劇となる。このため、本研究では GOs のレスキューの可能性を探るための検討を行った。

第 1 章では、GOs の PB および CSC 由来ゲノムを高精度で解析する技術の開発を目的として、超低温保存マウス未受精卵を使用した検討を行った。単一細胞かつ複数の metaphase II CSCs が含まれるヒト GOs の染色体解析において、CSC の正確なサンプリングおよび解析が課題であった。本検討により、加温後の超低温保存マウス未受精卵から、metaphase II CSC を偏光顕微鏡下で視認しながらマイクロマニピュレーションを行うことで、高い精度でサンプル採取に成功し、NGS 法による解析も十分可能であった。一方、マウス未受精卵の PB については、PVP によりピペットを洗浄した上で使用することにより安定したサンプリングは可能であったが、ゲノム増幅が認められないサンプルが複数確認された。マウス未受精卵の PB は大きさにばらつきがあり、萎縮しているものも多く認められた。凍結融解の過程による影響であるのか、採卵時から差が存在するのかは明らかではないが、ゲノム増幅が認められなかったサンプルは、ゲノムがサンプリング時に既に損なわれていたと考えられた。このことから、ヒト GOs の解析においては、PB の細胞膜がしっかりと保存されているサンプルを選定する必要があると考えられた。

第2章では、生殖補助医療におけるGOsの採卵率について山下湘南夢クリニックの採卵成績を元に調査し、卵巣刺激法によりGOsの採卵率に差が認められないことを確認した。しかしながら、既報では患者の体質や遺伝背景による差が認められないと報告 [15, 17, 18, 20] されている事について、山下湘南夢クリニックの採卵では2015年10月から2018年11月までの期間において、3名の患者において異なる周期でGOsが得られた。現段階の例数では、症例数が少ないこと、患者ごとの卵巣刺激法や採卵回数にばらつきが大きいため、臨床におけるGOsの採卵率の集計を引き続き実施し、検証する必要があると考えられた。

第3章では、これまで詳細な報告がなされていなかった未成熟GOsの成熟率およびPBの放出パターンの調査を行った。採卵時GV期およびmetaphase I期であったGOsのmetaphase II期への成熟率については通常の未成熟卵の成熟培養後の成熟率と差は認められないことが確認された。

第4章では、第1章で検討したマイクロマニピュレーションを用いた手法により、臨床で得られたGOsのPBsおよびmetaphase II CSCsゲノムの採取を行った。マイクロマニピュレーションを用いることにより、3個のGOs全てのPBsおよびCSCsゲノムの採取に成功した。NGS法による解析の結果、全てのPBsおよびCSCsゲノムから、染色体の数的異常が確認された。染色体No.毎の数的異常の頻度については、本検討では傾向を十分に検討することは出来なかった。しかしながら、CSCsとその対応するPBsの染色体数的異常がほぼ相補的であったことから、第一減数分裂時に染色体の不分離が高確率で起こっている可能性が示唆された。

GOsはGV期においてGVを2個保有し、GVBD後成熟の過程でCSCを1つあるいは2つ有するmetaphase II期卵へと成熟する。この成熟の過程で染色体の数的異常が発生しやすい時期が存在すると考えられる。マウスにおいて、通常の2倍の細胞質体積を持つArtificial Giant (AG) oocytesにICSIし、胚移植後に正常個体を得られている [53]。Wakayamaら [53] はAG作成の際に2個の通常のmetaphase II期卵母細胞を用意し、片方を除核してから融合をさせている。このため、使用したマウス卵母細胞のCSCは、成熟を終えて安定した状態で受精を迎え、この点が正常個体獲得につながったと考えられる。しかしながら、胚移植後の正常個体獲得率は非常に低いことが報告されており (4-15% vs 78%)、2倍量の細胞質体積は受精後の卵割へ悪影響を与える可能性が示唆されている。卵子の細胞質体積が減数分裂時の染色体分配に与える影響については北島らにより報告されている [54]。人為的に細胞質体積を調節したマウス卵母細胞では、

細胞質体積が大きくなるほど、減数分裂時に染色体が2つに分離するタイミングが早くなるとされている [54]。このことから、本検討で確認された GOs の染色体数的異常は、通常の倍の体積を有する特性が減数分裂時の染色体分配に影響を与えている可能性が考えられた。

自然発生にて得られた GOs は **germinal vesicle break down (GVBD)** から一つの細胞質内に 2 組 (あるいはそれ以上) の染色体セットが存在する状態で減数分裂を経る。本検討の結果から、染色体の数的異常は第一減数分裂時に生じていることが示唆され、少なくとも GVBD 前にレスキューを実施しなければならないと考えられる。つまり、成熟した状態で得られた GOs は PBs および CSCs の中に高確率で染色体の数的異常を有している可能性が高く、治療に用いることができないことが強く示唆された。今後 GV 核の染色体量を明らかにする必要があるが、GOs の生殖補助医療への応用を考えた場合、GV 期でのレスキューを視野に入れた検討が必要である。例えば、GV 期 GOs のレシピエント卵への GV 期核移植が考えられる [55]。現在、ヒトにおける GV 期核移植は世界的に禁止されており、承認されているのは英国のミトコンドリア病に関する限定的実施の場合のみである。核移植の不妊治療への応用は、今後も慎重な検討および議論が重ねられる必要はあるが、GOs のレスキューでは必須の技術となる可能性がある。

今後、特に自然周期および低刺激周期採卵の必要な高齢患者の生殖補助医療において、GOs が遺伝子源として治療に応用できる可能性が立証できれば、その意義は大きいと考えられる。本検討において GV 期 GOs の染色体解析が実施できていないため、GOs の GV 核が正常な染色体を有しているかを今後検討していく必要がある。

本論文の一部は以下に公表した。

Kawano H, Yamashita N, Ito J, Kashiwazaki N.

Chromosomal analyses of human giant diploid oocytes by next-generation sequencing.

Reproductive Medicine and Biology 2021; 00:1-7

<https://doi.org/10.1002/rmb2.12378>

謝辞

本論文を作成するにあたり、ご指導ご鞭撻を賜り、終始懇切丁寧なご助言をくださいました麻布大学獣医学研究科の柏崎直巳教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究に関しまして終始ご指導ご鞭撻を頂きました伊藤潤哉教授に心より感謝致します。本学位論文をまとめるにあたり、ご指導、院内データ使用の許可および多大な支援を賜りました山下湘南夢クリニック院長山下直樹先生に心より感謝致します。本検討に使用する GOs の収集に多大なご協力をいただきました、山下湘南夢クリニック培養室の皆様およびスタッフの皆様に深く感謝致します。最後に、本論文の NGS 解析に関して終始ご助言をくださいました、株式会社アイジェノミクス・ジャパンの松岡俊樹氏に深甚なる謝意を表します。

引用文献

- [1] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978 August 12;2(8085):366-6736(78)92957.
- [2] Cohen J, Trounson A, Dawson K, Jones H, Hazekamp J, Nygren KG, et al. The early days of IVF outside the UK. *Hum Reprod Update* 2005 October 01;11(5):439-459.
- [3] 鈴木雅洲 体外受精 成功までのドキュメント 共立出版 1983
- [4] 早川 昌弘 生殖補助医療にて出生した児の予後 日本 IVF 学会 2018
- [5] 月経周期と女性ホルモンのメカニズム 産婦人科ゼミナール 日本産婦人科医会 2019
- [6] Frydman R, Forman RG, Belaisch-Allart J, Hazout A, Rainhorn JD, Fries N, et al. Improvements in ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Ann N Y Acad Sci* 1988;541:30-36.
- [7] Wildt L, Diedrich K, van der Ven H, al Hasani S, Hubner H, Klasen R. Ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization controlled by GnRH agonist administered in combination with human menopausal gonadotrophins. *Hum Reprod* 1986 January 01;1(1):15-19.
- [8] Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, al-Hasani S, Reissmann T, et al. Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 1994 May 01;9(5):788-791.
- [9] Smits J, Camus M, Devroey P, Erard P, Wisanto A, Van Steirteghem AC. Incidence of severe ovarian hyperstimulation syndrome after GnRH agonist/HMG superovulation for in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1990 November 01;5(8):933-937.
- [10] 竹原祐志, 加藤修 低刺激採卵誘発法 産科と婦人科 2012 79 891-896
- [11] 林伸旨 Poor Responder (POR) 日本産科婦人科学会雑誌 2012 64 巻 9 号

[12] Ferraretti AP, La Marca A, Fauser BC, Tarlatzis B, Nargund G, Gianaroli L, et al. ESHRE consensus on the definition of 'poor response' to ovarian stimulation for in vitro fertilization: the Bologna criteria. *Hum Reprod* 2011 July 01;26(7):1616-1624.

