

図 1 各ICSI治療周期の受精率の分布

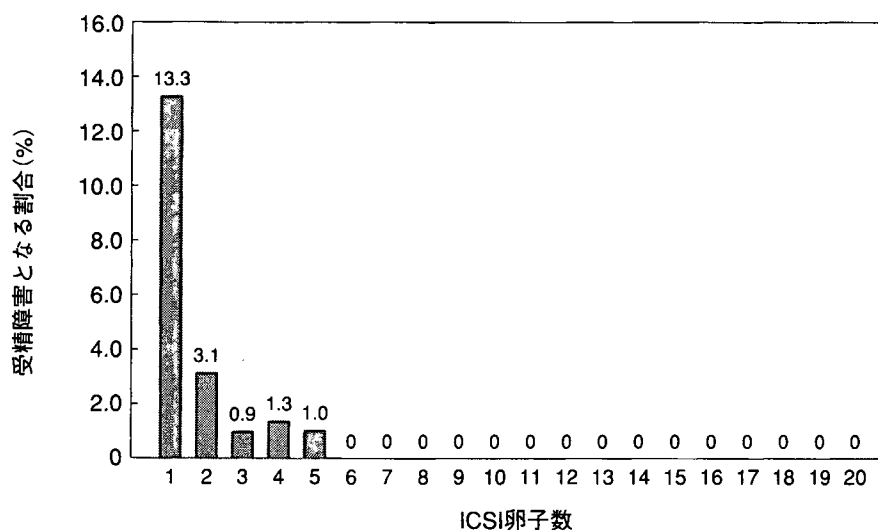


図 2 ICSIを行った卵子数と受精障害となる割合の関係

つぎに、受精障害の再発性について述べる。初回に ICSI を実施し、そのときの結果が受精率 0% の場合、第 2 回目の ICSI を計画して実施した場合、受精障害がふたたび発生する頻度は 13% となった。このようなことが起こる頻度は全治療周期の 0.7% に相当する。2 回続けて受精障害となった症例では受精過程の異常が恒常的に存在している可能性が示唆される<sup>1)</sup>。

### 受精障害の原因

ICSI は受精のプロセスにおいて受精能獲得から精子卵子融合までの過程をバイパスして受精を成立させるので、問題はそれ以後の受精過程にあると考えられる。図 3 に受精過程を示したが、精

子卵子融合より後の過程とは、卵子活性化、精子頭部の脱凝縮から前核形成に至る過程となる。

#### 1. 卵子活性化の異常

ICSI では精子と卵子の細胞膜融合が起こらないので、卵活性化の刺激は精子が持ち込む卵活性化因子によると考えられる。この因子は明確に同定されていないが、現在では精子がもっている phospholipase C zeta (PLC zeta) と考えられている<sup>2)</sup> (「サイドメモ」参照)。この因子の活性が低い場合や欠如していることが受精障害の原因として考えられる。まったく欠如していれば卵子活性化は起こらず、ICSI を行っても卵子は第 2 減数分裂中期のままとなる。卵子内に注入された精子は不動化がなされ、核蛋白が正常で、なおかつ卵子内の還元機

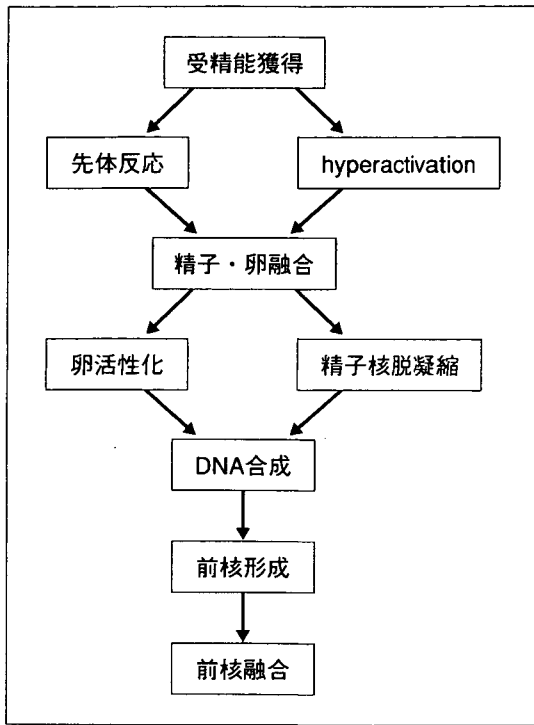


図 3 受精のプロセス

構が正常であれば脱凝縮だけすることになる。卵活性化因子の活性が低下している場合、卵子の活性化機構が多少刺激されたのであれば、卵細胞内の maturation promoting factor (MPF) が低値となり第二極体が放出されるが、活性化因子の活性が低いと MPF が再合成されてしまい、卵活性化機構が停止することもある。この場合、卵子には第二極体の放出が認められ、卵細胞質内に注入されている精子は脱凝縮し、その後 premature chromatin condensation (PCC) を起こしていることもある (metaphase III)。

サイド  
メモ

精子の卵活性化因子

顕微授精において精子の卵活性化因子は、卵子内に顕微注入された後に、精子細胞膜の崩壊に伴って、精子頭部から卵子内にリークし、卵活性化にかかわる刺激伝達系を介して、卵子内にカルシウムオシレーションとよばれる律動的な一過性カルシウムイオン濃度上昇を発生し、卵子を活性化させる。つまり第二減数分裂中期で停止していた分裂を再開する作用をもつ。現在ではこの因子の候補として精子の phospholipase C zeta (PLC zeta) が有力とされている。

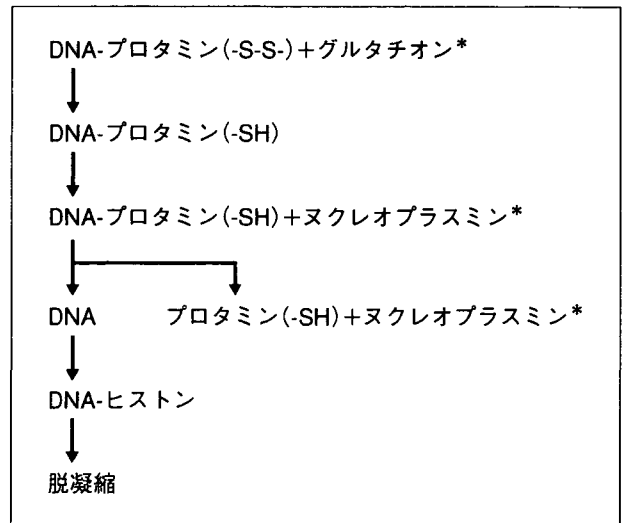


図 4 精子核脱凝縮のメカニズム(文献<sup>3)</sup>より改変)

\* : sperm nucleus-decondensing factor.

2. 精子頭部脱凝縮の異常

成熟した精子の頭部には DNA がたいへんコンパクトにパッケージされている。その状態では受精に必要な DNA 合成ができない。そのためのプロセスが脱凝縮である。成熟精子の核蛋白はプロタミンであり、まず、これが還元されてプロタミン内のジスルフィド結合(-SS)が減じられ、つぎにプロタミンと親和性が強いヌクレオプラスミンが作用しプロタミンと結合する。このとき、DNA は卵子内に存在するヒストンと結合することになる<sup>3)</sup>。このようにして DNA のパッケージが緩み、脱凝縮に至る(図 4)。

核蛋白にジスルフィド結合が多量に産生された場合は通常の卵子内の還元機構では不十分となり、脱凝縮障害を起こす可能性がある<sup>4)</sup>。いわゆる男性のエイジングの影響なども考えられる。また、通常は核蛋白に過剰のジスルフィド結合がつくられないようにチオール残基(-SH)に亜鉛イオンが結合している。この亜鉛は副生殖腺(おもに前立腺)から分泌されるので、該当部位の炎症などによる亜鉛の供給低下なども原因になりうる。これが理論上考えられる。このような場合の ICSI された卵子の所見については、精子の脱凝縮障害、つまり無変化の精子頭部を認めることになると思われる。このような原因と精子のもつ卵活性化能の有無との関連については知見がない。精子の核蛋白異常が精子卵子融合の障害と密接に関連すること

が報告されている。つまり、このような核蛋白異常が精子頭部の細胞膜機能異常と関連することになり、卵活性化因子の発現異常と関連する可能性も否定できず、今後の研究成果に期待したい。

### 3. 前核形成などの異常

雌雄前核が形成されると精子星状体が雌性前核を中央に牽引し、両前核の融合に重要な働きをする。精子星状体の中心となり精子中心体に異常があるとこの過程が障害され、受精障害となる。最近では精子中心体の異常についての研究報告が認められ<sup>5)</sup>、その実態の全容が明らかになることを期待したい。

### ☪ 受精不成立卵子の所見

ICSI 実施後の受精判定時 (ICSI 後 20~22 時間) に受精不成立と判定された卵子のホールマウント標本を作製し、グルタルアルデヒドで固定、アセトラクモイドで染色を行い観察すると、ICSI 後生存し、かつ受精しなかった卵子の 10.6% に ICSI された精子が認められなかった<sup>6)</sup>。これらの卵では ICSI 後に注入された精子が穿刺部位より排出されてしまったものと考えられる。また、2.6% の卵子では卵外の卵細胞膜に付着していた。残りの 86.8% の卵では精子が卵内に観察されたが、いずれの卵子も前核形成と第二極体放出を認めなかった。

