

正常受精が確認できなかった胚の染色体構成の検討とその 着床前診断の可能性

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
著者	伊藤, 嘉奈子 雀部, 豊 西村, 崇代 ほか7名,
巻/号	17巻2号
掲載ページ	p. 73-76
発行年月	2000年4月

正常受精が確認できなかった胚の染色体構成の検討と その着床前診断の可能性

伊藤嘉奈子・雀部 豊・西村 崇代・菅 睦雄
 渋井 幸裕・中野由起子・間崎 和夫・安部 裕司
 久保 春海・平川 舜

東邦大学医学部産科婦人科学第1講座 大田区 〒143-8541

要旨：ヒト体外受精において、受精の判定は通常媒精または顕微授精 16～18 時間後に行なわれ、雌雄前核と第 2 極体の放出が確認された胚 (2PN 胚) は正常受精と判定される。ところが、臨床の現場ではこれに当てはまらない胚が少数存在し、その取り扱いに苦慮している。本研究では、受精判定時に前核が 0 個の胚 (0PN 胚)、1 個 (1PN 胚)、3 個 (3PN 胚)、4 個 (4PN 胚) を atypical embryos と定義し、その実際の染色体構成を調べ、さらに着床前診断の可能性を探ることを目的とした。本研究に対するインフォームドコンセントの得られた 24 症例から得られた 38 個の atypical embryos の解析を行った。割球 3 個以上の atypical embryos は胚生検を行い、生検割球と残りの割球を 13, 18, 21, X, Y 染色体特異的のプロンプを用いた fluorescence *in situ* hybridization にて解析した。割球 2 個以下の胚には生検は行わず、そのまま固定し解析した。対照として同 24 症例から得られた正常受精胚 34 個を用いた。基本的な倍数性が 2n であったものは、0PN 胚、1PN 胚、3PN 胚にそれぞれ 60%、55%、44%、対照の 2PN 胚に 73% 認めた。3PN 胚由来の 2n 胚には性染色体異数体を 75%、13, 18, 21 染色体異数体を 25% 認めた。また生検割球と胚全体の診断結果を比較したところ、診断効率は 87% であり、誤診の可能性を認めた胚はモザイクが原因であった。Atypical embryos にも移植可能な胚を多く含んでいることが示された。また、その着床前診断が可能であり、診断効率は 87% であった。モザイクによる誤診の可能性を 13% の胚に認めた。
キーワード：着床前診断、胚生検、Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)、染色体異常、前核

体外受精において、受精の判定は通常 conventional IVF (以下 conv. IVF) または intracytoplasmic sperm injection (以下 ICSI) 施行 16～18 時間後に行われている。正常受精胚として移植に用いられているのは、雌雄前核と第 2 極体の放出を認めた胚 (2PN 胚) であり、前核が無く第 2 極体の放出

を認めないものは未受精卵と判定されている。この段階で正常受精胚とも未受精卵とも診断不能な胚が少数存在し、臨床の現場ではその取り扱いに苦慮している。

本研究では、このような胚を atypical embryos と定義した。そして fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を用いてその実際の染色体構成を明らかにし、着床前診断の可能性を探ることを目的とした。

対象および方法

対象：1997 年 6 月から 1998 年 1 月までに東邦大学大森病院で conv. IVF または ICSI を行った症例のうち、本研究に対するインフォームドコンセントの得られた 24 症例 (IVF 7 症例、ICSI 17 症例) より提供された atypical embryos 38 個 (IVF 胚 12 個、ICSI 胚 26 個) を用いた。対照として同 24 症例から得られた正常受精胚 34 個 (IVF 胚 19 個、ICSI 胚 15 個) を用いた。Atypical embryos の内訳は、第 2 極体の放出が確認されたが前核を認めなかった胚 (0PN 胚) 15 個、前核が 1 個の胚 (1PN 胚) 11 個、前核が 3 個の胚 (3PN 胚) 9 個、前核が 4 個の胚 (4PN 胚) 3 個であった。

