

博士論文

ヒト未成熟 GV 期卵の有用性に関する研究

2024 年 3 月

浅間 勇人

岡山大学大学院

環境生命科学研究科

【目次】

略語一覧	2
用語集	3
概要	6
第 1 章 ヒト GV 期卵の核仁周囲のクロマチン集積.....	9
第 2 章 ヒト GV 期卵核仁周囲のクロマチン集積と核成熟の関係	12
2.1 緒言	13
2.2 対象と方法	16
2.2.1 対象	16
2.2.2 採卵	16
2.2.3 タイムラプス解析.....	17
2.2.4 統計解析.....	17
2.3 結果	19
2.4 考察	21
第 3 章 rescue IVM 後の最適 ICSI 施行時間の検討	23
3.1 緒言	24
3.2 対象と方法	26
3.3 結果	27
3.4 考察	29
第 4 章 総括	31
謝辞	34
参考文献.....	35
図表	54

略語一覧

IVF = in vitro fertilization: 体外受精

GV = germinal vesicle: 第 1 減数分裂前期（卵核胞期）

MI = metaphase I: 第 2 減数分裂前期

MII = metaphase II: 第 2 減数分裂中期

GVBD = germinal vesicle break down: 卵核胞崩壊

c-IVF = conventional in vitro fertilization: 通常の体外受精

ICSI = intracytoplasmic sperm injection: 細胞質内精子注入(顕微授精)

c-ICSI = conventional ICSI: 通常の細胞質内精子注入(顕微授精)

1PN = monopronucleated zygote: 単一前核の接合子/受精卵

2PN = two pronuclei zygote: 2 つ前核の接合子/受精卵

3PN = three pronuclei zygote: 3 つ前核の接合子/受精卵

1st PB = first polar body: 第 1 極体

2nd PB = second polar body: 第 2 極体

Cleavage rate = 受精卵の分割率

Blastocyst rate = 受精卵の胚盤胞発生率

PCO = polycystic ovarian: 多嚢胞性卵巢

PCOS = polycystic ovarian syndrome: 多嚢胞性卵巢症候群

OHSS = ovarian hyperstimulation syndrome: 卵巢過剰刺激症候群

用語集

1. 生殖補助医療技術 (ART)

不妊症患者の妊娠成立のために、卵子と精子、あるいは胚を体外で取り扱う治療法で体外受精、顕微授精、胚移植、卵子・精子・胚の凍結融解技術を総称して生殖補助医療技術 (Assisted Reproductive Technology : ART) と呼ぶ。

2. 体外受精(c- IVF)

卵子が入っている培養液の中に、培養液にて洗浄もしくは密度勾配法にて運動精子のみを集め、精子濃度を約 10～20 万個/mL に調整し媒精することで受精を図る方法である。

3. 顕微授精 (ICSI)

射出精子の濃度が低い、もしくは精子運動率が低く c-IVF では受精が成立しない患者を対象に、顕微鏡下で形態や運動性を判断し、良好な 1 個の精子を選んで、細いキャピラリーを用いて卵子に直接精子を穿刺して受精を図る方法である。

4. タイムラプスシステム(Time-lapse system: TLS)

タイムラプス (Time-lapse) 技術は、一定の時間間隔で静止画像を撮影し、これらの画像を連続的に再生することによって、動的なプロセスを視覚的に捉える手法であり、生殖医学の領域において重要性を持つ。生殖補助医療において、タイムラプス胚観察システムを活用することで、胚の培養過程を容易に追跡できる。これにより、胚を培養器外に取り出す必要がなく、受精から胚盤胞発生に至る一連の発育過程を連続的かつ詳細に観察することが可能となる。さらに、この技術を用いて、胚の細胞分裂パターンや発育の速度を評価し、胚を選定する際の貴重な情報を提供する。したがって、タイムラプス技術は生殖補助医療において新たな胚の判断材料として、胚発生の詳細なモニタリングと妊娠成功率の向上に寄与している。本研究では、Embryo Scope® time-lapse system (Vitrolife)のタイムラプスシステムを用いて胚観察を行った。

また、Vitrolife 社のタイムラプスシステムには、胚盤胞において独自の胚評価法ツ

ールの KIDScore™ D5（以下、KIDS5）と iDA score-v1（以下、iDA）が備わっている。KIDS5 は、培養士が EmbryoViewer[®]ソフトウェアの Annotate ページで記録したアノテーションに基づいて算出される。このアノテーションは、分割のパターン、発生速度、胚盤胞の質の 3 つの要素で構築されている。iDA は、全世界 18 施設、115,000 個以上の胚のタイムラプス画像をもとに AI によって解析され、自動的に算出される。どちらの評価法も 1 から 9.9 までの連続スケールから小数点 1 桁区切りのスコアで評価し、高い数値ほど妊娠継続の可能性が高いとしている。

5. ROC 曲線

ROC 曲線（Receiver Operating Characteristic curve）は、通信工学理論としてレーダーシステムにおけるノイズから敵機の存在を検出するための方法として開発され、敵機の存在を正確に検出する能力と、誤検出の可能性との間のトレードオフを示す。臨床研究の領域では、ROC 曲線はしばしば診断検査の有用性を評価するための有力な手法として応用されており、連続変数である独立変数と二分変数であるアウトカムとの関係の強さを客観的に評価するために利用され、診断テストの性能を客観的かつ定量的に評価する。

6. 多嚢胞性卵巣症候群(PCOS : polycystic ovarian syndrome)

症状としては、無月経や月経不順、多毛、肥満などで、女性の約 5～10%にみられる。下垂体から分泌される LH(黄体ホルモン)と FSH(卵胞刺激ホルモン)のホルモン値のバランスが崩れ、男性ホルモン(アンドロゲンまたはテストステロン)が高くなる。男性ホルモンの影響で卵巣の白膜が厚くなり、排卵しにくくなる疾患で、不妊の原因にもなる。通常、卵巣では主席卵胞が約 20mm ほどで排卵となるが、PCO 症例は卵巣の周りに約 10mm ほどの未熟な卵胞が 10 個以上形成される。体外受精の採卵においては卵胞数に対して採卵数が少なく、未熟卵や変性卵が多いということが知られている。

7. 卵巣過剰刺激症候群(OHSS : ovarian hyperstimulation syndrome)

OHSS は、排卵誘発剤による卵巣刺激によって起こる。症状としては、多くの卵胞が発育することで、卵巣が大きく腫れ上がり、腹水が貯まって下腹部の張りや痛みがでる。また、重症化すると血栓症や腎不全などを併発することがある。予防するために、OHSS を起こしにくいマイルド法で卵巣刺激を行ったり、排卵誘発剤の

量を調節する。

8. 生殖補助医療における卵巣刺激方法

成熟卵子を獲得へ向けての採卵では、大きく分けて3つの卵巣刺激方法があり、その方法を以下に示す。

8-1. 自然周期

排卵誘発剤を一切使用せずに自然発育した卵胞に焦点を当てて採卵する方法。注射や内服薬を使用しないので、身体的にも経済的にも軽減できる。基本的に発育してくる卵胞は1つのため、採卵できる卵子も1個であるので、採卵時に排卵済みや卵子が回収できない可能性もある。

8-2. 低刺激周期(mild stimulation)

クロミフェン（クロミッド）法やクロミフェン+hMG法などがある。月経の3日目からクロミフェンの内服を開始し、卵胞の発育を進行させていく。必要であればhMG製剤を注射し、卵胞の発育を促す。注射の回数も少ないため、身体的にも経済的にも軽減でき、かつ卵巣過剰刺激症候群のリスクも比較的に低い。調節卵胞刺激周期と比べると、1回の採卵で回収できる卵子数は少ない。

8-3. 調節卵巣刺激法(hyper stimulation)

GnRH アゴニスト（ロング法、ショート法）や GnRH アンタゴニスト法などがある。基本的に月経の3日目から連日注射を打つため、身体的にも経済的にも負担が大きい。また、卵巣過剰刺激症候群のリスクも他の方法より高い。しかし、回収できる卵子数が多く、採卵回数に対しての妊娠期待値も大きい。

概要

2021 年、日本における体外受精による出生児数は過去最多の 6 万 9797 人となり、その出生率は 11.6 人に 1 人 (8.6%) に上昇した (2021 年、厚生労働省)。また、我が国においては晩婚化、晩産化に伴う少子化が大きな問題となっており、体外受精における役割は年々増大している。その体外受精において、成熟卵の獲得を目的とした調節卵巣刺激後に採卵された卵子の約 15-30% が未成熟な MI 期または GV 期の卵子であるという課題が存在する。これらの未成熟卵子の中で、数時間で MII 期卵への到達が可能な MI 期卵においては追加培養後に卵細胞質内精子注入法 (ICSI) が適用可能な場合が多く、MI 期卵由来の胚からも健康な児が得られることが報告されている。一方、GV 期卵は卵核胞崩壊 (germinal vesicle breakdown: GVBD) が起こらず核成熟が停止することがあり、更には核成熟のタイミングが不定であること、また受精後の胚発生率が低いことから、GV 期卵は廃棄となることが多いのが現状である。このような状況から、GV 期卵を廃棄せずに有効活用するには、GVBD を経て MII 期に到達する GV 期卵を選別し、極体放出後から ICSI 施行までの最適タイミングを調べる必要がある。これらの背景から、本研究では主に GV 期卵の特性や ICSI 施行時の最適なタイミングに焦点を当て、後方視的な解析を通じて採卵から受精までのプロセスを詳細に検討した。なお、本研究は岡山大学倫理委員会 (承認番号: 研 2205-11) の承認を得て行った。

まず初めに、ヒト GV 期卵においては核仁周囲にクロマチンの集積が起こることが報告されていることから、これがその後の GVBD および卵成熟を予測できるかどうかを検証するため、GV 期卵の動態解析を行った。この解析には、経時的自動連続観察システ

ム (Embryo Scope Flex, VitroLife 社) を用い、調節卵巣刺激法のうち低刺激な mild stimulation 法を用いて成熟卵獲得を目的とした採卵時に得られた 274 個の GV 期卵に対する後方視的解析を行った。結果として、GV 期卵核仁周囲のクロマチン集積率は 88.0% (241/274) であり、この集積が確認された GV 期卵子では GVBD 率が 91.7% (221/241)、MII 期卵到達率が 83.8% (202/241) であることが示された。一方、クロマチン集積のない GV 期卵子では GVBD 率が 21.2% (7/33)、MII 期卵到達率が 15.2% (5/33) に過ぎず、有意に低い結果が得られた ($p < 0.001$)。また、卵細胞質面積においてクロマチン集積の有無によるカットオフ値が $10,314 \mu\text{m}^2$ (AUC: 0.688, 95%CI: 0.581-0.795) であることが明らかとなり、この値以上の GV 期卵では核仁周囲のクロマチン集積が高確率で起こることが示唆された。実際、GV 期卵母細胞面積がカットオフ値以上の場合の核仁周囲にクロマチンの集積を確認できた割合は 96.3% (78/81)、カットオフ値未満の場合は 84.0% (105/125) であり、カットオフ値以上で有意に高いことが明らかになった ($p = 0.006$)。同様に、GVBD の有無による卵細胞質面積のカットオフ値は $10,335 \mu\text{m}^2$ (AUC: 0.663, 95% CI: 0.569-0.756) であり、カットオフ値以上の GVBD 率 94.7% (71/75) に対し、カットオフ値未満の場合は 77.1% (101/131) とカットオフ値以上で有意に高率に GVBD が起こることが明らかとなった ($p < 0.001$)。次に、GV 期卵から MII 期卵まで到達した卵子 182 個に対して ICSI を施行した結果と採卵時に MI 期だった卵子 145 個に ICSI を施行した結果を後方視的に解析した。その結果、ICSI 受精率は 200 分未満: 66.7% (8/12)、200 分以上 400 分未満: 68.0% (53/78)、400 分以上 600 分未満: 84.9% (56/66)、600 分以上: 65.4% (17/26) であり、GV 期卵由来成熟卵子の ICSI 施行では、ICSI 施行時間が 400 分以上 600 分未満の区間で受精率が有意に高かったことが明らかとなった (200 分以上 400 分未満と 400 分以上 600 分

未満の群間比較: $p = 0.020$ 、400 分以上 600 分未満と 600 分以上の群間比較: $p = 0.048$)。

また、GV 期卵と MI 期卵を比較した際にも、GV 期卵由来の ICSI 施行では MI 期由来卵と同等以上の受精率であることが示された。採卵時に MI 期卵であった卵子の ICSI 受精率はそれぞれ 200 分未満で 46.5% (20/43)、200 分以上 400 分未満で 81.8% (18/22)、400 分以上 600 分未満で 76.2% (16/21)、600 分以上で 67.8% (40/59)であり、200 分未満は他の 3 群に対して有意に低い受精率を示した ($p < 0.05$)。更に、ICSI 施行時の紡錘体の有無に関する検討では、GV 期卵由来および MI 期卵由来のいずれにおいても紡錘体が可視できた場合の受精率が有意に高かったことが確認され、GV 期卵由来成熟卵は ICSI 施行時において、第一極体放出後から 282 分以上経過後に紡錘体が高率で確認でき (AUC: 0.638, 95% CI: 0.455-0.838)、その後の ICSI 施行で高い受精率を期待できることが示唆された。一方、MI 期卵由来成熟卵の ICSI 施行の場合は、186 分以上経過後 (AUC: 0.788, 95% CI: 0.692-0.840) であり、GV 期卵は MI 期卵と比較して、ICSI 施行時の至適タイミングが遅い結果が得られたことから、採卵時の成熟度がその後の成熟速度に影響を与え、最適 ICSI 施行時間に差が生じる可能性があることが本研究において明らかになった。また、GVBD から MII 期到達までの時間は 13 時間 21 分から 16 時間 20 分までの間で正規分布を示しており、個体差、個人差があることが考えられた。

19 個の GV 期由来胚 (分割期胚 16 個、胚盤胞 3 個) を 18 人の患者に移植した結果、3 症例が妊娠に至り、3 児の健児出産が確認された。このように、GV 期卵の rescue IVM は、核仁周囲のクロマチン集積により GVBD を予想し、タイムラプス観察を通じて極体放出から ICSI までの時間を考慮することで、良好な結果が得られる可能性が示唆された。この研究結果は、これまで多くの場合廃棄となっていた GV 期卵を有効に利用する判断材料となり、生殖補助医療の進展に寄与することが期待される。

第 1 章

ヒト GV 期卵核仁周囲のクロマチン集積について

1.1 緒言

生殖補助医療技術（ART）において、卵子の品質に関する単純な形態学的予測因子の探索は重要な課題である。そのような予測因子のひとつとして、GV 期卵（卵核胞期）における核仁周辺のクロマチン集積の形態がある。ヒトの GV 期卵子には核仁周囲にクロマチン集積はあるが、マウスの GV 期卵子には核仁周囲にクロマチン集積がないことが報告されている（Otsuki J, et al. 2007）。GV 期卵は、形態学的、分子生物学的レベルの両方で、全体的なクロマチン再配列によって特徴づけられる（Bogolyubova I, et al. 2020）。ヒトを含むいくつかの哺乳類では、GV 内のクロマチンの再配列は、核小体様体（NLB: the nucleolus-like body）、あるいは最近では非定型核小体（ANu: the atypical nucleolus）と呼ばれる転写的に不活性な核仁へと変化することと一致している（Fulka JJ, et al. 2019）。この場合、凝縮したクロマチンは、ANu の周辺に多かれ少なかれコンパクトなリングを形成し、カリオスフィア（karyosphere）と呼ぶ場合がある（Parfenov V, et al. 1989; Bogolyubov D S, et al. 2018）。冒頭で述べたが、ヒトの GV 期卵子には核仁周囲にクロマチン集積はあるが、その GV 期卵におけるクロマチン配置の明確な分類はない。ヒト GV 期卵で見られるクロマチンの主な構造パターンは以下の通りである（Combells, et al. 2002; Miyara F, et al. 2003）。(i)核様体（ANu 周囲リング）が観察されず、クロマチンは GV を通して分散しており、いくつかのヘテロクロマチンの塊のみが ANu の近傍と外側の両方に位置している。(ii)ANu はクロマチンによって不完全に縁取られている。(iii)ANu はクロマチンに完全に取り囲まれているが、いくつかのクロマチンの塊は ANu 周囲リングの外側に散在している。(iv)すべてのクロマチンが GV 内で ANu を取り囲み、コンパクトで整った核様体を形成している。胞状卵胞から採取

されたヒト卵母細胞の約 50%は、クロマチンがかなり凝縮している (Sanchez F, et al. 2015)。核形質の状態、GV の位置、核外被の形状、卵子の大きさなど、広く用いられている形態学および形態計測的指標は、クロマチンの集積 (Escrich L, et al. 2010) と関連しており、IVM 周期における卵子の質の潜在的なマーカーになりうることを示唆されている。一方、マウス GV 期卵の場合は核仁周囲のクロマチンリングは存在するが、ヒトに見られるようなクロマチンの集積はみられず、クロマチンは核内に散乱した状態で存在する (Miyara F, et al. 2003)。また、ヒト GV 期卵の場合、卵核崩壊 (GVBD) は核仁の崩壊が最初に起こり、核仁周囲に集積していたクロマチンが一塊 (染色体凝集塊) となり、その後に核膜の崩壊が起こるが、マウス GV 期卵の場合は核仁と核膜崩壊がほぼ同時に起こる (Otsuki et al., 2007)。染色体の凝集はヒト以外にはブタでも報告され (Bui et al., 2004)、染色体は凝集することでクロマチンの凝縮および遺伝子転写の調節が行われていることが報告されている。

第 2 章

ヒト GV 期卵核仁周囲のクロマチン集積と核成熟の関係

2.1 緒言

卵母細胞の発生過程には2段階の減数分裂があり、その結果、受精とさらなる接合体の発生に適した倍数体雌性配偶子が形成される (Farini D, et al. 2022)。減数分裂期の二倍体期は、卵母細胞の核が卵核胞期 (GV 期) と呼ばれる段階であり (Palmerini M G, et al. 2022)、卵母細胞が成熟へと移行するために極めて重要である。卵母細胞の成熟は、細胞質因子と核因子が共存する複雑なプロセスである (Jiang Y, et al. 2023)。GV 期と卵核胞崩壊 (GVBD) の後、2つの減数分裂期が卵子成熟の重要な段階である。その後、第一極体 (PB1) の放出を伴う MI 期 (metaphase I) と、第二極体 (PB2) の放出によって決定される MII 期 (metaphase II)。それぞれの段階は、雌性配偶子が発育能力の最適な状態に到達することを可能にするため、卵子にとって同様に重要である (Straczynska P, 2022)。しかし、卵母細胞が主に受精能力を獲得し、さらに将来の胚へと適切に発育するのは GV 期である (Conti M, et al. 2018)。卵母細胞の成熟に実質的に関与する核および細胞質因子と構造の両方が作られ、蓄積され、さらなる発生事象に統合される (Coticchio G, et al. 2015)。減数分裂の進行に影響する決定因子のいくつかはすでに解明されているが、GV 期の発生停止に関連する他の因子はまだ定義されていない (Sirait B, et al. 2021; Ozturk S, et al. 2022)。GV 期卵は、形態学的、分子生物学的レベルの両方で、全体的なクロマチン再配列によって特徴づけられる (Bogolyubova I, et al. 2020)。ヒトを含むいくつかの哺乳類では、GV 内のクロマチンの再配列は、核仁が核小体様体 (NLB: the nucleolus-like body)、あるいは最近では非定型核小体 (ANu: the atypical nucleolus) と呼ばれる転写的に不活性な核仁へと変化することと一致している (Fulka JJ, et al. 2019)。この場合、凝縮したクロマチンは、ANu の周辺に多かれ

少なかれコンパクトなリングを形成し、核球 (karyosphere) と呼ばれることもある (Parfenov V, et al. 1989; Bogolyubov D S, et al. 2018)。