これらの卵子について卵細胞質内に注入された精子の状態は、①脱凝縮した精子核のみを認めた (68.2%)、②変化がない精子頭部のみを認めた (27.3%)、③PCC を認めた (4.5%)、のいずれかであった<sup>6)</sup>。①の状態は卵子は活性化しておらず、ICSI されて不動化処理を受けた精子が非特異的に脱凝縮を起こしたと思われる。②の状態では無変化な精子頭部が存在しているが、これは精子細胞膜が破綻していない可能性 (不動化処理が不十分) と、精子核が非常に堅くパッケージされている (前出) 可能性が考えられる。前者の場合では不十分な精子不動化処理以外に、精子注入時に伸展された卵細胞膜に精子が包まれてしまったことも考えられる。これは細胞膜の伸展性がよい卵子の場合に起こりうることである。③の状態は①と同じである。脱凝縮した精子クロマチンが MPF が高

いために PCC となったと考えられる。以上のことから ICSI 後に受精しなかった卵の約 70% は精子が卵内に注入されていたにもかかわらず、卵活性化が起こらなかったと理解できる。

ICSI 後に受精が成立しなかった卵子に対して、いわゆる 1 day old ICSI を妊孕能が確認されているボランティアの精子で行うと約 70% に受精が確認できた<sup>1)</sup>。つまり ICSI 後に受精を認めなかった卵子の約 50% は精子側の原因であることが推測される。残りの原因についての詳細な検討はなされていないが、前述したような種々の原因が考えられることになる。

### ☪ 受精障害への対処

受精障害の原因として卵活性化因子の異常が考えられるのであれば、コンセンサスが得られていないが卵活性化処理併用の ICSI という対処法がある。しかし、他の原因については対処法がないのが現状である。

ICSI 後の受精障害の再発率は 13% であるので、多くの症例は 2 度目の ICSI で受精卵を得ることができる。しかし、受精障害のリスクが高い場合には、現在報告されている方法として卵活性化処理を併用することがあげられる。臨床研究として実施されている方法はカルシウムイオノフォア (A23187) 処理<sup>7)</sup>、電気刺激法 (electroporation, electrostimulation ともいう)<sup>8)</sup>、およびストロンチウム処理などがある<sup>9)</sup>。これらの方法はいずれも ICSI の受精障害例に対して実施され、分娩例が得られている。

卵活性化の効率からいうと、電気刺激法がもっともよく、つぎにカルシウムイオノフォアとなる。ストロンチウム処理は効果の安定性がやや欠ける。いずれの方法も活性化効果の機序は卵細胞内の一過性のカルシウムイオンの増加である。電気刺激とカルシウムイオノフォア処理では単発のカルシウムイオンの一過性上昇が得られ、卵子が活性化される。これに対してストロンチウム処理はマウスで多用されているところで、マウスでは正常過程の受精と同じように、カルシウムイオンの一過性上昇の後にカルシウムオシレーションが続く。したがってマウスではストロンチウム処理は

表 1 カルシウムイオノフォア処理の方法

- |  |
|--|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. A23187 を DMSO に溶解して 1 mM の stock solution をつくる (暗所, 冷凍保存)</li> <li>2. Stock solution 10 <math>\mu</math>l を regular medium 990 <math>\mu</math>l に添加し, 10 <math>\mu</math>M の処理液をつくる</li> <li>3. 卵を処理液に 10 分間 (7~15 分) 浸ける</li> <li>4. Regular medium で 3 回洗浄する</li> </ol> |
|--|

生理的活性化刺激に近いもので、好ましいと考えられている。しかし、ヒト卵子ではストロンチウム処理後のカルシウムオシレーションが観察されておらず、ストロンチウム処理による卵活性化機序は明らかになっていない。その機序が明らかになっているカルシウムイオノフォア処理、および電気刺激法が望ましいと思われる。電気刺激法については、ICSI する前に電気刺激を加えるか、ICSI 後に刺激を加えるかの 2 法がある。ICSI 後に電気刺激を加える機序は不明であるが、精子染色体の異常(構造異常)が 40~60% に認められる。したがって、ICSI 前に電気刺激を加えることが推奨されるが、ヒト卵に対してこのプロトコールを実施すると ICSI 後の卵子の変性率がきわめて高くなってしまふ。電気刺激による卵子細胞膜の損傷の修復が短時間では十分になされていないことによると考えられる。以上により、現時点ではカルシウムイオノフォア処理がもっとも行いやすい方法と思われる(表 1)。

ICSI 後の受精判定を IVF での 6-hours after ICSI のように<sup>10)</sup>、早い時期で行い、受精していない場合に卵活性化刺激を加えるという方法も考案される。ICSI 後の受精判定の時期をいつ行うかがキーポイントである。ICSI での受精で大事なことは精子の不活化処理の完遂度である。しっかりと不活化処理を行わないと受精の開始が遅れることになる。まだ、十分検討されたデータはないが、ICSI 後 4~6 時間程度で受精の評価を行いたい。早い時間というのは、卵子の老化を考えてのことと、もうひとつは卵細胞内に注入された精子は脱凝縮を

起こし、時間経過とともに PCC に至ることになるが、PCC は異常なクロマチンの凝縮で染色体や DNA 損傷が誘起される可能性がある。よって、PCC に変化する前に手を打つ必要がある。

## おわりに

ART での受精障害は ART を実施してはじめてわかるもので、これ以上の受精に関する方法がない ICSI の場合ではたいへん困る事態となる。受精の判定時間や、人為的卵活性化処理法などがキーポイントとなる。今後の研究により、受精障害への対処法が確立されることを望む。

## 文献

- 1) 柳田 薫：難治性受精障害への対応。日本産科婦人科学会雑誌, **56** : N485-N488, 2004.
- 2) Saunders, C. M. et al. : PLC zeta : asperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*, **129** : 3533-3544, 2002.
- 3) Yanagimachi, R. : *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. Raven Press, New York, 1994, pp.189-317.
- 4) Kuvist, U. : Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin-decondensation ability in man. *Acta Physiol. Scand.*, **109** : 79-84, 1980.
- 5) Terada, Y. et al. : Centrosomal function assessment in human sperm using heterologous ICSI with rabbit eggs : a new male factor infertility assay. *Mol. Reprod. Dev.*, **67** : 360-365, 2004.
- 6) 柳田 薫・他 : ICSI と卵の活性化。産婦人科の世界, **49** : 361-368, 1997.
- 7) Hoshi, K. et al. : Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon. *Fertil. Steril.*, **63** : 1241-1245, 1995.
- 8) Yanagida, K. et al. : Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Hum. Reprod.*, **14** : 1307-1311, 1999.
- 9) Yanagida, K. et al. : Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of fertilization. *Reprod. Biomed. Online*, **13** : 801-806, 2006.
- 10) Chen, C. et al. : Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. *Hum. Reprod.*, **18** : 2118-2121, 2003.

\* \* \*

## 11. 顕微授精

柳田 薫 片寄治男 藤倉洋子 岩本晃明

### はじめに

卵細胞質内精子注入法 (ICSI) では生理的な受精にかかわる精子の選択がなされずに、生殖補助医療に携わる人間が、1個の精子を選択する。また、その授精の方法も体外受精と比較すると侵襲的である。従って、ICSIにおいては、いかに良質の精子を選択するか、発生過程に問題がないのか、遺伝的安全性はどのようなかなどが問題となる。また、無精子症例では効率のよい精子回収のために MD-TESE が開発されている。

### Q-1・顕微授精に用いる精子の選び方、処理方法について?

精子の使命は父方の遺伝情報を卵子に届けることなので、精子 DNA の正常性が保たれている精子を選択することが重要となる。正常な DNA を持つ精子を選択する方法として現在試みられている方法を以下に解説する。

#### 1. 運動性良好精子を選択する方法

死滅した精子でも受精し胚発生が可能なこともあるが、原形質膜の破綻は DNA の破壊につながるような精子では個体発生ができない。原形質膜が健常であれば DNA が障害を受けにくいと考えられる。具体的には最も運動が活発な精子を選択する。精子 DNA の断片化

の研究から、運動性が悪い精子は精子 DNA 断片化が多いと報告されている<sup>1)</sup>。さらに精子のミトコンドリア DNA の断片化と精子運動性の低下とが負の相関にある<sup>2)</sup>。実際の臨床データからも、DNA 他断片化の程度は IVF の受精率とも負の相関があり<sup>1)</sup>、さらに精子の直線速度 (straight line velocity) が高いほど ICSI での受精率が高くなるとの報告があり<sup>3)</sup>、間接的に、精子運動性がよい精子は DNA が健常であることを示唆している。

精子回収法については、精液採取後、精液の処理開始から培養時間が長くなればなるほど、精子染色体の異常率が増加することや、培養時間や遠心操作が増加するにつれて精子 DNA の断片化が増加することが報告されているので、無意味な培養や遠心操作を慎み、精液静置法や密度勾配遠心法でも短時間で合理的な精子回収法を心がける必要がある。

#### 2. 強拡大観察下の精子形態により選択する方法

ノマルスキー微分干渉装置を用いて CCD からモニターディスプレイに精子の画像を写し、最終倍率約 6,000 倍で精子形態を観察する。正常形態の精子を選択して ICSI を行うと、妊娠率と生児獲得率が有意に高いことが報告されている<sup>4)</sup>。いくつかの追試がなされ同様の結果が導き出されている。この場合、必要な機器はノマルスキー微分干渉装置と対物レンズ (×60~×100, 油浸) で、比較的簡単に準備ができる。

#### 3. HA-coated slide sperm-binding assay で精子を選択する方法

成熟した精子は原形質膜にヒアルロン酸受容体が発現している。また、ヒアルロン酸に結合

Kaoru YANAGIDA, Haruo KATAYOSE, Yoko FUJIKURA, Akira IWAMOTO  
国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター  
〒329-2763 那須塩原市井口 537-3

