

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11098

研究課題名(和文) ヒト卵子形成および胚発生における卵胞液中・血中脂肪酸の影響

研究課題名(英文) Effects of polyunsaturated fatty acids on fertilization and embryonic development

研究代表者

銘苺 桂子 (Mekaru, Keiko)

琉球大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：30444912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、卵胞液中のPUFA(多価不飽和脂肪酸)の濃度が、卵子の質や受精、胚の質との関連を明らかにすることである。2016年8月から2017年12月の間に、体外受精と胚移植の対象となる28人の女性を対象に前向き研究を実施。28個の血清サンプルと140個の卵胞液サンプルを収集し、PUFA分画をガスクロマトグラフィーを使用して分析した。各患者の6つの連続した卵胞から2mlずつ個別に吸引し、卵胞から採取した卵子のその後の培養状況と一致させた。ある種のPUFAは受精の有無によって有意に高値、または低値であり、卵胞液中のPUFAの濃度は、受精において重要な役割を果たす可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国では、晩婚化により初産年齢が高齢化の一途をたどっており、不妊治療を要するカップルが急増している。不妊治療のひとつである体外受精においては、顕微操作など技術の発展が著しいものの、最終的な妊娠成功には卵子や精子の質が重要である。食生活が卵子の質に関連するかどうかに関する疑問は、大きな研究課題である。本研究により、ある種のPUFA(多価不飽和脂肪酸)が受精に影響する可能性が明らかとなった。しかしながら、良好胚との関連はみられず、食生活の改善によって体外受精の成績を向上させることができるかどうかは未だ不明である。今後のさらなる研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Objective is to clarify the concentration of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the follicular fluid affect fertilization and the quality of embryos. A prospective study was conducted on 28 women eligible for in-vitro fertilization and embryo transfer between August 2016 and December 2017. Twenty-eight serum and 140 follicle fluid samples were collected and analysed. PUFAs fractions from the serum and follicular fluid were analysed using gas chromatography. Two milliliters of follicular fluid was collected from six consecutive follicles of each patient. Each individual follicle was aspirated independently and matched to an oocyte growing in this particular follicular milieu. Certain PUFAs showed significantly higher or lower levels depending on fertilization. There was no significant difference in the concentration of PUFAS in the follicular fluid between good and poor quality blastocyst. The concentration of PUFAs in the follicular fluid plays an important role in fertilization.

研究分野：生殖不妊内分泌

キーワード：生殖不妊内分泌 生殖補助医療 多価不飽和脂肪酸 卵胞液

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

わが国の社会では、晩婚化により初産年齢が高齢化の一途をたどっており、波及的な影響として望むときに子供に恵まれず、不妊治療を要するカップルが急増している。不妊治療における体外受精の実施件数も増加しており、その結果として H22 年では総出生児数に占める体外受精出生児数の割合が 2.7% となるなど、こちらも増加の一途をたどっている。体外受精・胚移植 (In vitro fertilization- Embryo transfer; IVF-ET) では顕微操作など技術の発展が著しいものの、最終的な妊娠成功には卵子や精子の質が重要である。食生活をはじめとする生活習慣が妊娠や胚の質に及ぼす影響については社会的な関心が高まっているものの、どのような因子がどの程度、妊娠成功や胚の質に実際に関わっているかは明らかではなく、科学的な根拠に基づく詳細な解析が求められていた。一方で、脂肪は肥満の原因として摂食制限される傾向があるが、生体内では非常に重要な役割を果たしている。エネルギー源としての貯蔵脂質、細胞膜成分としての構造脂質、情報伝達にかかわるホルモンも脂質である。脂肪酸はこれら脂質の構成成分の主要な成分であり、食習慣と体内脂肪酸構成が密接に関わっていることが示されてきた。しかしながら、妊娠成功や胚の質と食習慣との関係は未だ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は体外受精・胚移植 IVF- ET において卵胞液内の多価不飽和脂肪酸値と、卵子や胚の質、及び体外受精・胚移植の成績との関連について明らかにすることである。ヒト生殖現象における多価不飽和脂肪酸の意義を検討することにより、増加する不妊症の原因の一つが食生活にあることを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