[13] Biljan MM, Buckett WM, Dean N, Phillips SJ, Tan SL. The outcome of IVF-embryo transfer treatment in patients who develop three follicles or less. *Hum Reprod* 2000 October 01;15(10):2140-2144.

[14] 竹田恵子 卵巣刺激法の変遷と生殖医療の個別化：「自然周期」の見直しが意味するもの 大阪大学大学院人間科学研究科紀要 2016 42 81-102

[15] Balakier H, Bouman D, Sojecki A, Librach C, Squire JA. Morphological and cytogenetic analysis of human giant oocytes and giant embryos. *Hum Reprod* 2002 September;17(9):2394-2401.

[16] Funaki K, Mikamo K. Giant diploid oocytes as a cause of digynic triploidy in mammals. *Cytogenet Cell Genet* 1980;28(3):158-168.

[17] Lehner A, Kaszas Z, Murber A, Rigo J, Urbancsek J, Fancsovits P. Giant oocytes in human in vitro fertilization treatments. *Arch Gynecol Obstet* 2015;292(3):697-703.

[18] Rosenbusch B, Schneider M, Gläser B, Brucker C. Cytogenetic analysis of giant oocytes and zygotes to assess their relevance for the development of digynic triploidy. *Hum Reprod* 2002 September;17(9):2388-2393.

[19] Rosenbusch B. The potential significance of binovular follicles and binucleate giant oocytes for the development of genetic abnormalities. *Journal of Genetics* 2012;91(3):397-404.

[20] Machtinger R, Politch JA, Hornstein MD, Ginsburg ES, Racowsky C. A giant oocyte in a cohort of retrieved oocytes: does it have any effect on the in vitro fertilization cycle outcome? *Fertil Steril* 2011;95(2):573-576.

[21] 日本産科婦人科学会 「着床前診断」に関する見解 2019

[22] Zegers-Hochschild F, Adamson GD, Dyer S, Racowsky C, de Mouzon J, Sokol R, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Hum Reprod* 2017 September 01;32(9):1786-1801.

[23] Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril* 2013 September 01;100(3):624-630.

[24] Munne S. Status of preimplantation genetic testing and embryo selection. *Reprod Biomed Online* 2018 October 01;37(4):393-396.

[25] 大場利治 次世代を超えた DNA シーケンス技術 生物学 2017 第 95 卷 第 9 号

[26] Fiorentino F, Biricik A, Bono S, Spizzichino L, Cotroneo E, Cottone G, et al. Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil Steril* 2014 May 01;101(5):1375-1382.

[27] ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日、文部科学省、厚生労働省、経済産業省）

[28] Cohen J, Malter H, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, et al. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988 July 16;2(8603):162-6736(88)90710.

[29] Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, et al. Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* 1988 October 01;2(8614):790-6736(88)92433.

[30] Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992 July 04;340(8810):17-18.

[31] 平成 29 年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告（2016 年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および 2018 年 7 月における登録施設名） 日本産科婦人科学会雑誌 2018 第 70 卷 9 号

- [32] Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* 1997 July 19;350(9072):186-187.
- [33] Tran QT, Jatsenko T, Poolamets O, Tsuiko O, Lubenets D, Reimand T, et al. Chromosomal scan of single sperm cells by combining fluorescence-activated cell sorting and next-generation sequencing. *J Assist Reprod Genet* 2019 January 01;36(1):91-97.
- [34] Yoshizawa M, Nakamoto S, Tsunoda Y, Muramatsu T. A short-term hypotonic treatment for chromosome preparation of intact and zona-penetrated mouse embryos. *Theriogenology* 1990 April 01;33(4):789-797.
- [35] Araki Y, Yoshizawa M, Araki Y. A novel method for chromosome analysis of human sperm using enucleated mouse oocytes. *Hum Reprod* 2005 May 01;20(5):1244-1247.
- [36] Zhang SP, Lu CF, Gong F, Xie PY, Hu L, Zhang SJ, et al. Polar body transfer restores the developmental potential of oocytes to blastocyst stage in a case of repeated embryo fragmentation. *J Assist Reprod Genet* 2017 May 01;34(5):563-571.
- [37] Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation polar body diagnosis. *Biochem Mol Med* 1996 June 01;58(1):13-17.
- [38] Verlinsky Y, Cieslak J, Freidine M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod* 1995 July 01;10(7):1923-1927.
- [39] Munne S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 1995 April 01;10(4):1014-1020.
- [40] AUSTIN CR, BRADEN AW. Anomalies in rat, mouse, and rabbit eggs. *Aust J Biol Sci* 1954 November 01;7(4):537-542.
- [41] Cummins L, Koch J, Kilani S. Live birth resulting from a conjoined oocyte confirmed as euploid using array CGH: a case report. *Reprod Biomed Online* 2016 January 01;32(1):62-65.

- [42] Gougeon A. Frequent occurrence of multiovular follicles and multinuclear oocytes in the adult human ovary. *Fertil Steril* 1981 April 01;35(4):417-422.
- [43] Reynaud K, Halter S, Tahir Z, Thoumire S, Chebrou M, Chastant-Maillard S. Polyovular follicles. *Gynecol Obstet Fertil* 2010 June 01;38(6):395-397.
- [44] Vicdan K, Isik AZ, Dagli HG, Kaba A, Kisnisci H. Fertilization and development of a blastocyst-stage embryo after selective intracytoplasmic sperm injection of a mature oocyte from a binovular zona pellucida: a case report. *J Assist Reprod Genet* 1999 August 01;16(7):355-357.
- [45] AUSTIN CR. Anomalies of fertilization leading to triploidy. *J Cell Comp Physiol* 1960 November;56(Suppl 1):1-15.
- [46] Rosenbusch BE. Mechanisms giving rise to triploid zygotes during assisted reproduction. *Fertil Steril* 2008 July 01;90(1):49-55.
- [47] Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 2007 January 01;67(1):73-80.
- [48] 内山一男, 菊池理仁, 家田祥子, 山下直樹, 竹原祐志, 貝嶋弘恒, 加藤修 LC-Polscope による卵子紡錘体観察の有用性 *J. Mamm.Ova. Res.* 2008 25 105-110
- [49] Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, Ndukwe G, Kelada E, et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril* 2010 February 01;93(3):1006.e7-1006.e10.
- [50] Griffin DK, Ogur C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it? *Reproduction* 2018 July 01;156(1):F29-F50.
- [51] 実験医学増刊 Vol. 30 No.2 特集 「in vivo 実験医学によるヒト疾患解明の最前線」
- [52] Ning L, Li Z, Wang G, Hu W, Hou Q, Tong Y, et al. Quantitative assessment of single-cell whole genome amplification methods for detecting copy number variation using hippocampal neurons. *Sci Rep* 2015 June 19;5:11415.
- [53] Sayaka W, Satoshi K, Van Thuan N, Hiroshi O, Takafusa H, Eiji M, et al. Effect of volume of oocyte cytoplasm on embryo development after parthenogenetic activation,

intracytoplasmic sperm injection, or somatic cell nuclear transfer. *Zygote* 2008 August 01;16(3):211-222.

[54] Kyogoku H, Kitajima TS. Large Cytoplasm Is Linked to the Error-Prone Nature of Oocytes. *Dev Cell*. 2017 May 8;41(3):287-298.

[55] Li GP, Lian L, Wang MK, Lian Y, Chen DY. Maturation of the reconstructed oocytes by germinal vesicle transfer in rabbits and mice. *Theriogenology* 2001 September 15;56(5):855-866.