する精子は精子核の染色体異常率や DNA 障害も少ないことがわかっている。ヒアルロン酸に結合した精子をマイクロピペットで回収して、その良質な精子を ICSI するということが試みられている<sup>5)</sup>。

### Q-2・受精をしっかりと成立させるコツについて？

精子を卵細胞内に注入して受精をしっかりと成立させるコツは不動化処理をしっかりと行うことである。精子が ICSI された後でも原形質膜が健常であれば、精子が持っているといわれる卵活性化因子が卵子内に入らない。また、精子 DNA も卵子細胞質とは隔離されている。不動化処理は精子頸部をマイクロピペットの先端で押さえつけてしごくようにする。精子はほとんど細胞質がないため、細胞膜の損傷はほとんど修復されないため、精子頸部に与えた細胞膜の損傷は比較的速い速度で頭部まで拡大する。その結果、精子-卵子相互作用 (sperm-egg interaction) が円滑に行われる。つまり、精子頸部の脱凝縮、卵活性化因子の漏出が起こる。不動化処理をしっかりと行った場合、卵活性化の引き金となるカルシウムレスポンス (カルシウムオシレーションの発現) は ICSI 後の約 15 分前後から始まる<sup>6)</sup>。そして精子頸部の脱凝縮も ICSI の 15~30 分後 (射出精子の場合) から認められる。不動化処理が弱いと (精子細胞膜へのダメージが小さいと)、カルシウムレスポンス発現時間の遅延 (ICSI 後 90 分など) が認められ、胚発生への影響も懸念される。従って、精子頸部に近い頸部をしっかりと不動化する必要がある。もちろん精子頸部に直接ダメージを与えてはいけない。マイクロピペットの先端は細く柔軟であるので、先端で精子頸部をしごくときには、しっかりと精子頸部を押しつけるようにしごく必要がある。特に、先端を 30° 曲げたピペットを使用している場合は先端が浮いていないこと、PVP 溶液中で不動化を行う場合は PVP の粘度による抵抗を考えて処理を行

う。

不動化処理は ICSI の直前に行う必要がある。不動化処理によって精子細胞膜は破綻することになり、以後退行性変化が急速に進む<sup>7)</sup>。つまり、ヒト精子を不動化してから ICSI までの時間が長ければ長いほど、精子の持つ卵活性化能と個体発能が低下するからである。

また、動物では、先体が健常な精子を ICSI すると、先体酵素が卵子内に持ち込まれることになる。ハムスターでは 1 個のハムスター精子を ICSI すると、卵子内に持ち込まれた先体酵素の作用で卵子は変性してしまう<sup>8)</sup>。ヒトの場合でも先体酵素の影響が懸念されるが、不動化処理後、ICSI される頃の先体の有無を調べると、大方の精子先体は除かれているとの研究報告もあり、ヒトでは先体の影響を考えなくてよいようである。

### Q-3・精巣精子を用いた ICSI のほうが射出精子を用いるより成績がよいというの本当か？

現在では無精子症はもちろん、生存精子さえ獲得できれば ICSI により受精卵獲得・妊娠が可能である。しかし、死滅精子症 (necrozoo-spermia) は精子原形質膜から精子核 DNA まで損傷が高度であり、雄性ゲノムとしての機能はなく ICSI 後の受精・胚発生が期待できない。これほどの高度な障害精子でなくとも ICSI が適応される症例のなかには、特に核 DNA のダメージを受けた精子を多く含むものがみられる。DNA 断片化は spermiogenesis 過程での核クロマチン remodeling 異常、酸化的ストレス、アポトーシスの三つの機序により誘発される。精子 DNA 断片化が一重鎖 (single strand brake) の場合、卵による修復がある程度可能で error も少ないが、アポトーシス精子核のような二重鎖 (double strand brake) の場合は修復が完全ではなく error も多いといわれている。DNA 断片化精子が ICSI された場合、クロマチン構造異常が高度な場合を除き受精は障害

されないが、8細胞期以降（胚性ゲノム活性化）の胚発生が障害されること、初期流産が増加することが指摘されている（late paternal effect）<sup>9)</sup>。従って、射出精子を用いた ICSI が反復不成功に終わった場合などは精子核 DNA 断片化の検査を行う必要性はある。

検査法にはトルイジンブルー染色、DNA breakage detection-fluorescence *in situ* hybridization, *in situ* nick translation assay, comet assay, TUNEL assay, sperm chromatin structure assay などがあり、それぞれ基準値が設けられているが、近年比較的簡易迅速な sperm chromatin dispersion (SCD) test の有用性が報告され、Halo Sperm<sup>®</sup>として市販もされている（基準値は 20～30%以上が異常値）。過去の ICSI 臨床成績と DNA 断片化検出により今後も予後が不良と判断されたときには患者へ十分なインフォームドコンセントを得た上で精巣内精子回収（TESE）による ICSI を勧める価値はある。実際 DNA 断片化の多い射出精子から TESE に切り替えることで妊娠率が 5.6% から 44.4% に、着床率が 1.8% から 20.7% に有意に向上した報告もある<sup>10)</sup>。精巣内精子核 DNA 断片化率は極めて低く（平均 4.8%）ICSI への利用価値は高い<sup>10)</sup>。DNA 断片化に代表される射出精子障害は主に酸化的ストレスが原因であるため、抗酸化剤のカクテル療法（ビタミン C, E,  $\beta$ カロチン, 亜鉛, セレン）の有効性も指摘されており今後さらなる検討が期待される。以上から DNA 断片化に代表される射出精子の異常が指摘された症例に関しては精巣内精子が有効であるということになる。

#### Q-4・ICSI での胚盤胞発生率は IVF より低いのは本当か？

Sequential media の開発は体外で胚盤胞を発生させることを可能にし、良好胚選別により着床率が向上し良好な臨床成績を示している。また、胚盤胞単一胚移植は多胎妊娠防止のために必須の技術であることは周知の事実である。し

かし、胚盤胞まで発生する受精卵の割合は症例により異なり、報告によっても差異が生じているのが現状である。

授精方法（通常 IVF あるいは ICSI）による胚盤胞発生率の違いを検討した報告は多数みられ、Shoukir (1998), Dumoulin (2000), Griffiths (2000) など初期の報告では統計学的に明らかに ICSI での胚盤胞発生率は IVF に比べて低いことが示されている。これらは day 2 あるいは day 3 胚移植後に余剰となった胚の発生率を検討しているという弱点があった。その後、全卵胚盤胞培養の検討からも初期の報告と同様の結果が導き出されていたが、同時に授精方法による胚盤胞発生率には差がないとする結果も報告されている。しかし、胚盤胞発生率に差がないとする報告の詳細をみると、統計学的には有意差はないもののすべての検討項目（% total blastocyst, %good blastocyst, %top blastocyst）において胚盤胞発生率は ICSI 後が低値を示している<sup>11)</sup>。

ICSI による受精には、精子側の状況として精子原形質膜や先体がそのまま注入される、IVF では受精不可能な核クロマチン異常あるいは核 DNA 断片化精子が注入される可能性が高い、精子不動化の状況によっては卵活性化を遅延させる可能性が高くそれが精子染色体異常を惹起するなどの特徴があり、胚発生に不利な状況がしやすい。また、mechanical には穿刺による卵細胞骨格の損傷、PVP 溶液の注入などが生理的条件下と異なることが要因として危惧される。

今後 ICSI 卵胚発生が IVF に近い成績を保てるよう、良好精子選別法や培養環境のさらなる開発が望まれる。

#### Q-5・顕微授精によって染色体異常児の増加がいられていますが本当か？

ICSI によって出生した児（あるいは胎児）の染色体異常、先天奇形、身体精神発達に関する調査報告が近年主にベルギーのグループらの中

心に集積されてきた。児の発達に関しては現在のところ IVF あるいは自然出生の児と比較して ICSI による影響はないと報告されている<sup>12)</sup>。また、調査当初差がないといわれてきた先天奇形に関しては ICSI によって頻度が上昇したとする報告も散見され、今後さらに詳細な検討を要することが指摘されている。

ICSI は注入精子選択の問題、正常受精過程のバイパス、卵に対する機械的な損傷など受精卵の細胞遺伝学的異常を惹起する可能性が指摘される。児の染色体異常を検討する場合、それが ICSI の手技によってもたらされたものなのか (de novo 異常)、注入される精子あるいは卵にすでに染色体異常が存在したためなのか (inherited 異常) を分けて検討することが重要である。

ICSI を受ける患者全体の約 3% に異常核型が見つかり、うち約 85% が男性に約 15% が女性に責任があるといわれている。また、無精子症や重症乏精子症患者ではさらにその頻度は増加し、無精子症と関連する遺伝子の微小欠失 (Y chromosomal microdeletion) を含めると 30% 以上にも達するといわれている。ICSI は染色体異常精子でも受精を可能するため、特に重症男性不妊症においては本法実施前にあらかじめ検査およびカウンセリングを行い遺伝的異常に関する情報提供をする必要がある。

ICSI 後妊娠の染色体異常検査は出生前に絨毛あるいは羊水細胞を用いた検討が多い。2002 年の Steirteghem らおよび Bonduelle らがまとめた報告によれば、de novo 異常に関しては性染色体異常が 0.60~0.63%、常染色体異常が 0.40~0.95% の頻度であり、正常出生新生児のそれぞれ 0.20~0.45%、0.07~0.47% に比較して有意に上昇していた<sup>13)</sup>。同じ Bonduelle らのまとめた報告のなかには分娩となった児の 0.59~1.48% に性染色体異常が、1.48~1.69% に常染色体異常が確認されている<sup>13)</sup>。流産により染色体異常が淘汰されることも考慮に入れる必要があるが、これらは ICSI 後胚の 1.0~1.6% に de novo 染色体異常が発生する可能性を示唆してい