- (1) 血中脂肪酸濃度と卵胞液中脂肪酸濃度の相関、血中ホモシステイン濃度と卵胞液中ホモシステイン濃度の相関: IVF-ET における調節卵巣刺激は GnRH agonist long 法または antagonist 法とし、HMG300 単位を初日と 2 日目に投与、3 日目以降は 225 単位の連日投与とする。18mm 以上の卵胞が 2 個確認できたところで hCG10000 単位を投与し、35 時間後に経膈超音波ガイド下の採卵を行う。採卵直前に静脈血を採取し遠心後血清を凍結、血清中の全脂肪酸分画、を測定する。同一症例のすべての卵胞液をそれぞれに 2ml ずつ凍結し、全脂肪酸分画とホモシステイン濃度を測定し、血中脂肪酸濃度との相関を評価する。また、血中 n-6・n-3 系脂肪酸濃度と卵胞中 n-6・n-3 系脂肪酸濃度、発育卵胞数、採卵数、受精率、採卵決定前の Estradiol 値、妊娠率との相関関係を評価する。
- (2) 卵胞液中脂肪酸濃度、ホモシステイン濃度と卵子・胚の質、胚発生能、妊娠との相関: 採卵 4 時間後に ICSI を行い、それぞれの卵胞液に対応する卵子についてその後の受精、胚発生を評価する。妊娠は胎嚢の確認を以て行う。2) で得られたそれぞれの卵胞液中 n-6・n-3 系脂肪酸濃度と卵胞に対応する卵子・胚の質、胚発生能、妊娠との相関関係を評価する。

## 4. 研究成果

- (1) 卵胞液内多価不飽和脂肪酸濃度は血中濃度よりも有意に低値であり、およそ 1/3 の値であった (表 1)。乳牛においても同様の結果が得られており、卵胞液の脂肪酸濃度は血清中の濃度と相関するものの、卵胞液中の濃度が低い。乳牛の卵胞液にはオレイン酸、パルミチン酸、ステアリン酸が多く含まれるが、血清の 40% 程度の値であった<sup>1)</sup>。ヒトにおいても、卵胞液と血清中の脂肪酸濃

度と相関するが、血清濃度よりも低いとする報告がある<sup>2)</sup>。

- (2) 成熟卵の得られた卵胞液では未成熟卵(MI, GV)の得られた卵胞液よりも有意にリノール酸(n-6PUFA)が有意に低値であった(表 2)。リノール酸はコーン油、ペニ花油、ひまわり油、菜種油に含まれ、n-6系で最も食事に含まれる脂肪酸であり、ウシにおいても、減数分裂と卵子の成熟に関連しているとの報告がある<sup>3)</sup>。
- (3) 受精卵の得られた卵胞液と未受精卵(MII, MI or GV)の得られた卵胞液の多価不飽和脂肪酸濃度の比較においては、n-6系脂肪酸であるリノレン酸が有意に高値、n-3系脂肪酸であるEPAとDHAが有意に低値であった(表 3)。同様に、ヒト卵胞液において、受精卵の数とn-6系脂肪酸であるリノール酸は正の相関を示したとする報告がある<sup>4)</sup>。また、n-6系脂肪酸を摂取させた牛の顆粒膜細胞はステロイド分泌が増加するとの報告がある<sup>5)</sup>。エストロゲン濃度は胚の成熟や受精に関わる重要な因子であることから、n-6系脂肪酸であるリノレン酸によるステロイド合成が受精に影響した可能性が考えられる。
- (4) 良好胚の得られた卵胞液と不良胚の得られた卵胞液の多価不飽和脂肪酸濃度の比較(表 4)では、いずれの多価不飽和脂肪酸も有意差は認めなかった。同様に、着床した胚の得られた卵胞液と着床しなかった胚の得られた卵胞液の多価不飽和脂肪酸濃度の比較でも、着床の有無で多価不飽和脂肪酸濃度に有意差は認めなかった。卵胞液内の多価不飽和脂肪酸は排卵直後の卵子の成熟よりも、受精率に影響を与えている可能性がある。今後は摂食と血中濃度が妊娠との関連を認めるかについて検討していく。

