

厚生労働科学研究費補助金
子ども家庭総合研究事業

わが国における新しいリプロダクティブヘルス促進体制
構築のための基礎的・臨床的研究

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 梅澤 明弘

平成19(2007)年4月

目 次

| | | |
|-----|---|----|
| I | 総括研究報告書 | 1 |
| | わが国における新しいリプロダクティブヘルス促進体制構築のための 基礎的・臨床的研究 | 3 |
| | 梅澤 明弘 | |
| II | 分担研究報告書 | 11 |
| | 1. 精液を介する感染症制御の研究～HIV-1、HTLV-1、サイトメガロウイルスを中心に | 13 |
| | 吉村 泰典 久慈 直昭 | |
| | 2. 受精の膜融合にかかる液性因子の同定 | 17 |
| | 岡部 勝 | |
| | 3. 受精の膜融合と卵子活性化にかかわる形態学的解析：老化と凍結の評価を含めて | 19 |
| | 年森 清隆 | |
| | 4. 子宮内膜症合併不妊に対する生殖補助医療の成績向上を目指した臨床的・基礎的研究 | 21 |
| | 矢野 哲 大須賀 穰 | |
| | 5. 卵子の質の低下を引き起こす原因究明に関する基礎的研究 | 25 |
| | 宮戸 健二 | |
| III | 研究成果に関する一欄表 | 27 |
| IV | 研究成果の刊行物・別冊 | 33 |

I 総括研究報告書

わが国における新しいリプロダクティブヘルス促進体制構築のための
基礎的・臨床的研究

梅 澤 明 弘

わが国における新しいリプロダクティブヘルス促進体制構築のための

基礎的・臨床的研究（H18-子ども-プロ-008）

主任研究者 梅澤 明弘 国立成育医療センター生殖医療研究部長

研究要旨：本研究では新しい不妊症治療（生殖補助医療）を国民に長期・安定的に供給すべく、生殖医療の科学的・実用的な品質管理を明示する。HIV-1をはじめとする、妻及び子の双方に重篤な影響を及ぼす感染症については、感染を防ぐために精液と女性の接触を防ぐ必要があり、自然妊娠を望めなくなる。このような場合にはたとえ体外受精や ICSI を使用しても、可能な限り水平感染の可能性を減らす工夫が必要である。連続密度勾配を応用した本法により男性不妊の合併症例においても精子回収率と洗浄効率を両立させることができると考えられた。また本法は HTLV-1 除去にも応用可能である。一方、提供精液を用いた不妊症治療においても、精液を介した感染症制御は大きな問題である。特に胎児病をおこして出生する児に重篤な疾患を生じるおそれのあるサイトメガロウイルスなどの感染症については、男性のスクリーニング検査についてのガイドライン策定が必要である。また、子宮内膜症は不妊症の原因の大きな割合を占めており、本研究において治療の標準化をめざす。子宮内膜症による不妊治療に手術療法と体外受精は有効であるが、いまだ効果は十分でなく更なる妊娠率向上のためには手術療法の限界まで踏まえた管理が必要である。子宮内膜症卵巣嚢胞の保存手術では約 3 割の再発があり、再発率をあげる要因として嚢胞の大きさなどがある。今後は再発まで考えた長期管理の指針を検討していく必要がある。子宮腺筋症は体外受精の成績を低下させなかったため、子宮腺筋症の適切な管理と体外受精を組み合わせることにより妊孕性の向上が期待できると考えられた。メトフォルミンは子宮内膜症に対し治療効果をもつ可能性が示唆されたので、より研究をすすめる必要性が認められた。わが国における新しいリプロダクティブヘルス促進体制は、基礎的・臨床的研究を推進することにより、構築可能となる。

A. 研究目的

我が国における体外受精を中心とする生殖補助技術の利用は 50,000 例に達し、また生殖補助技術由来の出生児は全出生の 1% 以上を占める。この技術が不妊夫婦だけでなくその親族、生まれてくる子供達を含めて国民の多くに関与するようになってきている。本研究では、次世代に悪影響を及ぼさないための品質管理・安全管理に関する

技術革新を基礎的、臨床的側面から推進することを目的とする。

B. 研究方法

1. 生殖補助医療における感染対策

わが国でキャリアの多い HTLV-1 や、近年抗体保有率が低下している cytomegalovirus について、また HIV-1 のような重篤な感染症の精液中の感染リスク評価と精液からの病原体除去について、

基礎的・臨床的検討を行った。

2. 分子生物学的妊孕性評価を目的とした 卵子形成・受精卵初期発生に関わる遺 伝子解析

マウス卵巣から抽出した各発生段階の卵胞卵子に発現する遺伝子を解析し、哺乳動物の卵子発生・初期胚発生に関与する遺伝子を解析する。これをもとにして、ヒト体外受精治療で偶発的に得られた未熟卵・非受精卵・異常受精卵および凍結余剰卵・胚のうち、同意の得られたものを用いてマウスで卵子特異的に発現する遺伝子のホモログのヒトでの発現を検討し、それによりヒト受精卵の質を分子生物学的に測定する尺度を決定した。

3. 子宮内膜症合併不妊

生殖年代の女性に頻度が非常に高く、かつ、不妊症の原因として最も重要な疾患のひとつである子宮内膜症について、不妊治療に与える影響の解析と妊娠率向上を目指した新たな子宮内膜症治療に対する基礎研究を行った。

4. 受精イメージング系の構築

IZUM01, CD9 を免疫染色した結果から、時間経過にともなって IZUM01, CD9 の局在が大きく変化することがわかってきた。そこで、受精のイメージング系マウス卵を用いて構築することにより、受精前後での細胞膜の動態を経時的に明らかにした。

5. 卵子の質低下を引き起こす原因

受精及び胎児の発育に影響を与える母体因子の研究は進んでいない。そこで、母体へのストレスにより排卵後の卵子が影響を受け、10 分後に死滅、または、受精能力が極度に低下することを見出した。マウスをモデル動物として用い、マウスへのストレスとして母体への温度を急速に低下

させた。今後、このような卵子の質の低下を引き起こす母体因子を同定し、母体のストレス応答と卵子の質の低下との関連を明らかにした。

C. 研究結果

1. 生殖補助医療における感染対策

再現性よく精子を回収することを目的として、傾斜回転式連続密度勾配作成器を用いて連続密度勾配を作成した。管底に集まった精子の回収は、試験管の管底に滅菌した画鋸で小孔をあけることにより行った。この分画にはまだ感染性のリンパ球が含まれている可能性があり、術者の針差し事故と飛散を防ぐため、シリコンで作製したプロテクターを使用した。

精液からの HIV 除去効率とそれに関与する因子を検討した。作成した連続密度勾配の上にウイルスを重層して遠心すると、1,600 g、10 分の場合で 1/100,000 程度ウイルスを希釈可能であり、一方精子は同一条件でその 50%以上が管底部に回収できた。

80 症例、159 検体の洗浄精子液の精液性状は、濃度 200 万、あるいは運動率が 5% といった男性不妊症例が含まれていた。このような例も含めて、全例で運動精子が回収可能であった。病勢を現す、血中ウイルス量、CD4 リンパ球数と陽性例の関係では、血中ウイルス量や回収精子数と陽性例は相関しなかった。また、男性不妊を合併して SWIMUP 精子数が少ない症例でも、陽性例はなかった。