胚生検と固定：採卵後 3 日目に 3 個以上の割球を認めた胚に対して胚生検を行った。胚の前培養および胚生検には Ca^{2+} 、 Mg^{2+} を含まない Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) に 0.5% bovine serum albumin (BSA) と 200 μM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を添加して用いた。胚を 30 分間前培養 (37°C) した後、マイクロマニピレーターを用いて顕微鏡下に胚生検を行った。胚固定用ピペットにて胚を固定後、biopsy 用ピペットにて partial zona dissection を行い透明帯の 12 時の位置に摘出割球直径の約 2/3 の大きさのスリットを作製した。そして 6 時の位置の囲卵腔に挿入した biopsy 用ピペットから培養液を囲卵腔へ注入し、割球を押し出す expulsion 法を行った¹⁾。

生検割球と残りの割球は別々に固定した。割球が 2 個以下の胚は生検を行わずにそのまま固定した。固定は、吉澤ら²⁾の方法に準じて行った。すなわち 1% Sodium Citrate に 0.5% BSA を加えた低張液で 5 分間の処理を行った後、低張

(受付 1999 年 4 月 8 日 / 受理 2000 年 2 月 4 日)

別刷請求先：〒143-8541 大田区大森西 6-11-1
 東邦大学医学部産科婦人科学第 1 講座

液にカルノア液（メタノール:酢酸=3:1）を2.5%濃度になる様に加えて前固定した。胚または割球を少量の前固定液とともにスライドガラス上に移動し、胚または割球がスライドガラスに付着したのを確認後、カルノア液を7~8滴滴下し固定した。

FISH: 性別および性染色体異数体を診断するためにX, Y染色体, 新生児に頻度の高い異数体を診断するために13, 18, 21染色体を対象としてFISH³⁾を行った。プローブはVYSIS社から市販されている直接蛍光標識プローブを用いた。13 (orange), 18 (yellow), 21 (orange), X (aqua), Y (green) となるようにプローブ混合液を調製し(図1), 生検割球または残りの割球の上に1 μlのプローブ混合液を載せた。6×6 mmのカバーガラスで覆い、パラフィルムを張り付け、75°Cのホットプレート上で3分間DNAの熱変性を行った後、37°Cの湿潤容器内で2時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後の洗浄は、50% formamide 加2× sodium chloride/sodium citrate (SSC), 0.1% nonidet P-40 加2× SSC を(各々40°C, 10分間)用いて行った。4,6,-diamidino-2-ohenyindole (DAPI) で対比染色し、シグナルに適したフィルターを用いて落射式蛍光顕微鏡でシグナルを観察した。

FISHによる胚の診断基準: Munneら⁴⁾の方法を基準に改変を加えて次のような診断基準を用いた。すべてのまたは大部分の割球の倍数性がそれぞれn, 2n, 3nであった場合その胚の基本的な倍数性はn, 2n, 3nであると診断した。また1個の胚において2つ以上のcell-lineで構成されている場合をモザイク, 無秩序なcell-lineの場合はchaoticモザイクと診断した。また異数体であっても基本的な倍数性が2nである胚は2n胚に含めた。

結果

FISHの結果: 図1は atypical embryos から得られた生検割球のFISHの結果である。Aqua (X); 1個, green (Y); 1個, orange (13/21); 4個, yellow (18); 3個を認め、この割球は18トリソミー, 男性と診断した(図1)。

Atypical embryosの倍数性: 対照の2PN胚では基本的に2nであったものは25/34個(73%) 認めたのに対し、0PN胚では9/15個(60%), 1PN胚では6/11個(55%), 3PN胚では4/9個(44%) 認めた。4PN胚には2nは認めなかった(図2)。これらは対照の2PN胚と比較すると統計上有差は認めなかった。

2n胚における異数体: 基本的な倍数性が2nであった atypical embryos のうち性染色体異数体は、0PN胚では1/9(11%), 1PN胚では2/6(33%), 3PN胚では3/4(75%) 認められた。13, 18, 21染色体異数体は3PN胚にのみ1/4(25%) 認められた(図3)。

生検割球と胚全体の診断結果: 38個の atypical embryos のうち21個の胚に生検が可能であり、それらより34個の割球を摘出した。摘出した34個にFISHを行ったところ、4個

