総説**REVIEW ARTICLE****レーザー・アシストハッチング**

矢野 浩史, 久保 敏子

医療法人 矢野産婦人科

(平成 28 年 3 月 2 日受理, 平成 28 年 3 月 20 日掲載決定)

Laser Assisted Hatching

Kohji Yano, Toshiko Kubo

Yano Maternity Clinic

(Received March 2, 2016, Accepted March 20, 2016)

要 旨

生殖補助医療で得られた受精卵は体外培養の影響により、透明帯の硬化が惹起されて胚の脱出(孵化)が阻害される場合がある。アシストハッチング(assisted hatching: AH)は透明帯の一部分を切開して、孵化を促進する技術である。従来は機械的あるいは化学的 AH が行われてきたが、最近ではレーザー・アシストハッチング(laser assisted hatching: LAH)が広く行われるようになった。LAH は今後も ART をサポートする重要な技術である。

キーワード : 生殖補助医療, 体外受精・胚移植, アシストハッチング, レーザー・アシストハッチング, ダイオードレーザー

Abstract

In the embryos made by assisted reproductive technology (ART), the hatching has been frequently inhibited by the hardening of the zona pellucida due to the *in vitro* culture. Assisted hatching (AH) is a technique to promote the hatching of embryo by breaching a part of zona pellucida using mechanical or chemical method. Laser technologies became increasingly common for zona manipulation. Laser assisted hatching (LAH) is an important technique to support the ART.

Key words : assisted reproductive technology, *in vitro* fertilization and embryo transfer, assisted hatching, laser assisted hatching, diode laser

1. 緒言

1978 年の英国における体外受精・胚移植(*in vitro* fertilization and embryo transfer: IVF-ET)の成功により、生殖補助技術(assisted reproductive technology: ART)は女性の不妊症に対する切り札的な治療として発展してきた。さらに、顕微授精(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)により男性不妊も治療可能となり、瞬く間に ART は世界中において難治性不妊患者に実施されるようになった。日本では東北大学産婦人科チームによる成功(1983

年)を受けて本格的に臨床応用を開始したが、欧米の先進治療国より 5 年遅れることとなった。しかしながら、その後の ART 実施件数は急増し、現在では世界で最も多く実施されている国となった。2013 年の ART による年間出生児数は 40000 人を超え、全出生児の 4% に達している。レーザーの医療分野における発展は目覚しく、YAG あるいは KTP レーザーなどは手術の際に多く用いられているが、ART の分野においてもその有用性は認知されている。顕微鏡下に卵子や受精卵を操作する際に

はレーザーが不可欠な機器として用いられている。受精卵の透明帯を一部分切開して、孵化（ハッチング）を促進するアシストハッチング（assisted hatching: AH）は 1980 年の始めより行われてきたが、レーザーが導入されることによって精度が飛躍的に向上した。本稿では主にレーザーを用いたアシストハッチング（AH）について解説する。

2. アシストハッチング（AH）

透明帯は卵母細胞の周囲を取り囲むように存在している細胞外マトリックスである。卵母細胞と卵胞の発育に伴ってその厚みを増して、成熟したヒト卵子の透明帯の厚さは約 15 μm となる。生理的意義として卵子あるいは受精卵（胚）の保護を担っている。受精卵が胚盤胞までに発育すると、その透明帯は伸展されて菲薄化し一部分が破綻して胚の脱出が始まる（Fig.1）。これを胚の孵化（ハッチング）というが、ハッチングした胚が子宮内膜に着床すれば妊娠が成立する。IVF や ICSI 等の ART で得られた受精卵は体外培養や凍結融解処理の影響により透明帯が硬化（zona hardening）し、ハッチング障害が惹起されやすく^{1,2)}、着床率が低下すると云われている。AH はこのように変化した胚の透明帯の一部を切開する、あるいは孔を開けるなどの操作を施してハッチングを促進する技術である。以前より機械的あるいは化学的 AH が行われてきたが、最近ではダイオードレーザー（diode laser）を用いる AH が広く行われている。

Fig.1 Time-lapse observation of the embryo natural hatching (EmbryoScope®). (a) Expanded blastocyst. (b) Starting to the hatch. (c) On the way to the hatching.

Fig.2 Zona dissection.

2.1 アシストハッチング（AH）の種類

AH について多くの種類が考案されているが、代表的な方法について解説する。

2.1.1 機械的方法

透明帯切開法（zona dissection）³⁾

AH を考案した Cohen が最初に発表した方法である³⁾。囲卵腔の広い部分を 12 時方向にして胚を固定し、マイクロピペットで透明帯を穿刺貫通する。固定用ピペットに擦り合わせる様にして透明帯の一部を切開する。sucrose 処理した胚盤胞に対する透明帯切開を示す（Fig.2）。技術的に若干難しいため、効果が不安定で、胚が傷害される可能性がある。

2.1.2 化学的方法

1) 透明帯開孔法（zona opening）⁴⁾

透明帯切開法に次いで考案された。透明帯を化学的に薬液処理する方法である（Fig.3）。マイクロピペットで酸性タイロイド液（acid Tyrode; pH 2.5）を固定した胚に吹き付けて透明帯を溶解する（Fig.4 (a)）。透明帯の外層は厚いが溶解しやすく、内層は薄く膜状であるが溶解しにくい。外層が溶解されて内層に到達したら、タイロイド溶液の吹き付けを止めて膜表面にマイクロピペットの先端を付着させ（Fig.4 (b)）、強く吸引して膜を破り開孔する（Fig.4 (c)）。分割期胚にも胚盤胞にも応用できるが、薬液による胚への影響が危惧される。

Fig.3 Zona thinning/opening.

