

## Effects of Anticentromere Antibodies on Oocyte Maturation and Embryo Cleavage

Naomi HIDAKA<sup>1)</sup>, Kyoko SHIROTA<sup>1)</sup>, Yumi NAGATA<sup>2)</sup>,  
Kou HONJOU<sup>2)</sup>, Shingo MIYAMOTO<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

<sup>2)</sup> IVF Nagata Clinic

### Abstract

Several studies have reported that antinuclear antibodies (ANA) are related to adverse reproductive events. The purpose of this study was to investigate the clinical significance of anticentromere antibodies (ACA) among types of ANA in patients undergoing IVF and ICSI. The rate of fertilization was significantly decreased and the levels of multipronuclear oocytes were significantly increased in the patients with positive ACA (ACgroup) compared with that observed in the negative ACA (ANgroup) and negative ANA (Cgroup) groups undergoing IVF. Meanwhile, the levels of metaphase II oocytes and rates of fertilization and embryo cleavage were significantly decreased and the multipronuclear rate was significantly increased in the ACgroup compared with the ANgroup and Cgroup in the patients undergoing ICSI. These data suggest the ACA adversely affects the results of ART in infertile females.

**Key words:** Antinuclear antibody, anticentromere antibody, fertilization rate, multipronuclear, ART

### 抗セントロメア抗体が卵および胚に及ぼす影響

日高 直美<sup>1)</sup> 城田 京子<sup>1)</sup> 詠田 由美<sup>2)</sup>  
本庄 考<sup>2)</sup> 宮本 新吾<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 福岡大学医学部 産婦人科

<sup>2)</sup> アイブイエフ詠田クリニック

**要旨:** 自己抗体, 特に抗核抗体 (antinuclear antibodies: ANA) と不妊の関係が近年報告されている. ANA の1つである CREST 症候群に特徴的な抗セントロメア抗体 (anticentromere antibodies: ACA) と不妊との関係を調べるため, 生殖補助医療 (ART) 症例を ACA 陽性患者 (ANA+/ACA+: AC 群 n=19), ACA 以外の ANA 陽性患者 (ANA+/ACA-: AN 群 n=59), ANA 陰性患者 (コントロール ACA-/ANA-: C 群 n=100) の3群に分け, 卵の成熟度, 正常受精率, 多前核胚出現率, 胚分割率を後方視的に調査した. IVF (in vitro fertilization) では, AC 群で正常受精率が有位に低く, 多前核胚出現率が有位に高かった. 分割率は AC 群及び AN 群で低い傾向にあった. ICSI (intracytoplasmic sperm injection) では AC 群で GV (germinal vesicle) 率及び M I (metaphase I) 率が有位に高く, M II (metaphase II) 率は有位に低かった. 正常受精率及び分割率は AC 群で有位に低く, 多前核胚出現率は有位に高かった. 以上より, ACA が卵の体内での成熟及び胚の体外での発生に負の影響を及ぼしていることが示唆された.

**キーワード:** 抗核抗体, 抗セントロメア抗体, 受精率, 多前核胚, ART

## はじめに

近年、生殖補助医療技術 (Assisted reproductive technology: ART) により、不妊治療は大きく進歩した。特に顕微受精 (intracytoplasmic sperm injection: ICSI) の開発が、高度乏精子症や受精障害の患者の治療成績の向上に大きく貢献している。2011年の総出生児数1,050,806人のうち、ARTによる出生児数は32,426人で、全体の3.1%を占めている。日本で初めての体外受精児が誕生した1983年以降、2011年までのARTによる累積出生時数は303,806人と、30万人を超えていることが報告されている。<sup>(1)</sup>