HTLV-1 精子について pol 遺伝子を target とした nested PCR の、体外受精培養液中における測定感度は 50 コピー/ml であった。原精液 5500 万/ml、運動率 80% の夫精液より、swim up 精子 290 万/ml、0.6ml を回収することができた。HTLV-1 遺伝子は、swim up 後精子浮遊液では検出されなかった。

29 名の精子提供男性の感染症検査にお

いて、梅毒・B型およびC型肝炎に罹患しているものはいなかった。

cytomegalovirus 抗体については、IgM が陽性であった症例は一例もない。前期に IgG が陰性で、後期に陽性転化した症例も見られなかった。

2. 分子生物学的妊孕性評価を目的とした卵子形成・受精卵初期発生に関わる遺伝子解析

マウス未受精卵遺伝子プロファイルにおける母体加齢による変化を観察した。すなわち、5-6 週齢と 42-45 週齢の CD57BL/6 雌マウスから未受精卵を採取し、NIA 22K 60-mer oligo microarray を用いて比較検討した。なお、ヒト IVF-ET のモデルとなるよう、これらのマウスには採卵前に過排卵を施した。その結果から、加齢による酸化ストレスおよびミトコンドリアの障害などが観察され、生殖細胞でも体細胞と同様の加齢メカニズムを有することが示唆された。しかし一方では、炎症あるいは Insulin/IGF シグナル経路に関わる遺伝子に変化が見られなかったことや“Stemness”に関わる遺伝子 (stress-resistance や chromatin remodeling に関わる遺伝子あるいは RNA helicases など) も加齢により発現低下していたことなどは、卵細胞の加齢に特異的であった。さらに、EST データベースにより卵特異的な発現が示唆される多数の遺伝子において、加齢による発現の低下が認められた。その中に、マウス新規遺伝子群 (既知遺伝子 *Mater* を含む) が含まれることが見出され、着床前期胚の遺伝子発現プロファイリングによれば未受精卵から 2 細胞期胚に特異的に認められ、ヒト NALP(NACHT, Leucine-rich repeat and PYD-containing)⁴、NALP6、あるいは NALP14 にホモロジーを認めた。我々はこの遺伝子群を *Nalp alpha-kappa* と名付け、これらに関し、全長 cDNA の塩基配列、種保存性、発現の組織特異性、着床前期胚における役割などを検討したところ、これらの遺伝子の発現は、Northern blot により卵巣特異的であることが、そして *In situ hybridization* により卵特異的であることが明らかとなった。*Nalp iota* に対する siRNA 発現ベクターを受精卵に注入

すると、コントロールに比較し着床前期胚発生が明らかに阻害されたことから、この遺伝子が着床前期胚発生に重要であることが示唆された。

3. 子宮内膜症合併不妊に対する生殖医療の適応

術後再発は全体 224 例中 68 例に認められ、再発率は 30.4%であった。単変量解析では、年齢、不妊症、子宮筋腫、子宮腺筋症の有無、子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術既往の有無、単数か複数か、片側か両側か、術後薬物治療の有無はいずれも、再発に有意な影響を与えなかった。子宮内膜症に対する薬物療法既往のある症例、最大嚢胞径の大きい症例、rASRM が高得点の症例では、再発を起こしやすい傾向があり、一方術後妊娠した症例では再発を起こしにくい傾向があった。ロジスティック回帰分析では、他の因子と独立して統計学的に有意に再発率を上げる因子として、子宮内膜症に対する薬物既往、大きい最大嚢胞径の 2 因子があげられた。rASRM スコア得点は再発率に統計学的に有意な影響は与えなかった。術後妊娠は再発率を低下させた。

子宮腺筋症の IVF-ET に与える影響の検討では、着床率、臨床妊娠率、流産率で優位差を認めなかった。

患者の同意の下、子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術検体より子宮内膜症性間質細胞を分離培養し、培養上清中の IL-8、aromatase の産生量を ELISA にて測定した。メトフォルミンの添加により、IL-8 産生量は対象に比べ濃度依存性に 67%まで低下させた。また、aromatase の遺伝子発現及び活性を濃度依存性に最大 58%と 66%に抑制した。さらにメトフォルミンの添加は、細胞増殖能を濃度依存性に最大 22%に抑制したが、細胞毒性は認められなかった。

4. 卵子の質低下を引き起こす原因

性成熟した 8 週齢マウスからの卵子の採取を行ったところ、ストレス投与群から採

取した排卵卵子は90%以上が形態の異常を呈し、1時間以内に断片化を起こし、残りの10%についても6時間以内に死滅した。それに対し、コントロールとして安楽死直後に採卵した卵子では、細胞死の割合は10%以内であった。未成熟な3週齢マウスからの卵子の採取を行ったところ、上記と同様の結果が得られた。

卵巣内にある卵子について、卵巣を細切して取り出したところ、体外培養によって24時間培養することにより、卵子は成熟した卵子の直径に達し、透明体を除くことにより精子との融合も可能であった。

CD9 トランスジェニックマウスを用いて前述の実験を行った。CD9 は膜4回貫通型タンパク質で、CD9 のN末端に蛍光タンパク質を結合させた融合タンパク質はCD9 と同等の機能を持ち、卵子の細胞膜を可視化できる。そこで顕微鏡観察を行ったところ、卵子の細胞膜は崩壊していることが分かった。

D. 考察

1. 精液からの HIV-1 除去効率

感染精液を洗浄してウイルスを除去する場合、洗浄効率と同時に考えなければならないのは精子の回収効率である。通常の体外受精でスィムアップを行った際の精子回収率を鑑みると、密度勾配洗浄とスィムアップを行った場合、症例によっては、回収率は非常に低くなることが予想される。精子回収率を犠牲にしても、ウイルスを可能な限り除去することが必要ではあるが、回収率が低すぎるとウイルスは除去できても精子が一匹も回収できない結果となる。

今回開発した連続密度勾配とスィムアップを用いた精子洗浄法は、精子回収効率を向上させるとともに、男性不妊を合併する HIV-1 感染男性においても、HIV-1 を測定感度以下まで除去した精子浮遊液を調整する事が可能であった。

洗浄精液を用いた治療は、精子内ウイルスの存在が報告されていることから、どのように厳密にウイルス除去を試みても水平感染の可能性は0ではない。しかしこの治療が、挙児を希望するこのような夫婦にとって重要な選択肢である以上、せっかく精液を採取してもそれが使用出来ないことがないように、可能な限り回収率と洗浄効率を改善する工夫が今後も必要と考えられる。

2. HTLV-1 の精液からの除去

わが国西南部（九州・四国南部・沖縄）に罹患者が多い成人T細胞白血病（Acute T-cell Leukemia、以下ATL）の原因ウイルスである human T-lymphotropic virus type 1（以下HTLV-1）は、ATLだけでなくHTLV-1 associated myelopathy（HAM）の病因でもあり、このHTLV-1 キャリアは日本に100万人以上いるといわれている。特にATLは発症すれば約50%が半年以内に合併症で死亡し、残る患者もほとんどが2年以内に死亡する、予後不良の疾患である。