表および図

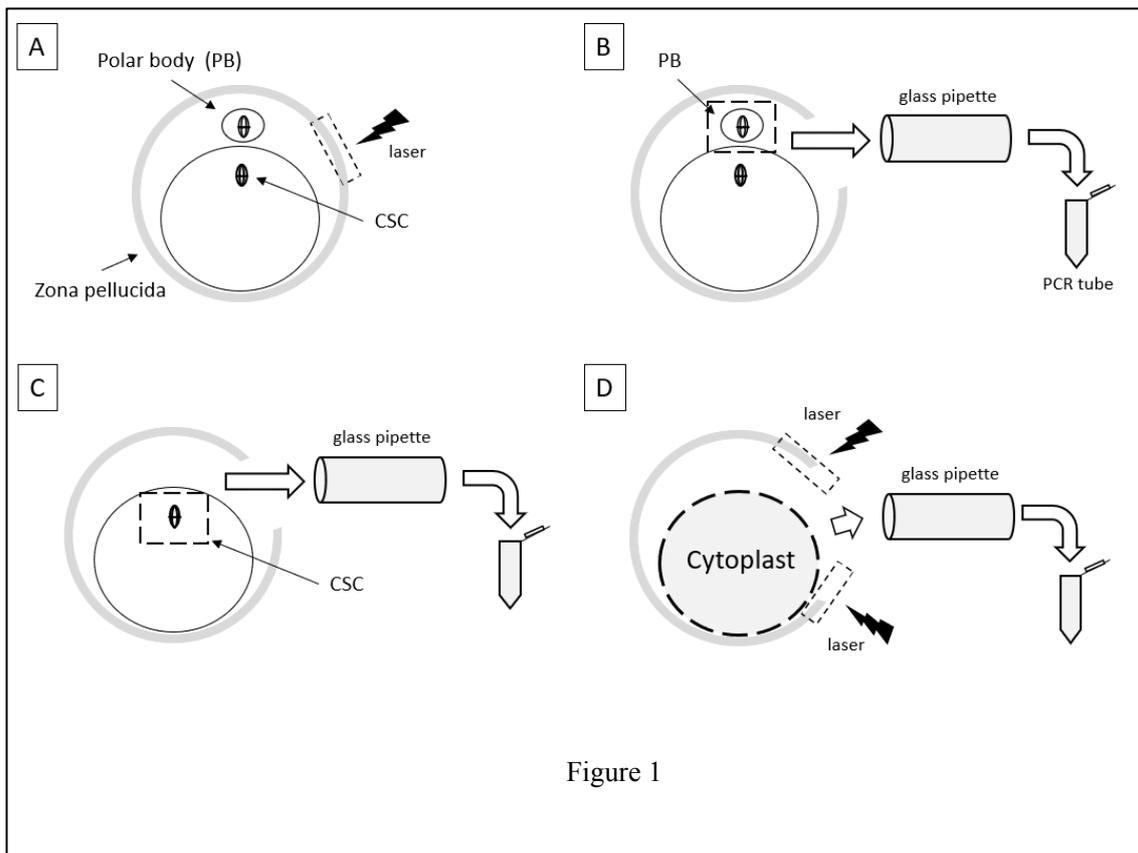


Figure 1

Figure 1. Micro-manipulation procedure for sampling the polar body and the chromosome-spindle complex (CSC) from a mature oocyte in the mouse

- A) Laser perforation of the zone pellucida
- B) Tubing the polar body
- C) Tubing the CSC
- D) Tubing the cytoplasm

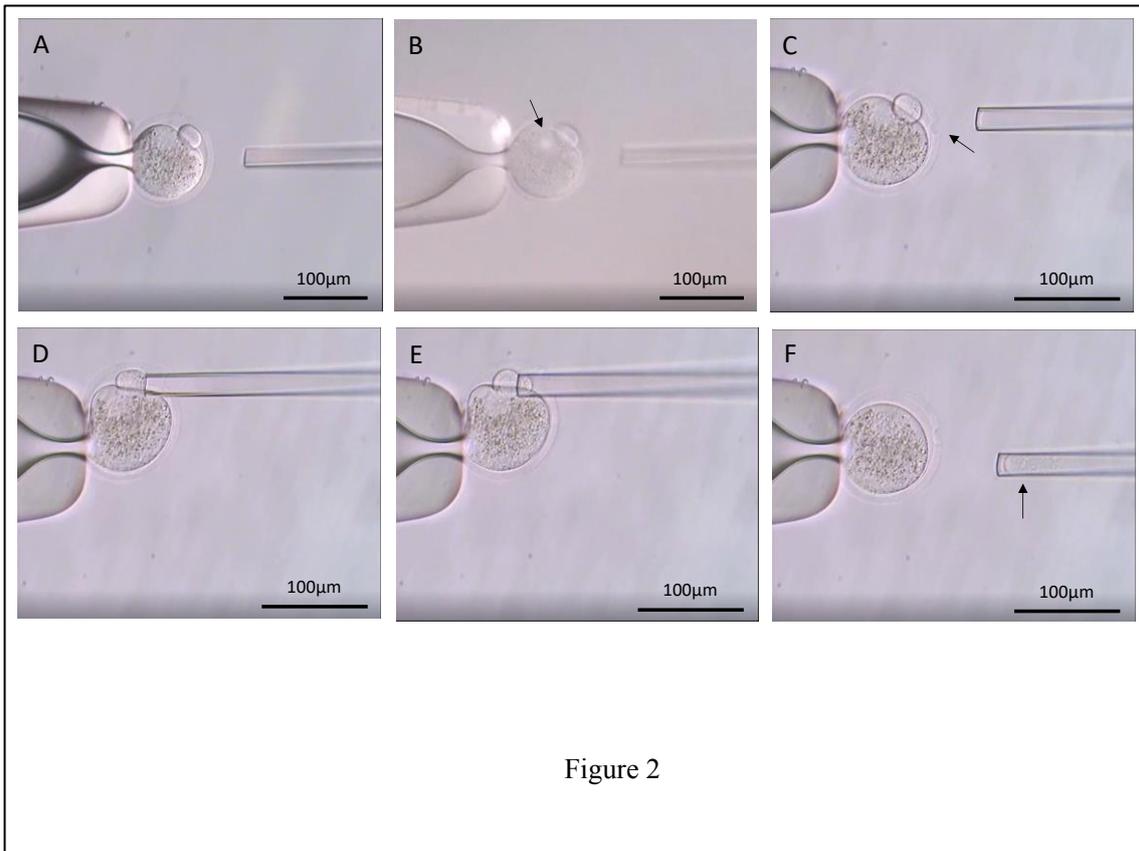


Figure 2

Figure 2. Micro-manipulation procedure for sampling the polar body from the mature oocyte in the mouse

- A) The mouse metaphase II (MII) oocyte retained with a holding pipette at the time of sampling.
- B) Confirmation of the mouse metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) with polarized field. The CSC (arrow) is visible near the polar body, so check its position before sampling the polar body.
- C) Laser perforate the zona pellucida of the mouse MII oocyte (arrow).
- D-E) The polar body sampling (bright field). Place the pipette on the side of the polar body and slowly aspirate.
- F) The polar body collected in the pipette can be confirmed (arrow).