Fig.4 Zona thinning/opening of the embryo. (a) Thinning of the outer layer of zona pellucida (ZP) by spraying the acid Tyrode solution. (b) Drawing of the inner layer of ZP by the pipette. (c) Breaching of the inner layer of ZP.

2) 透明帯菲薄法 (zona thinning) ⁵⁾

透明帯菲薄法の操作は開孔法と同様に行う (Fig.3). 透明帯の外層のみを溶解して内層を破らず温存する (Fig.4 (a)). 透明帯の個々の性質により溶解の程度が様々であり, すべての胚を均一に処理することは難しく技術を要する. 初期胚における透明帯の意義は胚実質の外部環境からの保護や分割球の拡散防止などであるが, 開孔すれば透明帯の胚に対する保護作用が破綻する. また, 開孔を行なう際に胚実質が酸性溶液により障害される可能性がある. 菲薄法はこれらの欠点を補うために考案されたが, 広範囲に菲薄する方がより効果的である ⁶⁾.

2.1.3 レーザーを用いる方法

1) レーザー・アシストハッチング (laser assisted hatching: LAH) ⁷⁾

LAH は倒立顕微鏡のステージ下方から dish 中の胚にレーザーを照射して透明帯の処理を行なう方法である (Fig.5). セッティングや操作の煩雑さが少なく, 初心者であっても簡単に透明帯の処理を行なうことができる. 初期の頃には Excimer (エキシマ), ArF (アルゴン), XeCl (キセノン), YAG (ヤグ) などのレーザーが試されたが, 現在は波長 1.48 μm の赤外線ダイオードレーザー (infrared diode laser) が用いられている ⁷⁾. このレーザーは安全性が高く, プラスチックシャーレや培養液に吸収されにくいため非接触型のシステムが可能である. また, 装置が小型で倒立顕微鏡に設置可能で, 従来の装置に比べて安価である. 安全対策として照射は低出力 (Class 1M) で使用され, レーザー熱の影響を軽減するように照射時間の制限や等温線リング機能を備えている. 最近は照射部位や範囲をモニター上で指示するだけで自動的に透明帯の処理ができるソフトも登場している. OCTAX-NLAS レーザーシステム (OCTAX NaviLaseTM, MTG Medical Technology Vertriebs-GmbH, Germany) を示す (Fig.6, 7). OCTAX-NLAS の仕様は出力: 100 ~ 150 mW, 照射時間: 0.1 ~ 50.0 ms (0.1 ms 毎の設定が可能), 照射精度: 1 μm 未満である. 他のシ

Fig.6 System of laser assisted hatching (LAH). Equipping for OCTAX NaviLaseTM to Inverted microscope (OLYMPUS IX71).

Fig.7 Laser assisted hatching (LAH). (OCTAX NaviLaseTM). Pulse frequencies can be changed.

Fig.5 Laser assisted hatching (LAH).

ステムとして, ZiIos-tk (Zona Infrared Laser Optical System; Hamilton Thorne Research, USA), Saturn 5 Active (Research Instruments Limited, UK) などがあり同様に使用できる.

2) レーザー・アシストハッチング (LAH) の実際

従来の方法に比べて, より均一にかつ微細に透明帯の処理ができるようになった. レーザー光照射により透明帯はスポット状に蒸散される. 照射時間 2.6 ~ 2.9 ms で一回の照射で径 10 μm 程度のスポットができるように設定して, 照射を繰り返す (Fig.8). レーザー光照射により生じる熱の胚に対する影響を回避するため, 胚実質から最も離れた透明帯部分に照射する. 胚の発育を連続観察できるタイムラプスシステム (time-lapse cinematography) を用いると透明帯を薄く処理した部位からハッチングが始まっていることを観察できる (Fig.9). また, 受精卵の染色体異常などを調べる着床前診断 (preimplantation genetic diagnosis: PGD) の際にレーザーを用いると胚の割球生検や胚盤胞生検が容易となる (Fig.10).

Fig.8 Laser assisted hatching (LAH) for the embryo. (a) Dissection of the zona pellucida. (b) Thinning of the zona pellucida.

Fig.9 Time-lapse observation of the laser thinning embryo hatching. (EmbryoScope®). (a) Thinning of the zona pellucida. (b) Starting to the hatch from the part of thinning. (c) On the way to the hatching.