表 1. 多価不飽和脂肪酸の血中濃度と卵胞液内濃度

PUFAs		Concentration of Blood ( $\mu\text{g/ml}$ )	Concentration of follicular fluid ( $\mu\text{g/ml}$ )
Linoleic acid	C18:2 6	914.5 $\pm$ 149.1	238.2 $\pm$ 34.0
-Linolenic acid	C18:3 6	4.8 $\pm$ 1.7	0.93 $\pm$ 0.42
Dihomo- -linolenic acid	C20:3 6	38.9 $\pm$ 13.9	16.5 $\pm$ 4.3
Arachidonic acid	C20:4 6	209.3 $\pm$ 43.8	77.9 $\pm$ 12.2
Docosatetraenoic acid	C22:4 6	5.5 $\pm$ 1.9	5.3 $\pm$ 2.2
Eicosadienoic acid	C20:2 6	8.1 $\pm$ 2.0	4.6 $\pm$ 0.87
Alpha-Linolenic acid(ALA)	C18:3 3	20.1 $\pm$ 7.0	3 $\pm$ 0.65
EPA	C20:5 3	27.6 $\pm$ 10.7	8.1 $\pm$ 3.1
Docosapentaenoic acid	C22:5 3	14.0 $\pm$ 3.5	5.6 $\pm$ 1.5
DHA	C22:6 3	124.7 $\pm$ 31.3	43.4 $\pm$ 8.7

表 2. 成熟卵(MII)の得られた卵胞液と未成熟卵 (MI or GV )の得られた卵胞液の多価不飽和脂肪酸濃度の比較

PUFAs			MII (n = 127)	MI/GV (n = 13)	<i>p</i>
Linoleic acid	C18:2	6	230.3 ± 40.2	257.9 ± 50.1	0.019
-Linolenic acid	C18:3	6	1.05 ± 0.45	0.96 ± 0.31	0.27
Dihomo- -linolenic acid	C20:3	6	15.2 ± 3.8	14.3 ± 4.4	0.39
Arachidonic acid	C20:4	6	75.3 ± 17.5	80.5 ± 21.2	0.34
Docosatetraenoic acid	C22:4	6	5.2 ± 2.3	5.7 ± 4.7	0.7
Eicosadienoic acid	C20:2	6	4.34 ± 0.88	4.4 ± 0.94	0.78
Alpha-Linolenic acid(ALA)	C18:3	3	3.04 ± 0.86	3.26 ± 0.26	0.24
EPA	C20:5	3	8.6 ± 3.6	9.2 ± 3.5	0.54
Docosapentaenoic acid	C22:5	3	5.2 ± 1.3	6.1 ± 2.3	0.12
DHA	C22:6	3	40.2 ± 7.4	42.9 ± 11.1	0.34

表 3. 受精卵の得られた卵胞液と未受精卵(MII, MI or GV )の得られた卵胞液の多価不飽和脂肪酸濃度の比較

PUFA			Fertilised oocytes (n = 90)	Unfertilised oocytes (n = 40)	<i>p</i>
Linoleic acid	C18:2	6	231.1 ± 48.1	233.9 ± 37.1	0.71
-Linolenic acid	C18:3	6	1.12 ± 0.45	0.9 ± 0.39	0.007
Dihomo- -linolenic acid	C20:3	6	15.5 ± 3.6	14.4 ± 4.4	0.16
Arachidonic acid	C20:4	6	75.4 ± 18.1	77.6 ± 2.6	0.51
Docosatetraenoic acid	C22:4	6	5.4 ± 2.6	5.3 ± 3.1	0.8
Eicosadienoic acid	C20:2	6	5.4 ± 2.6	5.3 ± 3.1	0.8
Alpha-Linolenic acid(ALA)	C18:3	3	3.0 ± 0.89	3.0 ± 0.81	0.96
EPA	C20:5	3	8.2 ± 3.5	10.1 ± 3.6	0.004
Docosapentaenoic acid	C22:5	3	5.1 ± 1.3	5.7 ± 1.8	0.036
DHA	C22:6	3	39.9 ± 6.4	42.9 ± 10.7	0.09