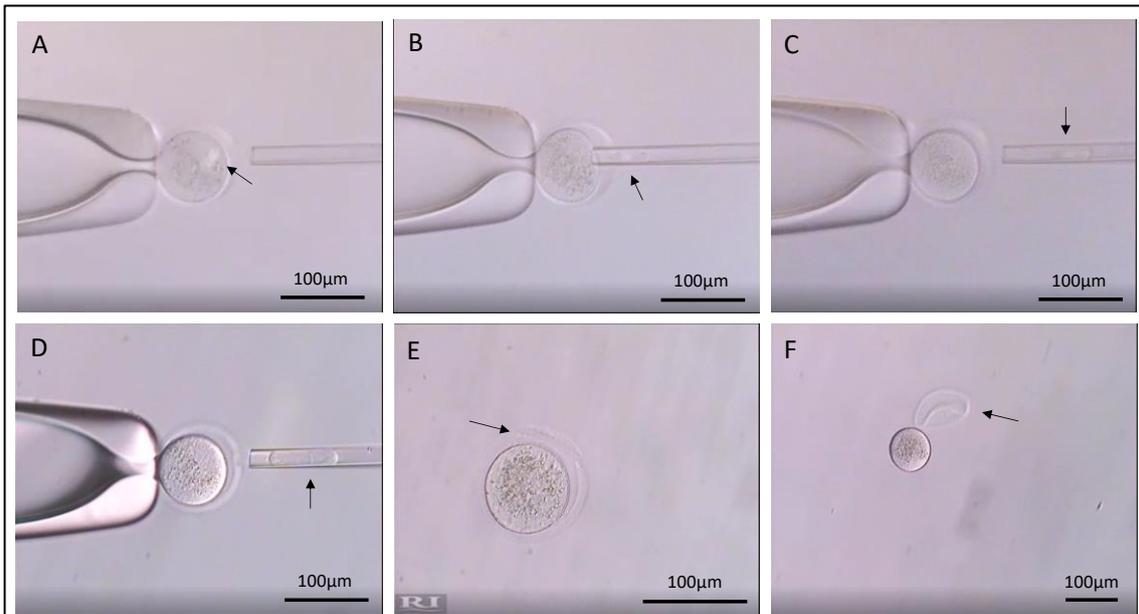


Figure 3

Figure 3. Micro-manipulation procedure for sampling the mouse metaphase II chromosome-spindle complex (CSC) from the mature oocyte in the mouse

A) The mouse metaphase II oocyte whose the polar body was sampled in Figure 2. Visualize the CSC in a polarized field (arrow) and insert a glass pipette through the opening of the zona pellucida.

B-C) Aspirate with a glass pipette while visually observing the CSC. The CSC can be sufficiently visually recognized (arrow) even in a glass pipette.

D) Collected the CSC. Chromosomes are aligned perpendicular to the glass pipette (arrow).

E) Largely open the zona pellucida with a laser (arrow).

F) Suck the cytoplasm through the opening of the zona pellucida (arrow) with a glass pipette. The cytoplasm then performs NGS analysis to see if any chromosomes remain.

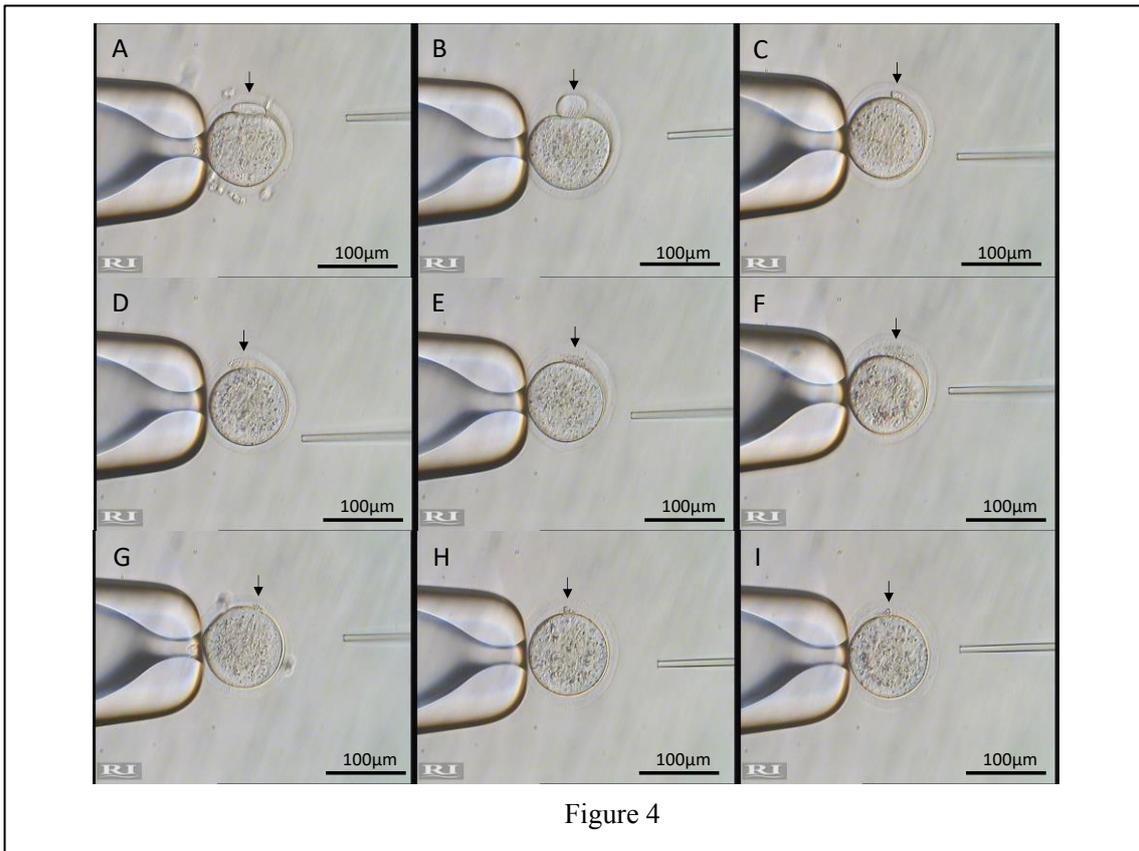


Figure 4. Polar bodies after warming of vitrified mouse mature oocytes

A-C) Various sizes and shapes of the first polar body were observed. These are the ones in which no damage was observed in the cell membrane of the polar body (arrows).

D-F) Polar bodies with damage to cell membrane (arrows).

G-I) Polar bodies that is small and has unclear cell membrane damage (arrows).

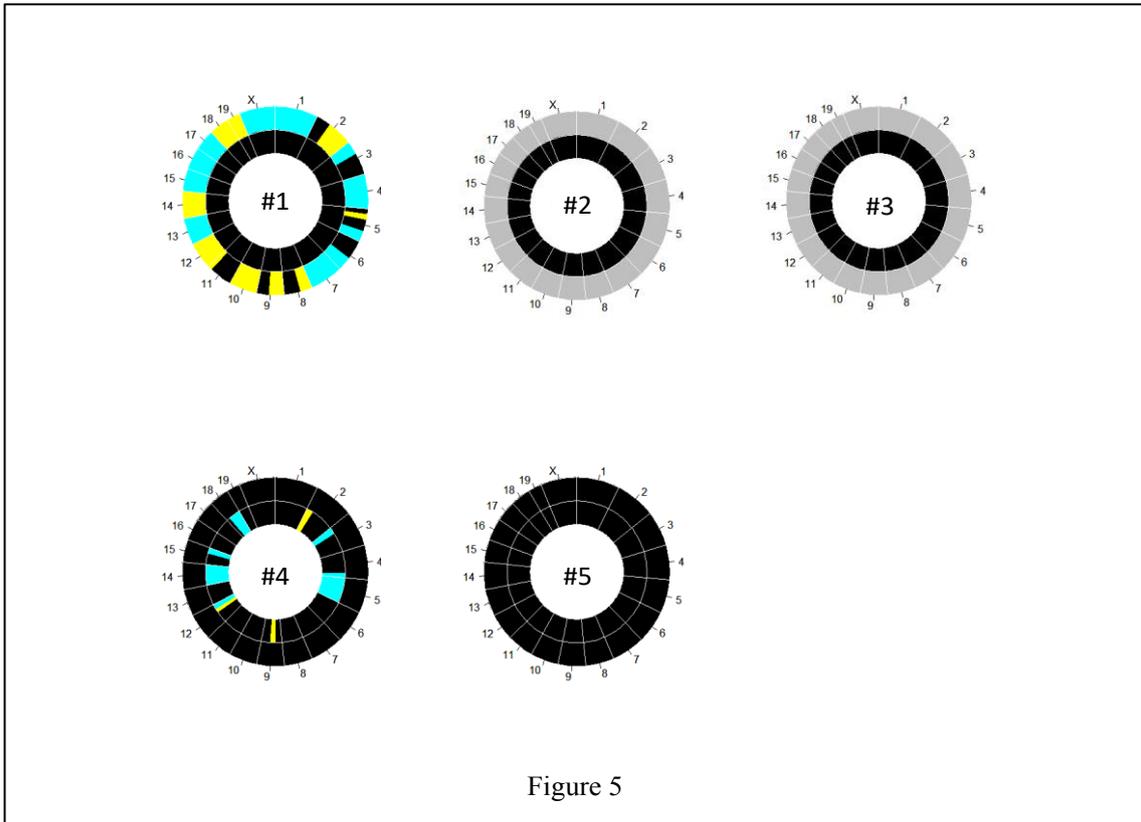


Figure 5. Chromosome analysis results of chromosome-spindle complex (CSC) and first polar body collected from mouse metaphase II oocytes by NGS analysis

The center of the circle indicates the sampling number. The numbers and letters on the outer circumference of the circle indicate the chromosome number and sex chromosome, the outside of the double circle indicates the chromosome derived from the first polar body, and the inside indicates the chromosome derived from the CSC. The color of the circle indicates chromosomal ploidy (light blue: 1n, black: 2n, yellow: 3n, gray: no DNA amplification).