GVBD と PB1 と PB2 の放出の間に、ミトコンドリア、ゴルジ複合体、小胞体などのオルガネラの再配置とリモデリングのプロセスが起こる (Coticchio G, et al. 2015; Mao L, et al. 2014)。このことは、最新のタイムラプス技術を使って鮮明に示されている (Yamochi T, et al. 2016)。卵子成熟過程におけるこのような再配列の機能的意義は、完全には明らかになっていない。卵子構造の変化が、胚の成熟とさらなる発育に関与していると考えられている。例えば、マウス (Bellone M, et al. 2009) とヒトの卵子 (Levi M, et al. 2013) における GV の中心位置は、卵子が減数分裂を再開する傾向と正の相関があり、細胞骨格の機能状態に依存している (Almonacid M, et al. 2015)。

現在のところ、GV 期卵とそれに続く胚の初期品質と発生能を評価する統一的な方法はない。しかし、このような統合的アプローチは、不妊治療の見通しを立てる上で有用であろう。MII 期卵の成熟卵母細胞の形態学的パラメータとともに、GV 期卵のパラメータにおけるいくつかの変化は、おそらくホルモン刺激に対する反応の質を評価する基準として役立つであろう (Reprod Biomed Online. 2017)。

完全に発育した GV 卵子は、3mm を超える卵胞から分離された場合、MII まで自然成熟することが可能である (Escrich L, et al. 2011)。刺激周期 (Escrich L, et al. 2018) および非刺激 IVM (Gremeau A, et al. 2012; Das M, et al. 2014) の両方で、体外で成熟した卵子の着床レベルおよび胚盤胞の量と質は、従来の IVF 周期と比較して低いことが判明した。体外で成熟した卵子の割合が低く、さらに胚の質が低いことから、胞状卵胞から採取された卵子のかなりの割合が減数分裂不能である。

よりコンパクトなクロマチンを持つ GV 卵母細胞は発育能力が高いと思われる。例え

ば、核球が完全に発達したブタの卵子は、体外成熟後の体外受精に適している (Lee J, et al. 2019)。反対に、主に拡散したクロマチンを持つマウス GV 卵母細胞は受精可能であるが、その後 *in vitro* では胚盤胞期に達しない (Monti M, et al. 2013)。さらに、同様のクロマチンパターンを持つヒトの卵母細胞は、細胞質変性のいくつかの超微細構造的徴候を示す (Monti M, et al. 2017)。卵子形成におけるクロマチンリモデリングの欠陥もまた異数性を引き起こし、着床前後の発生停止、着床障害、自然流産を引き起こすことが実験的に示されている (Baumam C, et al. 2010)。

よって、まず第一に GV 期卵核仁周囲のクロマチン集積の有無と核成熟との関連を調べた。

2.2 対象と方法

2.2.1 対象

2021 年 4 月 15 日から 2022 年 12 月 31 日にかけて、金沢たまごクリニックにおいて成熟卵獲得を目的とした採卵を行い、GV 期卵子を有する 232 名 (35.1 ± 5.1 歳) の 285 周期を対象とした。なお、PCO 症例を除外した。また、体外受精を施行する前に、学会・論文発表などについては匿名性を保ち個人情報保護について説明し、患者の同意を文書にて得ている。

2.2.2 採卵

卵巣刺激法は、クロミフェン（富士製薬株式会社）と hMG（フェリング株式会社）で行った。卵胞発育とホルモン値（E2,LH）を管理し、主席卵胞径が 18 mm を超えた時点で hCG を 5000 単位またはスプレキュアを投与し、36 時間後に経膈超音波ガイド下に採卵を行った。回収した卵子は Universal IVF Medium（Origio）中で採卵から 2 ～3 時間の前培養を行った。その後、ヒアルロニダーゼ（株式会社北里コーポレーション）により卵丘細胞-卵母細胞複合体（cumulus-oocyte complex: COC）を除去し、卵子の裸化処理を行った。

2.2.3 タイムラプス解析

すべての GV 期卵を Embryo Scope Flex (VitroLife) を用いて継続観察した。タイムラプス画像は 11 個の焦点面で 10 分ごとに自動的に撮影された。各卵子を SAGE 1-Step 培地 (Origio) または GX-TL 培地 (VitroLife) に培養した。また、卵子、胚の培養は 37°C、CO₂: 6%、O₂: 5% の気相条件下で培養を行った。核小体周囲のクロマチン集積の有無を記録し、GVBD との関係を解析した。GV 期卵子の面積も、Embryo Scope Flex タイムラプスシステム搭載のスケールを用いて測定し、GVBD との関係を解析した。また、採卵後 48 時間までタイムラプス観察を継続し、第一極体放出 (1PB) つまり M II 期卵到達まで継続的に観察を行った。

この研究は、岡山大学 (承認番号: 研 2205-11) の倫理委員会によって承認された。

2.2.4 統計解析

ロジスティック回帰分析を用いて、核小体周囲にクロマチンの集積を確認できた GV 期卵子と確認できなかった GV 期卵子の GVBD の発生を調べ、比較した。独立変数には、患者の年齢と本研究で使用した 2 つの異なる培養液を用いた。GVBD の発生と核小体周囲のクロマチンの集積との間に有意な関連があるかどうかを判定するためにカイ二乗検定を用いた。GV 期卵子の GVBD 発生と卵母細胞面積とのカットオフ値を決定するために、ROC 曲線分析を行った。P 値が 0.05 未満を統計的に有意とみなした。統計解析には、R (R Foundation for Statistical Computing) をベースとしたオープンソースの統計解析ソフトウェアである EZR ソフトウェア (自治医科大学埼玉医療センタ

一) を使用した。

2.3 結果

核小体の周囲にクロマチンの集積が確認できた GV 期卵子と確認できなかった GV 期卵子を図 4 に示す。合計で 319 個の GV 期卵子が得られた。このうち、裸化処理後の残骸としてわずかに付着している卵丘細胞の存在により、クロマチンの集積が曖昧な GV 期卵子 45 個を除外した 274 個の GV 期卵子が研究の対象となった。核小体周囲のクロマチンの集積率は 88.0% (241/274) であった。GV 期卵子 274 個のうち、88.0% (241/274 個) が GVBD を観察できた。核小体の周囲にクロマチンの集積が確認できた GV 期卵子の GVBD 率は 91.7% (221/241)、MII 期卵到達率は 83.8% (202/241) であり、核小体の周囲にクロマチンの集積が確認できなかった GV 期卵子の GVBD 率 21.2% (7/33)、MII 期卵到達率 15.2% (5/33) に比べて有意に高かった (図 7)。

ロジスティック回帰分析では、患者の年齢および 2 種類の培養液で調整した結果、核小体の周囲にクロマチンの集積を確認できた GV 期卵子における GVBD のオッズ比は 41.8 (95%CI : 15.9-110.0) であり、クロマチンの集積を確認できた GV 期卵子に比べて有意に高かった ($p < 0.001$) (表 1)。

核小体の周囲にクロマチンの集積の有無による面積のカットオフ値は $10,314 \mu\text{m}^2$ であった (AUC : 0.688、95%CI : 0.581-0.795)。GV 期卵母細胞の大きさがカットオフ値以上の場合の核小体の周囲にクロマチンの集積を確認できた割合は 96.3% (78/81) であったが、カットオフ値未満の場合は 84.0% (105/125) であった。カットオフ値以下とカットオフ値以上では、統計的に有意な差がみられた ($p = 0.006$) (図 9-A)。GVBD については、GVBD のある卵子とない卵子の面積の差のカットオフ値は $10,335 \mu\text{m}^2$ であった (AUC: 0.663, 95% CI: 0.569-0.756)。GV 期卵母細胞の大きさがカットオフ

値以上の場合、GVBD 率は 94.7% (71/75) 以上であったのに対し、GV 期卵母細胞の大きさがカットオフ値未満の場合、GVBD 率は 77.1% (101/131) であった ($p < 0.001$) (図 9-B)。

2.4 考察

本研究では、核小体周囲にクロマチンの集積を確認できた GV 期卵子が MII 期に達する割合が高いことが判明した。さらに、採卵時の卵細胞質面積が $10,314 \mu\text{m}^2$ 以上の GV 期卵子にクロマチン集積の発生率が高いことが判明し、核小体周囲のクロマチン集積と GV 期卵子の卵細胞質成熟との相関が示唆された。これは、ヒトの GV 期卵において、核小体周囲のクロマチンの集積が GVBD の進行に重要であり、核小体周囲のクロマチンの集積を確認できなかった GV 期卵では進行が低いことを示した。したがって、ヒトの GV 期卵子が GVBD を開始するためには、核小体周辺でクロマチンが集積する必要があることが示唆された。

最近、発表された Salmov らの研究では、クロマチン集積をクラス A、クラス B、クラス C の 3 種類に大別した (Daniil Salimov, et al. 2023)。GV 内にクロマチンの塊があるものをクラス A、ANu 周囲をすべてのクロマチンが集積したものをクラス C、クラス A と C の中間をクラス B。少なくとも 1 つはクロマチンの塊が常に ANu に隣接して見られたが、異なるクロマチンパターンが観察され、それらは Miyara ら (Miyara F, et al. 2003) によって提唱された分類によると、クラス A、B、C の卵母細胞で観察されたものに最も近い。同時に、Combells ら (Combells, et al. 2002) によると、D クラスに特徴的な「分散したクロマチンの糸」と GV 内のクロマチンの塊を区別することはできなかった。Salmov らの研究では、クラス C の卵母細胞が最も多く、クラス A の卵母細胞が最も少なかった。クラス B および C の GV 期卵は、MII 期卵まで成熟した卵母細胞でより頻繁に検出された。成熟に入ったが MI 期で停止した卵母細胞は、クラス A に分類されることが多かった。同時に、クラス C の卵母細胞に関しては、追加培養後の

核相に有意差は見られなかった。対照的にクラス B では、MII 期卵まで到達した群は GVBD が起こらなかった群よりも有意に高く確認できた。クラス A では、MII 期卵まで到達した群と GVBD が起こらなかった群、および MII 期卵まで到達した群と MI 期で停止した群で有意差があるが、MI 期で停止した群と GVBD が起こらなかった群には有意差はなかった。また、すべてのクラスの卵母細胞で高い異数性率が認められた。クロマチン集積が最も低いクラス A の卵母細胞では、異数性の頻度がクラス B および C の卵母細胞よりもわずかに高いようであったが、これらの差は統計学的に有意ではなかった。Salmov の研究をまとめると、減数分裂をうまく完了できないヒト GV 期卵は、主に核仁へのクロマチン集積のレベルが低い結果となっており、我々の結果と一致している。さらにクロマチン凝縮のレベルは、*in vivo* で光学顕微鏡を用いて決定することができることから、この形態学的特性は、レスキューIVM プログラムにおいて最も質の高い GV 期卵を選択するための有望な方法であることが頷ける。

本研究では、卵子を他の顕微授精受精卵と同じタイムラプスディッシュで培養し、タイムラプス観察を行ったため、市販の IVM 培地は使用しなかった。IVM は基本的に卵巣刺激を行わずに優性卵胞から採取した卵子に対して行われる。これらの卵子では、細胞質の成熟を促進するために、卵丘細胞は除去されない。しかし、本研究の卵子は顕微授精の前に裸化されたため、裸化された状態の GV 卵子を MII 期になるまで培養し、レスキューIVM を行った。本研究では IVM 培地を使用していないため、IVM 培地を使用する場合には、さらなる検討が必要である。

第 3 章

rescue IVM 後の最適 ICSI 施行時間の検討

3.1 緒言

生殖補助医療は、不妊症の患者に家族を築く機会を提供するために始まりました。長年にわたる基礎的な研究で体外成熟（In Vitro Maturation : IVM）は、生殖補助医療の歴史の中で、その臨床利用が患者と医師の希望をより広げ豊かにする段階に達している。ヒト卵母細胞のIVMに関する研究では、核の成熟を確立し、約36時間でM II期卵到達が示され（Edwards RG, 1965）、体外受精にも成功した（Edwards RG, et al. 1969）。その後、卵子提供による症例であるが、卵巣刺激をされていない卵胞から採卵された未熟卵子をIVM後に生児が得られている（Cha KY, et al. 1991）。しかし、IVM分野の課題は、IVMによる卵子が体内で成熟した卵子と比較して発育能力が低いことである。この課題は、ヒトよりも広く研究されている他の哺乳類においても同様に、すべての哺乳類において卵子が卵胞から取り出されると、その後の発育能力は制限される（Loneragan P, et al. 2016; Luciano AM, et al. 2018）。IVMでは、未成熟卵子を卵胞から取り出すことは避けられず、成熟卵子を得て行う通常のIVFとの結果も大きく変わってくる。

また、IVMとrescue IVMが混同されている現状がある。IVMは調節卵巣刺激を行わない小卵胞やPCO症例などに対して、未成熟卵を獲得し、体外で成熟させることを目的とした採卵である。rescue IVMは調節卵巣刺激を行ない、成熟卵子獲得を目的とした採卵で、未成熟卵子が得られ、成熟卵子まで追加培養を行うものである。IVMは広く研究されているが、それに対してrescue IVMに関する文献は少なく、2021年のFertility and Sterilityでは安全性の面から注意して実施されるべきという文献もある。しかし、これは実施件数が少ないことから述べられており、実際にIVM後にインプリンティングエラーが増加することは示されていないこと（Eun Jeong, et al. 2019）や新生児の健康およ

び発達結果は少数の例で報告された範囲では通常のIVFで生まれた子供たちと異なるとされていない (Mostinckx L, et al. 2019; Yu EJ, et al. 2019)。

紡錘体は、卵子や精子の形成過程で起きる減数分裂において、染色体の正確な分配と細胞の正確な形成を行う極めて重要な機能を果たしている。生殖補助医療でのICSI施行時に紡錘体の位置を可視化して行うことは広く一般的であり、紡錘体を可視化できた卵子は受精率をはじめとするその後の分割率や胚盤胞到達率が高率である報告も多数ある (CG Petersen, et al. 2008)。また、採卵時M I 期卵を調べた研究では、M I 期からM II 期への移行期後に約75~90分は紡錘体の構築に時間を要し、さらに第一極体放出後 (M II 期卵到達) に紡錘体が約40~60分間完全に消失すること (Montag, et al. 2006) を示しているため、少なくとも一部のヒトMII卵子での紡錘体の不在が、単なる細胞の異常ではないことを示唆している。したがって、紡錘体が見られない卵子の受精率が劣っている場合、ICSI施行のタイミングが誤っている可能性があることを示しているかもしれない。加えて、採卵時GV期卵の研究は非常に少なく、採卵時M I 期卵と同様の結果で得られるとは限らない。

以上のことから、本研究では採卵時GV期卵において、rescue IVM後の最適ICSI施行時間を探ることを目的とする。

3.2 対象と方法

前章で得られたGV期卵の内、MII期卵まで到達した卵子（第1極体放出が確認できた卵子とした）があった125名の患者（ 35.5 ± 5.2 歳）、153周期から得られた182個にICSIを施行した。ICSIには、IX73-SLIMSI（EVIDENT社）を用い、紡錘体の形成もICSI施行の際に確認した。第1極体放出からICSI施行までの時間を計測し、最適ICSI施行時間を検討した。

また、採卵時にMI期卵であった卵子があった121名の患者（ 35.9 ± 5.7 歳）、103周期から得られた145個に対しても同様にICSIを施行し、採卵時GV期卵であったICSI施行胚と比較した。

統計解析には、第1極体放出からICSI施行の最適な時間を探るために4区分（200分未満、200分以上400分未満、400分以上600分未満、600分以上）に分けて、カイ二乗検定を用いて比較した。 p 値が0.05未満を統計的に有意とみなした。

3.3 結果

第一極体放出からICSI施行の最適な時間を探るために4区分(200分未満、200分以上400分未満、400分以上600分未満、600分以上)に分けて検討した。GV期卵由来のICSI施行の受精率はそれぞれ200分未満で66.7% (8/12)、200分以上400分未満で68.0% (53/78)、400分以上600分未満で84.9% (56/66)、600分以上で65.4% (17/26)であった(図10)。200分以上400分未満と400分以上600分未満の間 ($p = 0.020$)、および400分以上600分未満と600分以上の間 ($p = 0.048$) で、いずれも400分以上600分未満で有意に高い結果となった。採卵時にM I 期卵であった卵子のICSI受精率はそれぞれ200分未満で46.5% (20/43)、200分以上400分未満で81.8% (18/22)、400分以上600分未満で76.2% (16/21)、600分以上で67.8% (40/59)であった(図14)。200分未満は他の3区分に対して有意に低い受精率となった ($p < 0.05$)。

また、ICSI施行時に紡錘体の有無で受精率を比較した結果、GV期由来では紡錘体有で76.3%(122/160)、紡錘体無で54.5%(12/22)となり、M I 期由来では紡錘体有で70.6%(84/119)、紡錘体無で34.6%(9/26)となり、いずれも紡錘体が可視できた卵子の受精率は有意に高かった ($p < 0.05$) (図12-B)。さらに、紡錘体の可視とICSI施行時間のカットオフ値は、GV期由来では282分 (AUC: 0.638, 95% CI: 0.455-0.838) (図13)、M I 期由来では186分 (AUC: 0.788, 95% CI: 0.692-0.840) となった(図16)。このカットオフ値でそれぞれを分けて可視率を比較した結果、GV期由来(91.8% vs 72.2%)とM I 期由来(92.6% vs 51.4%)ともにカットオフ値以上で有意に高い結果となった ($p < 0.05$) (図13,16)。

GV期卵由来の19個の胚(分割期胚16個、胚盤胞3個)を18人の患者に移植し、3症例が

妊娠・出産に至り、3児の健児が得られた。M I 期卵由来の16個の胚（分割期胚11個、胚盤胞5個）を16人の患者に移植し、2症例で妊娠を認め、1症例で1児が出産まで至った。また、GV期卵由来とM I 期卵由来の胚盤胞移植で出産まで至ったのはそれぞれ1症例ずつで、その胚評価システムのスコアリングは、KIDSにおいてGV期卵由来で8.6、M I 期卵由来で4.9、iDAにおいてGV期卵由来で7.9、M I 期卵由来で5.5となった。

3.4 考察

採卵時M I 期卵の他の研究において、裸化した卵子の追加培養を4-6時間行なった後にICSI施行した結果が採卵時M II 期卵と同等である (Shu Y et al., 2006)。本研究での採卵時M I 期卵は、200分以上400分未満 (3時間20分から6時間40分) で他の3区間よりも有意に高い結果となり、Shuらの研究に同意できる結果となった。しかし、Shuらの研究では採卵時M I 期卵が主であり、GV期卵はサンプル数も少なく、正常受精を得られていなかった。これは、本研究で第極体放出後400分以上600分未満 (6時間40分から10時間) のICSI施行で高い受精率の結果が得られたことから、採卵時の卵子成熟ステージによって至適ICSI施行ウィンドウが変わってくると示唆できる。さらに紡錘体可視でのカットオフ値でも採卵時GV期卵は、採卵時M I 期卵よりも約100分 (282分 vs 186分) 遅い結果となった。本研究の結果から調節卵巣刺激周期における採卵時GV期卵は、第一極体放出後6時間40分から10時間の間で紡錘体を確認後のICSI施行で高い受精率が望めることが示唆された。

当院の採卵時M II 期卵由来胚のKIDSとiDAのスコアと生児獲得から算出したROC曲線解析を行なったカットオフ値は、KIDSが5.4 (AUC:0.635, 95%CI:0.563-0.707)、iDAが7.8 (AUC:0.608, 95%CI:0.536-0.679) となった。GV期卵由来胚は両スコアともカットオフ値を上回っていたが、M I 期卵由来胚は両スコアともカットオフ値を下回った。これはGV期卵由来胚は5日目に胚盤胞到達し、培養士が評価するガードナー分類は3AAであったのに対し、M I 期卵由来胚は6日目に到達で4BCであったため、3つの評価法で一致していると考えられる。本研究で得られた生児4名に遺伝子疾患は認められない。

本研究において採卵時に採取されるGV期卵は第一極体放出からICSIの至適ウィンドウまでに時間を要する事が判明した。GV期卵のrescue IVMはタイムラプス観察により極体放出からICSIまでの時間を考慮することで挙児獲得が可能であると考えられる。