ARTを複数回施行してもなかなか妊娠に至らない難治性不妊の患者が存在し、その多くが原因不明とされてきた。近年、一部の難治性不妊症例の中に抗核抗体が陽性の症例が存在し、自己抗体が不妊と関わる事が報告されている。<sup>(2-10)</sup>しかし、多数の疾患特異的な抗核抗体が存在する中で、どの抗体が不妊と関連するのかについては不明な部分が多く、意見が分かれている。<sup>(11-13)</sup>ANAの一つであり限局性皮膚硬化症 (CREST症候群) に特異的な抗セントロメア抗体 (anticentromere antibodies: ACA) 陽性患者については、ICSIの際に得られる成熟卵の割合が低く、受精後も胚の分割率が低い事が報告されている。<sup>(14,15)</sup>今回の研究では、ACA陽性患者 (ANA+/ACA+: 以下AC群) の卵の成熟度、正常受精率、多前核胚出現率、胚分割率を、ACA以外のANA陽性患者 (ANA+/ACA-: 以下AN群) と、ANA陰性患者 (ACA-/ANA-: コントロール群, 以下C群) と比較し、ACAが卵の体内での成熟および胚の体外での発生に及ぼす影響を明らかにする事を目的とした。

## 対象と方法

### 対象

2006年5月から2013年12月までの間に、IVF 詠田クリニックでARTを行った2340人のうち、AC群19人 (42採卵周期) を対象とした。年齢、BMI (body mass index) でマッチングを行い、AN群59人 (115採卵周期)、C群100人 (149採卵周期) を無作為に抽出し、卵の成熟度、正常受精率、多前核胚出現率、胚分割率について後方視的ケースコントロール研究を行った。本研究は十分なインフォームドコンセントの下に了承を得て、福岡大学の倫理委員会で承認を受けた。

### 排卵誘発

排卵誘発は、年齢や過去の治療成績等に応じてGnRH (gonadotropin releasing hormone) アゴニスト法 (short,

ultra-short, long) あるいはGnRH アゴニストを使用しない低刺激法 (minimal, antagonist) を選択した。卵巣刺激にはhMG (human menopausal gonadotropin) またはrecombinant FSH (recombinant follicle stimulating hormone: rhFSH) を使用した。hMG/rhFSHの投与は、経陰超音波で卵胞発育をモニタリングしながら、年齢や過去の排卵誘発に対する反応も参考に月経3日目より卵胞径が18mmに達するまで連日投与 (150-450単位/日) した。採卵の約36時間前にhCG (5,000-10,000単位) を投与した。

### 培精 (in vitro fertilization: IVF) 及びICSIと胚の評価

採卵後の卵子は2-3時間の前培養後、精子所見に準じてIVFまたはICSIを施行した。ICSIはヒアルロニダーゼ処理を行い、GV (germinal vesicle) 率、M I (metaphase I) 率、M II (metaphase II) 率も検討した。IVFあるいはICSIの約18時間後に受精確認をし、2前核 (two distinct pronuclei: 2PN) 及び第2極体 (second polar body) を認めるものを正常受精とした。正常受精率 (2PN/総培精・ICSI数)、多前核胚出現率 (3PN以上/総受精数)、分割率 (day2-3で4-8細胞/総2PN胚) を検討した。

### 統計学的分析

Kruskal-Wallis検定、Tukey-Kramer法、及び $\chi^2$ 検定で行い、P値<0.05を有意差ありとした。

## 結 果

患者背景を表1に示す。平均年齢、BMIは各群間に有意差は認めなかった。原発性不妊はAC群及びAN群で高い傾向にあったが、有意差は認めなかった (P=0.121)。不妊期間はC群に比べAC群が有意に長かった (P=0.021)。

総hMG・rhFSH量はGnRHアゴニスト法では各群間に有意差は認めなかった。低刺激法では他の2群に比べAC群で有意に投与量が多かった。hCG投与時の血中E2値、LH値、FSH値は全て各群間に有意差は認めなかった。採卵数も各群間に有意差は認めなかった。

### IVF

正常受精率はAC群で35.3±0.09%、AN群で70.0±0.03%、C群で70.3±0.03%と、他の2群よりAC群で有意に低く (P=0.0038) (図1a)、多前核胚出現率はAC群で32.4±0.08%、AN群で7.6±0.02%、C群で7.5±0.05%と、AC群で他の2群より有意に高かった (P=0.0013) (図1b)。分割率はAC群で83.9±0.09%、AN群で84.4±0.03%、C群で97.1±0.01%と、AC群及びAN群で低い傾向にあった。