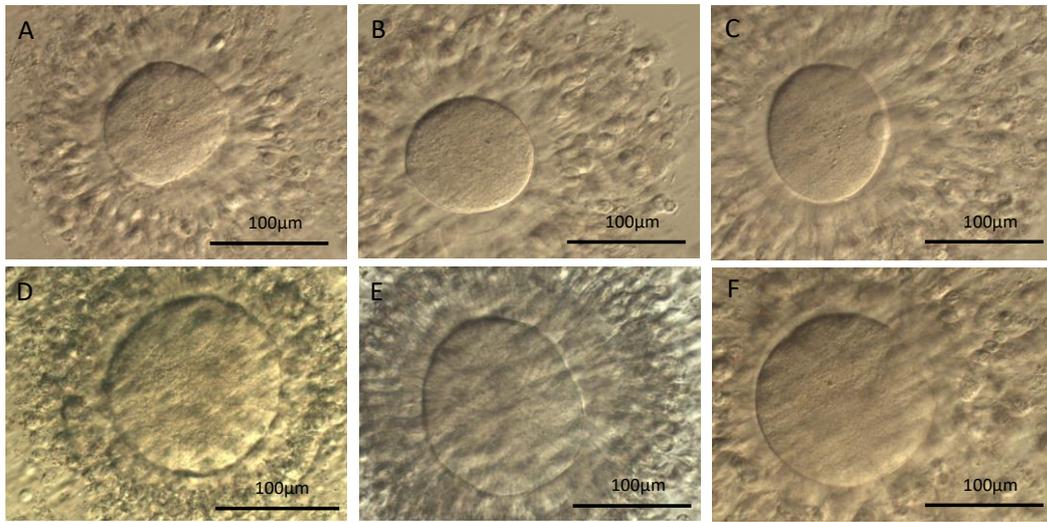


Figure 6

Figure 6. Maturation stage of normal oocyte and giant oocyte

- A) A normal oocyte of germinal vesicle stage
- B) A normal oocyte of metaphase I stage
- C) A normal oocyte of metaphase II stage
- D) A giant oocyte of germinal vesicle stage
- E) A giant oocyte of metaphase I stage
- F) A giant oocyte of metaphase II stage

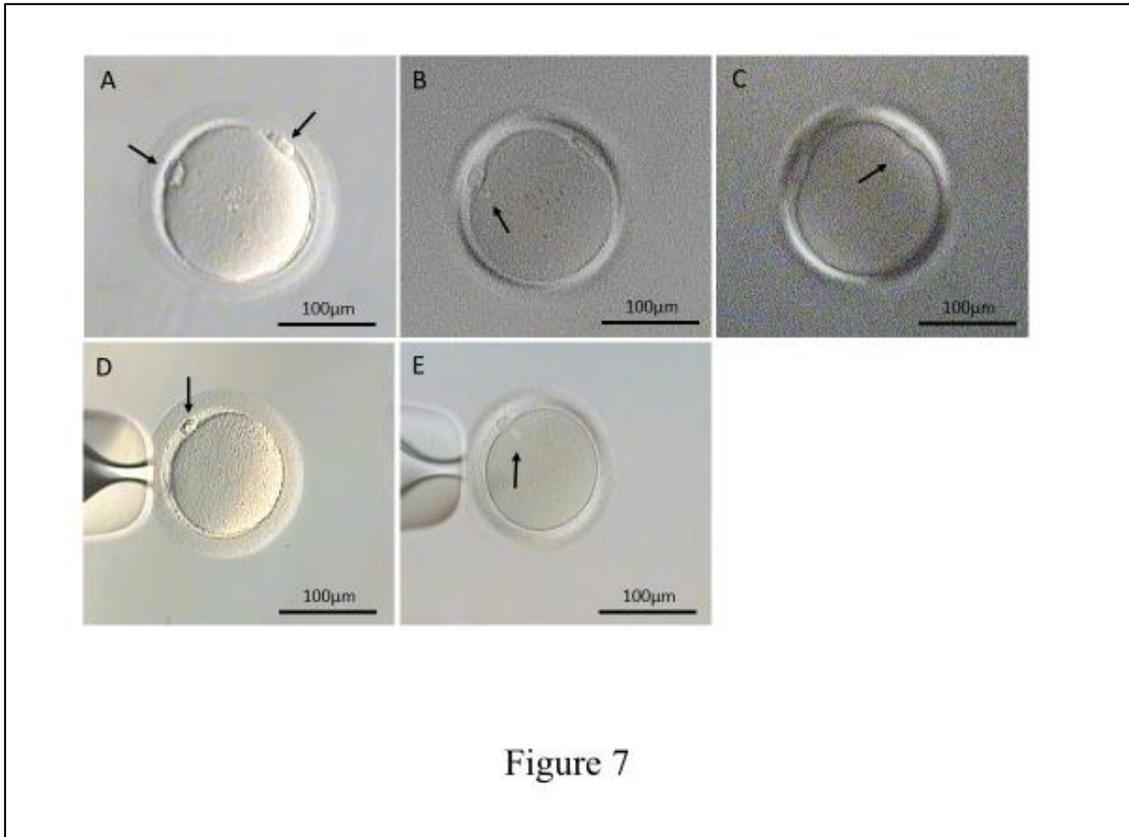


Figure 7. A giant oocyte with two polar bodies and two chromosome-spindle complexes (CSCs)

A) A giant oocyte with two polar bodies (arrows).

B&C) A giant oocyte with two CSCs in the cytoplasm. The CSCs (arrows) were observed below the polar bodies by polarized microscopy.

D) A normal metaphase II oocyte with one polar body (arrow).

E) A normal metaphase II oocyte with one CSC (arrow).