第 4 章

総括

2021 年、日本の体外受精による出生児数は歴史的な最高水準となり、6 万 9797 人が誕生し、その出生率は 11.6 人に 1 人 (8.6%) に上昇した。我が国においては、晩婚化や晩産化が進むなかで少子化が深刻な課題となっており、これに対処する手段として体外受精の役割が年々拡大している。しかしながら、体外受精における出産率は 20%程度にとどまり、成熟卵の獲得を目的とした調節卵巣刺激後に採卵された卵子の約 15-30%が未成熟な MI 期または GV 期の卵子であるという課題が存在する。特に GV 期卵は卵核胞崩壊 (germinal vesicle breakdown: GVBD) が起こらず核成熟が停止することがあり、更には核成熟のタイミングが不定であること、また受精後の胚発生率が低いことから、GV 期卵は廃棄となることが多いのが現状である。本研究では、GV 期卵の特性と ICSI 施行の最適タイミングに焦点を当て、後方視的解析を通じて採卵から受精までのプロセスを詳細に検討した。GV 期卵の動態解析には、経時的自動連続観察システム (Embryo Scope Flex, VitroLife 社) を使用し、調節卵巣刺激法のうち低刺激な mild stimulation 法を用いて成熟卵獲得を目的とした採卵時に得られた 274 個の GV 期卵に対する後方視的解析を行った。解析の結果、GV 期卵核仁周囲のクロマチン集積率は 88.0% (241/274) であり、この集積が確認された GV 期卵子では GVBD 率が 91.7% (221/241)、MII 期卵到達率が 83.8% (202/241) であったが、クロマチン集積のない GV 期卵子では GVBD 率が 21.2% (7/33)、MII 期卵到達率が 15.2% (5/33) に過ぎず、有意に低い結果が得られた。卵細胞質面積においてクロマチン集積の有無によるカットオフ値は $10,314\mu\text{m}^2$ であり、この値以上の GV 期卵では核仁周囲のクロマチン集積が高確率で起こることが示唆された。さらに ICSI 施行において、GV 期卵由来成熟卵子の受精率は ICSI 施行時間が 400 分以上 600 分未満の区間で有意に高いことが明らかになった。また、GV 期卵由来成熟卵は ICSI 施行時において、第一極体放出後から

282 分以上経過後に紡錘体が高率で確認でき、その後の ICSI 施行で高い受精率を期待できることが示唆された。一方、MI 期卵由来成熟卵の ICSI 施行の場合は、186 分以上経過後であり、GV 期卵は MI 期卵と比較して、ICSI 施行時の至適タイミングが遅い結果が得られた。これらの結果から、採卵時の成熟度がその後の成熟速度に影響を与え、最適 ICSI 施行時間に差が生じる可能性が示唆された。19 個の GV 期由来胚（分割期胚 16 個、胚盤胞 3 個）を 18 人の患者に移植した結果を調べたところ、3 症例が妊娠・出産に至り、3 児の健康な成長が確認された。これらのことから、GV 期卵の rescue IVM は、核仁周囲のクロマチン集積により GVBD を予測し、タイムラプス観察を通じて極体放出から ICSI までの時間を考慮することで、良好な結果が得られる可能性が示唆された。本研究結果は、これまで多くの場合廃棄となっていた GV 期卵を有効に利用する判断材料となり、生殖補助医療の進展に寄与することが期待される。

謝辞

本研究の遂行ならびに本論文の作成にあたり、3年間懇切に御指導御鞭撻いただきました岡山大学環境生命科学研究科生殖補助医療学研究室の大月純子准教授に謹んで感謝申し上げます。助言や激励、博士課程への道を繋いでくださった岡山大学環境生命科学研究科生殖補助医療学研究室の田崎秀尚助教には心より感謝申し上げます。また、日頃のゼミや来校した際に多くの面でお世話になりました岡山大学環境生命科学研究科生殖補助医療学研究室の皆様には深く感謝いたします。

学業支援や患者様への説明などのあらゆる面で支えていただいた金沢たまごクリニックの道倉康仁先生、上林大岳先生に心より感謝申し上げます。

研究面ならびに研究面以外のサポートと日ごろから多くの助言とご指導を頂いた岡山大学大学院環境生命科学研究科動物生殖生理学の木村康二教授、動物応用微生物学の森田英利教授、動物遺伝学の辻岳人准教授には深く感謝申し上げます。

最後に、長きに渡り学生生活の支援ならびに本研究の完遂に集中させていただいた金沢たまごクリニック培養室の橋爪敦子氏、前多亜紀子氏、西出博美氏、幸松美佐氏、谷内文佳氏、湊谷真悠子氏、竹内祐子氏、古木沙梨奈氏および丹羽幸子氏（2023年2月まで在籍）と小西庸平氏（2023年4月まで在籍）に心から感謝いたします。

2024年3月

参考文献

A Ferrer-Vaquer, M Barragán, A Rodríguez, R Vassena. Altered cytoplasmic maturation in rescued in vitro matured oocytes. Human Reproduction, Vol.34, No.6, pp. 1095–1105, 2019. <https://doi:10.1093/humrep/dez052>

A Le Du, I J Kadoch, N Bourcigaux, S Doumerc, M-C Bourrier, N Chevalier, R Fanchin, R-C Chian, G Tachdjian, R Frydman, N Frydman. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. Human Reproduction. 2005;20(2):420–424. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh603>

Aijun Zhang, Bufang Xu, Yijuan Sun, Xiaowei Lu, Zhihong Niu, Qian Chen, Yun Feng, Chen Xu. The effect of human cumulus cells on the maturation and developmental potential of immature oocytes in ICSI cycles. J Assist Reprod Genet. 2012;29:313–319 <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9712-3>

Almonacid M, Ahmed WW, Bussonnier M, Mailly P, Betz T, Voituriez R, Gov NS, Verlhac MH. Active diffusion positions the nucleus in mouse oocytes. Nat Cell Biol. 2015;17:470–479. <https://doi.org/10.1038/ncb3131>

Azita Faramarzi, Mohammad Ali Khalili, Mehrdad Soleimani. First successful pregnancies following embryo selection using Time-lapse technology in Iran: Case report. Iranian Journal of Reproductive Medicine. 2015;13(4):237-242.

Azita Faramarzi, Mohammad Ali Khalili, Sareh Ashourzadeh, Maria Grazia Palmerini. Does rescue in vitro maturation of germinal vesicle stage oocytes impair embryo morphokinetics development?. *Zygote*. 2018;26:430-434. <https://doi.org/10.1017/S0967199418000515>

Barbara Lawrenz, Elena Labarta, Human Fatemi, Ernesto Bosch. Premature progesterone elevation: targets and rescue strategies. *Fertil Steril*. 2018;109(4):577-582. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.02.128>

Baumann C, Viveiros MM, De La Fuente R. Loss of maternal ATRX results in centromere instability and aneuploidy in the mammalian oocyte and pre-implantation embryo. *PLoS Genet*. 2010;6:e1001137. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001137>

Bellone M, Zuccotti M, Redi CA, Garagna S. The position of the germinal vesicle and the chromatin organization together provide a marker of the developmental competence of mouse antral oocytes. *Society for Reproduction and Fertility*. 2009;138:639–643. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0230>

Bo Huang, Xinling Ren, Li Wu, Lixia Zhu, Bei Xu, Yufeng Li, Jihui Ai, Lei Jin. Elevated Progesterone Levels on the Day of Oocyte Maturation May Affect Top Quality Embryo IVF Cycles. *PLOS ONE*. 2016;11(1):e0145895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145895>.

Bogolyubov D. Karyosphere (karyosome): A peculiar structure of the oocyte nucleus. *Int. Rev. Cell Mol Biol*. 2018;337:1–48.

Bogolyubova I, Bogolyubov D. Heterochromatin morphodynamics in late oogenesis and early embryogenesis of mammals. *Cells*. 2020;9:1497. <https://doi.org/10.3390/cells9061497>

Catherine Patrat, Aida Kaffel, Lucie Delaroche, Juliette Guibert, Pierre Jouannet, Sylvie Epelboin, Dominique De Ziegler, Jean-Philippe Wolf, Patricia Fauque. Optimal Timing for Oocyte Denudation and Intracytoplasmic Sperm Injection. *Obstetrics and Gynecology International*. 2012;403531. <https://doi.org/10.1155/2012/403531>.

Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Hum Reprod Update*. 1998;4:103–20. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.2.103>.

Christians E, Boiani M, Garagna S, Dessy C, Redi CA, Renard JP, Zuccotti M. Gene expression and chromatin organization during mouse oocyte growth. *Dev Biol*. 1999;207(1):76–85. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.9157>.

Combelles C.M.H, Cekleniak N.A, Racowsk, C, Albertini D.F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Hum Reprod*. 2002;17:1006–1016. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.4.1006>

Conti M, Franciosi F. Acquisition of oocyte competence to develop as an embryo: integrated nuclear and cytoplasmic events. *Hum Reprod Update*. 2018;24(3):245–66. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx040>.

Coticchio G, Dal Canto M, Renzini M M, Guglielmo M C, Brambillasca F, Turchi D, Novara PV, Fadini R. Oocyte maturation: Gamete-somatic cells interactions, meiotic

resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Hum Reprod Update*. 2015;21:427–454. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv011>

Dan-Yu Qin, Hua-Hua Jiang, Qing-Yun Yao, Wen Yao, Xiao-Qiong Yuan, Yi Wang, Tao-Ran Deng, Yao-Yao Du, Xin-Ling Ren, Na Guo, Yu-Feng Li. Rescue in vitro maturation may increase the pregnancy outcomes among women undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Frontiers in Endocrinology*. *Front. Endocrinol.* 2022;13:1047571. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1047571>

Daniela Nogueira, Jean Clair Sadeu, Jacques Montagut. In Vitro Oocyte Maturation: Current Status. *Reproductive Medicine*. 2012;30:199-213. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1311522>.

Daniil Salimov, Tatiana Lisovskaya, Junko Otsuki, Alexandre Gzgzryan Irina Bogolyubova, Dmitry Bogolyubov. Chromatin Morphology in Human Germinal Vesicle Oocytes and Their Competence to Mature in Stimulated Cycles. *Cells*. 2023;12:1976. <https://doi.org/10.3390/cells12151976>

Das M, Son WY, Buckett W, Tulandi T, Holze H. In-vitro maturation versus IVF with GnRH antagonist for women with polycystic ovary syndrome: Treatment outcome and rates of ovarian hyperstimulation syndrome. *Reprod Biomed Online*. 2014;29:545–551. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.07.019>.

De Vos A, Van de Velde H, Joris H, Van Steirteghem A. In vitro matured metaphase-I oocytes have a lower fertilization rate but similar embryo quality as mature metaphase-II oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*. 1999;14:1859– 63.

<https://doi.org/10.1093/humrep/14.7.1859>.

De Vos M, Grynberg M, Ho TM, Yuan Y, Albertini DF, Gilchrist RB. Perspectives on the development and future of oocyte IVM in clinical practice. *J Assist Reprod Genet.* 2021;38(6):1265–80. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02263-5>.

Debey P, Szöllösi MS, Szöllösi D, Vautier D, Grousse A, Besombes D. Competent mouse oocytes isolated from antral follicles exhibit different chromatin organization and follow different maturation dynamics. *Mol Reprod Dev.* 1993;36(1):59–74. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360110>.

Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, Yovich JL. Birth from cryopreserved embryos following in vitro maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1997;12(5):1056–8. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.5.1056>.

Escrich L, Galiana Y, Grau N, Insua F, Soler N, Pellicer A, Escrivá MJ. Do immature and mature sibling oocytes recovered from stimulated cycles have the same reproductive potential? *Reprod Biomed Online.* 2018;37(6):667–76. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.08.023>.

Escrich L, Grau N, Meseguer M, Pellicer A, Escrivá MJ. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril.* 2010;93:2557–2564. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.077>

Escrich, L, Grau N, Mercader A, Rubio C, Pellicer A, Escrivá MJ. Spontaneous in vitro

maturation and artificial activation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *J Assist Reprod Genet.* 2011;28:111–117. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9493-5>

ESHRE Special Interest Group of Embryology and Alpha Scientists in Reproductive Medicine. The Vienna consensus: Report of an expert meeting on the development of ART laboratory performance indicators. *Reprod Biomed Online.* 2017;35:494–510 <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2017.06.015>

Fulka JJ, Benc M, Loi P, Langerova A, Fulka H. Function of atypical mammalian oocyte/zygote nucleoli and its implications for reproductive biology and medicine. *Int J Dev Biol.* 2019;63:105–112. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180329jf>

Farini, D, De Felici M. The beginning of meiosis in mammalian female germ cells: A never-ending story of intrinsic and extrinsic factors. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23:12571. <https://doi.org/10.3390/ijms232012571>.

Gremeau AS, Andreadis N, Fatum M, Craig J, Turner K, McVeigh E, Child T. In vitro maturation or in vitro fertilization for women with polycystic ovaries? A case–control study of 194 treatment cycles. *Fertil Steril.* 2012;98:355–360. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.04.046>.

Harasimov K, Uraji J, Mönnich EU, Holubcová Z, Elder K, Blayney M, Schuh M. Actin - driven chromosome clustering facilitates fast and complete chromosome capture in mammalian oocytes. *Nat Cell Biol.* 2023;25(3):439–52. <https://doi.org/10.1038/s41556-022-01082-9>.

Hassan Aly Hassan. Cumulus Cell Contribution to Cytoplasmic Maturation and Oocyte Developmental Competence In Vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2001;(18)10:539-543. <https://doi.org/10.1058-0468/01.1000-0539>

Ho-Joon Lee, David H Barad, Vitaly A Kushnir, Aya Shohat-Tal, Emanuela Lazzaroni-Tealdi, Yan-Guang Wu, Norbert Gleicher. Rescue in vitro maturation (IVM) of immature oocytes in stimulated cycles in women with low functional ovarian reserve (LFOR). *Endocrine*. 2016;(52):165–171. <https://doi.org/10.1007/s12020-015-0744-1>

Holubcova Z, Blayney M, Elder K, Schuh M. Error - prone chromosome - mediated spindle assembly favors chromosome segregation defects in human oocytes. *Science*. 2015;348(6239):1143–7. <https://doi.org/10.1126/science.aaa9529>

Huddleston HG, Jackson KV, Doyle JO, Racowsky C. hMG increases the yield of mature oocytes and excellent quality embryos in patients with a previous cycle having a high incidence of oocyte. *Fertil Steril*. 2009;92(3):946–9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.039>.

Irina Bogolyubova, Daniil Salimov, Dmitry Bogolyubov. Chromatin Configuration in Diplotene Mouse and Human Oocytes during the Period of Transcriptional Activity Extinction. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, 24, 11517. <https://doi.org/10.3390/ijms241411517>

Jane E Johnson, H Lee Higdon, William R Boone. Effect of human granulosa cell co-

culture using standard culture media on the maturation and fertilization potential of immature human oocytes. *Fertil Steril.* 2008;90(5):1674-79. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.017>

Jee BC, Han SH, Moon JH, Suh CS, Kim SH. Influence of well defined protein source on in vitro maturation of human oocyte: human follicular fluid versus human serum albumin. *Fertil Steril.* 2008;89:348–52. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.052>.

Jiang, Y, He Y, Pan X, Wang P, Yuan X, Ma B. Advances in oocyte maturation in vivo and in vitro in mammals. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24:9059. <https://doi.org/10.3390/ijms24109059>.

Jie H, Zhao M, Alqawasmeh OAM, Chan CPS, Lee TL, Li T, Chan DYL. In vitro rescue immature oocytes - a literature review. *Fertil Steril.* 2021;1–20. <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14647273.2021.1876932>. Accessed 16 June 2023

Jing-He Tan, Hui-Li Wang, Xing-Shen Sun, Yong Liu, Hong-Shu Sui, Jie Zhang. Chromatin configurations in the germinal vesicle of mammalian oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 2009;15(1):1-9. <https://doi.org/10.1093/molehr/gan069>

Jones GM, Cram DS, Song B, Magli MC, Gianaroli L, Lacham - Kaplan O, Findlay JK, Jenkin G, Trounson AO. Gene expression profiling of human oocytes following in vivo or in vitro maturation. *Hum Reprod.* 2008;23:1138–44. <https://doi.org/10.1093/humrep/den085>.

Kim B - K, Lee S - C, Kim K - J, Han C - H, Kim J - H. In vitro maturation, fertilization,

and development of human germinal vesicle oocytes collected from stimulated cycles. *Fertil Steril*. 2000;74(6):1153–8. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(00\)01617-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(00)01617-4).

Kwang-Yul Cha, Ri-Cheng Chian. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction and Embryology*. 1998;4(2):103-120. <https://doi.org/10.1093/humupd/4.2.103>.

Laura Escrich, Noelia Grau, Marcos Meseguer, Antonio Pellicer, Maria-Jose Escriba. Morphologic indicators predict the stage of chromatin condensation of human germinal vesicle oocytes recovered from stimulated cycles. *Fertil Steril*. 2010;93(8):2557-64. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.05.077>

Laura Escrich, Noelia Grau, María Jose de los Santos, Josep-Lluis Romero, Antonio Pellicer, María-Jose Escriba. The dynamics of in vitro maturation of germinal vesicle oocytes. *Fertil Steril*. 2012;98(5):1147-51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.07.1116>.

Le Du A, Kadoch IJ, Bourcigaux N, Doumerc S, Bourrier M - C, Chevalier N, Fanchin R, Chian R - C, Tachdjian G, Frydman R, Frydman N. In vitro oocyte maturation for the treatment of infertility associated with polycystic ovarian syndrome: the French experience. *Hum Reprod*. 2005;20(2):420–4. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh603>.

Lee JB, Lee MG, Lin T, Shin HY, Lee JE, Kang JW, Jin DI. Effect of oocyte chromatin status in porcine follicles on the embryo development in vitro. *Asian-Australas J Anim Biosci*. 2019;32:956–965. <https://doi.org/10.5713/ajas.18.0739>

Levi M, Ghetler Y, Shulman A, Shalgi R. Morphological and molecular markers are correlated with maturation-competence of human oocytes. Hum Reprod. 2013;28:2482–2489. <https://doi.org/10.1093/humrep/det261>

Madkour A, Bouamoud N, Kaarouch I, Louanjli N, Saadani B, Assou S, Aboulmaouahib S, Sefrioui O, Amzazi S, Copin H, Benkhalifa M. Follicular fluid and supernatant from cultured cumulus - granulosa cells improve in vitro maturation in patients with polycystic ovarian syndrome. Fertil Steril. 2018;110(4):710–9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.038>.

Manish Kumar, Mona Faraji, Parul Sarwalia, Sandeep Kumar, Moloya Gohain, Sachinandan De, Rakesh Kumar, T K Datta. Propensity in low-grade oocytes for delayed germinal vesicle breakdown compromises the developmental ability of sub-optimal grade Bubalus bubalis oocytes. Zygote. 2018;26(5):359-365. <http://doi.org/10.1017/S0967199418000321>.

Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. Reprod Biomed Online. 2014;28:284–299. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.10.016>

Marjan Omid, Mohammad Ali Khalili, Sareh Ashourzadeh, Marzieh Rahimpour. Reproduction, Fertility and Development. 2014;(26):407–413. <http://dx.doi.org/10.1071/RD13001>

Mattson BA, Albertini DE. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. Mol Reprod Dev. 1990;25(4):374–83. <https://doi.org/10.1002/mrd>.

1080250411.

Meng Wang, Lixia Zhu, Chang Liu, Hui He, Cheng Wang, Chenxi Xing, Jinming Liu, Liu Yang, Qingsong Xi, Zhou Li, Lei Jin. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021;9:e672081. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.672081>

Miyara F, Migne C, Dumont-Hassan M, Le Meur A, Cohen-Bacrie P, Aubriot F, Glissant A, Nathan C, Douard S, Stanovici A. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. *Mol Reprod Dev*. 2003;64:458–470. <https://doi.org/10.1002/mrd.10233>.

Montag M, Schimming T, van der Ven H. Spindle imaging in human oocytes: the impact of the meiotic cell cycle. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(4):442–6. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61996-7](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61996-7).