HTLV-1 感染の主因は感染細胞の宿主への移行であり、母乳中の感染リンパ球を介しての母子感染が問題となることは周知の事実であるが、性行為を介した夫婦間感染の存在も考えられている。夫婦間感染については HIV-1 と同様、seroconversion をおこした個体の virus とその配偶者の virus の gp46 envelope 遺伝子（高変異部位）配列が一致すること、感染男性精液がウサギに HTLV-1 感染をおこすことから、精液そのものが水平感染をおこすと考えられている。夫婦間感染の問題は、ATL 発症のほとんどが 40-60 歳であり、感染から発症まで長い期間が必要であるため、水平感染が起こったとしても発症するまでに平均寿命に達してしまい、臨床的には問題とならないとされてきた。しかし、少なくとも水平感染をおこした女性が妊娠・出産する場合に、母乳保育をおこなわない感染予防策をとったとしても2%は子どもが HTLV-1 キャリアとなる。このため、もし男

性が HTLV-1 キャリア、女性が非感染者というカップルが希望する場合には、選択肢の一つとして精液から感染細胞を除いて妊娠をはかる方法は考えられうる。

HTLV-1 は HIV-1 に比べて遺伝子変異が少ないため、中でも変異が低頻度でしかおこらない領域を PCR の標的とすれば、垂型による検出感度の差は少ないと考えられるため、検出系の構築は HIV-1 に比較すれば容易である。また前述のように同じレトロウイルスでも、HTLV-1 は HIV-1 と異なり精漿を含む体内の液性成分に感染粒子が存在する可能性は低いいため、swim up だけでも精液中の感染リンパ球を除いて感染性を低減できる可能性は高い。このように、検出のしやすさからも、感染性低減という面からみても方法論的に HIV-1 の場合より技術的に容易であると考えられるため、ART 施行時に偶発的に発見された夫が感染者、妻が非感染者のカップルでは、精液洗浄をする意義はある。

今回我々は精液中 HTLV-1 遺伝子の高感度検出系を確立し、これを用いることによって精子からの HTLV-1 の希釈が可能であると考えられた。HTLV-1 感染は妊婦検診で発見されることが多いが、献血時の血液検査で偶然発見される例もあり、このような例では本法が HTLV-1 垂直感染予防の一つの選択肢となる可能性がある。

3. 精子提供者におけるサイトメガロウイルス抗体保有状況に関する検討

精子提供において、遺伝的には問題のない胎児に不可逆的な障害をおこす疾患としてサイトメガロウイルス（以下 CMV）は重要な疾患であり、近年わが国でもその先天感染の報告がなされている。

CMV はヘルペスウイルス属の DNA ウイルスであり、環境に普遍的に存在する。通常成人では宿主に症状を起こすことは少ないが、疾病や疾病の治療などで免疫能が低下した患者の場合や、免疫的に未熟な胎児の場合には症候性感染をおこす。とくに胎

児への CMV 感染は全妊娠の 1% におこり、このうち 15% 程度が症候性となって後遺症を併発すると言われており、欧米では最も多い胎内感染であるされている。

我が国においても CMV 先天感染の報告は散見され、IUGR、水頭症、胎児水腫などを併発してその予後は概して不良であり、救命し得た例でも精神発達遅滞や聴力障害等の後遺症を残す。近年日本人成人における抗体保有率が下がっていることから考慮しても、児の先天異常（胎芽病）予防の観点から今後ますます重要となってくる周産期感染症の一つである。

CMV 母子感染で注意すべき事は、このウイルスが非常に多型性に富むため、CMV 抗体のある患者への別の型の CMV ウイルス感染が起こりうることである。Boppana らは、CMV 既感染者でも異なる型の CMV 初感染が起こりうることを報告している。

CMV の感染経路は性交感染だけではないため、たとえ性交がなくても水平感染や児への感染はおこりうるので、精液洗浄をする意義はない。しかし、夫も妻も非感染の場合で、精子提供をこの夫婦がうける場合には、精液からの CMV 感染は大きな問題となる。アメリカ不妊学会（American Fertility Society）および英国男性不妊学会（British Andrology Society）はこれに対して、それぞれ 1990 年および 1999 年に、初回採血時 IgM 抗体陽性、あるいは反復採血時 IgM and/or IgG 抗体陽転者の精液はたとえ妻の抗体陽性であっても使用をひかえるよう勧告している。2. 分子生物学的妊孕性評価を目的とした卵子形成・受精卵初期発生に関わる遺伝子解析

本研究で明らかになった加齢とともにその発現が低下した遺伝子は、卵形成・卵成熟過程において重要な役割を果たしていることが示唆され、卵のクオリティマーカーになりうる。また将来的には、マーカー遺伝子の発現から生殖細胞への分化方向をもつ幹細胞を選別する、あるいは卵形成過程において重要な遺伝子ネットワークのマスター遺伝子を発現調節すること

により胚性幹細胞から成熟卵細胞への分化をより効率的に誘導し、卵形成過程 in vitro model の作製に応用することも考えられる。クローニング技術を用いたテラーメード医療にとって、卵核を除去した大量の成熟卵細胞（卵細胞質）が必要となることが予想されるため、テラーメード医療の基盤整備にも貢献できると考えている。

4. 子宮内膜症合併不妊

子宮内膜症合併不妊の治療のため子宮内膜症性卵巣嚢胞を摘出後、約3割が再発する。そのため、現在不妊治療中である場合にはできるだけ早期の妊娠を目指して短期間に治療をステップアップする必要があると考えられる。一方で、妊娠を先に延ばしたい場合などは再発を予防する方法が必要となってくる。今回の研究で子宮内膜症に対しメトフォルミンが治療薬となる可能性が示唆されたため、副作用が少なく比較的長期間使えるメトフォルミンの更なる検討が必要と考えられる。

子宮腺筋症は社会状況の変化によりますます不妊との関係で重要な疾患となると考えられる。今回の研究では子宮腺筋症が明かに体外受精の成績を低下させるというデータは得られなかったが、子宮腺筋症のなかのあるサブグループが妊孕性を低下させる可能性が残っており、今後より詳細な検討が必要である。

5. 卵子の質低下を引き起こす原因

卵子、特に排卵させた卵子では、マウス母体を安楽死させた後に短時間で細胞死が引き起こされることが明らかとなった。しかし、この現象が急激な温度変化によるものなのか、母体内からのストレス物質により、排卵後の卵子のみが選択的に細胞死を誘導するのかは現在は不明である。ただしこのようなストレス物質を同定すれば短期間で不妊症を引き起こす原因のひとつとなる可能性が考えられる。

E. 結論

1. 生殖補助医療における感染対策

不妊症治療は、人工授精・体外受精が周産期医療に影響を与えるまでに普及した今、次世代へ負の遺産を可能な限り残さない方策を立てることが緊急の課題となっている。HIV-1をはじめとする、妻及び子の双方に重篤な影響を及ぼす感染症については、感染を防ぐために精液と女性の接触を防ぐ必要があり、自然妊娠を望めなくなる。このような場合にはたとえ体外受精やICSIを使用しても、可能な限り水平感染の可能性を減らす工夫が必要である。連続密度勾配を応用した本法により男性不妊の合併症例においても精子回収率と洗浄効率を両立させることができると考えられた。また本法はHTLV-1除去にも応用可能である。