表 1 患者背景

	AC群(n=19)	AN群(n=59)	C群(n=100)	P値
採卵周期	42	115	149	-
年齢(歳)	36.9±0.6	37.1±0.3	36.7±0.3	.532
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	21.8±0.8	21.7±0.4	20.9±0.3	.129
原発性不妊(%)	84.2	78.0	66.0	.121
不妊期間(年)	5.0±0.6 <sup>b</sup>	3.6±0.3	3.4±0.2	.021
排卵誘発法 (%)				.663
GnRHa(+)	32(76.2)	95(82.6)	120(80.5)	-
GnRHa(-)	10(23.8)	20(17.4)	29(19.5)	-
hMG・rhFSH投与量(IU)				
GnRHa(+)	1850±120.8	2016±80.7	1775±61.9	.070
GnRHa(-)	1755±300.7 <sup>ab</sup>	851.3±147.9	958.6±61.2	.009
hCG投与時のホルモン値				
E2(pg/mL)	2917±272.6	3457±235.5	3499±218.5	.676
LH(mIU/mL)	4.7±0.5	5.5±0.6	5.6±0.3	.058
FSH(mIU/mL)	13.3±1.1	12.2±0.5	12.6±0.4	.761
採卵数	10.6±1.0	10.8±0.8	9.5±0.6	.421

平均値±標準誤差。  
 a P<0.05 AC群 vs AN群  
 b P<0.05 AC群 vs C群

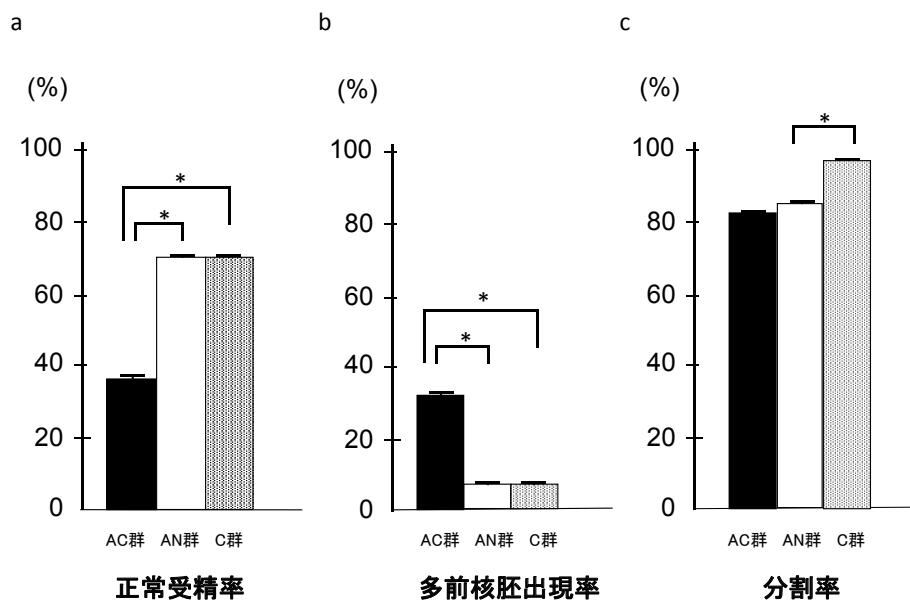


図 1 IVF 結果 a) 正常受精率 b) 多前核胚出現率 c) 分割率  
 平均値 ± 標準誤差, \*P<0.05

統計学的分析では AN 群と C 群間のみ有意差を認めた (P<0.0001) (図 1 c).

ICSI

GV 率及び M I 率は AC 群で他の 2 群より有位に高かった。一方、M II 率は AC 群で他の 2 群より有位に

低かった (表 2)。正常受精率は AC 群で 47.5±0.09%, AN 群で 81.7±0.03%, C 群で 80.9±0.02% と、AC 群で他の 2 群より有位に低かった (P<0.0001) (図 2 a)。多前核胚出現率は AC 群で 35.0±0.05%, AN 群で 0.9±0.004%, C 群で 2.4±0.008% と、AC 群で他の 2 群より有位に高かった (P<0.0001) (図 2 b)。分割率は AC 群で 67.6±0.06%,