Monti M, Calligaro A, Behr B, Pera RR, Redi CA, Wossidlo M. Functional topography of the fully grown human oocyte. *Eur J Histochem*. 2017;61:2769. <https://doi.org/10.4081/ejh.2017.2769>

Monti M, Zanoni M, Calligaro A, Ko MSH, Mauri P, Redi CA. Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes. *Biol Reprod*. 2013;8:2. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.103887>

Nagy ZP, Cecile J, Liu J, Loccufier A, Devroey P, Steirteghem AV. Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured germinal - vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril*. 1996;65(5):1047–50. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(96\)00300-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(96)00300-0)

1016/S0015 - 0282(16)58285 - 5.

Nogueira D, Staessen C, Van de Velde H, Van Steirteghem A. Nuclear status and cytogenetics of embryos derived from in vitro matured oocytes. *Fertil Steril*. 2000;74:295–8. [https://doi.org/10.1016/s0015 - 0282\(00\)00642 - 7](https://doi.org/10.1016/s0015 - 0282(00)00642 - 7).

Otsuki J, Momma Y, Takahashi K, Miyakura S, Nagai Y. Timed IVM followed by ICSI in a patient with immature ovarian oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2006;13(1):101–3. [https://doi.org/10.1016/s1472 - 6483\(10\)62022 - 6](https://doi.org/10.1016/s1472 - 6483(10)62022 - 6).

Otsuki J, Nagai Y. A phase of chromosome aggregation during meiosis in human oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2007;15(2):191–7. [https://doi.org/10.1016/s1472 - 6483\(10\)60708 - 0](https://doi.org/10.1016/s1472 - 6483(10)60708 - 0).

Ozturk S. Molecular determinants of the meiotic arrests in mammalian oocytes at different stages of maturation. *Cell Cycle*. 2022;21:547–571. <https://doi.org/10.1080/15384101.2022.2026704>.

Palmerini MG, Antonouli S, Macchiarelli G, Cecconi S, Bianchi S, Khalili MA, Nottola SA. Ultrastructural evaluation of the human oocyte at the germinal vesicle stage during the application of assisted reproductive technologies. *Cells*. 2022;11:1636. <https://doi.org/10.3390/cells11101636>.

Parfenov V, Potchukalina G, Dudina L, Kostyuchek D, Gruzova M. Human antral follicles: oocyte nucleus and the karyosphere formation (electron microscopic and autoradiographic data). *Gamete Res*. 1989;22(2):219–31. <https://doi.org/10.1002/>

[mrd.11202 20209.](#)

Patrizia Rubino, Paola Vigano, Alice Luddi, Paola Piomboni. The ICSI procedure from past to future: a systematic review of the more controversial aspects. *Human Reproduction Update*, 2016;22(2):194–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv050>

Pia Astbury, Goutham N Subramanian, Jessica Greaney, Chris Roling, Jacqui Irving, Hayden A Homer. The Presence of Immature GV— Stage Oocytes during IVF/ICSI Is a Marker of Poor Oocyte Quality: A Pilot Study. *Medical Sciences*. 2020;8(1):4. <https://www.mdpi.com/2076-3271/8/1/4>.

Qiyu Yang, Lixia Zhu, Lei Jin. Human Follicle in vitro Culture Including Activation, Growth, and Maturation: A Review of Research Progress. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11(548). <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00548>.

Racca A, Santos-Ribeiro S, De Munck N, Mackens S, Drakopoulos P, Camus M, Verheyen G, Tournaye H, Blockeel C. Impact of late-follicular phase elevated serum progesterone on cumulative live birth rates: is there a deleterious effect on embryo quality?. *Human Reproduction*. 2018;33(5):860–868. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey031>

Rachael P Norris, Marina Freudzon, Lisa M Mehlmann, Ann E Cowan, Alexander M Simon, David L Paul, Paul D Lampe, Laurinda A Jaffe. Luteinizing hormone causes MAP kinase-dependent phosphorylation and closure of connexin 43 gap junctions in mouse ovarian follicles: one of two paths to meiotic resumption. *Development*. 2008;135(19):3229–3238. <https://doi.org/10.1242/dev.025494>.

Ranganath A, Appaneravanda LC, Gerstl B, Math NT, Menon J, Gunasheela D. A Study to Find Optimal Intra - cytoplasmic Sperm Injection Timing of Oocytes Matured from Germinal Vesicle in in Vitro Maturation Cycles Using a Time Lapse System. *Hum Reprod.* 2021;14(4):415–21. https://doi.org/10.4103/jhrs.jhrs_130_21.

Sabine Roesner, Jens Erik Dietrich, Julia Weigert, Markus Montag, Bettina Toth, Thomas Strowitzki. Time-lapse imaging reveals differences in growth dynamics of embryos after in vitro maturation compared with conventional stimulation. *Fertility and Sterility.* 2017;107(3):606-612. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.12.026>.

Safak Hatirnaz, Baris Ata, Ebru Saynur Hatirnaz, Michael Haim Dahan, Samer Tannus, Justin Tan, Seang Lin Tan. Oocyte in vitro maturation: A sytematic review. *Turk J Obstet Gynecol* 2018;15:112-25. <https://doi.org/10.4274/tjod.23911>

Safak Hatirnaz, Suleyman Akarsu, Ebru Saynur Hatirnaz, Ahmet Zeki Isik, Michael Haim Dahan. The use of in vitro maturation in stimulated antagonist in vitro fertilization cycles of normo-hyperresponder women due to arrested follicular development: A rescue procedure. *Turk J Obstet Gynecol.* 2018;15:141-6. <https://doi.org/10.4274/tjod.22804>

Sagit Sela-Abramovich, Iris Edry, Dalia Galiani, Nava Nevo, Nava Dekel. Disruption of Gap Junctional Communication within the Ovarian Follicle Induces Oocyte Maturation. *Endocrinology.* 2006;147(5):2280–2286. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1011>

Salimov D, Lopata A, Nagai Y, Lisovskaya T, Portnov I, Miwa A, Otuki J. In human oocytes the aggregation of chromosomes around the nucleolus is associated with the initiation and completion of metiotic maturation. abstract of ASRM. 2014. <https://>

www.fertstert.org/article/S0015 - 0282(14)01033 - 4.

Samundi Sankari, M Elanchezhian, Divya Selvamani, M Nagarajan, D Gopikrishnan. Live Birth after Rescue In vitro Maturation–intracytoplasmic Sperm Injection in Type 1 Diabetes, Polycystic Ovary Syndrome Patient Using Clomiphene–antagonist Protocol. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 2018;11:75-78. https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_65_17

Sánchez F, Lolicato F, Romero S, De Vos M, Van Ranst H, Verheyen G, Anckaert E, Smitz JEJ. An improved IVM method for cumulus - oocyte complexes from small follicles in polycystic ovary syndrome patients enhances oocyte competence and embryo yield. *Hum Reprod*. 2017;32(10):2056–68. <https://doi.org/10.1093/humrep/dex262>.

Sánchez F, Romero S, De Vos M, Verheyen G, Smitz J. Human cumulus-enclosed germinal vesicle oocytes from early antral follicles reveal heterogeneous cellular and molecular features associated with in vitro maturation capacity. *Hum Reprod*. 2015;30:1396–1409. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev083>.

Satoshi Mizuno, Yuko Ishikawa, Hiroshi Matsumoto, Manabu Sato, Mamoru Ida, Aisaku Fukuda, Yoshiharu Morimoto. *Reprod Med Biol*. 2019;18:111–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12257>

Shogo Higaki, Masao Kishi, Keisuke Koyama, Masashi Nagano, Seiji Katagiri, Tatsuyuki Takada, Yoshiyuki Takahashi. Early germinal vesicle breakdown is a predictor of high preimplantation developmental competent oocytes in mice. *Zygote*. 2016;25:41–48. <https://doi.org/10.1017/S0967199416000290>

Sirait B, Wiweko B, Jusuf A, Ifitah D, Muharam R. Oocyte competence biomarkers associated with oocyte maturation: A review. *Front. Cell Dev Biol.* 2021;9:710292. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.710292>

Son W - Y, Lee S - Y, Lim J - H. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in vitro maturation cycles. *Hum Reprod.* 2005;20(11):3204– 7. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei195>.

Stephanie Beall, Carol Brenner, James Segars. Oocyte maturation failure: a syndrome of bad eggs. *Fertil Steril.* 2010;94(7):2507-2513. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.02.037>.

Straczynska P, Papis K, Morawiec E, Czerwinski M, Gajewski Z, Olejek A, Bednarska-Czerwinska A. Signaling mechanisms and their regulation during in vivo or in vitro maturation of mammalian oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2022;20:37. <https://doi.org/10.1186/s12958-022-00906-5>.

Tamar Margalit, Avi Ben-Haroush, Roni Garor, Naomi Kotler, Dania Shefer, Natalia Krasilnikov, Moran Tzabari, Galia Oron, Yoel Shufaro, Onit Sapir. Morphokinetic characteristics of embryos derived from in-vitro-matured oocytes and their in-vivo-matured siblings after ovarian stimulation. *RBMO.* 2019;38(1):7-11. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.10.002> 1472-6483/

Tannus S, Hatirnaz S, Tan J, Ata B, Tan SL, Hatirnaz E, KenatPektas M, Dahan MH. Predictive factors for live birth after in vitro maturation of oocytes in women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2018;297(1):199–204. <https://doi.org/10.1007/s00130-017-0348-8>

doi.org/10.1007/s00404 - 017 - 4561 - z.

Urrego R, Herrera-Puerta E, Chavarria N A, Camargo O, Wrenzycki C, Rodriguez-Osorio N. Follicular progesterone concentrations and messenger RNA expression of MATER and OCT-4 in immature bovine oocytes as predictors of developmental competence. *Theriogenology*. 2015;83:1179-87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.024>

V S Vanni, E Somigliana, M Reschini, L Pagliardini, E Marotta, S Faulisi, A Paffoni, P Vigano, W Vegetti, M Candiani, E Papaleo. Top quality blastocyst formation rates in relation to progesterone levels on the day of oocyte maturation in GnRH antagonist IVF/ICSI cycles. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0176482. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176482>

Vanhoutte L, Nogueira D, Dumortier F, De Sutter P. Assessment of a new in vitro maturation system for mouse and human cumulus-enclosed oocytes: three-dimensional prematuration culture in the presence of a phosphodiesterase 3-inhibitor. *Human Reproduction*. 2009;24(8):1946–1959. <https://doi.org/10.1093/humrep/dep104>

Vlaisavljević V, Kovac V, Sajko MC. Impact of insulin resistance on the developmental potential of immature oocytes retrieved from human chorionic gonadotropin - primed women with polycystic ovary syndrome undergoing in vitro maturation. *Fertil Steril*. 2009;91(3):957–9. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.12.062>.

Weon-Young Son, Seok-Yoon Lee, Jin-Ho Lim. Fertilization, cleavage and blastocyst development according to the maturation timing of oocytes in in vitro maturation cycles.

Human Reproduction. 2005;20(11):3204–3207. <https://doi.org/10.1093/humrep/dei195>

Xingyu Long, Cuiying Peng, Guangxiu Lu. Isolation and identification of genes differentially expressed in premature luteinization granulosa cell during controlled ovarian hyperstimulation. Fertil Steril. 2009;92(5):1767-71. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.04.051>

Yamochi T, Hashimoto S, Amo A, Goto H, Yamanaka M, Inoue M, Nakaoka Y, Morimoto Y. Mitochondrial dynamics and their intracellular traffic in porcine oocytes. Zygote. 2016;24:517–528. <https://doi.org/10.1017/S0967199415000489>

Yang Q, Zhu L, Wang M, Huang Bo, Li Z, Juan Hu, Xi Q, Liu J, Jin L. Analysis of maturation dynamics and developmental competence of in vitro matured oocytes under time - lapse monitoring. Reprod Biol Endocrinol. 2021;19(1):183. <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00868-0>.

Yimin Shu, Janice Gebhardt, Jill Watt, Jennifer Lyon, Danny Dasig, Barry Behr. Fertilization, embryo development, and clinical outcome of immature oocytes from stimulated intracytoplasmic sperm injection cycles. Fertil Steril. 2007;87(5):1022-27. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.08.110>.

Yini Zhang, Yongzhuang Ma, Zishui Fang, Shiqiao Hu, Zhou Li, Lixia Zhu, Lei Jin. Performing ICSI within 4 hours after denudation optimizes clinical outcomes in ICSI cycles. Reproductive Biology and Endocrinology. 2020;18:27. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00587-y>

Zuccotti M, Giorgi Rossi P, Martinez A, Garagna S, Forabosco A, Redi CA. Meiotic and developmental competence of mouse antral oocytes. *Biol Reprod.* 1998;58(3):700–4. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.3.700>.

Zuccotti M, Piccinelli A, Giorgi Rossi P, Garagna S, Redi CA. Chromatin organization during mouse oocyte growth. *Mol Reprod Dev.* 1995;41(4):479–85. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410410>.

图表

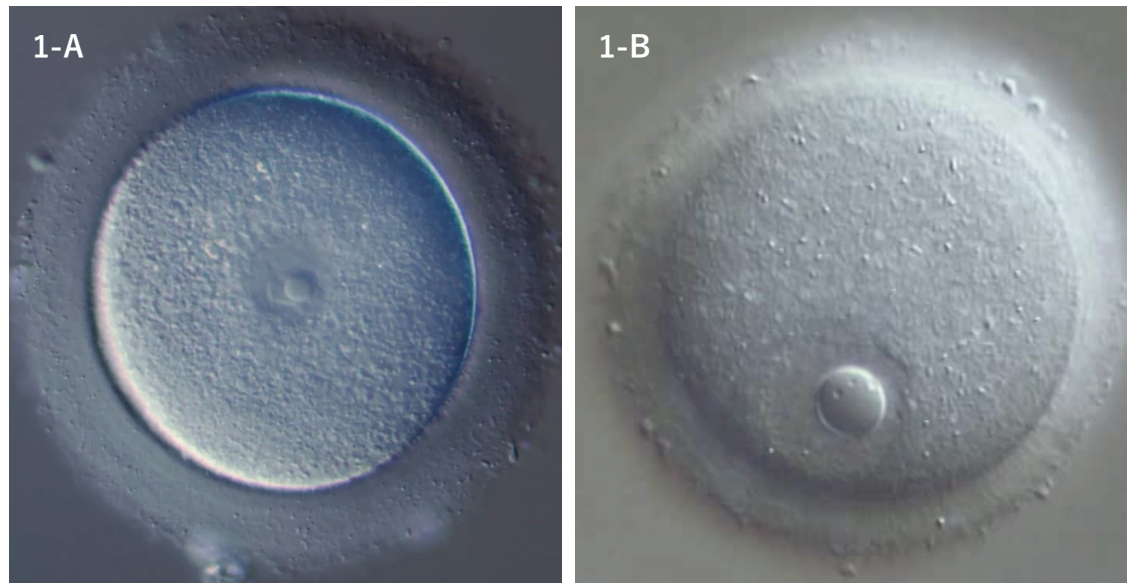


図 1.ヒトとマウスの GV 期卵（引用：Otsuki et al., RBM Online, 2007）

(1-A)ヒトの GV 期卵。核仁周囲にクロマチンが凝集しているのがはっきりと確認できる。このようにヒトの GV 内では、クロマチンが凝集した後に GV が卵表層に移動し、核仁が消失する。核仁消失後、クロマチンの凝集塊となり、GVBD が起こる。GVBD 後もこの凝集塊を数時間保ち、その後は拡散して第一減数分裂中期に進む。(1-B)マウスの GV 期卵。マウスの場合は、核仁周囲にクロマチンの凝集は基本的にみられず、GV 内にクロマチンが塊となり散在している。また、核仁と核膜がほぼ同時に消失する。

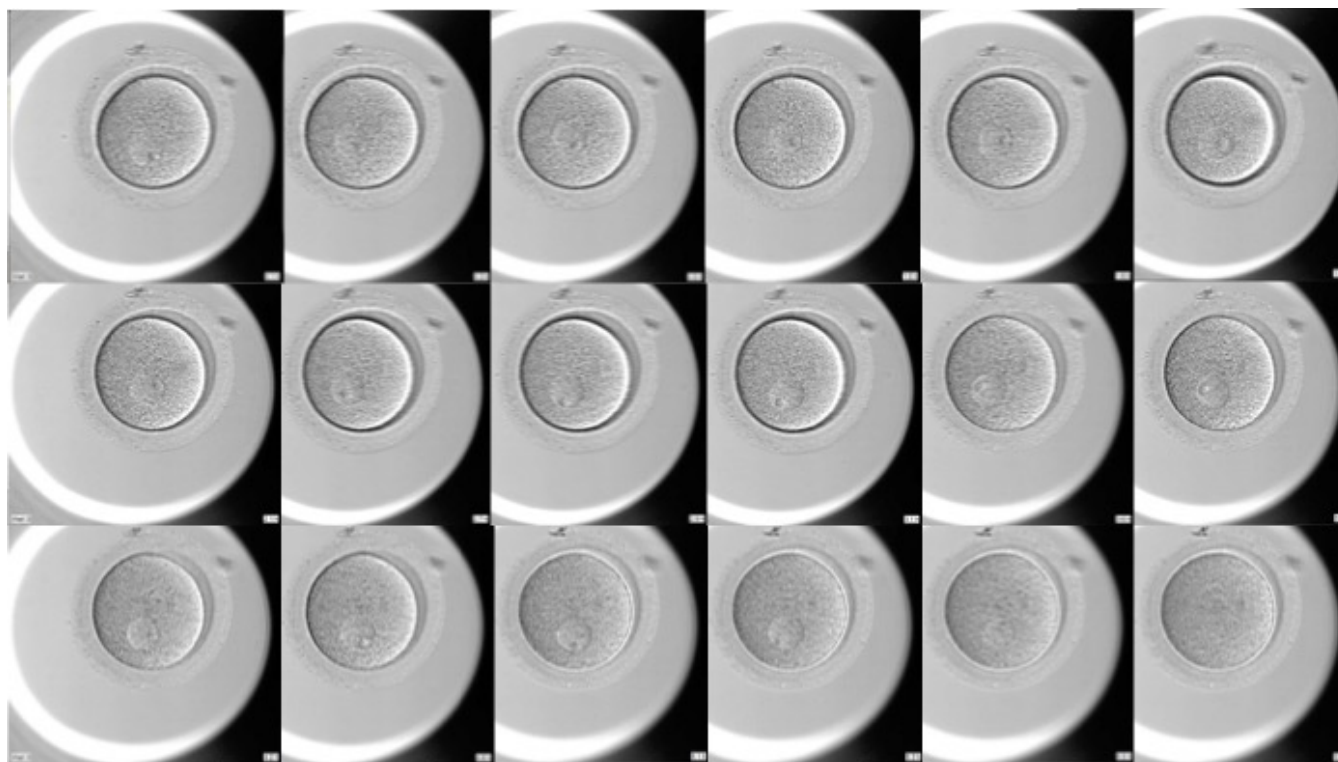


図 2.本研究で解析した Embryo Scope Flex (VitroLife) のタイムラプス画像

核仁周囲のクロマチン集積から GVBD までが確認できる。核仁も 11 つの焦点ポイントにより観察可能であり、実際の臨床現場でも解析できる。

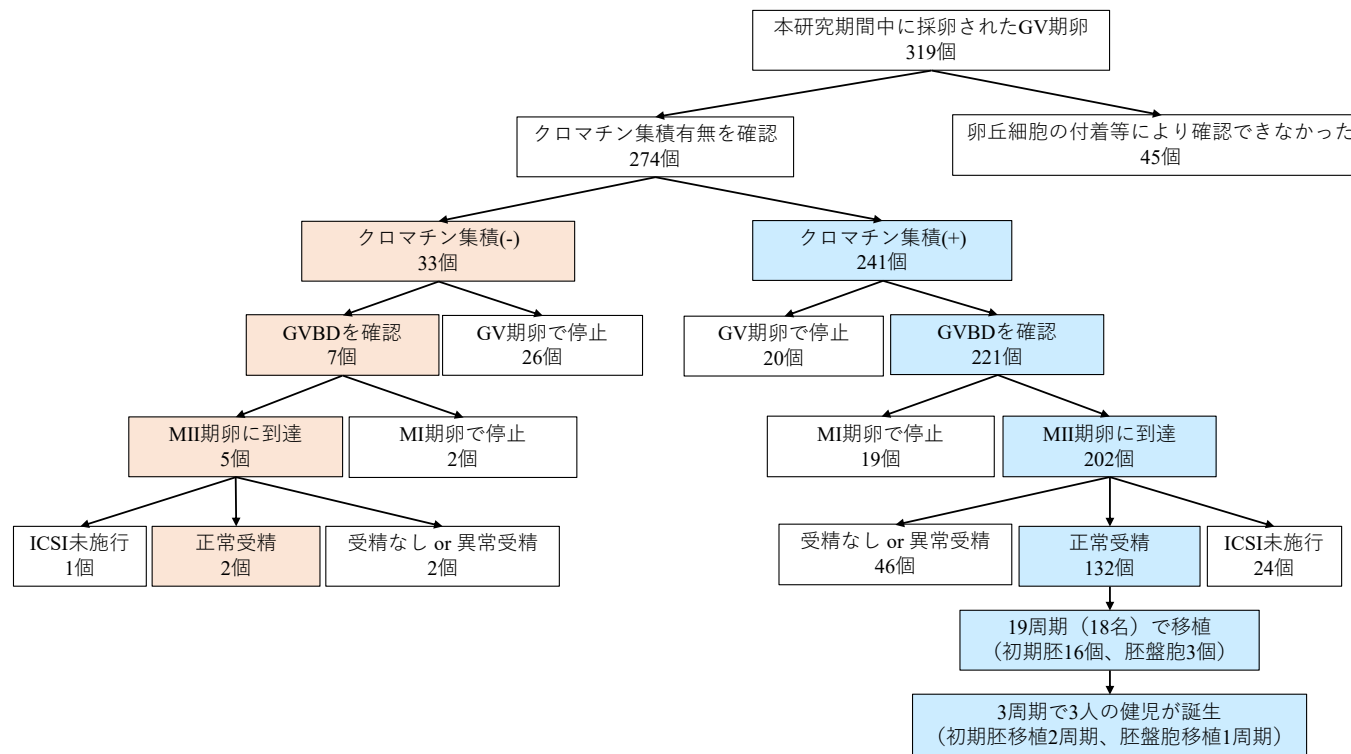


図 3.本研究で使用した GV 期卵の樹形図

樹形図は、採卵時に得られた 319 個の GV 期卵子の結果を示している。このうち、274 個の GV 期卵（裸化後に付着した卵丘細胞の残存のため、クロマチン集積有無が曖昧な 45 個の GV 期卵を除外）を本研究で解析に用いた。GV 期卵由来の 16 個の胚を移植し、3 名の健児が誕生している。