る。また、精液所見のうち精子濃度  $20 \times 10^6/\text{ml}$  未満と直進運動精子濃度が正常未満の症例で有意に de novo 染色体異常が増加することが示されている<sup>13)</sup>。さらに、Basaran らによれば、ICSI 後に発生した胎児 475 例を母体年齢、母体血清 (トリプル) マーカー検査、胎児超音波によって比較検討すると、染色体異常 (de novo および inherited) の頻度は危険因子のない群で 1.62%、高母体年齢群で 2.79%、母体マーカー陽性群で 10.0%、異常胎児超音波群で 28.0% であった。これら危険因子の有無もカウンセリングをする上で重要なポイントとなり参考とすべきである。

回答としては ICSI によって染色体異常 (児) は今のところ増加するということになるが、de novo 染色体異常発生をできる限り防止する技術の開発など今後報告される知見には注目すべきである。

#### Q-6・TESE, MESA による ICSI の最近のトレンドについて?

##### 1. TESE

従来の精巣生検は無精子症患者の診断、治療法の決定であった。すなわち閉塞性無精子症 (obstructive azoospermia; OA) であるのか、非閉塞性無精子症 (Non-OA; NOA) であるのかを鑑別することを目的として行ってきた。精巣組織所見で maturation arrest, sertoli cell only (SCO) あるいはごく少数精子がみられる hypo-spermatogenesis 等の造精機能不全の場合には絶対不妊として不妊カップルにはあきらめられていた。しかし 1993 年 Schoysman らにより閉塞性無精子症例の精巣から精子を採取し ICSI にて妊娠に初めて成功した報告、その後 Devroey らは NOA 症例の精巣内精子 (conventional-TESE; C-TESE) からも ICSI で妊娠例を報告し、その後欧米では、TESE 症例が急増した。工夫としては 1 カ所の精巣生検では精子回収は困難でも多カ所から採取する方法、あるいは大きなブロックとして精巣生検し



精子を見つけ出す方法が取られている。その精子回収率は岡田によれば20~25%と低率であるが、海外では45~63%<sup>14)15)</sup>と比較的良好な成績が報告されている。

採取された病理学的組織像別による精子回収率は hypo-spermatogenesis 例で50~100%と比較的高率の報告が多い。Maturation arrest 例では23~82%, Sertoli cell only 例では0%から最高でも67%と回収率は低い報告が多い。このような状況で手技の改善が求められて Schlegel<sup>15)</sup>が顕微鏡下での TESE (MD-TESE) の手技を発表し、彼自身の成績として C-TESE では45%であった回収率が63%に向上したと報告され、瞬く間にこの手法が広く採用されるようになった。この手技で精子が存在する精細管の特徴として精細管が太く透明もしくは白色があったところで高率に回収できることが述べられている。また NOA 症例で多く遭遇する染色体異常、Klinefelter 症候群でも TESE により41<sup>16)</sup>~72<sup>17)</sup>%平均すると半数以上の方で精子が回収されそのなかで妊娠例は50%近くが児を得ている。しかしわが国では胚培養士が増えてきたとはいえこの MD-TESE が行える施設はまだ限られているが、その成績は C-TESE にて採取できなかった症例でも精子が回収されることが報告されている。現状では従来絶対不妊とされた非閉塞性無精子症患者にも挙児の希望がかなえられる時代となった。

## 2. MESA

主として先天性両側精管欠損症例には良い適応である。通常は MESA 施行時に精巣の一部も採取しておくが100%運動精子が回収できる。また閉塞性無精子症例での精路再建術後で精子の出現をみない症例で有効な方法で何よりも運動精子が採取できることから推奨できる。PESA は局麻下で行えて一見容易であるが穿刺後の血腫の危険があるので注意が必要である。

## 文 献

- 1) Sun JG, Jurisicova A, Casper RF : Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm : correlation with fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*, **56** : 602-607, 1997.
- 2) Kao S, Chao HT, Wei YH : Mitochondrial deoxyribonucleic acid 4977-bp deletion is associated with diminished fertility and motility of human sperm. *Biol Reprod*, **52** : 729-736, 1995.
- 3) Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, et al : A first prospective study of the individual straight line velocity of the spermatozoon and its influences on the fertilization rate after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, **13** : 3103-3107, 1998.
- 4) Berkovitz A, Eltes F, Lederman H, et al : How to improve IVF-ICSI outcome by sperm selection. *RBM online*, **12** : 634-638, 2006.
- 5) Cayli S, Jakab A, Ovari L, et al : Biochemical markers of sperm function : male fertility and sperm selection for ICSI. *RBM online*, **7** : 462-468, 2003.
- 6) Yanagida K, Katayose H, Hirata S, et al : Influence of sperm immobilization on onset of Ca<sup>2+</sup> oscillations after ICSI. *Hum Reprod*, **16** : 148-152, 2001.
- 7) Rybouchkin A, Benijts J, De Sutter P, et al : Disintegration of chromosomes in dead sperm cells as revealed by injection into mouse oocytes. *Hum Reprod*, **12** : 1693-1698, 1997.
- 8) Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T : Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod*, **67** : 534-539, 2002.
- 9) Tesarik J, Greco E, Mendoza C : Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod*, **19** : 611-615, 2004.
- 10) Greco E, Scarselli F, Iacobelli M, et al : Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum Reprod*, **20** : 226-230, 2004.
- 11) Landuyt VL, De Vos A, Joris H, et al : Blastocyst formation in *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles : influence of the fertilization procedure. *Fertil Steril*, **83** : 1397-1403, 2005.
- 12) Bondulle M, Ponjaert I, Steirteghem AV, et al : Developmental outcome at 2 years of age for children born after ICSI compared with children born after IVF. *Hum Reprod*, **18** : 342-350, 2003.
- 13) Bondulle M, Assche EV, Joris H, et al : Prenatal testing in ICSI pregnancies : incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameter. *Hum Reprod*, **17** :

1) Sun JG, Jurisicova A, Casper RF : Detection of

- 2600-2614, 2002.
- 14) Silber SJ : Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in non-obstructive azoospermia. Hum Reprod, **15** : 2278-2284, 2000.
- 15) Schlegel PN : Testicular sperm extraction : microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. Hum Reprod, **14** : 131-135, 1999.
- 16) Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, et al : Sperm chromosome analysis and outcome of IVF in patients with non-mosaic Klinefelter's syndrome. Fertil Steril, **74** : 925-929, 2000.
- 17) Schiff JD, Gianpiero DP, Lucinda LV, et al : Success of Testicular Sperm Injection and Intracytoplasmic Sperm Injection in Men with Klinefelter Syndrome. JCEM, **90** : 6263-6267, 2005.

---

\* \* \*

\* \*

# 不妊治療と遺伝子異常

## —ARTで認識すべき遺伝子異常

柳田 薫\*

### はじめに

体外受精 (IVF) をはじめ卵細胞質内精子注入法 (ICSI) などの生殖補助医療 (ART) の歴史はまだ浅い。ICSIによって世界で最初に誕生した子供たちでも15歳であり、DAZが欠失している遺伝情報を持つ無精子症の父親から誕生した年長の男の子では13歳である。ARTの実施によって、誕生する子供にもたらされる遺伝子異常の調査は玉手箱の蓋が開けられたばかりである。

近年、そのような遺伝子異常とともにゲノムインプリンティング遺伝子群の異常とARTとの関連性が議論されている。ARTが原因となっていると考えられているインプリンティング関連疾患としては、Prader-Willi症候群 (PWS) や Angelman症候群 (AS) などがある。この稿ではインプリンティング異常とARTとの関連について解説する。

### ゲノムインプリンティング

例えばヒトの22本の常染色体は母親と父親からそれぞれ1本ずつ与えられ、対になっている。その1本の染色体上に乗っているすべての遺伝子には1対の対立遺伝子が存在することになる。つまり、同じ遺伝子のコピーを持っていることにな

る。通常はそれらの対立遺伝子は2つとも発現して個体に必要な機能を発揮している。しかし、遺伝子のいくつかは片方の親から受け継いだ遺伝子のみが発現する現象が知られている。このような遺伝子は後天的遺伝子修飾 (エピジェネティクス, epigenetics) により特定の遺伝子に対して遺伝的刷り込み (ゲノムインプリンティング: genomic imprinting) がなされている。エピジェネティクスとはヒストン-DNA complexに対する後天的化学的修飾によって遺伝子の発現がコントロールされることをいう。この修飾にはDNAのシトシンのメチル化 (DNAのメチル化) や核蛋白であるヒストンのメチル化・アセチル化 (ヒストン修飾) がある。DNAのメチル化では、プロモーターなどがメチル化されることで、DNA配列には変化がなくても、エピジェネティクスが乱れるとその遺伝子の作用が変化してしまうことになる。つまり、この刷り込みの異常はDNAを構成する塩基配列の突然変異ではなく、メチル化などの変異によるもの (epimutation) なので、DNAシーケンスを行っても発見できないのである。そして、このエピジェネティクスは環境因子から影響を受ける可能性が示唆されていることが問題となる。エピジェネティクスの異常 (loss of imprinting: LOI) は、対象となる遺伝子によって hypomethylation となることも hypermethylation となることもある。

全ゲノム中のインプリンティング遺伝子の調査は困難で、ほとんど偶発的に発見されるのが現状

\* やなぎだ かおる：国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター、国際医療福祉大学大学院医療福祉学研究科保健医療学専攻 生殖補助医療胚培養分野 (〒329-2763 栃木県那須塩原市井口537-3)