表 2 卵子成熟率

	AC群	AN群	C群	P値
GV率(%)	9.7±0.03 <sup>ab</sup>	2.1±0.01	3.7±0.01	.0008
M I 率(%)	21.9±0.03 <sup>ab</sup>	6.4±0.02	4.3±0.01	<.0001
M II 率(%)	71.7±0.04 <sup>ab</sup>	91.6±0.02	92.1±0.01	<.0001

平均値±標準誤差.

a P<0.05 AC群 vs AN群

b P<0.05 AC群 vs C群

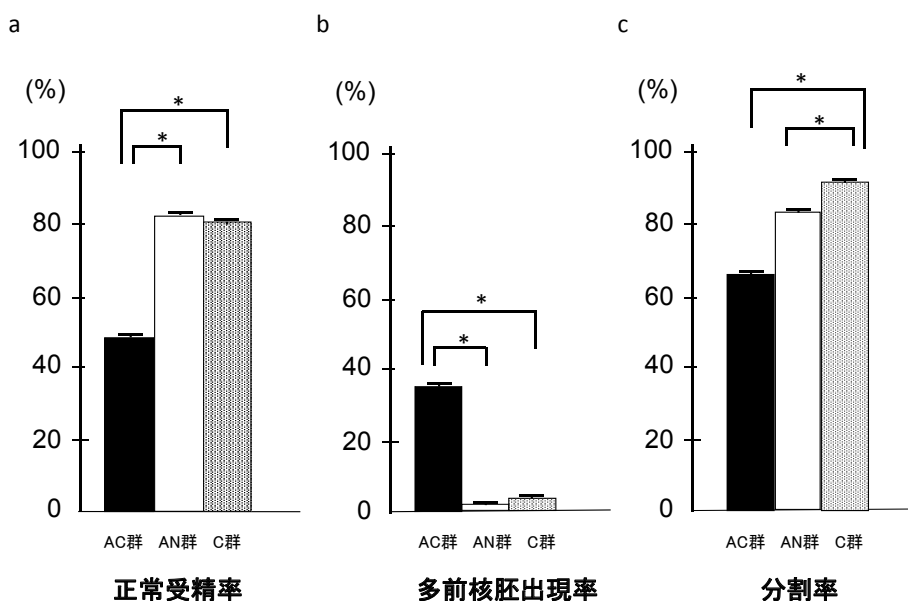


図 2 ICSI 結果 a) 正常受精率 b) 多前核胚出現率 c) 分割率  
平均値±標準誤差, \*P<0.05

AN 群で 82.1±0.03%, C 群で 91.5±0.02% と, AC 群及び AN 群は C 群に比べ有位に低かった (P<0.0001) (図 2c).

### 考 察

今回の研究で, ACA 陽性の症例では他の 2 群に比べて卵の成熟率及び正常受精率, 胚の分割率が低いことが明らかになった. また, ACA 陽性の症例では多前核胚出現率が他の 2 群に比べて有意に高い事が分かった.

胎生期に第一減数分裂前半で分裂停止していた卵 (GV) は, LH サージ (hCG 投与) の刺激を受け第一減

数分裂を再開し, M I 卵を経て M II 卵となって, 初めて受精可能な状態になる. 今回 AC 群で他の 2 群より GV 率及び M I 率が有意に高く, M II 率が有意に低かった事から, ACA が第一減数分裂再開後, 全ての段階において影響を及ぼしていると考えられた.

我々は AC 群と AN 群との ICSI における成績を比較し, AC 群で M II 率及び分割率が低いことを報告しているが, この時受精率に有意差は認めなかった.<sup>(14)</sup> 今回症例の増加により AC 群では受精率も有位に低い事が明らかになった. 今回 AC 群で多前核胚出現率が有位に高い事が分かった. 多前核胚は, 異常受精により正常な細胞分