一方、提供精液を用いた不妊症治療においても、精液を介した感染症制御は大きな問題である。特に胎児病をおこして出生する児に重篤な疾患を生じるおそれのあるサイトメガロウイルスなどの感染症については、男性のスクリーニング検査についてのガイドライン策定が必要である。

2. 分子生物学的妊孕性評価を目的とした卵子形成・受精卵初期発生に関わる遺伝子解析

本研究で挙げられた候補遺伝子は、卵子形成・受精卵初期発生において重要な役割を果たしていることが示唆され、分子生物学的に妊孕性を評価するためのクオリティマーカーになりうると考えられた。

3. 子宮内膜症合併不妊

子宮内膜症による不妊治療に手術療法と体外受精は有効であるが、いまだ効果は十分でなく更なる妊娠率向上のためには手術療法の限界まで踏まえた管理が必要である。子宮内膜症卵巣嚢胞の保存手術で

は約3割の再発があり、再発率をあげる要因として嚢胞の大きさなどがある。今後は再発まで考えた長期管理の指針を検討していく必要がある。子宮腺筋症は体外受精の成績を低下させなかったため、子宮腺筋症の適切な管理と体外受精を組み合わせることにより妊孕性の向上が期待できると考えられた。メトフォルミンは子宮内膜症に対し治療効果をもつ可能性が示唆されたので、より研究をすすめる必要性が認められた。

F. 健康危険情報

なし

G. 倫理面への配慮

1. 臨床研究に対する倫理面への配慮

HIV感染男性精液からのvirus除去と除去後精子による人工授精・体外受精・顕微授精(平成13年12月)に関し、慶應義塾大学医学部倫理委員会での承認を得た。

2. ヒト細胞に対する倫理面への配慮

国立成育医療センター研究所においては、ヒト細胞に関し、研究面において既に倫理審査を受け、承認を受けている(国立成育医療センター研究所、受付番号25、26及び27、平成15年1月承認、受付番号49、平成15年10月承認、受付番号55、平成15年11月承認、受付番号88、89、90、91平成16年7月承認、受付番号55、平成16年11月追加承認、受付番号146、平成17年4月承認、受付番号156、平成17年7月承認)。また、それぞれの組織については倫理的な手続きおよび考え方が年次毎に異なると予想され、「ヒト幹細胞等を用いる臨床研究に関する指針」に従い、最新の社会的な影響を十分に考慮する。

3. 実験動物に対する倫理

実験動物を用いる研究については、国立

成育医療センター研究所動物実験指針に準拠して研究を実施する(承認番号2003-002, 2005-003)。特に、動物愛護と動物福祉の観点から実験動物使用は、目的に合致した最小限にとどめる。またその際、麻酔等手段により苦痛を与えない等の倫理的配慮をおこなう。実験者は、管理者と相互協力のもと適切な環境のもと飼育管理を行う。

H. 研究発表

論文発表

1. Cui C, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, and Umezawa A. Human dystrophin expression in the mdx mouse, a model of Duchenne muscular dystrophy, can be conferred predominantly by "cell fusion" with human menstrual blood-derived cells. *Mol. Biol. Cell*, in press. 2007
2. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A. Hyaline cartilage formation and enchondral ossification modeled with KUM5 and OP9 chondroblasts. *J Cell Biochem*. in press. 2007
3. Yamada Y, Sakurada K, Takeda Y, Gojo S, Umezawa A. Single-cell-derived mesenchymal stem cells overexpressing Csx/Nkx2.5 and GATA4 undergo the stochastic cardiomyogenic fate and behave like transient amplifying cells. *Exp Cell Res*. 313:698-706, 2007
4. Umezawa A, Toyoda M. Two MSCs : Marrow stromal cells and mesenchymal stem cells. *Inflammation and Regeneration* 27(1):28-36. 2007
5. Tomita M, Mori T, Maruyama K, Zahir T, Ward M, Umezawa A, Young MJ. A comparison of neural differentiation and retinal transplantation with bone marrow-derived cells and retinal progenitor cells. *Stem Cells*. 24(10):2270-8. 2006

6. Nagayoshi K, Ohkawa H, Yorozu K, Higuchi M, Higashi S, Kubota N, Fukui H, Imai N, Gojo S, Hata J, Kobayashi Y, and Umezawa A
Increased mobilization of c-kit⁺ Sca-1⁺ Lin⁻(KSL) cells and colony-forming units in spleen(CFU-S) following de novo formation of a stem cell niche depends on dynamic, but not stable, membranous ossification. J. Cellular Physiology 208:188-194, 2006
7. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Umezawa A, Miyamoto K. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. Endocrinology. 147(9):4104-11. 2006

I. 知的財産権の出願・登録状況

- 1) 特許取得
なし
- 2) 実用新案登録
なし
- 3) その他
なし

II 分担研究報告書

1. 精液を介する感染症制御の研究ーHIV-1、HTLV-1、サイトメガロウイルスを中心に
吉村 泰典
久慈 直昭
2. 受精の膜融合にかかる液性因子の同定
岡部 勝
3. 受精の膜融合と卵子活性化にかかわる形態学的解析：老化と凍結の評価を含めて
年森 清隆
4. 子宮内膜症合併不妊に対する生殖補助医療の成績向上を目指した臨床的・基礎的研究
矢野 哲
大須賀 穰
5. 卵子の質の低下を引き起こす原因究明に関する基礎的研究
宮戸 健二

精液を介する感染症制御の研究～HIV-1、HTLV-1、 サイトメガロウイルスを中心に

分担研究者 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 吉村 泰典
慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 久慈 直昭

研究要旨本研究では、精液からのウイルス除去の基礎的方法としての HIV-1 除去の臨床的効率、および我が国に多い HTLV-1 の精液からの除去とその確認法、そして精子提供の場合に問題となるサイトメガロウイルスのわが国の精子提供者における抗体保有状況と水平・垂直感染の可能性について検討した。

HIV-1 感染精液を洗浄してウイルスを除去する場合、洗浄効率と同時に考えなければならないのは精子の回収効率であり、男性不妊などの症例で回収率が低すぎるとウイルスは除去できても精子が一匹も回収できない結果となる。今回開発した連続密度勾配と SWIMUP を用いた精子洗浄法は、男性不妊を合併する HIV-1 感染男性においても、HIV-1 を測定感度以下まで除去した精子浮遊液を調整する事が可能であった。また同様の洗浄法を用いて、我が国に多い HTLV-1 の精液からの除去とその確認が可能であると考えられた。

一方、わが国の 30 歳以下の精子提供者におけるサイトメガロウイルス抗体保有率は 50%程度であり、非配偶者人工授精における感染症スクリーニングガイドライン策定の必要性が明らかになった。

A. 研究目的

精液からのウイルス除去は HIV-1 のような特殊な感染症の水平伝播の危険性を減らすこととともに、不妊治療や ART をうける際に起きる偶発的な水平感染・垂直感染を予防することもその意義として現れてきている。

とくに精液を介する夫婦間感染は、HIV-1 の様な重篤な感染症の水平・垂直感染はもちろん、胎児への二次的垂直感染により児に先天的で回復不能の悪影響を及ぼす場合にも臨床的に問題となる。後者のような感染症の例としてサイトメガロウイルス (CMV) がある。