Fig.10 Application of laser to preimplantation genetic diagnosis (PGD). (a) Opening of the zona pellucida by laser. (b) Aspiration of blastomere by inserting the biopsy pipette from the part of opening. (c) Removal of blastomere.

3. アシストハッチング (AH) による発生リスク

レーザーによる AH の大規模調査は未だ無いので、従来から行われてきた AH における報告を示す。一卵性双胎 (monozygotic twin: MZ-T) の自然妊娠における発生率はおおよそ 0.4% と稀であるが、AH による MZ-T の発生リスクを指摘する報告がある⁸⁾。不十分な透明帯処理を行うと狭い切開部分から胚がハッチングする際に絞扼されて MZ-T のリスクになると考えられている。なお、先天性奇形の発生リスクは否定的である^{9,10)}。

4. まとめ

アシストハッチング (AH) が考案されてから 20 年以上経過したにもかかわらず、妊娠率が改善されるかについて議論されている。AH は全ての症例に有効という訳ではない^{11,12)} が、世界中の多数の施設において実施されているというエビデンスを考慮すれば、今後も ART における重要な技術であると思われる。

利益相反の開示

開示すべき利益相反なし。

参考文献

- 1) I. DeMeestere, P. Barlow, F. Leroy: Hardening of zona pellucida of mouse oocytes and embryos *in vivo* and *in vitro*. *Int J Fertil Womens Med*, 42: 219-222, 1997.
- 2) J. Carroll, H. Depypere, C.D. Matthews: Freeze-thaw-induced changes of the zona pellucida explains decreased rates of fertilization in frozen-thawed mouse oocytes. *J Reprod Fertil*, 90: 547-553, 1990.
- 3) J. Cohen, C. Elsner, H. Kort, H. Malter, J. Massey, M.P. Mayer, K. Wiemer: Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisted hatching using micromanipulation. *Hum Reprod*, 5: 7-13, 1990.
- 4) J. Cohen, M. Alikani, J. Trowbridge, Z. Rosenwaks: Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod*, 7: 685-691, 1992.
- 5) E.A. Khalifa, M.J. Tucker, P. Hunt: Cruciate thinning of the zona pellucida for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum Reprod*, 7: 532-536, 1992.
- 6) K. Yano, C. Yano, T. Kubo, I. Ohashi, N. Maeda, T. Fukaya: Chemical zona pellucida thinning with acidified Tyrode's solution: comparison between partial and circumferential techniques. *J Assist Reprod Genet*, 24: 471-475, 2007.
- 7) M. Germond, D. Nocera, A. Senn, K. Rink, G. Delacrétaz, S. Fakan: Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48-microns diode laser beam: efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril*, 64: 604-611, 1995.
- 8) S. Vitthala, T.A. Gelbaya, D.R. Brison, C.T. Fitzgerald, L.G. Nardo: The risk of monozygotic twins after assisted reproductive technology: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 15: 45-55, 2009.
- 9) K. Kanyo, J. Konc: A follow-up study of children born after diode laser assisted hatching. *Eur J Obstet Gynecol Repro Biol*, 110: 176-180, 2003.
- 10) J. Jwa, S.C. Jwa, A. Kuwahara, A. Yoshida, H. Saito: Risk of major congenital anomalies after assisted hatching: analysis of three-year data from the national assisted reproduction registry in Japan. *Fertil Steril*, 104: 71-78, 2015.
- 11) W.P. Martins, I.A. Rocha, R.A. Ferriani, C.O. Nastri: Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Reprod Update*, 17: 438-453, 2011.
- 12) Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology. Role of assisted hatching in *in vitro* fertilization: a guideline. *Fertil Steril*, 102: 348-351, 2014.

著者紹介

矢野 浩史 (Kohji Yano)

医療法人 矢野産婦人科 院長・理事長.

専門：生殖医療，周産期医療，婦人科内視鏡手術. 昭和57年 久留米大学医学部卒業，昭和62年 愛媛大学医学部付属病院 助手，平成1年 矢野産婦人科.

日本産科婦人科学会認定 産婦人科専門

医，日本生殖医学会認定 生殖医療専門医，日本産科婦人科内視鏡学会 技術認定医，日本卵子学会・生殖医学会認定 管理胚培養士. 日本産科婦人科学会 代議員，日本生殖医学会 代議員，中国四国生殖医学会 理事，日本受精着床学会 評議員，日本卵子学会 代議員，日本産科婦人科内視鏡学会 評議員，A-Part 日本支部 理事，日本IVF学会 評議員，日本レーザーリプロダクション学会 理事. 所属学会：ASRM (American Society Reproductive Medicine), ESHRE (European Society Human Reproduction and Embryology).

久保 敏子 (Toshiko Kubo)

平成8年 愛媛大学大学院理学部研究科生物学専攻修了，平成8年 医療法人 矢野産婦人科 入職，平成15年 日本卵子学会認定 生殖補助医療胚培養士. 所属学会：日本生殖医学会，日本受精着床学会，日本卵子学会，日本臨床エンブリオロジスト学会.