裂が起こらないために移植できない胚である。一般に多前核胚の出現には多精子受精の他に、第二極体の放出不全があるとされ、その多くは卵の質の低下によって起こると言われている。IVFでは多精子受精が起こりうるが、ICSIでは1個の精子を卵子細胞内に注入するため、多精子受精が多核の原因とは考えられない。また、第二極体の放出不全では3PNは起こり得るものの、今回の研究では抗AC群で4PNや5PN, 6PNまで散見された。ICSIでの多前核胚出現の原因として、その他に第二極体放出後の染色分体の分離不全、染色分体の散布による可能性があるという報告もある。<sup>(16)</sup>このような結果からAC群では減数分裂、受精、胚分割の各段階で障害を来す可能性が示唆される。

セントロメアはDNAと蛋白の複合体で、紡錘体微小管が染色体に直接結合する部分に存在し、減数分裂及び有糸分裂の際に重要な役割を果たしていると考えられている。<sup>(17)</sup>1990年に、マウスの卵にCREST症候群の患者血清から抽出されたACAを注入した結果、主に減数分裂中期と有糸分裂前中期に染色体の移動、分離障害を認めたという報告がある。<sup>(18)</sup>そのため、ACAが細胞分裂の障害を引き起こしていると考えられるが、明確なメカニズムは不明である。

強皮症患者では、その発症以前から妊孕性の低下が認められているとの報告がある。<sup>(19-22)</sup>今回の症例でも、AC群19名のうち実際に強皮症を発症しているのは3名だけだった。ANAは、核の染色パターンの違いにより認識する抗原を特定しているものであり、病態生理を反映している訳ではない。ANAの病因的意義は、いまだ明確とは言えないが、ANA自体が病原性を有する事が近年強く示唆されている。その機序として、ANAがその対応抗原とともに免疫複合体を形成し臓器に沈着する、ANAが臓器表面に沈着もしくはそこに存在する自己抗原に結合し補体活性化を促す、ANAが生きている細胞表面に結合してその細胞機能を変化させる、等が考えられ、近年抗リポゾーム抗体が活性化T細胞や単球の表面に結合し、TNF $\alpha$ やIL-6の産生を刺激するなど生体内の細胞に対し直接作用する事が示唆されている。<sup>(23)</sup>ANAの中でも抗DNA抗体については、それが病因的な抗体であると考えられ、抗DNA抗体の産生の抑制を目的とした治療法が提案されてきた。<sup>(24)</sup>しかし、ACAについては明らかな報告はない。よって、ACAの膠原病における病態生理をそれぞれ辿っていくと、ACAが卵、胚にどのように影響を与えるかについての情報が得られるかもしれない。また、ANAは多種存在し、ACA以外にもARTの治療成績に影響を及ぼすものが存在する可能性はある。今後更なる研究が必要である。

## 参 考 文 献

- 1) 日本産科婦人科学会:平成24年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告(2011年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2013年7月における登録施設名)
- 2) Geva E, Amit A, Lerner-Geva L, Azem F, Yovel I, Lessing JB: Autoimmune disorders: another possible cause for in-vitro fertilization and embryo transfer failure. *Hum Reprod*, Oct; 10(10): 2560-3, 1995.
- 3) Birkenfeld A, Mukaida T, Minichiello L, Jackson M, Kase NG, Yemini M: Incidence of autoimmune antibodies in failed embryo transfer cycles. *Am J Reprod Immunol*. Mar-Apr, 31(2-3): 65-8, 1994.
- 4) Geva E, Yaron Y, Lessing JB, Yovel I, Vardinon N, Burke M, Amit A: Circulating autoimmune antibodies may be responsible for implantation failure in in vitro fertilization. *Fertil Steril*, Oct; 62(4): 802-6, 1994.
- 5) Cubillos J, Lucena A, Lucena C, Mendoza JC, Ruiz H, Arango A, Quiroga G, Ferro J, Lucena E: Incidence of autoantibodies in the infertile population. *Early Pregnancy*, Jun; 3(2): 119-24, 1997.
- 6) Taylor PV, Campbell JM, Scott JM: Presence of autoantibodies in women with unexplained infertility. *Am J Obstet Gynecol*, Aug; 161(2): 377-9, 1989.
- 7) Wilson C, Elstein M, Eade OE, Lloyd R, Wright R: Smooth-muscle antibodies in infertility. *Lancet*, Dec 20; 2(7947): 1238-9, 1975.
- 8) Stern C, Chamley L, Hale L, Kloss M, Speirs A, Baker HW: Antibodies to beta2 glycoprotein I are associated with in vitro fertilization implantation failure as well as recurrent miscarriage.: results of a prevalence study. *Fertil Steril*, Nov; 70(5): 938-944, 1998.
- 9) Gleicher N, El-Roeity A, Confino E, Friberg J: Reproductive failure because of autoantibodies: unexplained infertility and pregnancy wastage. *Am J Obstet Gynecol*. June; 160(6): 1376-1385, 1989.
- 10) Tinneberg HR, Gasbarrini A: Infertility today.: the management of female medical causes. *Int J Gynaecol Obstet*, Dec; 123 Suppl 2: S25-30, 2013.
- 11) Ying Y, Zhong YP, Zhou CQ, Xu TW, Wang Q, Li J, Shen XT, Wu HT: Antinuclear antibodies predicts a poor IVF-ET outcome: impaired egg and embryo development and reduced pregnancy rate. *Immunol Invest*. 41(5): 458-68, 2012.
- 12) Ying Y, Zhong YP, Zhou CQ, Xu YW, Ding CH, Wang Q, Li J, Shen XT: A further exploration of the impact of antinuclear antibodies on in vitro fertilization-embryo