本研究では、精液からのウイルス除去の基礎的方法としての HIV-1 除去の臨床的効率、および我が国に多い HTLV-1 の精液からの除去とその確認法、そして精子提供の場合に問題となるサイトメガロウイルスのわが国の精子提供者における抗体保有状況と水平・垂直感染の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 精液からの HIV-1 除去効率とそれに関する因子の検討

乏精子症、精子無力症などの男性不妊症例で、再現性よく精子を回収することを目

的として、傾斜回転式連続密度勾配作成器を用いて連続密度勾配を作成した。ファルコン 2059 チューブに 80%パーコール液 2ml にハンクス液 2ml を重層し、76° 傾斜して回転させ連続密度勾配を作成した (図 1)。

管底に集まった精子の回収は、試験管の管底に滅菌した画鋸で小孔をあけることにより行った (図 2)。この分画にはまだ感染性のリンパ球が含まれている可能性があり、術者の針差し事故と飛散を防ぐため、シリコンで作成したプロテクターを使用した (図 3)。

洗浄操作後の swim up にも工夫を加えた。通常の swimup 法では、洗浄した沈差分画の上に培養液を重層する方法でも、培養液の下に沈査を注入する方法でも、ごく少量の洗浄後沈査が培養液分画に混入する可能性がある。そこで、図のようにあらかじめ外筒を培養液にいれ、これを通して沈査を管底に注入することにより、回収する培養液に沈査が直接触れないようにした (図 4)。

2. HTLV-1 の精液からの除去に関する検討

HTLV-1 *pol* 遺伝子部分配列を感染男性末梢血よりクローニング、これをコントロールとして nested PCR 法により培養液中に於ける HTLV-1 検出感度を検定した (図 5, 6)。

洗浄精子による治療を求めて来院した男性感染者・女性非感染者夫婦に対し、連続密度勾配法による精子洗浄・swim up を施行し、回収精子数および HTLV-1 遺伝子の存在の有無を前項 1 の系を用いて検討した。

3. 精子提供者における梅毒・B 型肝炎ウイルス・C 型肝炎ウイルス・クラミジア・サイトメガロウイルス抗体保有状況に関する検討

平成 18 年度に精子提供を行った提供者（すべて 30 歳以下の、聴取しうる限り遺伝性疾患・感染性疾患がない）40 名に対し、6 か月の間隔で 2 回、梅毒・B 型肝炎ウイルス・C 型肝炎ウイルス・クラミジア・サイトメガロウイルス抗体を検討した（前期・後期）。

C. 研究結果

1. 精液からの HIV-1 除去効率とそれに関与する因子の検討

作成した連続密度勾配の上にウイルスを重層して遠心すると、1,600 g、10 分の場合で 1/100,000 程度ウイルスを希釈可能であり、一方精子は同一条件でその 50%以上が管底部に回収できた。

80 症例、159 検体の洗浄精子液の精液性状は表の通りで、やはり濃度 200 万、あるいは運動率が 5% といった男性不妊症例が含まれていた。このような例も含めて、全例で運動精子が回収可能であった（表 1）。

病勢を現す、血中ウイルス量、CD4 リンパ球数と陽性例の関係では、血中ウイルス量が高いからと言って、あるいは回収精子数が少ないからと言って陽性例が多いわけではなかった（表 2）。また SWIMUP 濃度との関係をみてみると、男性不妊を合併して SWIMUP 精子数が少ない症例でも、陽性例はなかった（表 3）。

2. HTLV-1 の精液からの除去に関する検討

pol 遺伝子を target とした nested PCR の、体外受精培養液中における測定感度は 50 コピー/ml であった。

原精液 5500 万/ml、運動率 80% の夫精液より、swim up 精子 290 万/ml、0.6ml を回収することができた。HTLV-1 遺伝子は、swim up 後精子浮遊液では検出されなかった（図 7）。

3. 精子提供者における梅毒・B 型肝炎ウイルス・C 型肝炎ウイルス・サイトメガロウイルス抗体保有状況に関する検討（表 4）

29 名の精子提供男性の感染症検査において、梅毒・B 型および C 型肝炎に罹患しているものはいなかった。

血中クラミジア抗体は、年度前期の検査では陰性であったが後期の検査で陽性転化した例が一例みられた。

cytomegalovirus 抗体については、IgM が陽性であった症例は一例もない。また表には示していないが、前期に IgG が陰性で、後期に陽性転化した症例も見られなかった。

D. 考察

1. 精液からの HIV-1 除去効率に関する検討

感染精液を洗浄してウイルスを除去する場合、洗浄効率と同時に考えなければならないのは精子の回収効率である。通常の外受精で swim up を行った際の精子回収率を考えれば、密度勾配洗浄とスイムアップを行った場合、症例によって回収率は非常に低くなるであろうことは想像できるであろう。もちろん精子回収率を犠牲にしても、ウイルスを可能な限り除去することが必要なのではあるが、回収率が低すぎるとウイルスは除去できても精子が一匹も回収できない結果となる。

精子回収率の観点からは連続密度勾配が優れている。不連続界面の存在は精子回収率を低下させるだけではなく、ウイルス除去の再現性をも低下させてしまう。しかし連続密度勾配を再現性よくまた簡便に作成するのは困難であったため、従来精子洗浄には多段不連続密度勾配が用いられていた。今回開発した連続密度勾配と SWIMUP を用いた精子洗浄法は、男性不妊を合併する HIV-1 感染男性においても、HIV-1 を測定感度以下まで除去した精子浮遊液を調整する事が可能であった。

洗浄精液を用いた治療は、精子内ウイルスの存在が報告されていることから、どのように厳密にウイルス除去を試みても水平感染の可能性は 0 ではない。しかしこの治療が、拳児を希望するこのような夫婦にとって重要な選択肢である以上、せつかく精液を採取してもそれが使用出来ないことがないように、可能な限り回収率と洗浄効率を改善する工夫が今後も必要と考えられる。

2. HTLV-1 の精液からの除去に関する検討

わが国西南部（九州・四国南部・沖縄）に罹患者が多い成人 T 細胞白血病（Acute T-cell Leukemia、以下 ATL）の原因ウイルスである human T-lymphotropic virus type 1（以下 HTLV-1）は、ATL だけでなく HTLV-1 associated myelopathy（HAM）の病因でもあり、この HTLV-1 キャリアは日本に 100 万人以上いるといわれている。特に ATL は発症すれば約 50% が半年以内に合併症で死亡し、残る患者もほとんどが 2 年以内に死

亡する、予後不良の疾患である。

HTLV-1 感染の主因は感染細胞の宿主への移行であり、母乳中の感染リンパ球を介しての母子感染が問題となることは周知の事実であるが、性行為を介した夫婦間感染の存在も考えられている。夫婦間感染については HIV-1 と同様、seroconversion をおこした個体の virus とその配偶者の virus の gp46 envelope 遺伝子（高変異部位）配列が一致すること i、感染男性精液がウサギに HTLV-1 感染をおこすことから ii、精液そのものが水平感染をおこすと考えられている（表 5）。夫婦間感染の問題は、ATL 発症のほとんどが 40-60 歳であり、感染から発症まで長い期間が必要であるため、水平感染が起こったとしても発症するまでに平均寿命に達してしまい、臨床的には問題とならないとされてきた。しかし、少なくとも水平感染をおこした女性が妊娠・出産する場合に、母乳保育をおこなわない感染予防策をとったとしても 2% は子どもが HTLV-1 キャリアとなる。このため、もし男性が HTLV-1 キャリア、女性が非感染者というカップルが希望する場合には、選択肢の一つとして精液から感染細胞を除いて妊娠をはかる方法は考えられる。