表1 ヒト悪性腫瘍での刷り込み異常

腫瘍の種類	遺伝子
小児腫瘍	
Wilms' tumor	IGF2, H19, p57KIP2, M6P/IGF2R
Rhabdomyosarcoma	IGF2
Ewing's sarcoma	IGF2
Hepatoblastoma	IGF2
成人腫瘍	
Bladder	IGF2, H19, IPW
Breast	IGF2
Cervical	IGF2, H19
Choriocarcinoma	IGF2, H19
Colorectal	IGF2
Esophageal	H19
Gastric adenocarcinoma	IGF2
Glioma	IGF2
Hepatocellular	IGF2, H19
Leukemia-acute myeloid	IGF2
Leukemia-chronic myelogenous	IGF2
Lung	IGF2, H19, p73
Medulloblastoma	IGF2, H19
Mesothelioma	IGF2
Ovarian	IGF2
Prostate	IGF2
Renal cell carcinoma	IGF2, p73
Testicular germ cell	IGF2, H19
Uterine	IGF2

(文献2より引用・改変)

である。エピジェネティクスに関与する遺伝子は現在のところ88個が同定されている<sup>1)</sup>。エピジェネティクスの異常に起因する疾患としてよく知られているものは癌である。癌抑制遺伝子が不活化されることが癌の発症に関連しており(表1)<sup>2)</sup>、その不活化にエピジェネティクスが関与しているのである。そしてまた、ゲノムインプリンティングの異常はヒトの行動や先天異常に及ぶ種々の疾患の発症に関与し、インプリンティング異常によると考えられる疾患が多数報告されている(表2)<sup>2)</sup>。最初にエピジェネティクス異常が関与していることが判明した疾患がPrader-Willi症候群(PWS)である。そのほかにAngelman症候群(AS)、そしてBeckwith-Wiedemann症候群(BWS)などがある。

### 1. Prader-Willi症候群

1956年に発見された筋緊張低下、性腺発育不全、性格異常、肥満を四徴とする症候群である。16,000人に1人の発症で、乳児期には筋緊張低下、哺乳力不良、停留睾丸など、それ以後では過食、肥満、筋緊張低下のため運動発達遅滞、小さな手足、性器の発育不全、知的障害などを認める。認知障害、軽度精神遅滞、中枢性肥満を伴う過食症、視床下部性腺機能不全である。

生下時より症状がある場合が多いが、診断は困難である。多くは5歳までに診断されるが、15歳ころになって診断されることもある。原因は父親由来の15番染色体のq11-q13が欠損することによる(70%)。または、1対がどちらも母から由来する母方片親性ダイソミー(uniparental disomy: UPD)のためである(25%)<sup>3,4)</sup>。原因遺伝子とし

表2 ゲノムインプリンティングが原因となる主な疾患

病名	原因
胞状奇胎	雄核発生(胚体外組織の異常増殖)
卵巣奇形種	雌核発生(胚組織の異常増殖)
3倍体	2精子授精(胚体外組織の増殖)
Beckwith-Wiedemann症候群	父親性第11染色体ダイソミー(母性転座・逆位)
Prader-Willi症候群	母親性第15染色体ダイソミー(父性欠失)
Angelman症候群	父親性第15染色体ダイソミー(母性欠失)
新生児一過性糖尿病	父親性第6染色体ダイソミー
Silver-Russell症候群	母親性第7染色体ダイソミー
子宮内成長障害	母親性第14染色体ダイソミー
Wilms腫瘍	<i>Igf2</i> 遺伝子のインプリント欠落
骨肉腫	<i>Igf2</i> 遺伝子のインプリント欠落
Albright遺伝性骨ジストロフィー	高頻度母性由来遺伝, GNAS1 遺伝子の変異
インスリン依存性糖尿病	高頻度父性由来遺伝
躁鬱病	高頻度母性由来遺伝
てんかん	父親から伝達するとき重症

(「生命の誕生に向けて」日本哺乳動物卵子学会編より引用)

ては *necdin* (*NDN*) 遺伝子, *SNRPN* 遺伝子, *IPW* 遺伝子が考えられている。

基本的に遺伝性はなく, 再発危険率はない。染色体検査とメチル化検査でほぼ確定診断が可能である。できるだけ早期に確定診断をつけて, 肥満予防を目的に食事療法, 成長ホルモン投与を考慮する必要がある。

## 2. Angelman症候群

20,000~30,000人に1人の発症で1965年に報告された。発達障害, 言語障害, 精神発達遅滞, 失調性歩行, 四肢の振戦様運動, 特異な行動(すぐに笑ったりなど, 容易に興奮しやすい), 集中力低下, 小頭症, 痙攣, 脳波異常, 哺乳・摂食障害, 睡眠障害, 流涎, 下顎の突出など多彩な症状を呈する。痙攣は臨床上問題であるので, 抗痙攣剤の投与もある。多くは3歳以後に診断される。この症候群の70%に15番染色体上のq11-13領域の遺伝子(*UBE3A*)の欠失を認めている<sup>5)</sup>。4%未満であるが, インプリンティングの異常も報告されている<sup>6)</sup>。ASの原因遺伝子はPWSの原因遺伝子に隣接している。この症候群では母親由来の染色体の場合, 父から由来する父方片親性ダイソミーの場合などに認められる。

## 3. Beckwith-Wiedemann症候群

14,000人に1人の発症で, 臍帯ヘルニア, 巨舌, 巨人症を三主徴とする。ほかに内臓肥大, Wilms腫瘍, 肝芽腫など, 新生児一過性低血糖, 耳たぶの線状痕などを特徴とし, 新生児期に症状が顕著で, 成長とともに症状が明らかでなくなってくる。責任遺伝子座は11p15.5領域で, 父性トリソミー, 父性ダイソミーなどが認められる。この場合, 父性片親発現を示すインプリンティング遺伝子の過剰発現が原因と考えられている。父性片親性ダイソミーなどによる11p15.5領域の父方発現遺伝子 *IGF2* の機能(胎児期の細胞増殖の促進)により過成長, つまり巨大児になると思われる。このような作用や *H19* 遺伝子のメチル化異常により Wilms腫瘍などの腫瘍の発生に関連すると考えられる。また, この領域にある母方発現インプリント遺伝子 *p57<sup>KIP2</sup>* 遺伝子は *IGF2* 遺伝子発現を抑制するが, その遺伝子の変異により *IGF2* が抑制されず, 過剰発現になるからと考えられている。また, 巨大児の発現には父方発現遺伝子 *LIT1* の異常も関係していると考えられている<sup>7)</sup>。

## 体外培養と large offspring syndrome

動物モデルでもインプリンティングの異常が発

達異常や行動異常と関連があることが示されている現状から、ARTを行う場合にはエピジェネティクスへの影響に多大な注意が必要であるという警鐘が鳴らされている。

Khoslaら<sup>8)</sup>によれば、マウス胚を胚盤胞までM16 + FCS (fetal calf serum) で培養し胚移植すると、得られた産仔は低体重であり、インプリンティング遺伝子である*H19*, *IGF2*, *Grb7* (growth factor 受容体) の発現が低下していた。FCSを用いた培養は種々のインプリンティング遺伝子に影響し、胎児発育遅延を誘導することを示した。Youngら<sup>9)</sup>は、ヒツジでマニピュレーションや胚の体外培養環境が胎児形成異常と関連することを報告した。移植前の胚盤胞までの5日間を血清入りの培養液で培養したり、顆粒膜細胞と共培養すると、胎児の25% (12/48) がlarge offspring syndrome (LOS) となり、LOSの胎児では*Igf2R*のインプリンティング制御部位のメチル化が欠如していることを明らかにした<sup>9)</sup>。つまり、着床前期胚の培養などの処理がインプリンティング遺伝子のエピジェネティクスを変化させることが判明したのである。同様の報告はヒツジでSinclairら<sup>10)</sup>が、Behboodiら<sup>11)</sup>がウシでそれぞれ培養環境がLOSと密接な関係があることを述べている。母体の栄養状態がエピジェネティクスの異常を誘導して、成熟してからの悪性腫瘍、肥満、糖尿病などの病態を増加させている可能性をマウスモデルでWaterlandら<sup>12)</sup>も報告している。

Zaitsevaら<sup>13)</sup>は、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒトにおいて、雄性前核ではDNAの脱メチル化が行われるが、その状態を*in vitro*と*in vivo*とで比較した。そうすると、*in vitro*での前核ではメチル化が維持され、脱メチル化が遅延していることがわかった。このことは、胚培養やマニピュレーション時のエピジェネティクスの異常の原因の1つと思われる。

## ART との関連

このような背景のなか、IVFやICSIなどのARTによって生まれた子供たちにエピジェネティクスの異常に関連する疾患が発症したという報

告がなされた。これらの疾患は、BWS, AS, その他として網膜芽細胞腫の発症であった。

1999年のWashington University BWS Registryでのデータベースで、BWSの65例中3例(4.6%)がARTで生まれていた。この時期のアメリカ合衆国での全出生児に対するART児の割合が0.76% (30,285人/3,959,417人) であるので、BWS児においてはART児の割合が通常より6倍高いことになる<sup>14)</sup>。2003年、DeBaunら<sup>14)</sup>はARTによって生まれた7例のBWS症例(5例はICSI)を報告した。解析できたのは7例中6例で、そのうち5例にBWSに特有なエピジェネティクスの異常が認められた。4例がLIT1の異常、1例がLIT1とH19の異常であった。さらにDiaz-Meyerら<sup>15)</sup>が同様にLIT1の異常によると考えられるBWSの6例を、Gicquelら<sup>16)</sup>も6例をそれぞれ報告した。また、分子生物学的解析が行われていないが、1995年に凍結保存胚を用いたARTでBWSの報告がある<sup>17)</sup>。それらのART技術がBWSの発症にかかわるエピジェネティクス異常に関連するが、ARTのどのような技術に関連するかは不明である。