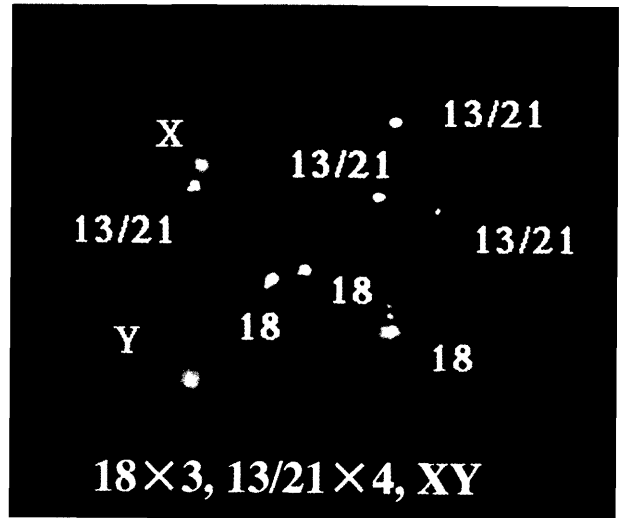


図1. 割球のFISH結果. Aqua (X), green (Y) 各1個ずつ, orange (13/21) 4個, yellow (18) 3個認め、この胚は18トリソミー男性と診断した。

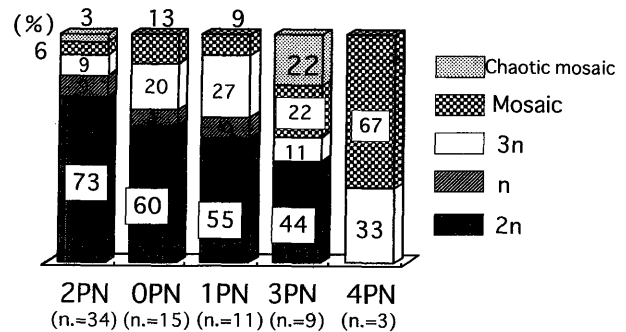


図2. 各PN数の倍数性分類. Atypical embryoにも基本的な倍数性が2nの胚が多く認められた。

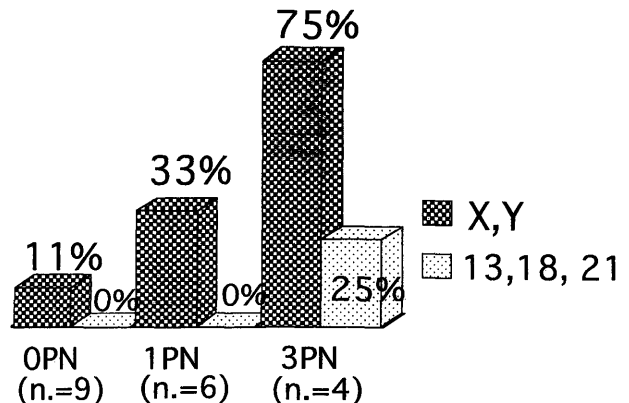


図3. 13, 18, 21, X, Yを用いた基本的な倍数性が2nであった胚における染色体異数体の割合. 染色体異数体は3PN胚に多く認められた。

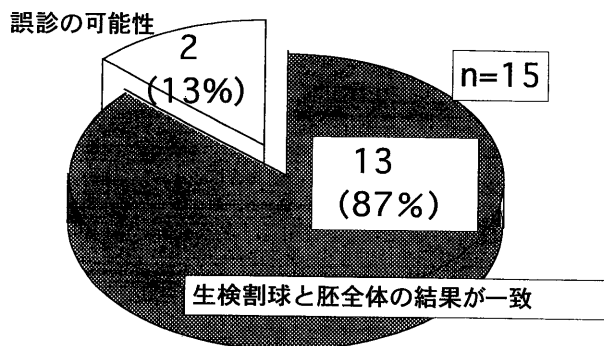


図4. Atypical embryosにおける着床前診断の診断効率。FISH解析による生検割球と残りの胚全体の診断結果の比較検討の結果はシグナルを得られた15個のうち2個において誤診の可能性を認めた。これより生検割球診断の診断効率は87%であることが示唆された。

表1. 診断結果が異なった症例

割球診断	残りの割球	胚の診断
1 1818 13/21×4 XY	1818 13/21×4 XX	Chaotic mosaic
	1818 13/21×4 XX	
	1818 13/21×3	
	13/21×1 Y	
	18 13/21×1 X	
2 1818 13/21×4 XY	18 13/21×3 X	Chaotic mosaic
	18×2 X	
	18 13/21×2 Y	
	18 13/21×4 XY	
	18 13/21×2	