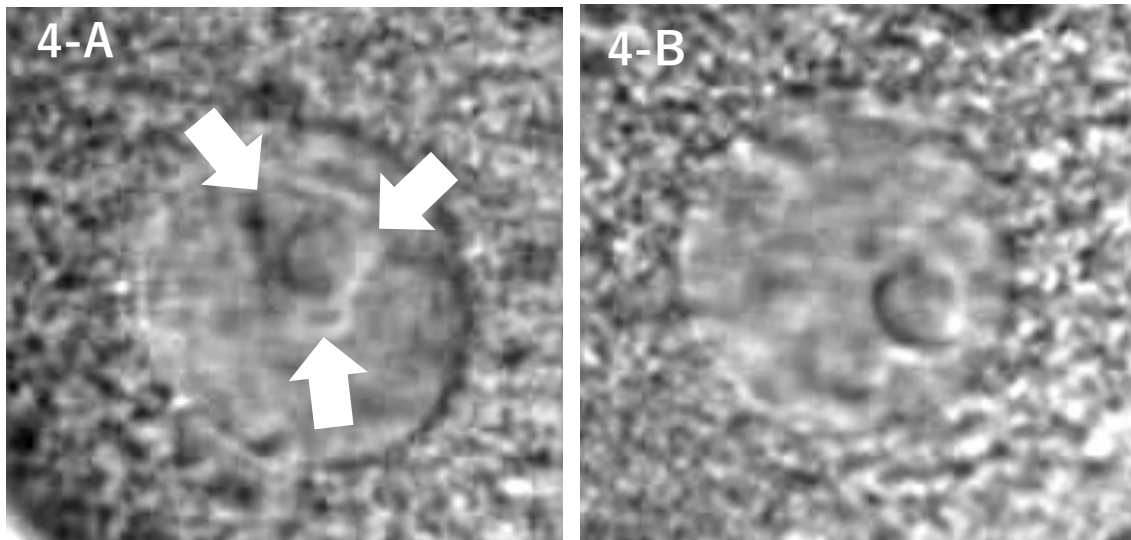


図 4. 核仁周囲のクロマチン集積

(4-A)核仁の周囲にクロマチンが集積している GV 期卵のタイムラプス画像。白矢印はクロマチンが集積しているのを示しており、核仁の周りにはっきりとクロマチンが見えている。(4-B)核仁の周囲にクロマチンが確認できない GV 期卵のタイムラプス画像。核仁は確認できるが、その周りにはクロマチンが集積していないのがわかる。



図 5. 金沢たまごクリニック培養室で使用しているタイムラプス(Embryo Scope Flex)

Vitro Life 社では Embryo Scope 8、Embryo Scope +、Embryo Scope Flex の 3 種類のタイムラプスインキュベーターを展開している。いずれのタイムラプスも胚の中心から上下に $15\mu\text{m}$ ピッチで各 5 つのフォーカスポイント (中心を含むと 11 ポイント) で 10 分間隔で撮影を行なっている。金沢たまごクリニックでは、全症例でこの Embryo Scope Flex で培養をしている。Embryo Scope Flex の特徴としては、1dish に 6embryos を同時に 24dish、144embryos の培養が可能である (Embryo Scope 8 は 1dish に 16embryos で同時に 8dish、128embryos。Embryo Scope + は 1dish に 16embryos で同時に 15dish、240embryos。)。Embryo Scope Flex の専用 dish は、他と比べると胚数が少ないが、dish つまり多くの患者を同時に培養しているのに適しており、mild stimulation が主な施設では有効なタイムラプスインキュベーターである。

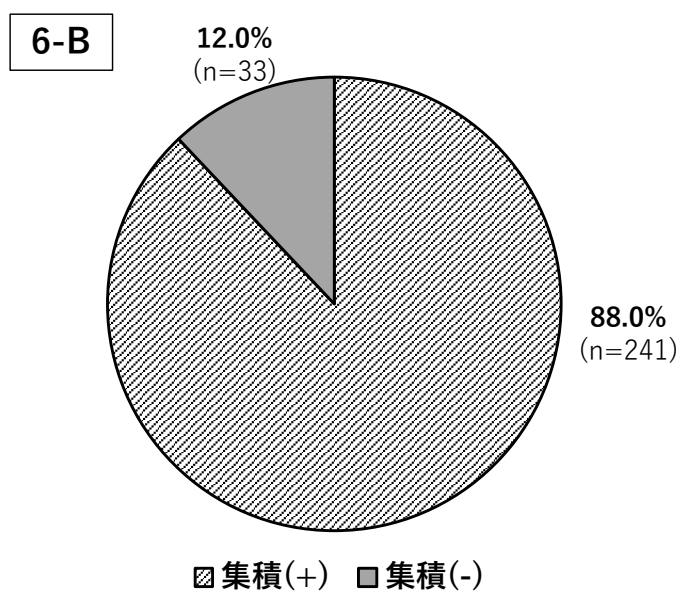
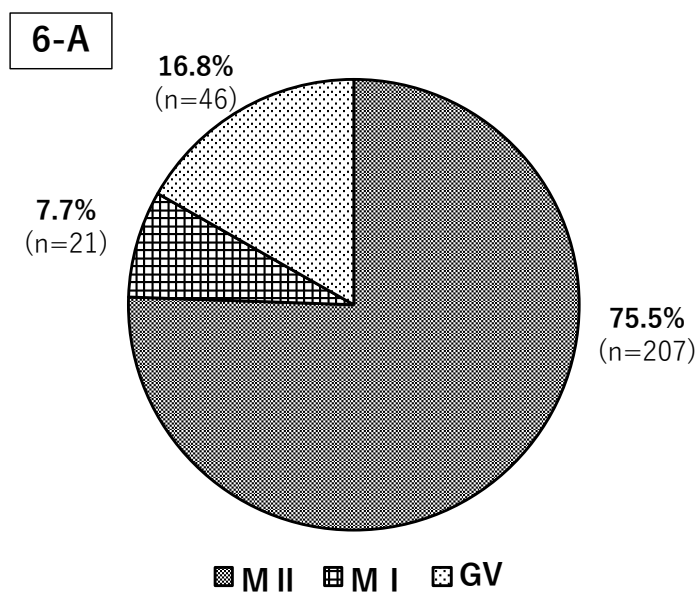


図 6. 採卵時 GV 期卵を追加培養した核相とクロマチン集積有無の割合

(6-A)274 個の GV 期卵を追加培養した結果、75.5%(207 個)が MII 期卵、7.7%(21 個)が M I 期卵、16.8%(46 個)が GV 期卵であった。(6-B)核仁周囲にクロマチン集積が見られた GV 期卵は 88.0%(241 個)で、クロマチン集積が見られなかった GV 期卵は 12.0%(33 個)となった。

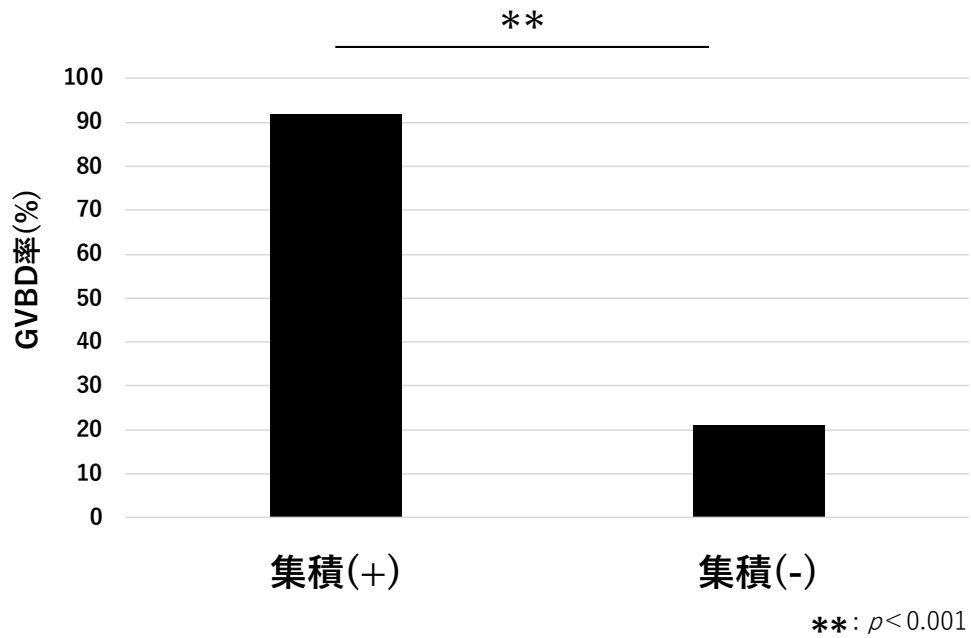


図 7. クロマチン集積の有無による GVBD 率

クロマチン集積が確認された卵（集積(+)）の GVBD 率は 91.7%(221/241)、クロマチン集積が確認できなかった卵（集積(-)）の GVBD 率は 21.1%(7/33)であり、集積(+)で有意に高い GVBD 率であった($p < 0.001$)。

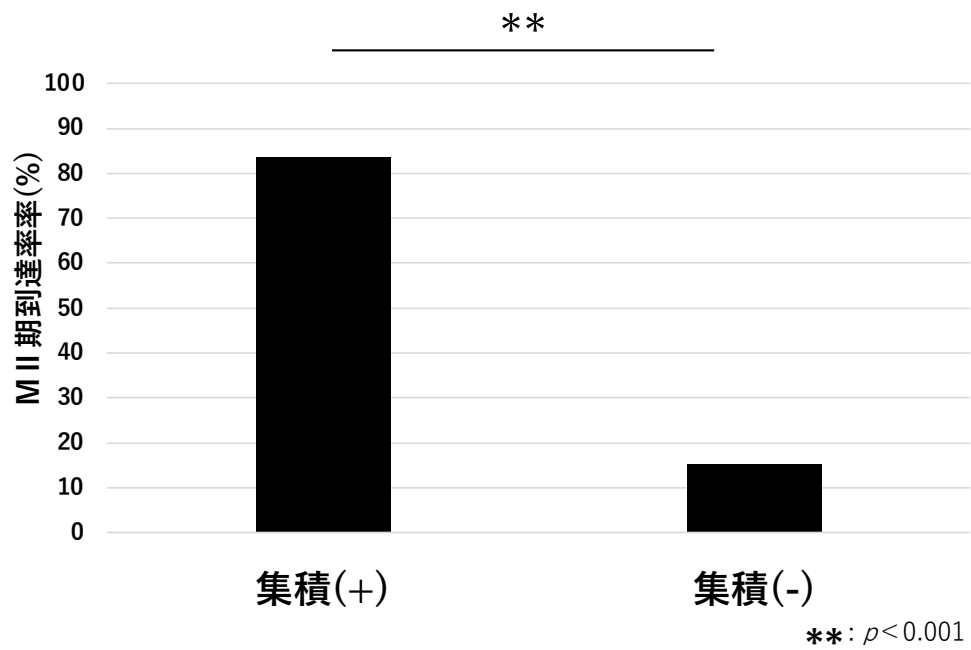


図 8. クロマチン集積の有無による MII 期到達率

クロマチン集積が確認された卵（集積(+)）の MII 期到達率は 83.8%(202/241)、クロマチン集積が確認できなかった卵（集積(-)）の MII 期到達率は 15.2%(5/33)であり、集積(+)で有意に高い MII 期到達率であった($p < 0.001$)。

表 1. GVBD を交絡因子としたロジスティック解析結果

GVBD がどのような要因で起こるかをクロマチン集積の有無、2 種類の培養液、年齢で検討した。培養液と年齢には関連性がなく、クロマチン集積の有無で関連性が認められた($p < 0.001$)。

	OR	95%CI	p -value
クロマチン集積	41.8	15.9-110.0	<0.001
培養液	1.8	0.8-4.4	0.168
年齢	1.0	0.9-1.1	0.843

表 2. 培養液別の ICSI 受精率

本研究では、GX-TL (VitroLife) または SAGE 1-Step (Origio) を用いて培養を行なった。ICSI 受精率に有意な差はなかった。

培養液	ICSI 施行数(個)	正常受精数(個)	正常受精率(%)	p 値
GX-TL	41	26	63.4	0.108
SAGE 1-step	141	108	76.6	

表 3. 採卵時 M I 期卵と GV 期卵の ICSI 受精率

採卵時の核相によって、受精率の有意な差は認められなかった。GV 期卵が高い傾向にあったが、今後も比較検討していくべきである。

採卵時の核相	ICSI 施行数(個)	正常受精数(個)	正常受精率(%)	p 値
M I 期卵	145	94	64.8	0.0911
GV 期卵	182	134	73.6	

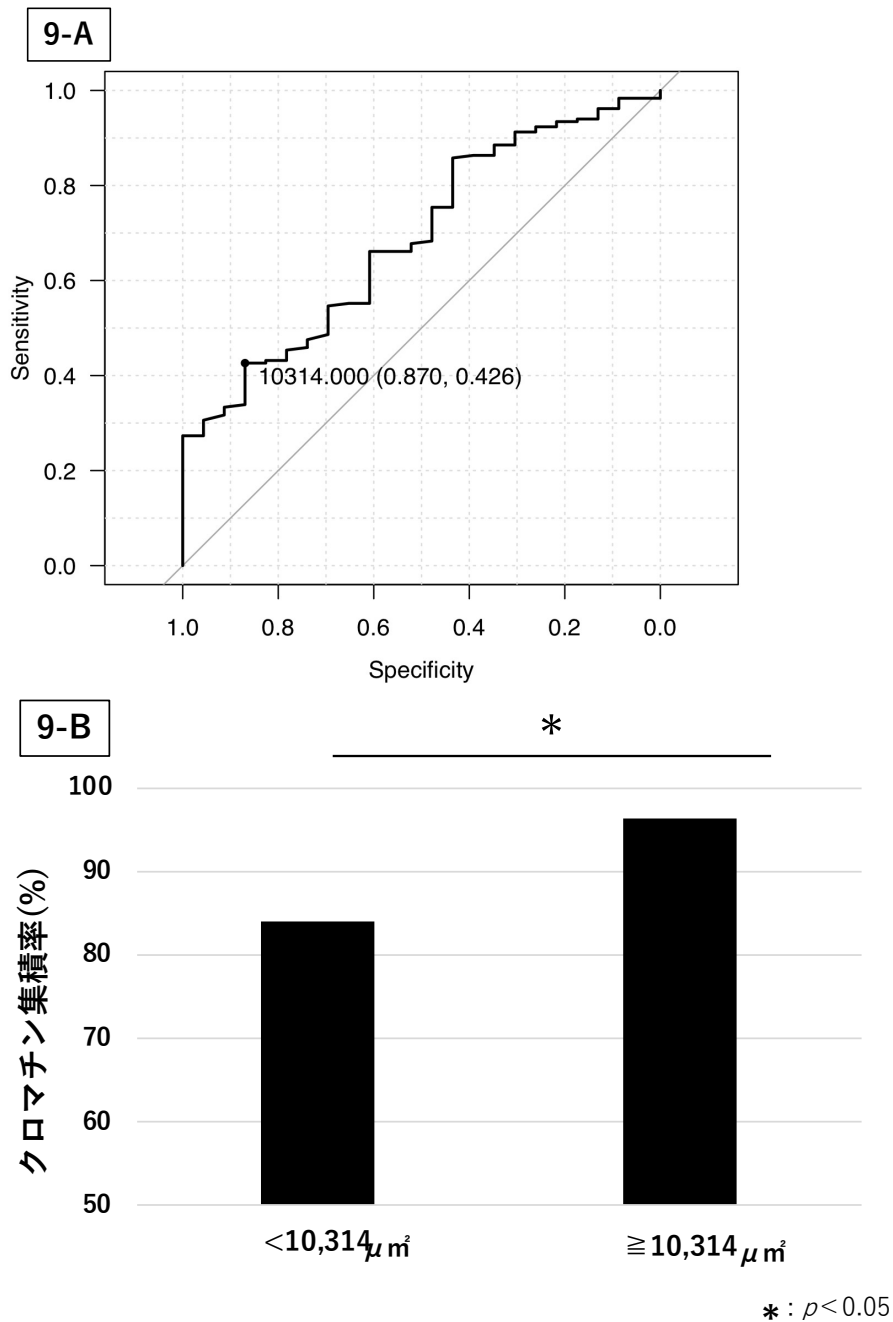


図 9. クロマチン集積と卵細胞質面積の ROC 曲線解析

(9-A)カットオフ値の面積が $10,314 \mu\text{m}^2$ (AUC : 0.688, 95%CI : 0.581-0.795)。(9-B) カットオフ値の卵細胞質面積 $10,314 \mu\text{m}^2$ で分けたクロマチン集積率。 $10,314 \mu\text{m}^2$ 以上が 96.3%(78/81)、 $10,314 \mu\text{m}^2$ 未満が 84.0%(105/125)となり、 $10,314 \mu\text{m}^2$ 以上で有意に高いクロマチン集積率となった($p < 0.05$)。