- transfer outcome. *Am J Reprod Immunol*, Sep;70(3): 221-9, 2013.
- 13) Kikuchi K, Shibahara H, Hirano Y, Kohno T, Hirashima C, Suzuki T, Takamizawa S, Suzuki M: Antinuclear antibody reduces the pregnancy rate in the first IVF-ET treatment cycle but the cumulative pregnancy rate without specific medication. *Am J Reprod Immunol*, Oct; 50(4): 363-7, 2003.
- 14) Shirota K, Nagata Y, Honjou K, Tsujioka H, Yoshizato T, Miyamoto S: Involvement of anticentromere antibody in interference with oocyte meiosis and embryo cleavage. *Fertil Steril*, Jun;95(8): 2729-31, 2011.
- 15) Ying Y, Zhong YP, Zhou CQ, Xu TW, Miao BY, Wang Q, Li J: Preliminary investigation of the impact of anticentromere antibody on oocyte maturation and embryo cleavage. *Fertil Steril*, Dec;100(6): 1585-9, 2013.
- 16) Rosenbusch BE: A preliminary concept, deduced from cytogenetic analyses, for explaining different types of multipronuclear oocytes obtained after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*, Nov;94(6): 2479-81, 2010.
- 17) Fukagawa T: The kinetochore and spindle checkpoint in vertebrate cells. *Front Biosci*, Jan; 1(13)2705-13, 2008.
- 18) Simerly C, Balczon R, Brinkley BR, Schatten G: Microinjected kinetochore antibodies interfere with chromosome movement in meiotic and mitotic mouse oocytes. *J Cell Biol*, Oct; 111(4) 1491-504, 1990.
- 19) Silman AJ, Black C: Increased incidence of spontaneous abortion and infertility in women scleroderma before disease onset: a controlled study. *Ann Rheum Dis*, Jun;47(6): 441-4, 1988.
- 20) Englert H, Brennan P, McNeil D, Silman AJ; Reproductive function prior to disease onset in women with scleroderma. *J Rheumatol*, Oct; 19(10): 1575-9, 1992.
- 21) Settn VD; Scleroderma and pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am*, Feb; 23(1): 133-47, 1997.
- 22) Scarpinato L, Mackenzie AH; Pregnancy and progressive systemic sclerosis: case report and review of the literature. *Cleve Clin Q*, summer; 52(2): 207-11, 1985.
- 23) 藤井隆夫：膠原病における抗核抗体の産生機序と病原性—治療応用に向けてのオーバービュー。日本臨床免疫学会誌；Vol 28 No4, 192-193.
- 24) 藤井隆夫：膠原病における抗核抗体の産生機序と病原性。 *Jpn J Clin Immunol*; 29(2): 57-64, 2006.

(平成 26. 9. 4 受付, 平成 26. 10. 9 受理)