2002年、Coxら<sup>18)</sup>はICSIで生まれたAngerman syndromeの2例を報告した。また、Orstavikら<sup>19)</sup>もICSIで生まれた1例を報告した。この3例はいずれもSNRPNのimprinting control center (ICC) がhypomethylationとなっておりエピジェネティクスの異常による発症であった。

網膜芽細胞腫では13番染色体q14にあるRB1遺伝子の変異が認められる。両眼性では遺伝性であるが、片側性例のなかにはRB1遺伝子のエピジェネティック異常があることが調査されている。Mollら<sup>20)</sup>はIVFで生まれた網膜芽細胞腫の5例を報告し、ARTでは生まれた子供の網膜芽細胞腫のリスクが高いことを報告した。

その後、デンマーク、イギリス、オランダからインプリンティング病とARTの関係の大規模な調査報告がなされた。デンマークでは1994年からNational IVF Registryが立ち上がり、データを集積してきた。1995年から2001年までの非IVF出生児442,349人、IVF出生児6,052人での調

査では、ART児にBWS, AR, PWDなどの発症は1例もないという結果が得られた<sup>21)</sup>。イギリスでの報告は213例のBWS例, 384例のAS例, 522例のPWS例, 38例の一過性新生児糖尿病 (transient neonatal diabetes mellitus : TNDM) 例について調査を行った。なお、一過性新生児糖尿病 (transient neonatal diabetes mellitus : TNDM) は稀な病態で、6番染色体q24の遺伝子のメチル化異常が報告されている (25%未満)。その結果、BWSとASの発症に関してはARTとの関連が考えられたが、ほかについては関連を認めなかった<sup>22)</sup>。オランダでの報告ではBWS, AS, PWSの発症についてはART児で増加するという根拠はなかったが、不妊ということとそれらの疾患の発症が関連することが示唆された<sup>23)</sup>。

## おわりに

インプリンティングの異常は、幼児期では発育や神経学的異常として、成人してからは悪性腫瘍として出現する。つまりASやPWS, Alzheimer病, 自閉症, 糖尿病, 肥満, 分裂病, 悪性腫瘍 (膀胱, 乳腺, 子宮頸部, 大腸・直腸, 食道, 肝細胞, 肺, 中皮腫, 卵巣, 前立腺, 精巣), 白血病などに関連する。着床前のエピジェネティクスの変化は、その後の遺伝子の発現に影響して、胎児発育にも影響する。さまざまな環境因子がエピジェネティクスに影響する可能性がある。女性が妊娠中にメチルが欠乏するような食事制限をすると、子供のインプリンティング遺伝子の発現に問題を起こす可能性も示唆される。ここで取り上げたARTもエピジェネティクスを変化させている可能性がある。われわれは慎重にARTの適応を守り、注意深くARTを実施する義務がある。

## 文 献

- 1) <http://www.geneimprint.com/site/genes-by-species>
- 2) Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, et al : Genomic imprinting : implications for human disease. *Am J Pathol* 154 : 635-647, 1999
- 3) Ledbetter DH, Engel E : Uniparental disomy in humans : development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum Mol Gene* 4 : 1757-1764, 1995
- 4) Nicholls RD : Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes : a review. *Am J Med Genet* 46 : 16-25, 1993
- 5) Clayton-Smith J, Laan L : Angelman syndrome : a review of the clinical and genetic aspects. *J Med Genet* 40 : 87-95, 2003
- 6) Buiting K, Saitoh S, Gross S, et al : Inherited microdeletions in the Angelman and Prader-Willi syndromes define an imprinting centre on human chromosome 15. *Nat Genet* 9 : 395-400, 1995
- 7) DeBaun MR, Niemitz EL, McNeil DE, et al : Epigenetic alterations of H19 and LIT1 distinguish patients with Beckwith-Wiedemann syndrome with cancer and birth defects. *Am J Hum Genet* 70 : 604-611, 2002
- 8) Khosla S, Dean W, Reik W, et al : Culture of pre-implantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update* 7 : 419-427, 2001
- 9) Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, et al : Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 27 : 153-154, 2001
- 10) Sinclair KD, McEvoy TG, Maxfield EK, et al : Aberrant fetal growth and development after in vitro culture of sheep zygotes. *J Reprod Fertil* 116 : 177-186, 1999
- 11) Behboodi E, Anderson GB, BonDurant RH, et al : Birth of large calves that developed from in vitro-derived bovine embryos. *Theriogenology* 44 : 227-232, 1995
- 12) Waterland RA, Jirtle RL : Transposable elements : targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol* 23 : 5293-5300, 2003
- 13) Zaitseva I, Zaitsev S, Alenina N, et al : Dynamics of DNA-demethylation in early mouse and rat embryos developed in vivo and in vitro. *Mol Reprod Dev* 74 : 1255-1261, 2007
- 14) DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP : Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 72 : 156-160, 2003
- 15) Diaz-Meyer N, Day CD, Khatod K, et al : Silencing of CDKN1C (p57KIP2) is associated with hypomethylation at KvDMR1 in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 40 : 797-801, 2003
- 16) Gicquel C, Gaston V, Mandelbaum J, et al : In vitro fertilization may increase the risk of Beckwith-Wiedemann syndrome related to the abnormal imprinting of the KCN1OT gene. *Am J Hum Genet* 72 : 1338-1341, 2003
- 17) Sutcliffe AG, D'Souza SW, Cadman J, et al : Minor congenital anomalies, major congenital malformations and development in children conceived from cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 10 : 3332-3337, 1995
- 18) Cox GF, Burger J, Lip V, et al : Intracytoplasmic

- sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* **71** : 162-164, 2002
- 19) Orstavik KH, Eiklid K, van der Hagen CB, et al : Another case of imprinting defect in a girl with Angelman syndrome who was conceived by intracytoplasmic semen injection. *Am J Hum Genet* **72** : 218-219, 2003
- 20) Moll AC, Imhof SM, Cruysberg JR, et al : Incidence of retinoblastoma in children born after in-vitro fertilisation. *Lancet* **361** : 309-310, 2003
- 21) Lidegaard O, Pinborg A, Andersen AN : Imprinting diseases and IVF : Danish National IVF cohort study. *Hum Reprod* **20** : 950-954, 2005
- 22) Sutcliffe AG, Peters CJ, Bowdin S, et al : Assisted reproductive therapies and imprinting disorders—a preliminary British survey. *Hum Reprod* **21** : 1009-1011, 2006
- 23) Doornbos ME, Maas SM, McDonnell J, et al : Infertility, assisted reproduction technologies and imprinting disturbances : a Dutch study. *Hum Reprod* **22** : 2476-2480, 2007
-



—総説—

## 精子核の質的評価と体外胚発生能

### Relationship between Assessment of Sperm Nuclear Qualities and Embryo Development *In Vitro*

片寄 治男<sup>1\*</sup>・高山 智子<sup>2</sup>・菅沼 亮太<sup>2</sup>・林 章太郎<sup>2</sup>  
柳田 薫<sup>1</sup>・佐藤 章<sup>2</sup>

Haruo Katayose<sup>1\*</sup>, Tomoko Takayama<sup>2</sup>, Ryota Suganuma<sup>2</sup>, Shotaro Hayashi<sup>2</sup>,  
Kaoru Yanagida<sup>1</sup> and Akira Sato<sup>2</sup>

<sup>1</sup>国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター 〒329-2763 那須塩原市

<sup>2</sup>福島県立医科大学医学部産科婦人科 〒960-1295 福島市

<sup>1</sup>Reproduction Center, International University of Health and Welfare Hospital, 537-3 Iguchi, Nasushiobara City, Tochigi 329-2763, Japan

<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Fukushima Medical University, 1 Hikarigaoka, Fukushima City, Fukushima 960-1295, Japan

**要旨:**卵細胞内精子注入法が生殖補助医療の中心的役割を果たしている現在、精子受精能の概念は大きく変わってきた。精子側に存在し、受精後の胚発生に影響を与える因子については近年数多くの検討がなされ、原因解明が確実に進行している。精子核についてはヒトの場合、蛋白構造上不均一な、すなわち精子核蛋白protamine内S-S結合の豊富な成熟あるいは過熟精子や、S-S結合の乏しい未熟精子がICSIの際に無作為に注入される可能性が高く、選択される精子核蛋白構造による受精・胚発生過程への影響が想定される。精子核クロマチン解析によれば、S-S結合の少ない症例ほど胚発生が良好であることが指摘される一方、精子DNA断片化の程度は胚発生異常と相関することが指摘されている。ICSIではS-S結合の少ない、DNA損傷のない精子核を注入すべきであるが、今後精子核の質に着目した精子機能検査法および良好精子核選別法の開発がさらに必要になるものと考えられる。

**キーワード:**胚発生、精子核クロマチン、DNA断片化

**Abstract:** Concept of the fertilizing ability of human spermatozoa has been drastically changed since intracytoplasmic sperm injection (ICSI) played an important role of modern reproductive medicine. Recent studies on the qualities of sperm nucleus revealed that the fertilization and embryo development *in vitro* should be related to the structure of sperm nuclear chromatin, especially in case of ICSI procedure. It has been suggested that oocytes injected with sperm nuclei with poor S-S bonds have more developmental potency than that with S-S rich sperm nuclei. Moreover, it has been pointed out from the assessment of DNA fragmentation that oocytes injected with genetically impaired nuclei have little potency to develop beyond 8 cell stage embryo. Hereafter, the more definitive assessments of sperm nuclear chromatin should be needed to select the best nuclei for ICSI procedure.