の胚から得られた6個(17%)は固定時に無核割球で、残りの2個の胚から得られた3個(9%)の割球にはシグナルを認めず、15個の胚から得られた25個(74%)の割球にシグナルを認めた。

生検割球と胚全体の診断結果の比較検討を行ったところ、シグナルを得られた15個の atypical embryos のうち2個において誤診の可能性を認め、診断効率は87%であった(図4)。誤診の可能性を認めた2個の胚では、生検割球で正常女性の染色体構成、胚全体で chaotic mosaic であった(表1)。

考 察

Conv.IVF では、精子が卵卵腔に停滞している時間が異なり卵実質に侵入する時間が一定していない。そのため媒精後から雌雄前核が出現するまでの時間は一定ではないが、Plachotら⁵⁾は雌雄前核を確認し易い時間は媒精後9～20時間であると報告している。一方、ICSIでは精子の侵入時間は明確である。Nagyら⁶⁾は、ICSI胚は最初の4時間までは前核形成は起こらず、6時間後にはじめて16%の胚が1前核、17%の胚が2前核を示す。そして8時間後には80%が

2前核、11%が1前核を示し、16時間後になると99%の胚が2前核を示し、その後前核が消失するまでの間、前核を確認できない卵が増加してくると報告している。よって受精の判定は媒精またはICSI施行16～18時間後に行うのが妥当と考えた。

Atypical embryosの成因は、OPN胚の場合、雌雄前核が早期に融合したため核膜の早期消失または雌雄前核の膨化不全、1PN胚の場合は雌雄前核の早期融合、雌性前核または雄性前核の膨化不全の可能性もある。3PN胚の場合はICSIとconv.IVFでは成因が異なり、ICSIによる3PN胚は第2極体の放出不全が考えられる⁷⁾。一方conv.IVFの場合は多精子受精が考えられる⁸⁾。また4PN胚でも多精子受精が原因と考えられる。

OPN胚、1PN胚に関しては、基本的な2n胚を多く認め、また2n胚の異数体も低率であった。

3PN胚に関しては、今回の我々の研究では、基本的な2n胚を44%認めた。吉澤ら⁹⁾の報告によると、ヒト胚においてはギムザ染色によるその解析率は40%と低いものの、3PN胚に2n胚を56%認め、我々の結果と矛盾しない。3PN胚が2n胚になる成因は、2細胞期以上の段階で余分な前核を排除する機構が働いていることが予想される⁹⁾。

また3PN胚由来の2n胚には異数体が多く、性染色体異数体、13、18、21常染色体異数体をそれぞれ75%および25%認めた。Macasら¹⁰⁾はICSIを行うことで卵の第2減数分裂における正常な染色体分離を障害している可能性を指摘している。我々の検討では3PN胚由来の2n胚はすべてICSI胚であり、これらに異数体が多かった原因がICSIの操作自体にある可能性が考えられる。

一般に前核数はその倍数性を反映していると考えられている。今回の我々の研究では2PN胚に関しては、前核数と実際の胚の倍数性はほとんど一致していると考えて良いが、OPN、1PN、3PN胚において、基本的な倍数性が2nである胚をそれぞれの60%、55%、44%に認めた。よって atypical embryos の前核数とその実際の倍数性は必ずしも一致しないことが示唆された。Atypical embryosに関しては、着床前診断を行えない状況下では、以下のように取り扱うことが妥当であると考えた。1PN胚、OPN胚は2PN胚と同様に胚移植に用いても問題がない。3PN胚由来の2n胚はすべてICSI胚であったので、ICSI胚由来の3PN胚は移植に用いても問題はないと考える。しかし、3PN胚由来の2n胚には異数体を多く認めているので、移植に用いる優先順位を下げることが望ましい。Conv.IVFの3PN胚は多精子受精が原因と考えられ、我々の研究でも2n胚は0%であったことから移植には用いるべきではない。

着床前診断を行える状況下では、 atypical embryos の倍数性や異数性を胚移植前に診断した方が安全と考える。しかし割球を用いた着床前診断はモザイク胚に対応出来ない弱点がある。今回の我々の検討では、OPN胚、1PN胚、3PN胚、4PN胚にそれぞれ13%、9%、44%、67%のモザイク