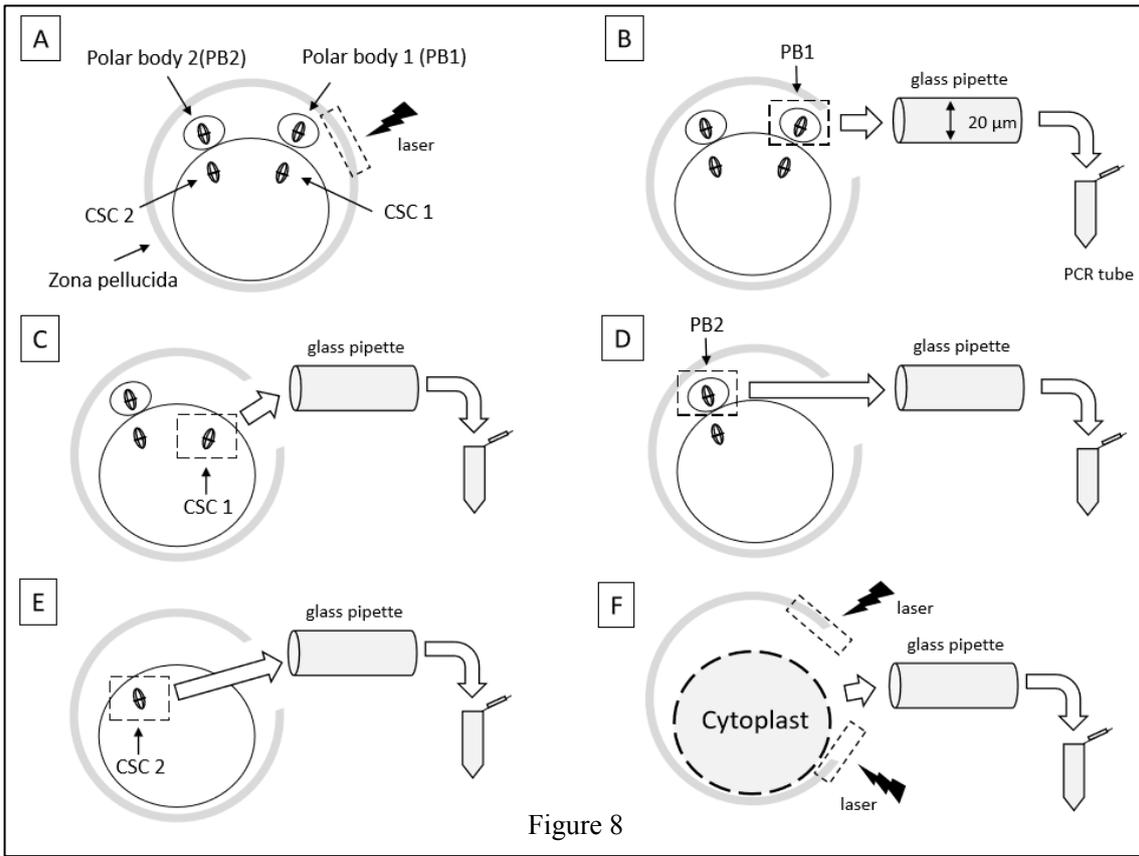


Figure 8

Figure 8. Micro-manipulation procedure for sampling polar bodies and chromosome-spindle complexes (CSCs) from a mature giant oocyte in the human

- A) Laser perforation of the zone pellucida
- B) Tubing polar body 1
- C) Tubing CSC 1
- D) Tubing polar body 2
- E) Tubing CSC 2
- F) Tubing cytoplasm

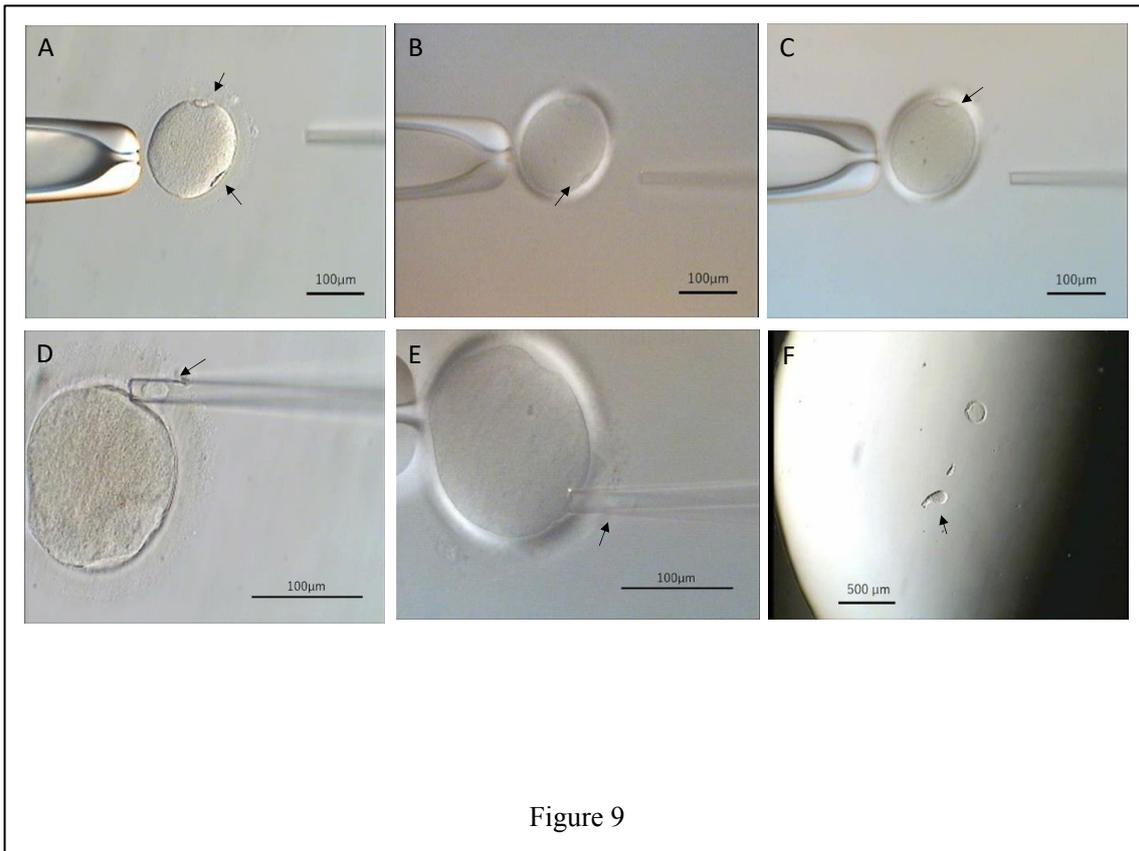


Figure 9

Figure 9. Micro-manipulation for sampling of polar bodies, chromosome-spindle complexes (CSCs) and remained cytoplasm from a mature giant oocyte in the human

- A) A giant oocyte retained with a holding pipette. The two polar bodies (arrows) are clearly visible by polarized light microscopy.
- B & C) Confirmation of the two CSCs in the cytoplasm by polarized light microscopy. The CSCs (arrows) were directly observed below the polar bodies.
- D) Tubing the polar body (arrow).
- E) Tubing the CSC (arrow) which was observed in the glass pipette.
- F) A cytoplasm (arrow) taken out of the zona pellucida.

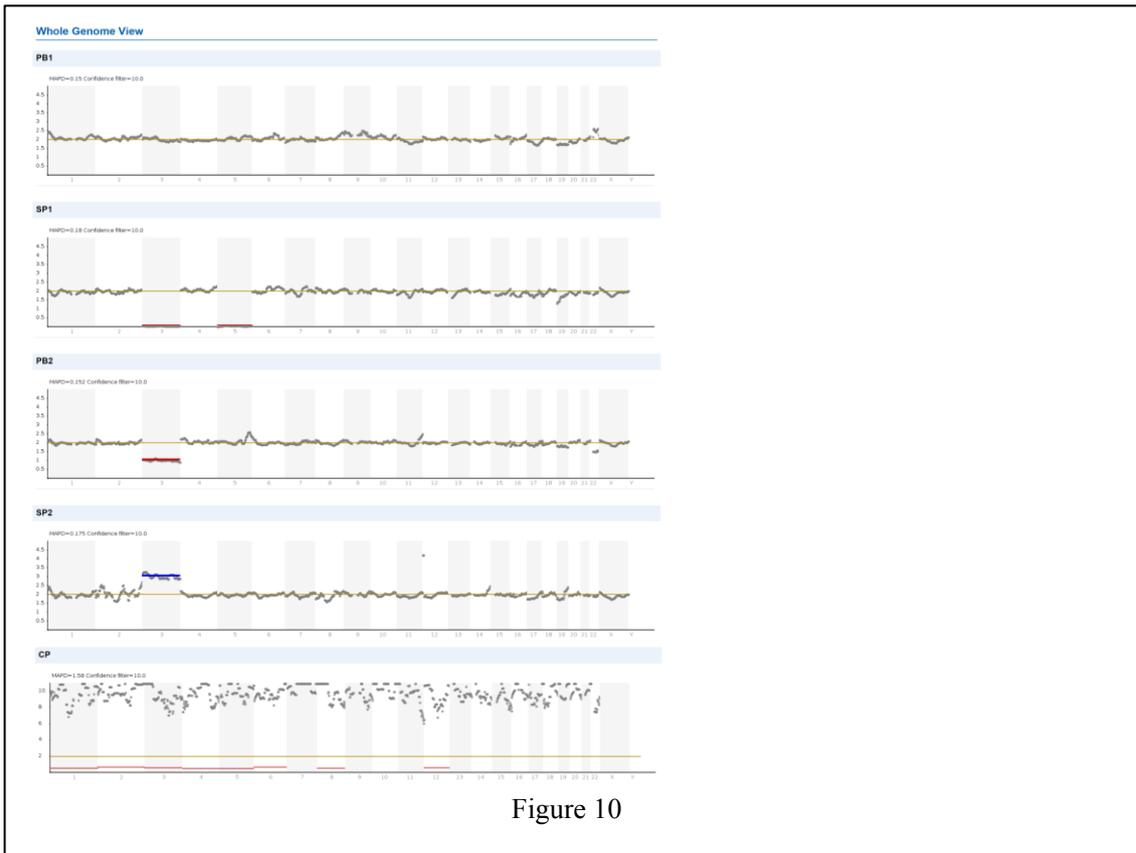


Figure 10

Figure 10. Whole genome view as relative value of each chromosomes derived from the #3 giant oocyte by next-generation sequencing analyses