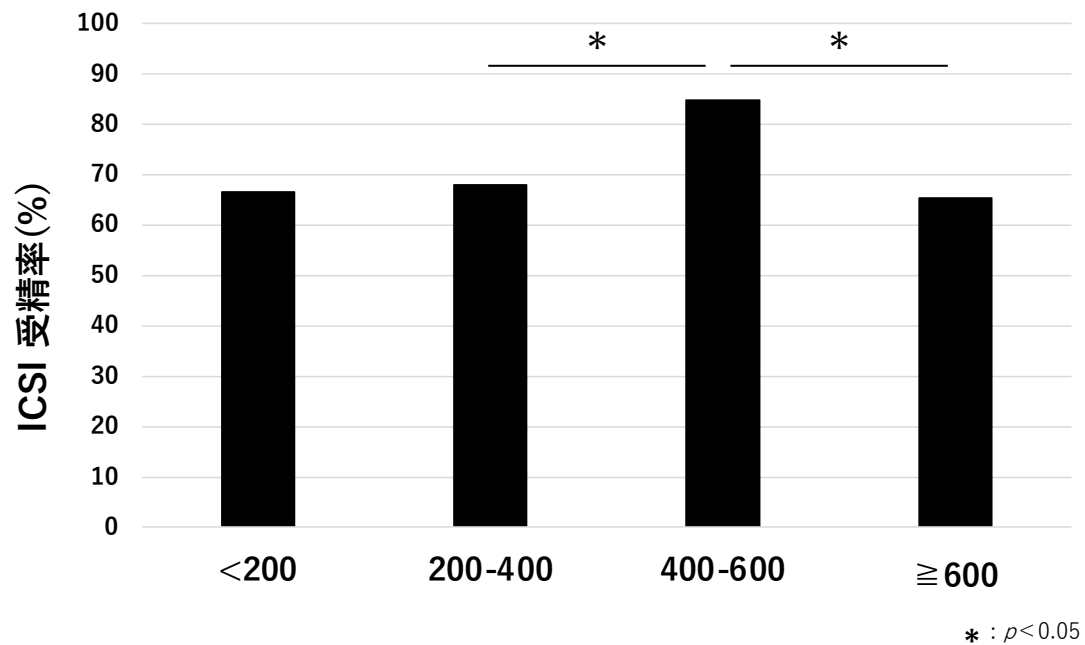


図 10. 4 区分に分けた採卵時 GV 期卵の ICSI 受精率

受精率は 200 分未満、200-400 分、400-600 分、600 分超でそれぞれ 66.7% (8/12)、68.0% (53/78)、84.9% (56/66)、65.4% (17/26) であった。200-400 分群と 400-600 分群の間 ($p = 0.020$)、および 400-600 分群と >600 分群の間 ($p = 0.048$) で有意な差が認められた。

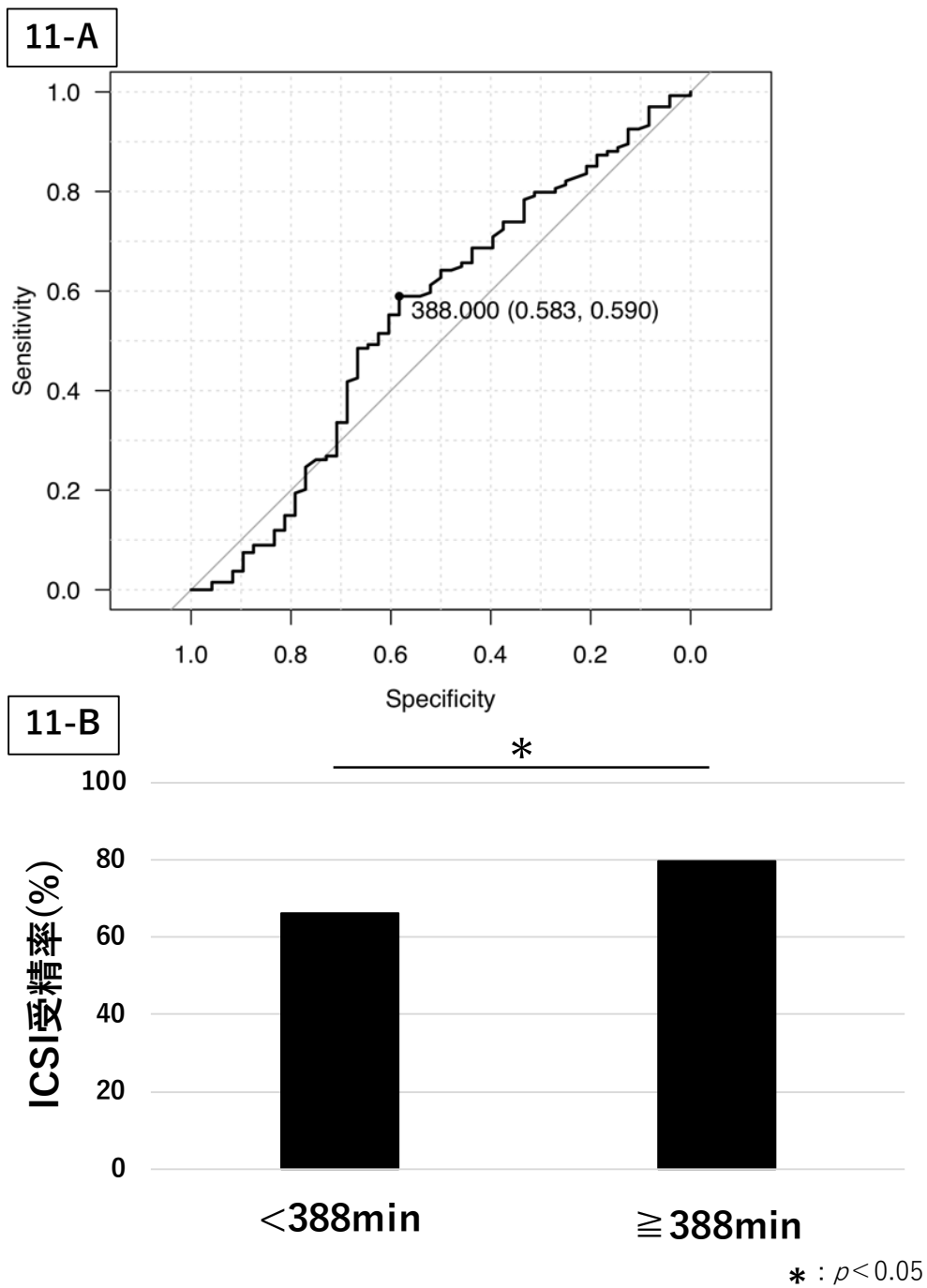


図 11. 第一極体放出後から ICSI 施行までの時間(ICSI time)と受精の ROC 曲線解析
 (11-A)カットオフ値の ICSI time は 388 分(AUC : 0.55)となった。(11-B) 388 分以上で
 79.8%(79/99)、388 分未満で 66.3%(55/83)となり、388 分以上で有意に高い受精率と
 なった ($p < 0.05$)。

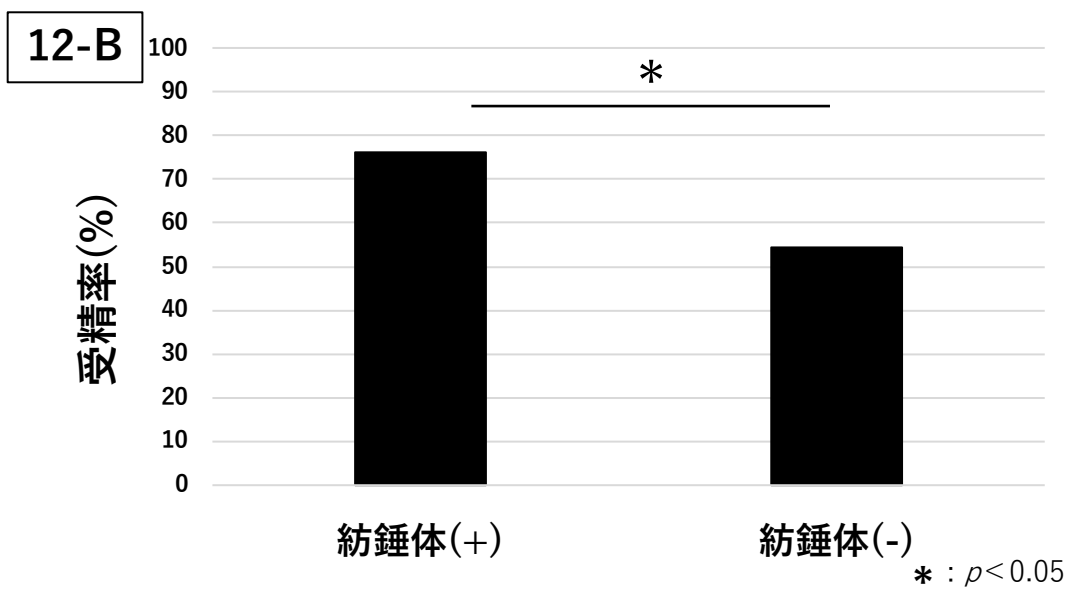
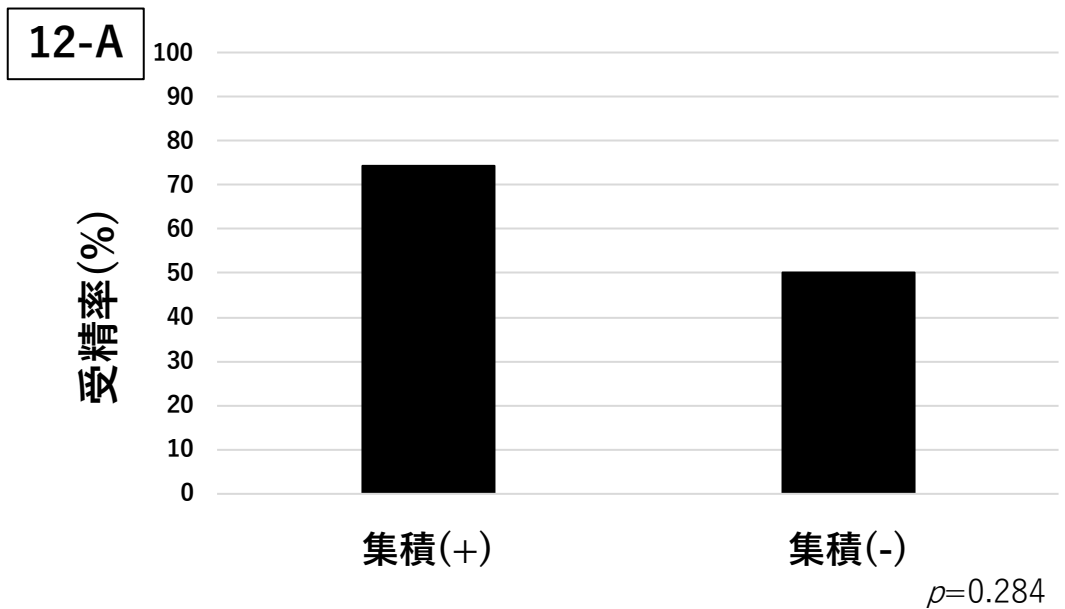


図 12. クロマチン集積と紡錘体可視の有無による ICSI 受精率

(12-A) クロマチン集積が確認された卵 (集積(+)) で 74.2%(132/178)、クロマチン集積が確認できなかった卵 (集積(-)) で 50%(2/4)であり、有意な差は認められなかった ($p = 0.284$)。 (12-B) 紡錘体(+)で 76.3%(122/160)、紡錘体(-)で 54.5%(12/22)となり、紡錘体(+)で有意に高い受精率となった ($p < 0.05$)。

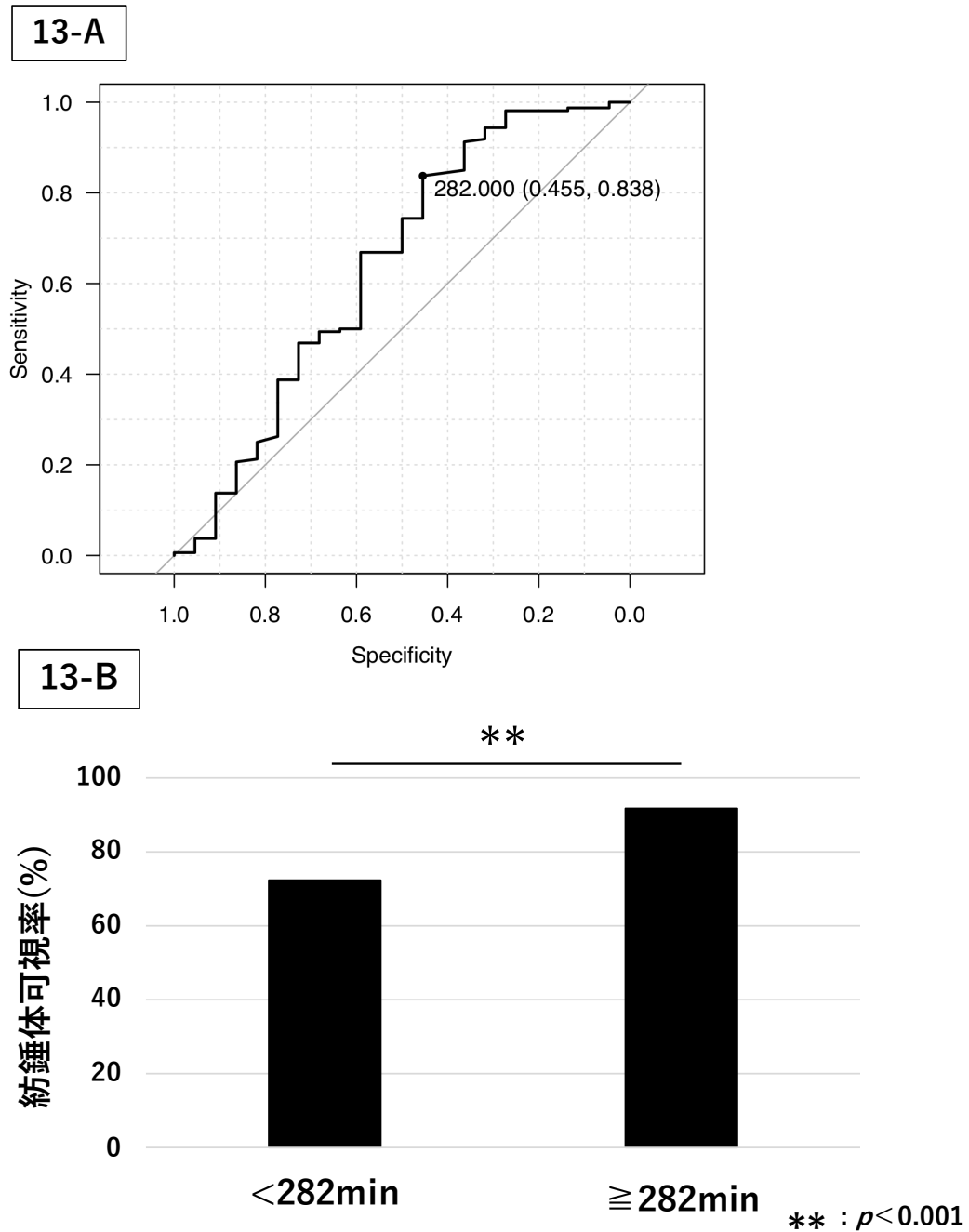


図 13. 採卵時 GV 期卵における第一極体放出後から ICSI 施行までの時間(ICSI time)と紡錘体の ROC 曲線解析

(13-A)カットオフ値の ICSI time は 282 分(AUC : 0.638)となった。(13-B)) 282 分以上で 91.8%(134/146)、282 分未満で 72.2%(26/36)となり、282 分以上で有意に高い紡錘体可視率となった ($p < 0.001$)。

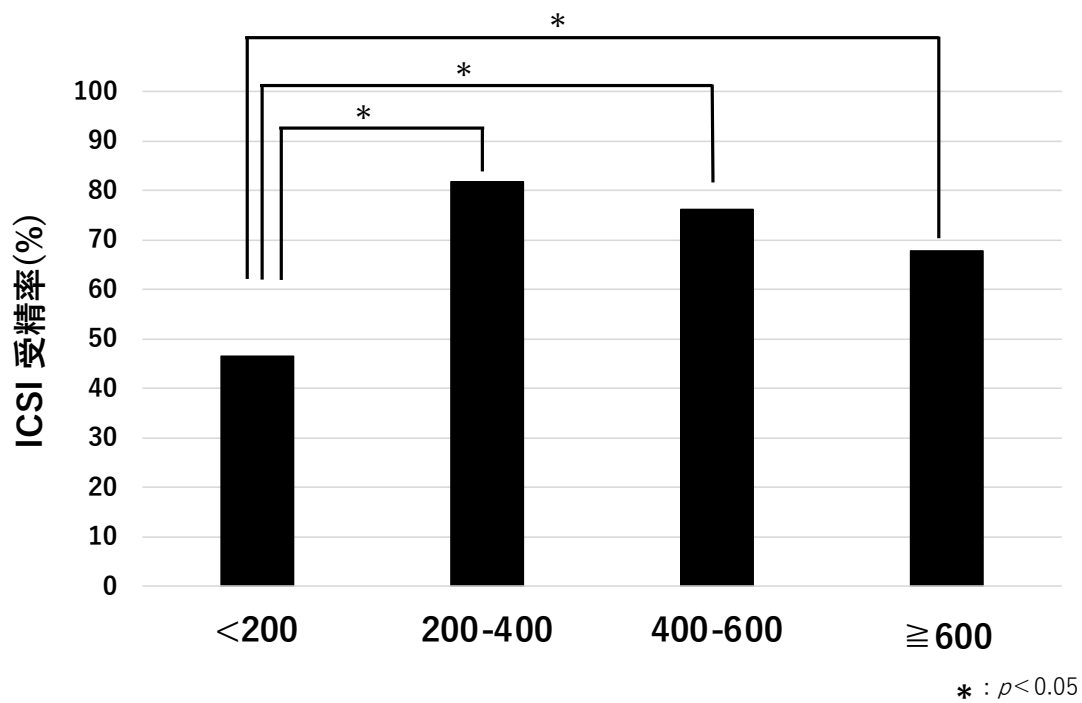


図 14. 4 区分に分けた採卵時 M I 期卵の ICSI 受精率

受精率は 200 分未満、200-400 分、400-600 分、600 分超でそれぞれ 46.5% (20/43)、81.8% (18/22)、76.2% (16/21)、67.8% (40/59) であった。200 分未満は他の 3 区間で有意な差が認められた ($p < 0.05$)。