胚を認め、誤診の可能性が危惧された。しかし、実際に生検割球と胚全体の診断結果を比較検討してみると、誤診の可能性を認めたのは2個だけであり、その正診率は87%と、十分に臨床的に応用可能であった。

文 献

- 1) 雀部 豊 (1993): 着床前遺伝子診断を目的としたマウス体外受精胚に対する biopsy 法の検討. 日産婦., 45, 650-656.
- 2) Yoshizawa, M., Takada, M. and Muramatsu, T. (1989): Incidence first-cleavage mouse eggs. J Mamm Ova Res., 119-125.
- 3) Sasabe, Y., Krisher, R.L., Stehlik, J.C., et al. (1996): Sex determination by simultaneous application of polymerase chain reaction and fluorescent in situ hybridization on the same blastomere of a pre-embryo. Fertil Steril., 66, 490-492.
- 4) Munne, S., Marquez, C., Magli, C., Morton, P. and Morrison, L. (1998): Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. Molecular Human Reproduction, 4 (9), 863-870.
- 5) Plachot, M., Junca, A.-M., Mandelbaum, J., Cohen, J., Salat-Baroux, J. and Da Lage, C. (1986): Timing of in-vitro fertilization of cumulus-free and cumulus-enclosed human oocytes. Hum. Reprod., 4, 237-242.
- 6) Nagy, Z.P., Liu, J., Joris, H., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A. (1994): Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 9 (9), 1743-1748.
- 7) Palermo, G., Joris, H., Derde, M.P., Camus, M., Devroey, P. and Van Steirteghem, A. (1993): Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. Fertil. Steril., 59, 826-835.
- 8) Plachot, M., Mandelbaum, J., Junca, A.M. et al. (1989): Cytogenetic analysis and development capacity of normal and abnormal embryos after IVF. Hum. Reprod., 4, 99-103.
- 9) Yoshizawa, M. (1997): Analyses of early development and chromosomal constitution of trippronuclear human and mouse eggs fertilized in vitro. Jpn. J. Fertil. Steril., 42 (1), 34-38.
- 10) Ervin, M., Bruno, I., Marinella, R. and Keller, P.J. (1996): The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 11 (11), 2496-2501.

Analysis of Chromosome Constitution on Atypical Embryos and Possibility of Preimplantation Genetic Diagnosis

Kanako Ito, Yutaka Sasabe, Takayo Nishimura, Mutsuo Suga, Yukihiko Shibui, Yukiko Nakano, Kazuo Masaki, Yuji Abe, Harumi Kubo and Shun Hirakawa

1st. Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine Toho University, Tokyo 143-8541, Japan

Embryos with two pronuclei and second polar body at 16-18 hours from conventional insemination or microinsemination have been recognized to be normal fertilized embryos. In this study, embryos without pronucleus and with second polar body (OPN), with one pronucleus (1PN), with three pronucleus (3PN) and with four pronucleus (4PN) were defined as atypical embryos. The first purpose of this study is to reveal the chromosome constitution of the atypical embryos and the second purpose was to carry out a feasibility study for preimplantation genetic diagnosis (PGD). Total 38 atypical embryos were analyzed. On day 3, the atypical embryos with more than 2 blastomeres were biopsied, and both the biopsied blastomeres and remaining sibling blastomeres were analysed by fluorescence in situ hybridization (FISH) using probes for chromosomes 13, 18, 21, X and Y. The atypical embryos with less than 3 blas-

tomeres were analyzed by FISH without biopsy. It was revealed that 60% of OPN, 50% of 1PN and 44% of 3PN embryos were basically 2n embryos. Seventy-five and twenty-five percent of 2n embryos derived from 3PN were aneuploids involving sex chromosomes and autosomes respectively. Although there were the possibility of misdiagnosis on 2 atypical embryos, diagnostics efficiency of preimplantation diagnosis was 87%. It was concluded that the number of pronucleus does not represent the ploidy of the atypical embryos and the atypical embryos are including a large number of embryos which can be transferred. PGD on the atypical embryos has 87% efficiency and were informative not to waste normal embryos.

Key words: Preimplantation diagnosis, Embryo biopsy, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), Chromosomal anomaly, Pronucleus.