PB indicates a polar body-derived genome, SP indicates a CSC-derived genome, and CP indicates a cytoplasm-derived genome. The numbers after PB and SP indicate that they correspond to each other. The numbers and letters (1 to 22, X, Y) at the bottom of the graph indicate the corresponding chromosome numbers and sex chromosomes. The vertical axis of the graph shows the amount of amplification of the genome, and the value of 2 is euploid. 1 indicates monosomy and 3 indicates trisomy. The details of the results are shown in Table 4.

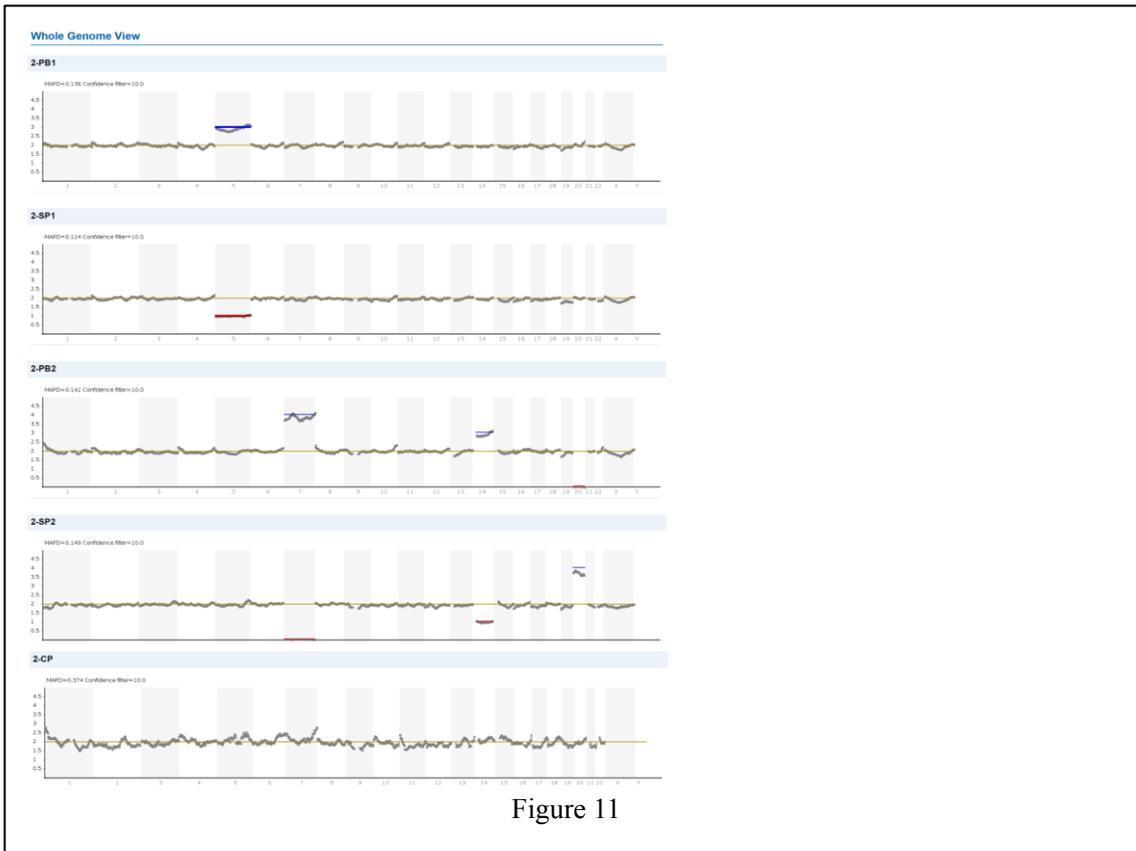


Figure 11

Figure 11. Whole genome view as relative value of each chromosomes derived from the #16 giant oocyte by next-generation sequencing analyses

PB indicates a polar body-derived genome, SP indicates a CSC-derived genome, and CP indicates a cytoplasm-derived genome. The numbers after PB and SP indicate that they correspond to each other. The numbers and letters (1 to 22, X, Y) at the bottom of the graph indicate the corresponding chromosome numbers and sex chromosomes. The vertical axis of the graph shows the amount of amplification of the genome, and the value of 2 is euploid. 1 indicates monosomy and 3 indicates trisomy. The details of the results are shown in Table 4.

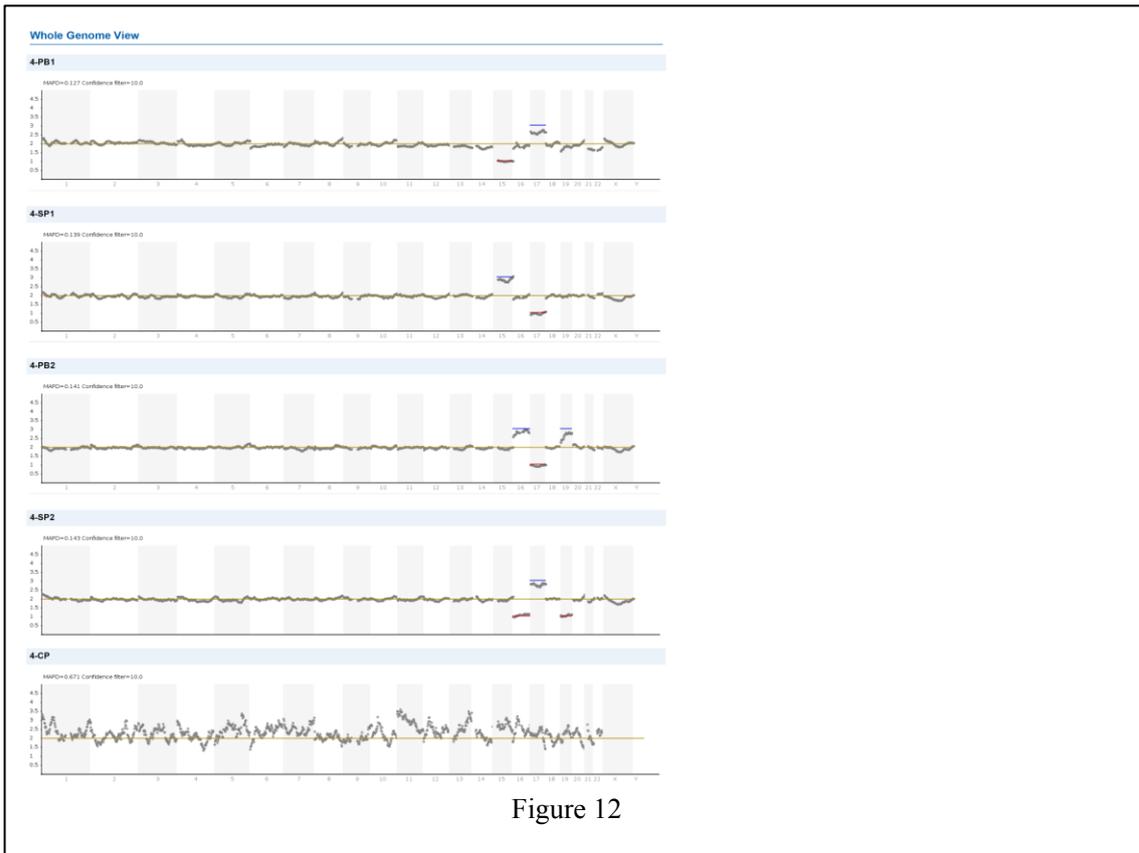


Figure 12

Figure 12. Whole genome view as relative value of each chromosomes derived from the #11 giant oocyte by next-generation sequencing analyses

PB indicates a polar body-derived genome, SP indicates a CSC-derived genome, and CP indicates a cytoplasm-derived genome. The numbers after PB and SP indicate that they correspond to each other. The numbers and letters (1 to 22, X, Y) at the bottom of the graph indicate the corresponding chromosome numbers and sex chromosomes. The vertical axis of the graph shows the amount of amplification of the genome, and the value of 2 is euploid. 1 indicates monosomy and 3 indicates trisomy. The details of the results are shown in Table 4.