**Key words:** Embryo development, Sperm nuclear chromatin, DNA fragmentation

#### はじめに

(受付 2007年9月5日/受理 2007年9月13日)

別刷請求先: 〒329-2763 那須塩原市井口537-3

国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: katayose@iuhw.ac.jp

精子機能評価法には現在までに様々な手法が開発され臨床応用されている。しかし、哺乳実験動物配偶子を用いた精子(核)顕微注入法が開発されてからヒト卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)が生殖補助医療の中心的役割を果たしている現在、精子受精能の概念は

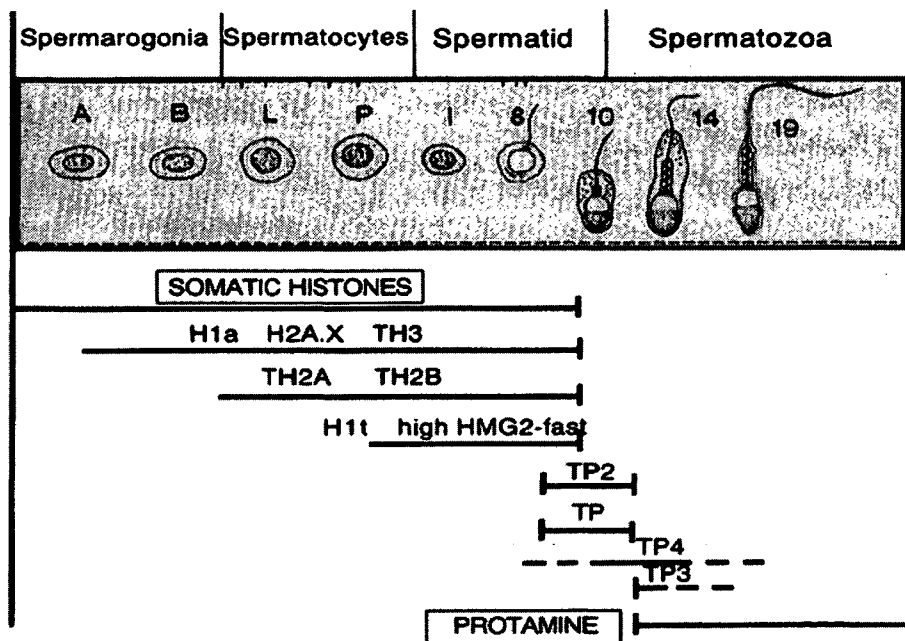


図1 精子形成過程と精子核蛋白置換 (poccia D 1986)

大きく変わってきた<sup>1-3)</sup>。すなわち、ヒト射出精子の運動能、受精能獲得および先体反応といった重要な event は ICSI をする上では必須ではなく、本法で2前核2極体が確認されれば注入された精子は受精能ありと判断され、たとえ円形精子細胞やより未熟な雄性生殖細胞でも卵活性化の追加刺激が加われば受精能は確認される<sup>4,5)</sup>。しかし、特にヒト臨床においては受精能と胚発生および着床とは直接関連しない症例に遭遇することが多く経験される。原因として夫人年齢が占める割合は高く重要であり、今後配偶子の加齢に関する研究と治療法の開発が望まれている一方、精子側に存在し受精後の胚発生に影響を与える因子については近年数多くの検討がなされ原因解明が確実に進行している<sup>6,7)</sup>。本稿では、体外胚発生に影響を与える精子核の研究、特にDNA-蛋白複合体の構造異常およびDNA損傷(断片化)に着眼した動物実験およびヒト臨床について得られた知見を概説する。

### 精子核クロマチン形成

精細管上皮で進行する spermatogenesis において、精子核は種特異的な形態に変化していく。Spermiogenesis の過程で精子核蛋白は、spermatid の体細胞型核蛋白 histone から arginine, cysteine を多く含む塩基性蛋白 protamine へと置換されていく(図1)<sup>8)</sup>。Protamine の存在により精子核 DNA は線状配列および toroid 形成により密に凝集され(packaging)、遺伝情報保存に有利な形態を獲得する。精巣から遊離された精巣内精子は精巣上体へ転送され、さらに分子レベルの変化を受け機能的に成熟した精子となるが、この間に惹起される

精子核の変化として protamine 分子内の S-S 結合の形成が挙げられる。これは、protamine 分子内 cysteine thiol 基 (-SH) 同士が主に phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) など glutathione peroxidase の酸化作用により disulfide 結合 (S-S 結合) を形成する反応であり、精子核安定性(成熟性)の主体となる<sup>9)</sup>。近年、phospholipid hydroperoxide glutathione peroxide を還元する抗酸化酵素、PHGPx が、精子形成過程や protamine の S-S 結合などにも深く関与し、精子核蛋白複合体構造の安定性に寄与していることが明らかになった<sup>10-13)</sup>。実際、男性不妊患者の PHGPx の発現低下を指摘する論文も散見される<sup>10,11)</sup>。PHGPx は glutathione peroxidase (GPx) family のひとつとして GPx4 とも呼ばれ、ヒトでは第19番染色体 (p13.3) に存在する遺伝子であり、精子核のみに存在し、精子核凝縮が行われる後期精子細胞や精子で著明に発現している。また isoform として、mitochondrial, cytosolic, nuclear の3型が同定され、nuclear PHGPx は 34kDa の selenoprotein であり、sperm nuclei glutathione peroxidase (snGPx) とも呼ばれている<sup>10-13)</sup>。DTT で S-S 結合を還元して脱凝縮した精子核に nPHGPx を加えると再凝縮が認められたことや、PHGPx の阻害剤である bromosulfophthalein で精子核の再凝縮が認められなかったことから、nPHGPx が protamine の S-S 結合に関与していると考えられている<sup>13)</sup>。また、ヒトの PHGPx は活性中心が cysteine の約1,000倍の効力をもつ selenoprotein であり抗酸化作用も強力であるといわれている<sup>11)</sup>。

霊長類を除く哺乳動物射出精子あるいは精巣上体尾部精子の核成熟性は均一かつ高度に安定しているが、ヒト射出精子

核のそれは不均一であるのが特徴である (heterogeneity)<sup>14)</sup>。ヒトでは DNA 核蛋白全体に占める protamine 分子総量の割合が bull, stallion, hamster, mouse と比較して少ないことが知られている他<sup>15)</sup>, bull, rat, ram, boar, guinea pig などの protamine が P1 だけの種と異なり, cysteine 残基のない P2 もヒトでは存在する。そのため, ヒトでは S-S 結合を形成するための cysteine 残基が少なく, 他の哺乳動物と比較して不安定な核クロマチンを有することになる<sup>16)</sup>。さらに, P2 は DNA に組み込まれた前駆体が後に修飾を受ける。このため P2 前駆体の proteolytic cleavage の異常は, ヒト sperm chromatin heterogeneity と潜在的な不妊症に影響しうると考えられている<sup>17, 18)</sup>。総じてヒト射出精子核蛋白は 85% が S-S 結合の比較的少ない protamine であり, 残り 15% は histone を含む未熟な蛋白で構成されている<sup>19)</sup>。ヒト精子の核蛋白に占める histone の割合は不妊患者で有意に高いことも知られている<sup>19)</sup>。

### 卵細胞質内での精子核クロマチン変化

正常受精過程では, 受精能獲得, 先体反応を完了した精子のみが卵細胞質膜と融合する。精子核は精子-卵子融合直後から卵細胞質と接触し, 雄性前核形成まで影響を受け, 精巣内のクロマチン形成と逆の変化を遂げる。卵細胞質内の還元型 glutathione (GSH) が主体となり精子核内 S-S 結合が還元され, 精子核膨化の間に核蛋白は histone 分子へと置換される。その後前核形成因子により雄性前核が形成されるが, この過程の進行には卵が活性化されていることを条件とする。未活性の場合, 精子核は premature chromatin condensation (PCC) を起こし紡錘糸を有する染色体を形成する。また, 裸化GV卵子や前核期胚などに先体反応完了精子を媒精しても融合は起こり, 精子核の S-S 結合は還元作用を受けるが核膨化は起こらない。これは精子核蛋白置換作用が metaphase 卵にのみ存在することを示唆する<sup>20)</sup>。卵細胞質内での精子核の時間的变化は, S-S 結合の還元に 20 分, 核膨化(蛋白置換)にさらに 40 分を要することが示されている(ゴールデンハムスター)<sup>20)</sup>。従って, 特に ICSI の場合, 注入される精子核クロマチンの構造によって受精過程に遅速が想定されることになる。

### 精子核クロマチン検査法

#### 1. 精子核クロマチンの構造解析

精子核蛋白の解析には, 構成される蛋白の組成と protamine 内の S-S 結合数を指標とする検査法が多い。Toluidine-blue, Giemsa, aniline-blue, feulgen 染色を用いた解析が紹介されているが, これらは染色の原理が不明瞭であることおよび染色像の濃淡による評価による欠点が指摘され汎用されていない<sup>21-24)</sup>。Monobromobimaine (mBr) は protamine の thiol 基に特異的に結合する色素であり, 395-425 nm excitation filter を装着した蛍光灯顕微鏡で観察することにより精子核 S-S 結合の多寡を判定できる<sup>25)</sup>。同様に thiol