HTLV-1 は HIV-1 に比べて遺伝子変異が少ないため、中でも変異が低頻度でしかおこらない領域を PCR の標的とすれば、垂型による検出感度の差は少ないと考えられるため、検出系の構築は HIV-1 に比較すれば容易である。また前述のように同じレトロウイルスでも、HTLV-1 は HIV-1 とことなり精しょうを含む体内の液性成分に感染粒子が存在する可能性は低いいため、swim up だけでも精液中の感染リンパ球を除いて感染性を低減できる可能性は高い。このように、検出のしやすさからも、感染性低減という面からみても方法論的に HIV-1 の場合より技術的に容易であると考えられるため、ART 施行時に偶発的に発見された夫が感染者、妻が非感染者のカップルでは、精液洗浄をする意義はある。

今回我々は精液中 HTLV-1 遺伝子の高感度検出系を確立し、これを用いることによって精子からの HTLV-1 の希釈が可能であると考えられた。HTLV-1 感染は妊婦検診で発見されることが多いが、今回の夫婦のように献血時の血液検査で偶然発見される例もあり、このような例では本法が HTLV-1 垂直感染予防の一つの選択肢となる可能性がある。

3. 精子提供者におけるサイトメガロウイルス抗体保有状況に関する検討

精子提供において、遺伝的には問題のない胎児に不可逆的な障害をおこす疾患としてサイトメガロウイルス（以下 CMV）は重要な疾患であり、近年わが国でもその先天感染の報告がなされている。

CMV はヘルペスウイルス属の DNA ウィルスであり、環境に普遍的に存在する。通常成人では宿主に症状を起こすことは少ないが、疾病や疾病の治療などで免疫能が低下した患者の場合や、免疫的に未熟な胎児の場合には症候性感染をおこす。とくに胎児への CMV 感染は全妊娠の 1% に起こり、このうち 15% 程度が症候性となって後遺症を併発すると言われており、欧米では最も多い胎内感染であるされている iii。

我が国においても CMV 先天感染の報告は散見され、IUGR、水頭症、胎児水腫などを併発してその予後は概して不良であり、救命し得た例でも精神発達遅滞や聴力障害等の後遺症を残す。近年日本人成人における抗体保有率が下がっていることから考慮しても、児の先天異常（胎芽病）予防の観点から今後ますます重要となってくる周産期感染症の一つである。

CMV 母子感染で注意すべき事は、このウィルスが非常に多型性に富むため、CMV 抗体のある患者への別の型の CMV ウィルス感染が起こりうることである。Boppana らは、妊娠前にサイトメガロウイルス抗体が陽性であった妊婦からの出生児でサイトメガロウイルス感染をおこしたものを集め、これらについて妊娠前と分娩時の母体の AP86 と T086 という二つのサブタイプ抗体産生の有無と、患児から分離されたウィルスのサブタイプを調べている iv。母体が今回の妊娠であらたに抗体獲得した症例では獲得した型のウィルスが分離されており、CMV 既感染者でも異なる型の CMV 初感染が起こりうる事がこの報告で示されている。

CMV の感染経路は性交感染だけではないため、夫が感染者で妻が非感染者の場合でも、たとえ性交がなくても水平感染や児への感染はおこりうるので、精液洗浄をする意義はない。しかし、夫も妻も非感染の場合で、精子提供をこの夫婦がうける場合には、精液からの CMV 感染は大きな問題となる。アメリカ不妊学会（American Fertility Society）v および英国男性不妊学会は（British Andrology Society）vi はこれに対して、それぞれ 1990 年および 1999 年に、初回採血時 IgM 抗体陽性、あるいは反復採血時 IgM and/or IgG 抗体陽転者の精液はたとえ妻の抗体陽性であっても使用をひかえるよう勧告している。

今回の検討では、抗体 (IgG) 陽性率は 52% と約半数であり、抗体保有率が低下している事を示唆する結果であった。IgM が陰性から陽性となる例は見られなかったが、cytomegalovirus に免疫を有しない精子提供者が約半数存在することから、cytomegalovirus 抗体検査は IgM、IgG ともに必要と考えられる。

E. 結論

不妊症治療は、人工授精・体外受精が周産期医療に影響を与えるまでに普及した今、次世代へ負の遺産を可能な限り残さない方策を立てることが緊急の課題となっている。

HIV-1 をはじめとする、妻及び子の双方に重篤な影響を及ぼす感染症については、感染を防ぐために精液と女性の接触を防ぐ必要があり、自然妊娠を望めなくなる。このような場合にはたとえ体外受精や ICSI を使用しても、可能な限り水平感染の可能性を減らす工夫が必要である。このような場合、男性不妊を合併すると精子回収率と洗浄効率を両立させる方法が必要となるが、連続密度勾配を応用した今回の方法はそれに適合する方法と考えられた。また本法は HTLV-1 除去にも応用可能である。

一方、提供精液を用いた不妊症治療においても、精液を介した感染症制御は大きな問題である。特に胎児病をおこして出生する児に重篤な疾患を生じるおそれのあるサイトメガロウイルスなどの感染症については、男性のスクリーニング検査についてのガイドライン策定が必要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K. Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: Assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. AIDS20(7):967-973 2006

久慈直昭 男性不妊・乏精子症 産婦人科の世界 「産婦人科外来診療マニュアル」58 巻 150-151; 2006

久慈直昭 人工授精—妊娠率をあげるには産婦人科の世界 「産婦人科外来診療マニュアル」58 巻 152-153; 2006

2) 学会発表

久慈直昭、水澤友利、浜谷敏生、橋場剛士、浅田弘法、岩田壮吉、末岡浩、青木大輔、吉村泰典 精子提供の匿名性に対する提供者の意識調査 第 58 回日本産科婦人科学会 2006/4/22-25 神奈川県 横浜 パシフィコ横浜

境田通泰、久慈直昭、水澤友利、浜谷敏生、橋場剛士、浅田弘法、岩田壮吉、末岡浩、青木大輔、吉村泰典、加藤真吾 HIV-1 sero-discordant 夫婦に対する洗浄精液を用いた不妊治療の可能性 第 58 回日本産科婦人科学会 2006/4/22-25 神奈川県 横浜 パシフィコ横浜

水澤友利、久慈直昭、浜谷敏生、橋場剛士、浅田弘法、岩田壮吉、末岡浩、吉村泰典 配偶子提供とその匿名性に関する潜在提供者の意識調査 第 51 回 日本生殖医学会総会・学術講演会 大阪府 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪 2006/11/8-10

清水清美、長岡由紀子、久慈直昭、吉村泰典、朝倉寛之 米国在住の日系卵子提供者の卵子提供および生まれた子どもの出自を知る権利の意識について～本邦における精子提供者との比較から～ 第 51 回 日本生殖医学会総会・学術講演会 大阪府 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪 2006/11/8-10