Table 1. Recovered giant oocytes (GOs) in the human

| No. of GOs | Donor age ^(a) | Ovarian stimulation method | No. of polar body | No. of CSC(s) ^(b) | Diameter ^(f) of the GOs (μm) |
|---------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------------|--|
| #1 | 33 | Clomid ^(c) | 2 | 2 | 147.79 |
| #2 | 44 | Clomid | 2 | 2 | 145.51 |
| #3 | 46 | Clomid | 2 | 2 | 144.38 |
| #4 | 46 | Clomid | 2 | 1 | 148.55 |
| #5 | 37 | Clomid | 2 | 2 | 153.58 |
| #6 | 43 | Clomid | 2 | 2 | 143.68 |
| #7 | 40 | Clomid | 1 | 1 | 153.34 |
| #8 | 42 | Letrozole ^(d) | 2 | 2 | 154.21 |
| #9 | 42 | Clomid | 1 | 1 | 145.20 |
| #10 | 32 | Letrozole | 2 | 2 | 147.14 |
| #11 | 43 | Natural ^(e) | 2 | 2 | 144.78 |
| #12 | 37 | Clomid | 2 | 2 | 147.76 |
| #13 | 39 | Letrozole | 1 | 1 | 147.99 |
| #14 | 43 | Clomid | 2 | 2 | 145.40 |
| #15 | 43 | Natural | 2 | 2 | 145.71 |
| #16 | 38 | Clomid | 2 | 2 | 147.27 |
| Mean \pm SD | 40.5 \pm 4.2 | - | 1.8 \pm 0.4 | 1.8 \pm 0.4 | 147.6 \pm 3.3 |

(a) Donor age at oocyte recovery

(b) CSC(s): chromosome-spindle complex(es)

(c) Clomid: Oocyte recovery in minimal ovarian stimulation using clomiphene citrate

(d) Letrozole: Oocyte recovery in minimal ovarian stimulation using aromatase inhibitor

(e) Natural: Oocyte recovery in natural cycle

(f) The diameter was measured by RI ViewerTM (Cooper Surgical, Inc. USA)

Table 2. Culture of human giant oocytes at metaphase I for oocyte maturation

| | No. of cycles | Average age of patients at oocyte recovery (Mean \pm SD) | No. of maturation culture | No. of matured oocytes |
|-------------------|---------------|--|---------------------------|------------------------|
| Normal MI oocytes | 1768 | 39.4 \pm 4.6 | 2326 | 2079 (89.4) |
| MI GOs | 6 | 40.1 \pm 5.3 | 6 | 6 (100) |

Table 3. Recovered metaphase I giant oocytes (GOs) in the human

| No. of GOs | Donor age ^(a) | Ovarian stimulation method | No. of polar body | No. of CSC(s) ^(b) | Diameter ^(f) of the GOs (μm) |
|---------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|------------------------------|--|
| #1 | 45 | Natural ^(c) | 2 | 2 | 142.10 |
| #2 | 37 | Clomid ^(d) | 2 | 2 | 142.74 |
| #3 | 40 | Clomid | 2 | 2 | 143.91 |
| #4 | 48 | Clomid | 2 | 1 | 145.17 |
| #5 | 34 | Letrozole ^(e) | 2 | 2 | 148.55 |
| #6 | 37 | Clomid | 1 | Not detected | 150.04 |
| Mean \pm SD | 40.1 \pm 5.3 | - | 1.8 \pm 0.4 | - | 145.4 \pm 3.2 |

(a) Donor age at oocyte recovery

(b) CSC(s): chromosome-spindle complex(es)

(c) Natural: Oocyte recovery in natural cycle

(d) Clomid: Oocyte recovery in minimal ovarian stimulation using clomiphene citrate

(e) Letrozole: Oocyte recovery in minimal ovarian stimulation using aromatase inhibitor

(f) The diameter was measured by RI ViewerTM (Cooper Surgical, Inc. USA)

Table 4. Culture of human giant oocytes at germinal vesicle for oocyte maturation

| | No. of cycles | Average age of patients at oocyte recovery (Mean±SD) | No. of maturation culture | No. of matured oocytes |
|-------------------|---------------|--|---------------------------|------------------------|
| Normal GV oocytes | 985 | 39.0±4.6 | 1274 | 829 (65.1) |
| GV GOs | 7 | 38.0±6.6 | 7 | 5 (71.4) |

Table 5. Recovery of giant oocytes (GOs) at germinal vesicle stage

| No. of GOs | Donor age ^(a) | Ovarian stimulation method | No. of polar body | No. of CSC(s) ^(b) | Diameter ^(e) of the GOs (μm) |
|------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|------------------------------|---|
| #1 | 31 | Clomid ^(c) | Not matured | Not matured | 146.58 |
| #2 | 43 | Clomid | 2 | 2 | 148.00 |
| #3 | 43 | Clomid | 2 | 2 | 146.97 |
| #4 | 39 | Letrozole ^(d) | 2 | 2 | 148.99 |
| #5 | 44 | Letrozole | Not matured | Not matured | 146.50 |
| #6 | 27 | Clomid | 2 | 2 | 143.55 |
| #7 | 36 | Clomid | Discard without consent | Discard without consent | 144.61 |
| #8 | 39 | Letrozole | 2 | 1 | 140.21 |
| Mean ± SD | 39.7 ± 4.9 | - | - | - | 145.7 ± 2.8 |

(a) Donor age at oocyte recovery

(b) CSC(s): chromosome-spindle complex(es)

(c) Clomid: Oocyte recovery in minimal ovarian stimulation using clomiphene citrate

(d) Letrozole: Oocyte recovery in minimal ovarian stimulation using aromatase inhibitor

(e) The diameter was measured by RI ViewerTM (Cooper Surgical, Inc. USA)

Table 6. Analyses of chromosome numbers in polar bodies and chromosome-spindle complexes (CSCs) of human giant oocytes (GOs) by the next-generation sequencing method

| No. of analyzed GOs | Genome derivation of the GOs ^(a) | Chromosome numbers in CSCs of the GOs ^(b) |
|---------------------|---|--|
| #3 | Polar Body 1 | Aneuploidy: +22q ^(c) |
| | CSC 1 | Aneuploidy: -3, -5, -19p ^(d) |
| | Polar Body 2 | Aneuploidy: -3, -22 |
| | CSC 2 | Aneuploidy: +3 |
| | Cytoplasm | Non-DNA detected |
| #16 | Polar Body 1 | Aneuploidy: +5 |
| | CSC 1 | Aneuploidy: -5 |
| | Polar Body 2 | Aneuploidy: +7, +14, -20 |
| | CSC 2 | Aneuploidy: -7, -14, +20 |
| | Cytoplasm | Non-DNA detected |
| #11 | Polar Body 1 | Aneuploidy: -15, +17 |
| | CSC 1 | Aneuploidy: +15, -17 |
| | Polar Body 2 | Aneuploidy: +16, -17, +19 |
| | CSC 2 | Aneuploidy: -16, +17, -19 |
| | Cytoplasm | Non-DNA detected |

(a) The numbers indicate the corresponding combinations

(b) +: trisomy, -: monosomy, numbers indicate chromosome number

(c) q: the long arm of chromosome

(d) p: the short arm of chromosome

The polar bodies and CSCs in GOs were separately collected by micro-manipulation