基に特異的に結合する DACM(N-(7-dimethylamino-4-methyl-3-coumarinyl) maleimide) と DNA 特異的色素 PI (propidium iodide) による二重染色 (Fluorescence resonance energy transfer; FRET 解析) では, DNA-protamine で構成されるクロマチン線維あるいは toroid の密度や結合度を定量的に測定できる<sup>26)</sup>。また, 蛋白組成解析には SDS-PAGE が用いられることがあるが, 得られる蛋白量が極めて少ないこと, 臨床スクリーニング検査としては煩雑であることから研究段階に留まっている<sup>27)</sup>。

核酸蛍光色素 acridine orange (AO) を用いた精子核クロマチン解析は, 落射型蛍光顕微鏡で判定する AO test と flow cytometry により判定する sperm chromatin structure assay (SCSA<sup>®</sup>) が紹介されている<sup>28, 29)</sup>。染色の原理は酸処理による精子核 DNA の denaturation の程度を波長 450-490 nm の blue light で励起することにより, S-S 結合の少ないクロマチンでは red 型 (>630 nm, denatured), S-S 結合の多いクロマチンでは green 型 (530 ± 30 nm, ds-DNA) の蛍光を呈することにある<sup>14)</sup>。妊孕性の確認された男性の精子は green 型が 50% 以上を占めるが, 受精障害男性の精子には red 型精子が有意に多く観察されることが判明している<sup>30)</sup>。AO test は簡便で比較的安価でできる検査であり, また thiol 基の特異的酸化剤 diamide を組み合わせることにより SDS-PAGE に相当する核蛋白異常精子を検出することもできる<sup>27)</sup>。しかし, 結果に関して観察者間の誤差が大きいこと, また蛍光の消退現象が判定を難しくしていることが欠点として指摘され, 精子機能検査として広く行われていない。SCSA<sup>®</sup> は高価ではあるが検査結果の客観性が高く, より多くの精子核を解析することができる<sup>29)</sup>。しかし, その解釈にはいくつかの問題点が指摘される。すなわち, この検査によれば >630 nm の蛍光強度が高い精子核が DNA 断片化精子の指標 (DNA fragmentation index; DFI) となるが, 実際には精子核 DNA は核蛋白 protamine 内 S-S 結合の多寡によって酸処理による変性の影響が異なり, AO の結合様式も DNA の状態により変化する。従って, DFI によって精子核断片化は判定できないことになる。また, 精巣内精子や S-S 結合の特異的還元剤 dithiothreitol (DTT) 処理精子の DFI は 100% になり矛盾する。精子核の heterogeneity が特徴であるヒト射出精子には SCSA<sup>®</sup> を行う上で対照が設けられないことも欠点として指摘される。

#### 2. DNA の解析

精子核の DNA 断片化検出法には種々の手法が報告されている (DNA breakage detection-fluorescent in situ hybridization assay<sup>31)</sup>, *in situ* nick translation assay<sup>32)</sup>, comet assay<sup>33)</sup>, TUNEL assay<sup>34)</sup>, sperm chromatin dispersion (SCD) test<sup>35)</sup>)。SCD test は DNA breakage detection-fluorescent *in situ* hybridization assay による DNA 断片化検査と結果の一致性が高く, 簡易で多くの検体の判定に適している。Halo sperm<sup>®</sup> として市販もされている<sup>36)</sup>。

【SCD test】精子浮遊液 100  $\mu$ l と等量の 1.4% low melting agarose を混和し、0.65% standard agarose でコーティングされたスライドガラス上に 50  $\mu$ l を滴下、カバーガラスで被覆する。これを 4°C で 4 分間以上冷却した後、カバーガラスを取り外し速やかに 0.08N HCl で 7 分間室温下に酸処理を施す (acid denaturation)。精子核蛋白の除去は、スライドを 0.4M Tris, 0.8M DTT, 1% sodium dodecyl sulfate, 50 mM EDTA (pH 7.5) で 10 分間、0.4M Tris, 2M NaCl, 1% SDS (pH 7.5) で 5 分間処理し、0.4M Tris, 2 mM EDTA (pH 7.5) で 3 回洗浄し行う。70%, 90% および 100% エタノールにより順次 2 分間の脱水処理を施した後、ethidium bromide など で染色し、蛍光顕微鏡にて 1 検体につき 100 精子核以上を観察する。判定は精子核周囲に拡散した DNA fiber が形成する halo の状態により large, medium, small, no halo と判定し、no halo sperm head の割合 (%) などを指標にする。

SCD test の原理については不明な点が多いが、DNA 断片化のない (少ない) 精子核の protamine は酸および detergent 処理により容易に抽出され、DNA fiber が halo を形成することが知られている。一方 DNA 断片化精子核では同じ処理によっても常に matrix protein (theca protein 含む) が残留し、halo 形成が阻害されていることがわかっている<sup>37)</sup>。つまり、精巣内での精子核蛋白置換異常、アポトーシスあるいは酸化的ストレスによって惹起される精子核 DNA 断片化は、クロマチン単位での傷害として考える必要がある。

## 精子核クロマチン異常

### 1. 動物モデル

精子核クロマチン異常精子モデルには、核蛋白に関する mutant が実験に用いられる。Protamine 内の S-S 結合の役割を検討するモデルとして、鳥類の核蛋白である galline を核蛋白として遺伝子改変されたマウスがある。Cystein 残基を持たない galline 蛋白内では S-S 結合は形成されず、核蛋白比 (galline/protamine1) がそれぞれ 0 (wild type), 1.94 (T75), 5.62 (T77) のマウスの検討では T77 マウスが不妊になることがわかっている。In vitro では卵透明帯貫通能の障害が不妊の原因として指摘されたが、ICSI により産仔が得られたことから遺伝的傷害のない精子核と考えられる<sup>38)</sup>。

Transitional protein (Tnp) は精巣内で体細胞型 histone が protamine に置換される時期に生合成される移行蛋白であり、type 1, 2 の 2 型が存在する。双方の生合成が knock out された Tnp mutant マウス (TnP1/TnP2 double knockout mouse) は、奇形精子が増加すること、運動性が減弱することにより完全な不妊となる。しかも、精巣上体を通過した精子の受精は ICSI を施しても阻害されている (人為的卵活性化の効果なし)。一方精巣内精子には野生型と同様の受精・胚発生能が ICSI により確認されていることから、この mutant の精子核クロマチンは構造的に極めて脆く、異常精子核蛋白と受精・胚発生障害の関連性を示唆するモデルと

考えられる<sup>39)</sup>。

Alkylated imino sugar に属する N-butyldeoxynojirimycin (NB-DNJ) はセラミド特異的 glucosyltransferase 阻害剤であり、これを摂取した雄マウスは不妊になるが、投与を中止すると妊孕性が回復する。投与中の精巣内精子核は構造異常が高度でかつ先体を欠失し、精巣上体精子では運動性も高度に障害されている。しかもこの精子を ICSI した場合、卵活性化が惹起されずに受精障害となる。しかし、ICSI 直後に人為的卵活性化を施せば正常な受精・胚発生が進行し産仔が得られることから、遺伝的傷害は惹起されていないことが証明されている。核クロマチン構造異常のメカニズムは不明だが、異常核クロマチンと卵活性化能の関連性がこのモデルにより示される<sup>40)</sup>。

### 2. ヒト精子

ヒト射出精子核クロマチンは、構成蛋白、S-S 結合の多寡において個体間にばらつきが存在する。S-S 結合のばらつきは thiol 基を検出する mBr 染色により容易に観察され、ヒトにおいては精巣上体での S-S 結合形成が不十分であることが指摘される<sup>25)</sup>。しかし、ヒトでは精漿中に豊富に存在する亜鉛イオンが thiol 基同士を水素結合させる機序が存在し、補助的に安定性に寄与している<sup>41)</sup>。S-S 結合の多寡は AO 染色の結果を左右する重要な因子であるが、thiol 基に乏しい histone 分子の存在も結果に影響し、AO がクロマチン構成蛋白の未熟性を証明できる所以である。この核クロマチンのばらつきは妊孕性を有する射出精子でも観察されるが、AO 染色により得られた指標 (%green) が 50% 未満の症例では妊孕性および体外受精での受精率が低下する<sup>28, 30)</sup>。また、AO 染色に diamide を組み合わせた方法によっても %green が 50% 未満の症例では、SDS-PAGE によって精子核内 protamine 分子が量的に減少していることが示され、受精障害の原因として注目される<sup>27)</sup>。

ヒト射出精子 DNA 断片化は、受精・胚発生に影響する。実験的にヒト精子核に DNase あるいは紫外線照射処理を施し、ハムスター卵に顕微注入すると dose-dependent に雄性前核形成が阻害される<sup>42)</sup>。また、前核形成能が保たれる容量の曝露でも雄性前核の DNA 合成能は低下する。曝露後の精子核を FRET 解析すると、クロマチン構造は対照未処理精子核に比べて明らかに疎な状態であり、クロマチン全体の損傷が存在することを示唆する<sup>26)</sup>。ヒトでは精巣内での精子核蛋白置換異常、アポトーシスあるいは酸化的ストレスによって惹起される DNA 断片化精子が射出中に検出される。DNA 断片化率の高い症例では精子運動率が低下し、妊孕性に影響する。AO 染色などによってクロマチン異常が指摘される症例では DNA 断片化率が高くなることが予測されるが、実際には SCSA<sup>®</sup> により得られた指標 (cell outside the main population; COMP, > 630 nm の emission を強く呈する精子核の割合) と SCD test との結果は一致しない ( $r = 0.114$ ,  $p = 0.291$ ,  $n = 91$ , 自験)。酸化的ストレスなどに