長西美和、久慈直昭、水澤友利、浜谷敏生、橋場剛士、浅田弘法、岩田壮吉、末岡浩、吉村泰典。ウイルス除去精液を用いた生殖補助医療の安全性。第 135 回日本生殖医学会関東地方部会、東京、成育医療センター 2007/2/10

受精の膜融合にかかる液性因子の同定に関する研究

分担研究者 岡 部 勝
大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨：膜貫通ドメインを持たないにもかかわらず、膜に存在し精子と卵子の相互作用に重要な役割を果たしているというSP56遺伝子に着目し、ノックアウトマウスの作製に取り組んでいる。BACクローンをを用いた最新の組換え体作製法を取り入れたノックアウト研究を進めつつある。

A. 研究目的

不妊に悩んでいるカップルは10組に1組といわれている。その多くが体外受精などの生殖補助医療を受けている。その一方で受精のメカニズムに関しては不明な部分がたくさん存在しており、生殖補助医療が十分な基礎的な知識に裏打ちされたものであるとは言いにくいのが現状である。

本研究はマウスをモデルとして受精の膜融合にかかわる因子を個体レベルの解析で明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

マウスの精子に存在するSP56は膜貫通ドメインを持たないにもかかわらず、精子の膜表面に分布しており、受精に関与することが報告されている。この遺伝子を欠損したマウスを作製してSP56の受精に及ぼす影響を検討する。

通常のES細胞を用いたノックアウト用のターゲティングベクターの作製及び、BACクローンを大腸菌内で組換えた後にES細胞に組換えBACを導入することにより高率で相同組換えを起こす方法を採用してノックアウトマウスを作製する。

(倫理面への配慮)

当面の間、ヒトのサンプルを使用することはない。実験動物としてマウスを使用するが、大阪大学の動物実験規則にのっとり、実験計画の審査を受けた上で実施する。

C. 研究結果

本年度は、通常のノックアウトベクターの構築ではなく、高率に組換え体をうるることが可能とされるBACクローンを使用した方法を試すべく実験を行なった。SP56遺伝子のエキソンイントロン構造をデータベースから抽出した資料を基に、まず染色体の当該部分を含むBACクローンを同定し、目的部分を含むクローンを2種、入手した。ついで、どの部分にNeoマイシン遺伝子を導入して遺伝子をノックアウトするかの作戦を立て、それにしたがってプライマーを設定して、高頻度組換えを起こすように仕組んだ大腸菌内でBACクローンの組換えを試みた。しかしながら現在のところ、この高頻度組換えの制御がうまく

くいかず、正確な組換え体の樹立にいたっていない。

D. 考察

組換え体作製時には遺伝子の種類により、どのようなベクター手法をとるにせよ、組換え頻度が低下したり、正常な組換え体が得られず異常な組換え体が優勢に得られることがしばしば起こる。本遺伝子についても最初に選んだ部位がこのような組換え困難な場所であった可能性がある。

今後はプライマーのデザインを変更しわずかに位置をずらすことで、組換え体作製の頻度の上昇を目指すことが必要であると考えている。但し、現在の知見では、ノックアウトベクターがその遺伝子に対して効率的なものになっているのかどうかについては、試して見ないとわからないので、また同時にノックアウト時に削るエクソンを別の位置に設計するような大幅な変更についても同時に検討してゆきたい。

E. 結論

受精の膜融合にかかる液性因子の同定に関する研究を行ない、精子-卵子相互作用に関わるものなかで重要性が指摘されているSP56をとりあげ、ノックアウトマウスの作製に着手した。BACクローンをを用いた方法で進行中であるが、当初の計画部位では効率的な組換えが起こらないことを見出したので、再度相同組換えの標的部位に変更を加えてノックアウトマウスを作製するとともに、他のノックアウトマウスの解析とも照らし合わせながら液性因子の解明に努めたい。

F. 健康危険情報

該当事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Okada Y, Ueshin Y, Isotani A, Saito-Fujita T, Nakashima H, Kimura K, Mizoguchi A, Oh-Hora M, Mori Y, Ogata M, Oshima R. G, **Okabe M** and Ikawa M, Complementation of placental defects and embryonic lethality by

trophoblast-specific lentiviral gene transfer, *Nat Biotechnol*, 25(2): 233-7, 2007

2. Yamaguchi R, Yamagata K, Ikawa M, Moss S B and **Okabe M**, Aberrant Distribution of ADAM3 in Sperm from Both Angiotensin-Converting Enzyme (Ace)- and Calmegin (Clgn)-Deficient Mice, *R. Biol Reprod*, 75(5):760-6, 2006
 3. 受精のメカニズム -イズモを中心に卵子と精子の結合に必要な因子とその異常に関連した受精異常について-, 井上 直和, 伊川 正人, **岡部 勝**, *産科と婦人科*, 73(6), 735-42, 2006
 4. 受精の膜融合における必須分子Izumoの同定, 井上 直和, **岡部 勝**, *Medical Science Digest*, 32(10), 416-7, 2006
 5. 遺伝子操作マウスを用いて見る卵子と精子の相互作用, **岡部 勝**, *生化学*, 78(11), 1062-72, 2006
 6. 精子の成熟と受精能獲得, **岡部 勝**, 新編 精子学 (編者: 森沢 正昭, 星 和彦, 岡部 勝), 153-173, 2006
2. 学会発表

岡部 勝, 遺伝子操作マウスが明らかにする受精のメカニズム, 大阪薬科大学ハイテク・リサ

ーチ・センター平成18年度公開シンポジウム (大阪), 2006年12月9日

岡部 勝, 井上 直和, 磯谷 綾子, 小林 慎, 山口 亮, 伊川 正人, 遺伝子改変動物を通してみる性決定や受精のメカニズム, 第23回日本疾患モデル学会総会 (群馬), 2006年11月30日-12月1日

Okabe Masaru, Observation of sperm-egg interaction through gene-manipulated animals, International Symposium "Cell signaling in gamete activation: from basic research to ART" (Tokyo), 2007/11/13-15

Masaru Okabe, Sperm-egg interaction examined by gene-manipulated mouse lines, 10th International Symposium on Spermatology (Madrid, Spain), 2006/9/17-22

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

該当事項なし

受精の膜融合と卵子活性化にかかわる形態学的解析 老化と凍結の評価を含めて

分担研究者 年森 清隆
千葉大学大学院医学研究院 教授

研究要旨：不妊症精子機能を診断する方法を確立する目的で、配偶子膜融合関連MN9/equatorinと卵子活性化関連MN13の分子を指標にして精子頭部構造と機能の関係を免疫組織化学的に解析し、画像基準を作成した。これに基づき、配偶子老化や凍結の影響を評価した。さらに、精子DNAの断片化による損傷を評価するための精子クロマチン拡散検出法を確立した。

A. 研究目的

配偶子膜融合関連MN9/equatorinと卵子活性化関連MN13の分子を指標にして免疫組織化学的に解析して基準を作成し、ヒト不妊精子の機能状態を評価する方法を確立する。これをもとに、配偶子の老化と凍結の影響を機能形態的に評価する。同時に精子DNA断片化検出法を作成する。