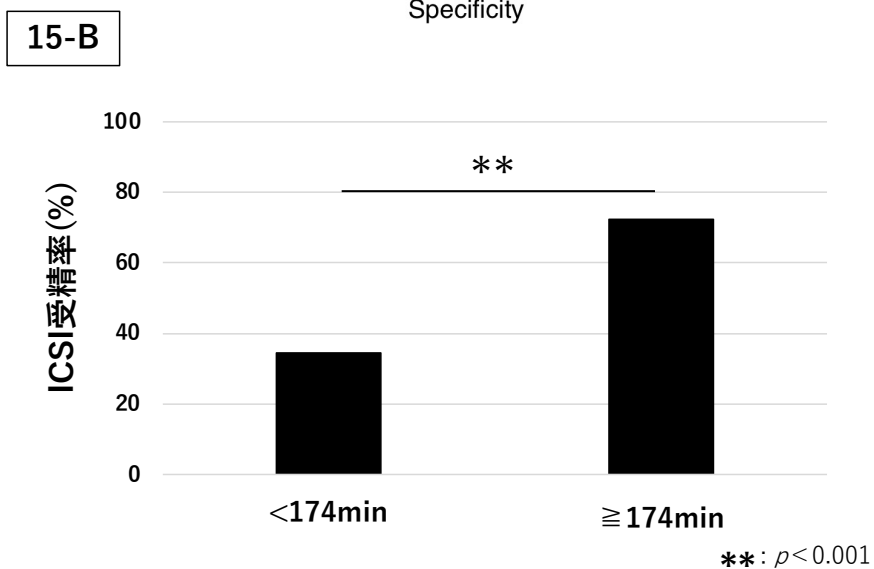
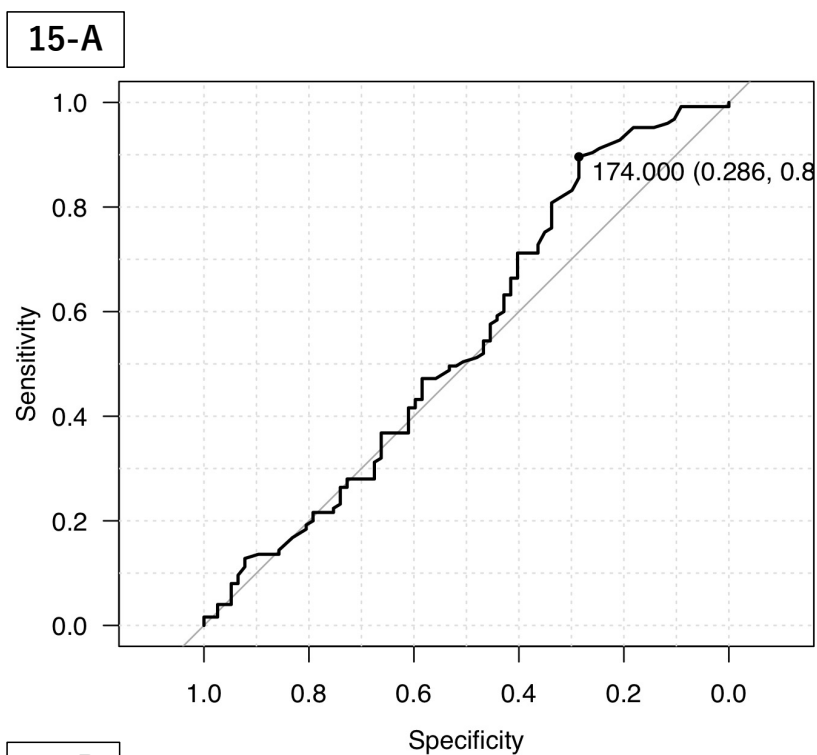
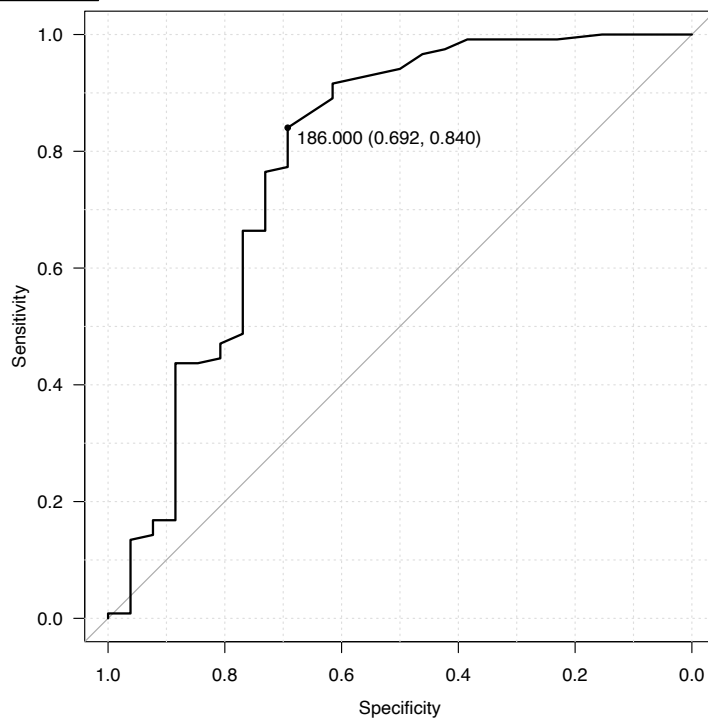


図 15. 採卵時 M I 期卵における第一極体放出後から ICSI 施行までの時間(ICSI time)と紡錘体の ROC 曲線解析

(15-A)カットオフ値の ICSI time は 174 分(AUC : 0.547)となった。(15-B) 174 分以上で 72.4%(84/116)、174 分未満で 34.5%(10/29)となり、174 分以上で有意に高い受精率となった ($p < 0.001$)。

16-A



16-B

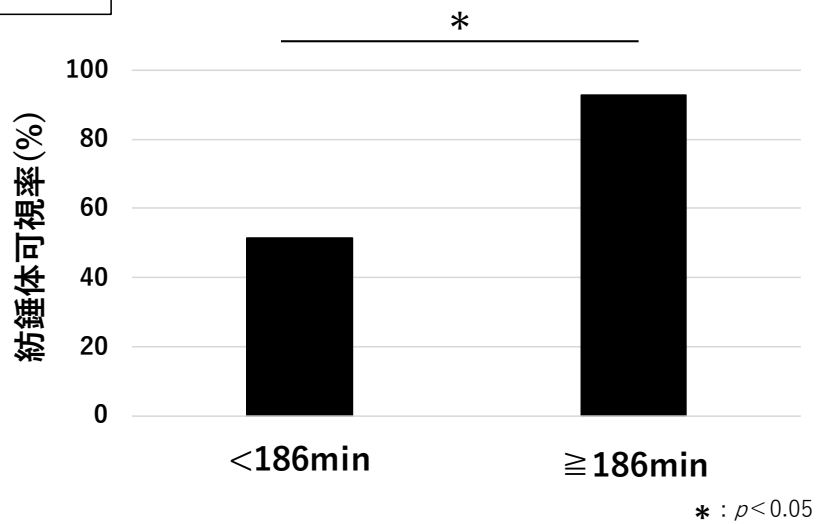
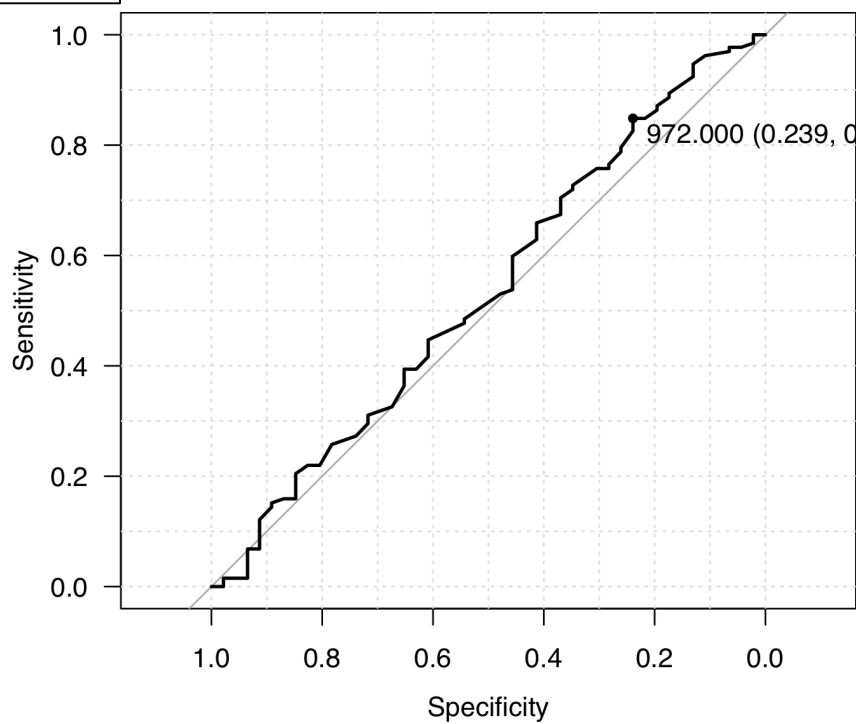


図 16. 採卵時 M I 期卵における第一極体放出後から ICSI 施行までの時間(ICSI time)と紡錘体の ROC 曲線解析

(16-A)カットオフ値の ICSI time は 186 分(AUC : 0.788)となった。(16-B) 186 分以上で 92.6%(100/108)、186 分未満で 51.4%(19/37)となり、186 分以上で有意に高い紡錘体可視率となった ($p < 0.05$)。

17-A



17-B

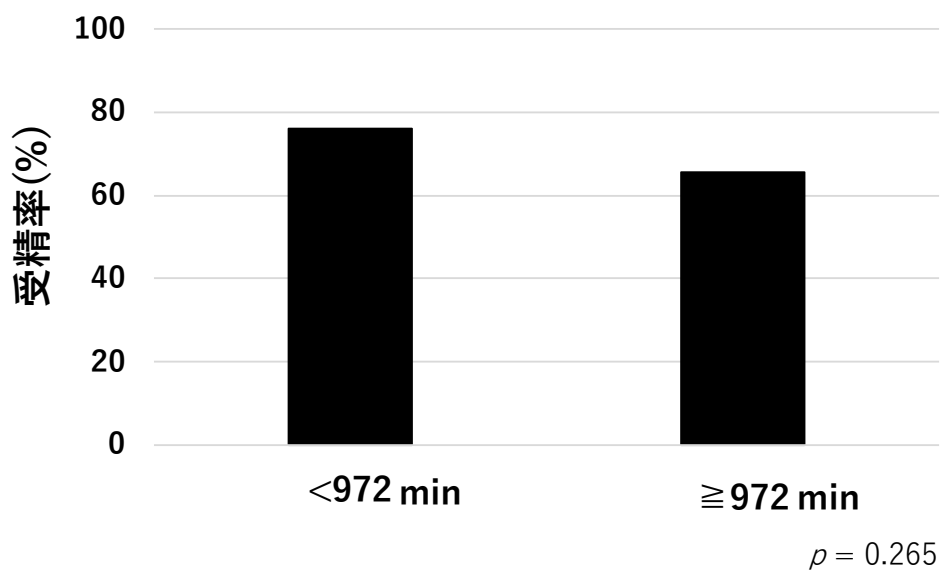


図 17. GVBD から第一極体放出までの時間と受精での ROC 曲線解析

(17-A) カットオフ値は 972 分 (AUC : 0.535) となった。(17-B) 972 分以上で 65.6%(21/32)、972 分未満で 76.0%(111/146) となり、有意な差はなかった ($p=0.265$)。

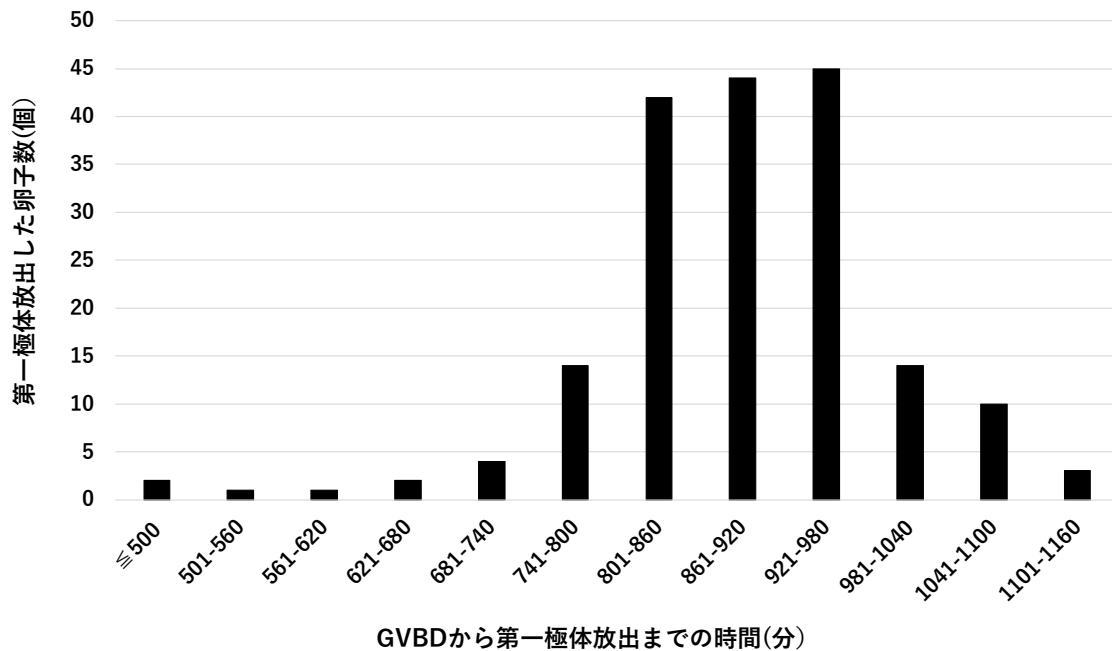
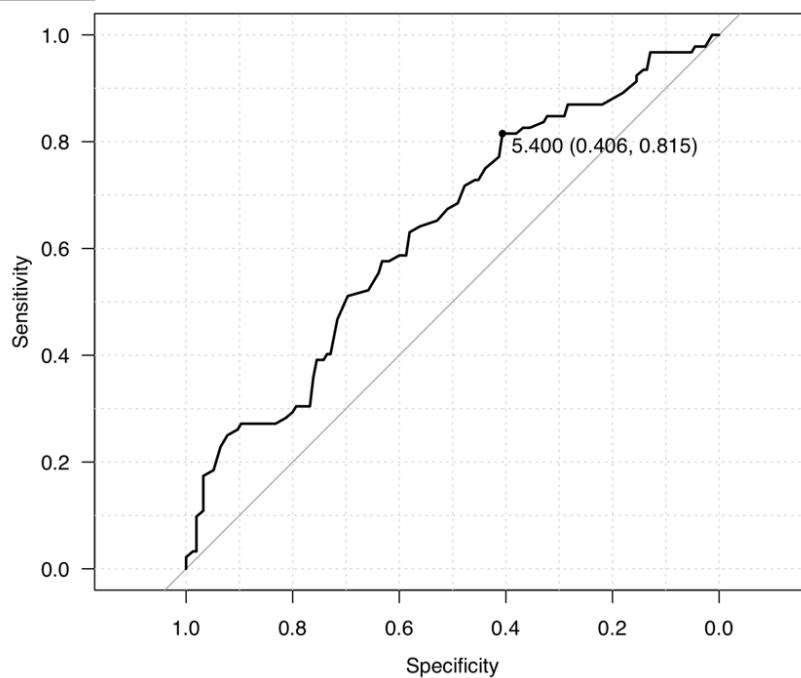


図 18. GVBD から第一極体放出までの時間の分布図

GVBD から第一極体放出までの計測し、801 分から 980 分まで（13 時間 21 分から 16 時間 20 分まで）の時間でほぼ正規分布（平均値：901.8±105.0 分、中央値：894 分、最頻値：858 分）を示した。図 17 で示した通り、ICSI 施行における受精率には関連しないが、図 10 で第一極体放出後 400-600 分において有意な ICSI 受精率であるため、この図を考慮すると GVBD 後およそ 20 時間から 26 時間 20 分で ICSI 施行となる予測が立てられる。

19-A



19-B

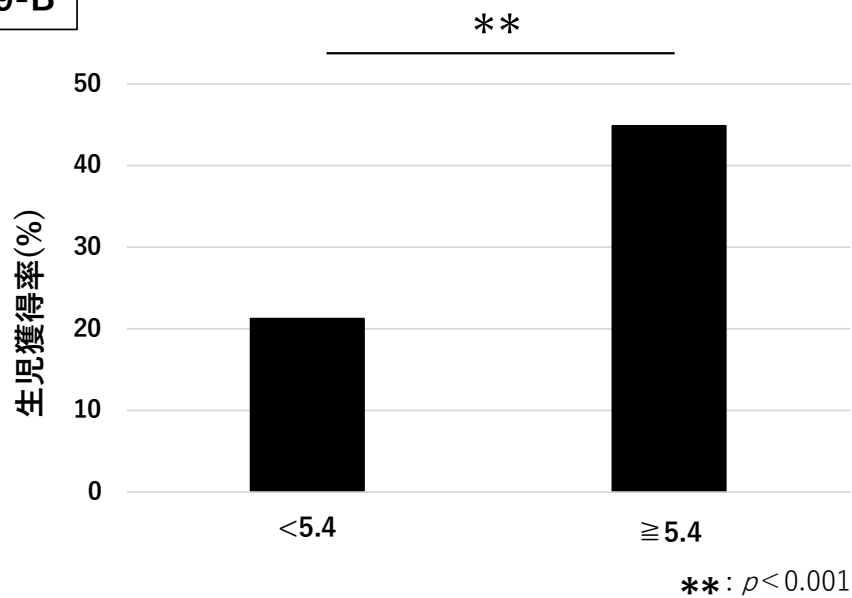
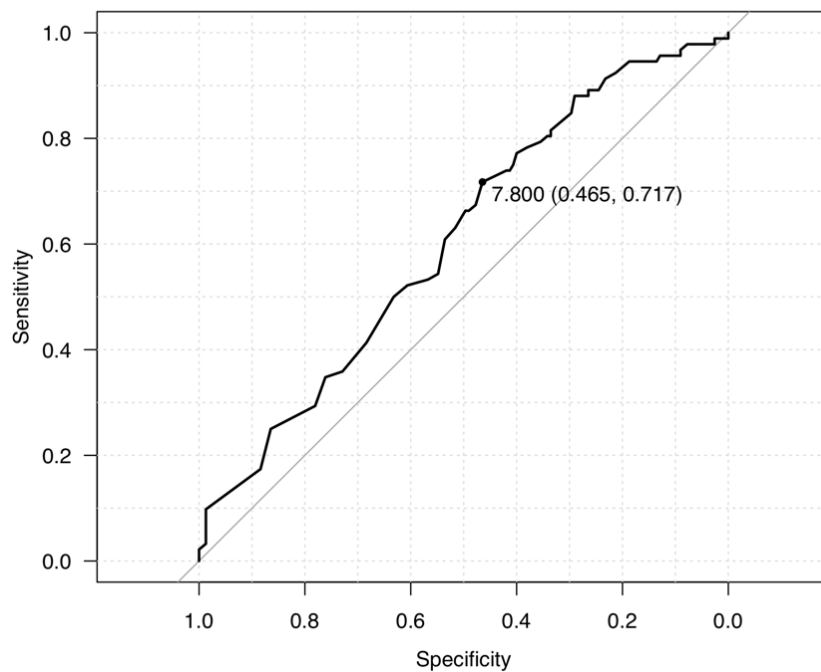


図 19.KIDScore D5 の ROC 曲線解析

(19-A)カットオフ値は 5.4(AUC : 0.635, 95%CI : 0.563-0.707)となった。(19-B)カットオフ値 5.4 で分けた生児獲得率。5.4 未満が 21.3%(17/80)、5.4 以上が 44.9%(75/167)となり、5.4 以上で有意に高い生児獲得率となった ($p < 0.001$)。

20-A



20-B

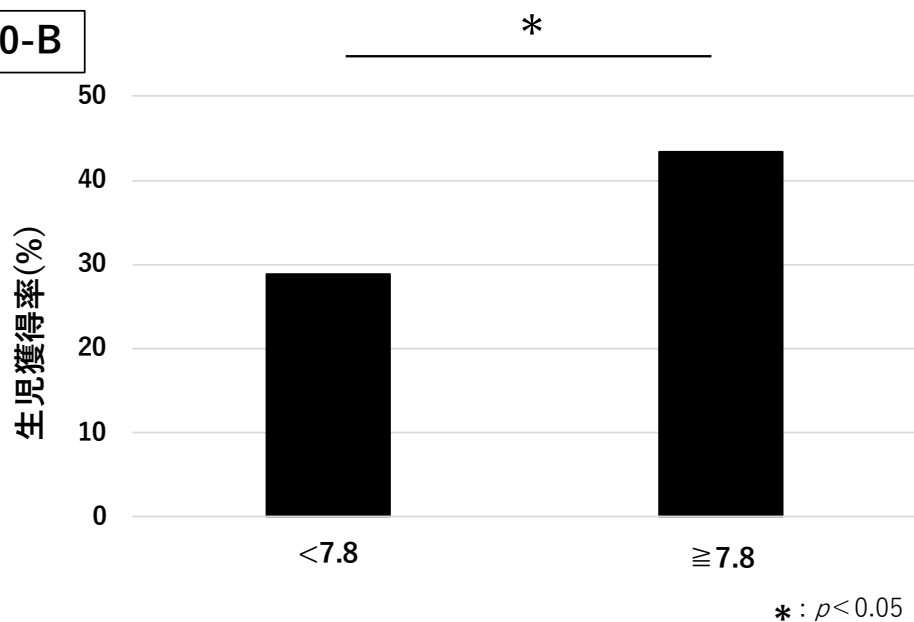


図 20.KIDScore D5 の ROC 曲線解析

(20-A)カットオフ値は 7.8(AUC : 0.608, 95%CI : 0.536-0.679)となった。(20-B)カットオフ値 7.8 で分けた生児獲得率。7.8 未満が 28.8%(30/104)、7.8 以上が 43.4%(62/143)となり、7.8 以上で有意に高い生児獲得率となった ($p < 0.05$)。