表 4. 良好胚の得られた卵胞液と不良胚の得られた卵胞液の多価不飽和脂肪酸濃度の比較

PUFAs			Good quality blastocysts* (n = 15)	Poor quality blastocysts (n = 28)	<i>p</i>
Linoleic acid	C18:2	6	234.3 ± 60.3	211.3 ± 35.5	0.19
-Linolenic acid	C18:3	6	1.4 ± 0.5	1.1 ± 0.5	0.12
Dihomo- -linolenic acid	C20:3	6	16.9 ± 3.3	15.4 ± 3.1	0.17
Arachidonic acid	C20:4	6	80.5 ± 13.5	71 ± 20.2	0.14
Docosatetraenoic acid	C22:4	6	6.2 ± 3.2	5.5 ± 2.8	0.5
Eicosadienoic acid	C20:2	6	4.7 ± 1.25	4.57 ± 1.12	0.75
Alpha-Linolenic acid(ALA)	C18:3	3	2.9 ± 1.1	2.9 ± 1.0	0.99
EPA	C20:5	3	8.6 ± 3.9	7.2 ± 3.2	0.53

Docosapentaenoic acid	C22:5	3	5.5 ± 1.5	5.1 ± 1.3	0.35
DHA	C22:6	3	36.9 ± 35.9	39.7 ± 5.0	0.96

表 5. 着床した胚の得られた卵胞液と着床しなかった胚の得られた卵胞液の多価不飽和脂肪酸濃度の比較

PUFA s			Pregnancy-positive (n = 21)	Pregnancy-negative (n = 14)	p
Linoleic acid	C18:2	6	215 ± 43.1	231.6 ± 43.7	0.2
-Linolenic acid	C18:3	6	1.2 ± 0.54	1.0 ± 0.2	0.075
Dihomo- -linolenic acid	C20:3	6	17.2 ± 4.2	15.1 ± 5.4	0.17
Arachidonic acid	C20:4	6	75.9 ± 20.4	75.1 ± 14.9	0.89
Docosatetraenoic acid	C22:4	6	5.9 ± 3.3	5.3 ± 2.5	0.5
Eicosadienoic acid	C20:2	6	4.4 ± 0.1	4.4 ± 1.2	0.47
Alpha-Linolenic acid(ALA)	C18:3	3	3.0 ± 0.9	2.8 ± 0.9	0.41
EPA	C20:5	3	7.2 ± 2.6	8.1 ± 4.1	0.47
Docosapentaenoic acid	C22:5	3	5.3 ± 1.5	5.1 ± 1.8	0.79
DHA	C22:6	3	38.2 ± 7.3	42.8 ± 8.6	0.17

#### 文献)

1. Leroy JL, Vanholder T, Delanghe JR, Opsomer G, Van Soom A, Bols PE & de Kruif A 2004a Metabolite and ionic composition of follicular fluid from different-sized follicles and their relationship to serum concentrations in dairy cows. *Animal Reproduction Science* 80 201–211. (doi:10.1016/S0378-4320(03)00173-8)
2. Valckx SD, De Pauw I, De Neubourg D, Inion I, Berth M, Franssen E, Bols PE & Leroy JL 2012 BMI-related metabolic composition of the follicular fluid of women undergoing assisted reproductive treatment and the consequences for oocyte and embryo quality. *Human Reproduction* 27 3531–3539. (doi:10.1093/humrep/des350)
3. Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M & Fukui Y 2001 Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction* 122 131–138. (doi:10.1530/rep.0.1220131)
4. Shaaker M, Rahimipour A, Nouri M, Khanaki K, Darabi M, Farzadi L, Shahnazi V, Mehdizadeh A. Fatty Acid Composition of Human Follicular Fluid Phospholipids and Fertilization Rate in Assisted Reproductive Techniques. *Iran Biomed J.* 2012;16(3):162-8. doi: 10.6091/ibj.1081.2012.
5. Mann GE, Lamming GE, Payne JE. Role of early luteal phase progesterone in control of the timing of the luteolytic signal in cows. *J Reprod Fertil* 1998; 113:47–51.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 銘苅 桂子
2. 発表標題 卵胞液中の多価不飽和脂肪酸濃度は受精率と関連する可能性がある
3. 学会等名 日本生殖医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 銘苅 桂子
2. 発表標題 Polyunsaturated fatty acid concentration in human follicular fluid may affect fertilisation
3. 学会等名 日本産科婦人科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiko Mearu
2. 発表標題 Polyunsaturated fatty acid concentration in the human follicular fluid may affect fertilization
3. 学会等名 European Society of Human Reproduction and Embryology (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	屋 宏典 (OKU HIRONORI) (10177165)	琉球大学・熱帯生物圏研究センター・教授  (18001)	