B. 研究方法

抗MN9/equatorin抗体と抗MN13抗体を用いた免疫組織化学法を用いて、健常なマウスとヒトの精子を各種の遺伝子ノックアウト (KO) マウスやヒト不妊症精子と比較して画像化し、基準画像を作成する。その結果をもとに老化と凍結の影響を評価する。精子DNA断片化を検出するためには、拡散クロマチン検出法を改良し、DNA染色のための簡便なWright染色法を確立する。

(倫理面への配慮)

ヒトの場合、(不妊クリニックで) 同意を得られた不妊症患者精子および健常ボランティア精子を、匿名化/ID化して用いた。将来、大規模解析をするため、大学倫理委員会に提出している。今回、ヒト卵子は対象としなかった。

C. 研究結果

MN9/equatorinとMN13を指標にして遺伝子KOマウスと健常ボランティアの免疫染色パターンを比較すると、頭部奇形度と卵子膜融合および卵子活性化能の間に相関が見られた。KOマウスとヒト不妊症患者の精子を解析した結果、体外受精 (IVF) にはMN9とMN13を両方持つ精子が良いが、卵子内精子注入法 (ICSI) の成功にはMN13の形成が相関し、MN9形成は関係しないことが判明した。関連構造の形成度は、電子顕微鏡による評価と一致した。凍結精子の細胞膜損傷度は、MN9検出の容易さと相関した。精子クロマチン拡散検出法では、3段階の断片化区分が実用的であり、これによる画像基準を作成した。

D. 考察

ヒト精子では、MN9/equatorinとMN13の染色性は、それぞれ膜融合部の形成度と卵子活性化部位の形成度に相関し、ヒト不妊症患者にみられる形態形成の不均一性とも良く相関する。また、老化や凍結に伴う膜融合や卵子活性化機能

低下は、MN9/equatorinとMN13の消失度として評価される。このように抗MN9/equatorin抗体と抗MN13抗体は、精子および精子-卵子相互関係の評価のマーカーとして有用である。しかし、卵子の機能評価にはまだ不十分である。今回確立した精子クロマチン拡散検出法は簡便であり、DNA断片化検出法として有用である。

E. 結論

MN9/equatorinとMN13の染色性を指標にした精子評価法および精子クロマチン拡散検出法は、機能と形態との相互関係を反映する。今後、不妊診断治療へのさらなる展開を探るため、ICSIやTESE-ICSIに用いられる多彩な未成熟精子や精巣精子の評価のために臨床的なブライントな研究や例数を増やして信頼性を高めるための検証が必要である。

F. 健康危険情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

本研究成果は、現在とりまとめて論文作成中である。本研究に関連する既発表論文の一部を別紙5に掲載した。

2. 学会発表

本研究成果は、平成19年に学会発表する。本研究に関連する既学会発表の一部は別紙5に掲載した。本研究に関連する話題は下記の基調講演でも触れ、紹介した。

年森清隆：日本女子大学・オープンリサーチセンター・シンポジウム「生き物の世界にみるオスとメスの関係」基調講演「配偶子の準備から受精まで：ヒトを含む哺乳動物の場合」、東京、平成19年2月24日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

子宮内膜症合併不妊に対する生殖補助医療の成績向上を 目指した臨床的・基礎的研究

分担研究者 大須賀穰 東京大学医学部 講師
矢野 哲 東京大学医学部 助教授

研究要旨：生殖補助医療を国民に長期・安定的に供給することは現在の重要課題の一つである。特に、本邦の特徴である少子化・妊娠の高齢化に応じた枠組みを構築しなくてはならない。このような要請をうけ、ここでは生殖年代の女性に頻度が非常に高く、かつ、不妊症の原因として最も重要な疾患の一つである子宮内膜症に焦点をあてた研究を行った。子宮内膜症性卵巣嚢胞の腹腔鏡下手術後の再発を調べた臨床研究では、手術後に約3割と高頻度に再発をしていることが認められ、嚢胞の大きさなどが関連していることが判明した。子宮腺筋症の体外受精の成績におよぼす影響についての臨床的研究では、子宮腺筋症は一般には体外受精の成績を低下させないことがわかった。また、子宮内膜症の新規治療薬に関する基礎的研究ではメトフォルミンが子宮内膜症を抑制する可能性が示唆された。これらの研究結果をもとに新たな子宮内膜症合併不妊に対するより効果的な生殖補助医療の適応が考えられた。

A. 研究目的

生殖補助医療を国民に長期・安定的に供給することは現在の重要課題の一つである。現在の少子化の時代において不妊症の治療はますます重要となっているが、一方で、結婚年齢、出産年齢の高齢化にともない生殖年齢の期間に好発する子宮内膜症、子宮筋腫などの疾患が不妊症治療に影響を与えることが増えており、これらの疾患と不妊症の関係を適切にとらえて介入していくことが以前にもまして重要となっている。本年度の研究においては、子宮内膜症が不妊治療にあたる影響の解析と、妊娠率向上をめざした新たな子宮内膜症治療に対する基礎研究を主な目的とした。

B. 研究方法

1. 子宮内膜症性卵巣嚢胞の核出後の再発について検討した。腹腔鏡下に子宮内膜症性卵巣嚢胞の摘出術を施行し、少なくとも術後2年間の経過観察が可能であった224例を対象とした。再発の定義は超音波断層法により2cm以上の子宮内膜症性卵巣嚢胞を確認したものとした。再発に影響をおよぼす因子として年齢、不妊症、子宮筋腫、子宮腺筋症の有無、子宮内膜症に対する薬物療法既往、子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術既往の有無、嚢胞が単数か複数か、最大嚢胞径、片側か両側か、r ASRMスコア、術後薬物治療、術後妊娠の有無について検討した。解析は単変量解析をおこなった後、ステップワイズ法により因子を選択し、ロジスティック回帰分析を行った。

2. 子宮腺筋症のIVF-ETに与える影響を検討した。2001～2003年の3年間に当科で施行されたIVF-ET周期のうち、long法を用いて排卵誘発を行った598周期（370症例）を対象とし、これらを以下のA-D群に分類した。AおよびB群を子宮腺筋症合併群とし、A群；子宮内膜症を合併する群（27症例、43周期）、B群；子宮内膜症を合併しない群（44症例、79周期）と細分類した。またCおよびD群を子宮腺筋症非合併群とし、C群；子宮内膜症を合併する群（46症例、65周期）、D群；子宮内膜症を合併しない群（253症例、411周期）と細分類した。これらの分類をもとに子宮腺筋症および子宮内膜症の有無によりART成績を後方視的に比較検討した。子宮腺筋症の診断は経膈超音波法によって行った。

3. 患者の同意の下、子宮内膜症性卵巣嚢胞の手術検体より子宮内膜症性間質細胞（ESC）を分離培養した。ESCにmetformin（10, 100, 1000 mM）とIL-1bを添加し、培養上清中のIL-8産生量をELISAにて測定した。また、ESCにmetforminとcAMPを添加し、aromataseの遺伝子発現を定量的PCRで、活性はアンドロステンジオン添加後のエストロン産生をEIAで測定し評価した。さらに、ESCにmetforminを添加し、細胞増殖能をBrdU取り込みで、細胞毒性をLDH放出により評価した。

（倫理面への配慮）

以上のうち、臨床検体をもちいるものについては、本学倫理委員会の承認のもと、患者から書面によるインフォームドコンセントを得て行った。