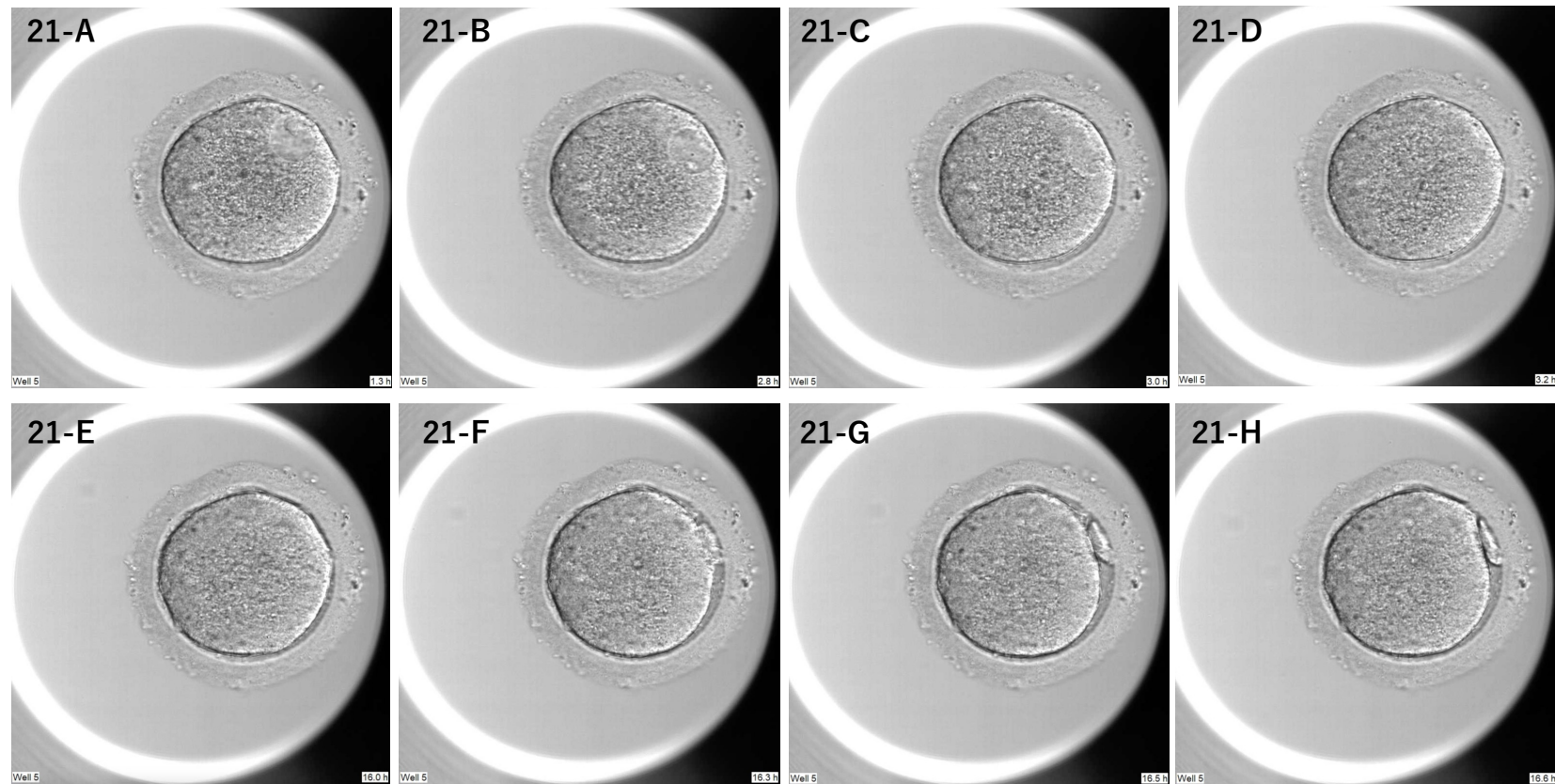


図 21.核仁周囲にクロマチン集積が確認できた GV 期卵の GVBD から第一極体放出後までのタイムラプス画像
(17-A)核仁周辺にクロマチン集積が確認できる。(17-B,C,D)核仁が GV 表面に移動し、GVBD が起きている。(17-E,F,G,H)GVBD 後、
約 13 時間 30 分後に第一極体が放出された。

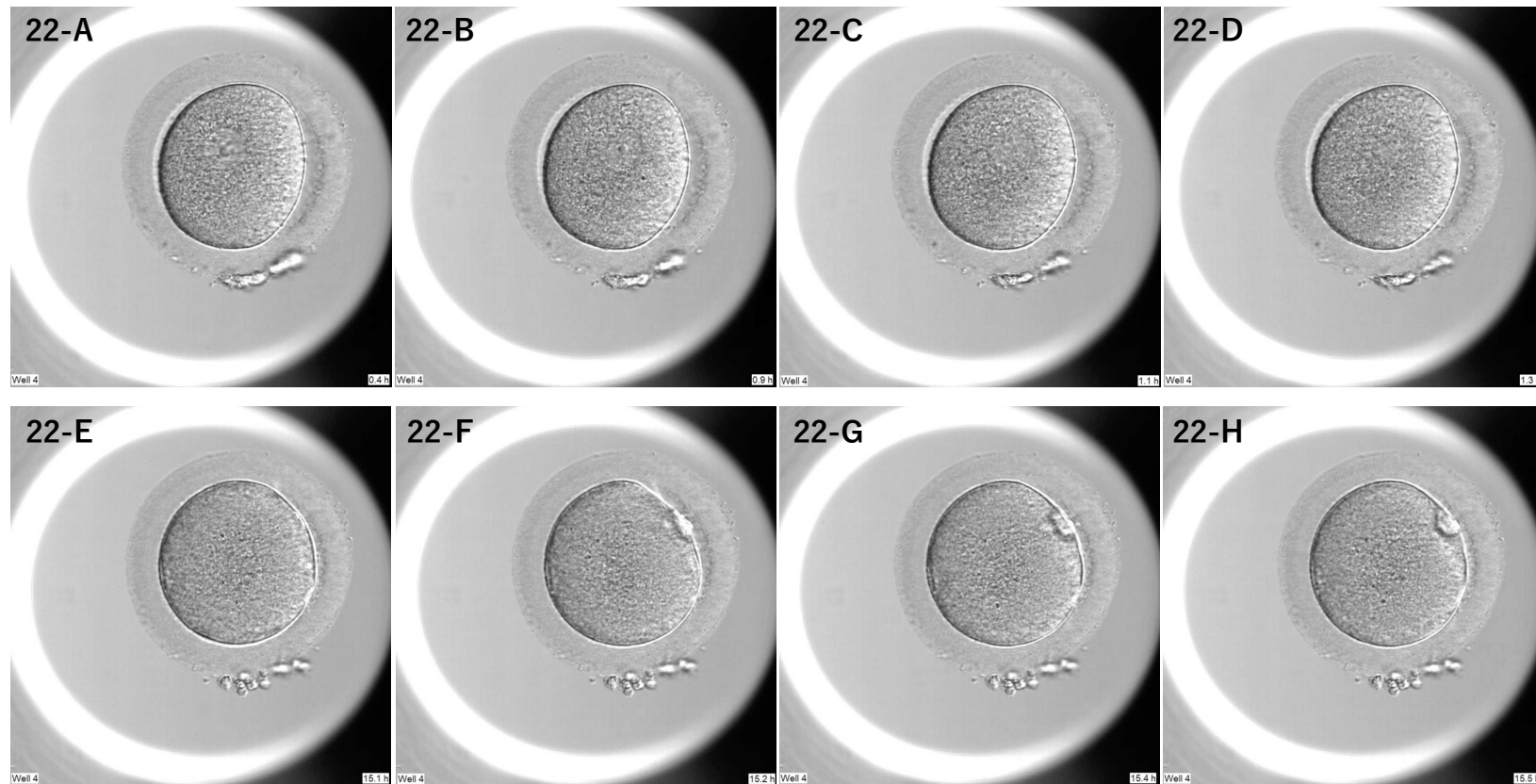


図 22.核仁周囲にクロマチン集積がなかった GV 期卵の GVBD から第一極体放出後までのタイムラプス画像

(18-A)核仁周辺にクロマチン集積が見られない。(18-B,C,D)核仁が GV 表面に移動し、GVBD が起きている。(18-E,F,G,H)GVBD 後、約 14 時間後に第一極体が放出された。

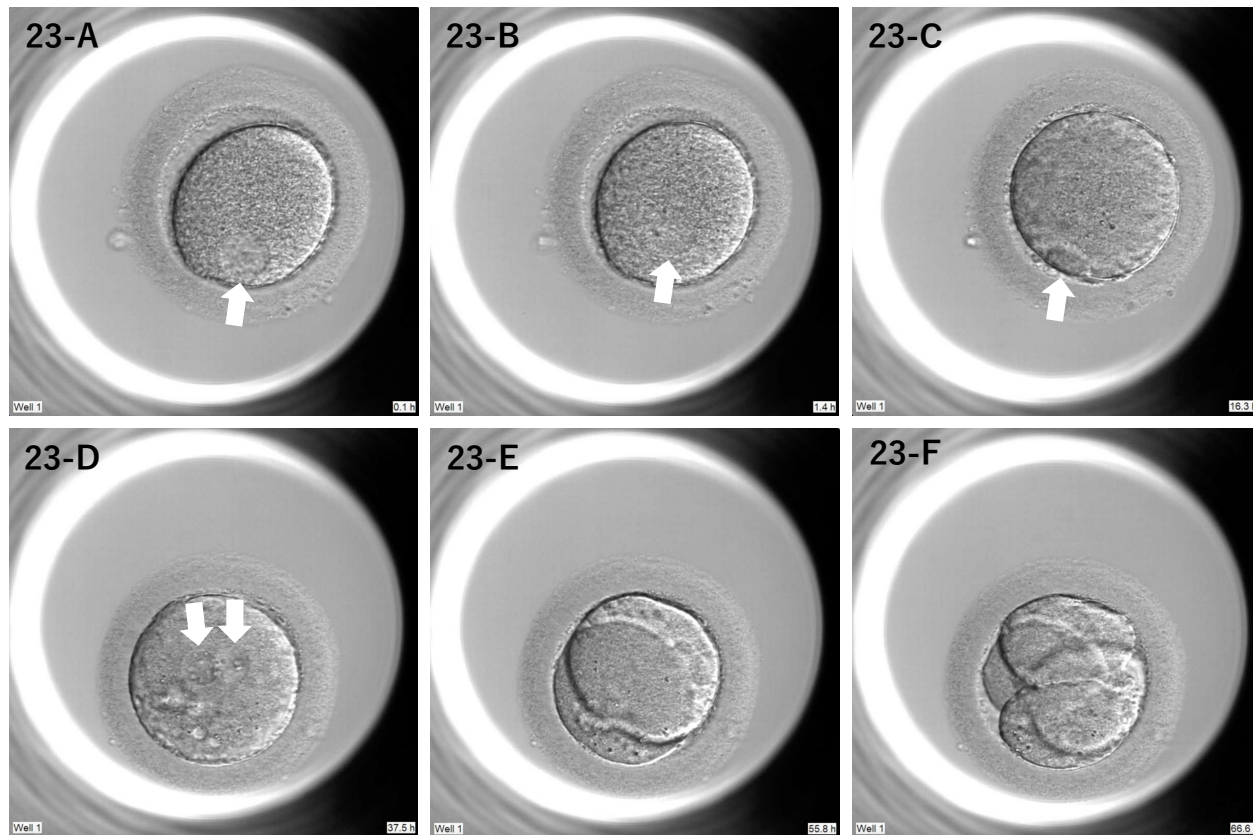


図 23.出産まで至った症例の各イベントのタイムラプス画像（新鮮胚移植、2023/1/14 出産）

GV 期にクロマチンの集積が見られ(19-A)、GVBD が起き(19-B)、第一極体が放出され(19-C)、成熟卵となる。ICSI 施行後、2 前核の形成(19-D)、2 分割期(19-E)、4 分割期(19-F)で新鮮胚移植し、38 週 4 日で健児の出産に至った（出産時 2825g）。

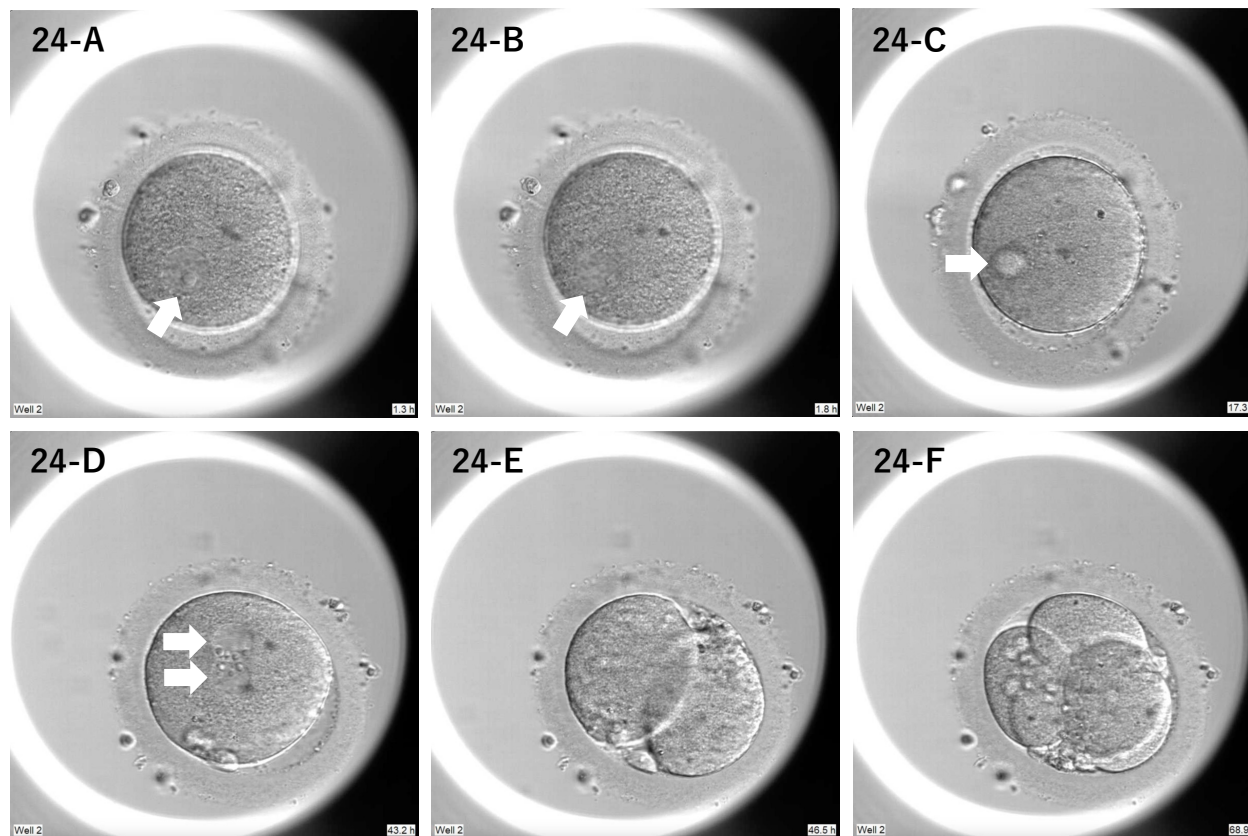


図 24.出産まで至った症例の各イベントのタイムラプス画像（新鮮胚移植、2023/2/5 出産）

GV 期にクロマチンの集積が見られ(20-A)、GVBD が起き(20-B)、第一極体が放出され(20-C)、成熟卵となる。ICSI 施行後、2 前核の形成(20-D)、2 分割期(20-E)、4 分割期(20-F)で新鮮胚移植し、39 週 4 日で健児の出産に至った（出産時 2718g）。

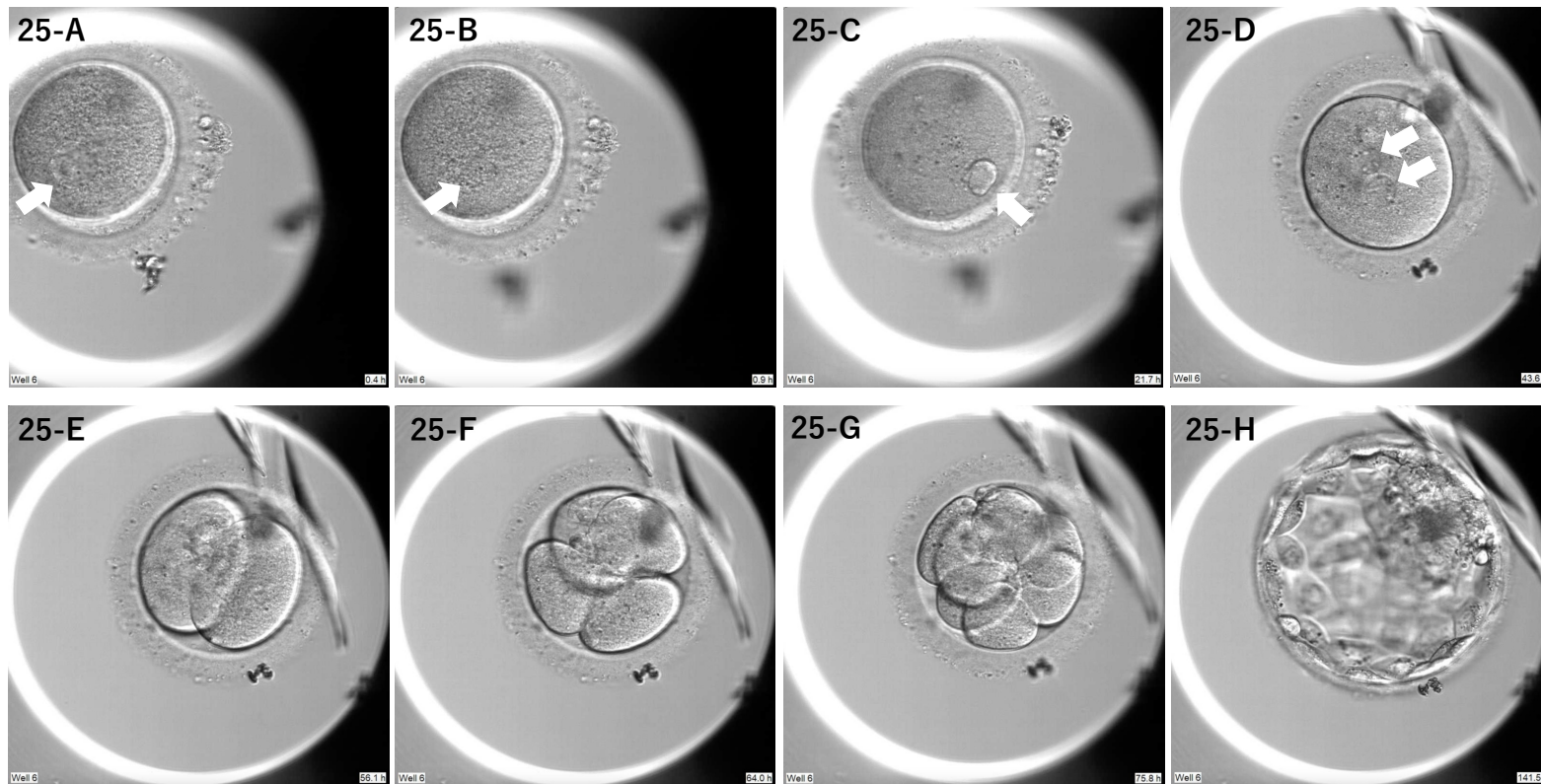


図 25.出産まで至った症例の各イベントのタイムラプス画像（凍結融解胚移植、2022/6/19 出産）

GV 期にクロマチンの集積が見られ(21-A)、GVBD が起き(21-B)、第一極体が放出され(21-C)、成熟卵となる。ICSI 施行後、2 前核の形成(21-D)、2 分割期(21-E)、4 分割期(21-F)、8 細胞期(21-G)、胚盤胞の形成(21-H)を確認後に凍結。その後、ホルモン補充周期の凍結融解胚移植し、39 週 4 日で健児の出産に至った（出産時 3240g）。