

表3 平成18年度体外受精、顕微授精の成績

	IVF-ET	ICSI	
		射出精子	射出精子以外の精子
患者総数	30,426	28,252	1,911
治療周期数	42,685	44,553	2,802
採卵総回数	40,334	42,478	2,689
移植回数	29,232	28,895	1,900
採卵当たり妊娠率(%)	22.0	17.7	16.9
移植当たり妊娠率(%)	30.4	26.0	23.9
妊娠当たり流産率(%)	21.3	22.2	21.6
妊娠当たり多胎妊娠率(%)	16.0	15.2	15.4
多胎妊娠当たり超多胎妊娠率(%)	6.6	5.6	7.1
出生児数	6,694	5,502	339
移植当たり生産率(%)	22.9	19.0	17.8

(平成18年度日本産科婦人科学会倫理委員会・登録・調査小委員会報告、日産婦会誌2007; 59: 1717-1739より引用、改変)

子宮外妊娠の発生率はイギリスの Human Fertilisation and Embryology Authority の報告(2003年)では、15万6,454治療周期(IVF, ICSI)のうち3万1,666治療周期で妊娠が成立し、その2.4%が子宮外妊娠であった。

Ⅲ. ARTの副作用、遺伝的安全性

IVFやICSIの主な副作用は、卵巣過剰刺激症候群(ovarian hyperstimulation syndrome; OHSS)と多胎妊娠である。

1. OHSS

複数卵子の採取を目的とした排卵誘発剤投与による副作用の1つである。発症機序は明確ではないが、卵巣腫大、血管透過性亢進による腹水貯留や胸水貯留、それらに伴う腹部痛、血液濃縮、乏尿などを起こす。卵巣の長径が7cmを超えた卵巣腫大、下腹部痛、脱水症状などから容易に診断できる。血栓症(多臓器血栓症、腸間膜動脈血栓症、脳血栓など)により重篤な経過をたどった例が報告されている。

発症のリスクファクターは、35歳未満、多囊

胞性卵巣症候群、痩せ型体格、血清エストロジオール高値(>4,000pg/ml)、多数の2次卵胞(12~14mm)、ネックレスサイン(卵巣皮質に小卵胞がネックレスのように並んで多数観察される超音波検査所見)、hCG投与による黄体維持療法の実施などである。また、妊娠した場合、内因性hCGの影響により重症化しやすい。発症頻度は軽度OHSSでは10~60%、入院治療が必要な中等度・高度OHSSでは1~10%である。

2. 多胎妊娠

ARTによる多胎妊娠の発生は移植胚数に依存する。日本産科婦人科学会ではIVFのスタート当初から、移植胚数を3個以内に制限するという会告を示した(1996年)。現在では多くの施設が2個以内に限定しているのが実状と思われるが、それでも多胎はART妊娠の16%に発生し、流・早産のリスクが増えることから新生児医療、特にNICUでの診療に負荷をかけ続けているのが現状である。2007年の日本生殖医学会の指針では、多胎妊娠の危険性が高い40歳未満は2個以下、特に35歳未満の初回患者は移植胚を1個に制限することとしている。

IVFをスタートした初期のころは、移植胚数を制限すると妊娠率が低下すると報告された。しかし、胚の培養環境、培養技術が向上している現在では、良好胚を選択すれば1個胚移植でも妊娠率は低下しない。受精卵をやや長めに培養し、良好胚盤胞となった胚を確認して移植する胚盤胞移植法は、1個胚移植を行ううえで合理的な手技である(図2)。

3. 遺伝的安全性

ARTによって誕生した児に染色体異常例が



図2 胚盤胞ステージの胚

増加するかは、IVFにおいてはエビデンスがないものの、ICSIで性染色体異常例が増加するとの報告がある⁹⁾。また、先天性形態異常の発生についても、ARTによって誕生した児に増加することが報告されているが(5.4% vs 3.8%)⁶⁾。母体の年齢や多胎妊娠などの因子の影響も考慮しなければならない。

乏精子症や無精子症例では、染色体異常(Klinefelter症候群)や造精機能関連遺伝子(DAZ遺伝子など)の欠失を認める場合がある。そして、ICSIによって得られた男児にその異常が継承される可能性がある。

4. エピジェネティクスに関する安全性

エピジェネティクス(後天的遺伝子修飾)とは、DNAの塩基配列を変えないことなしに遺伝子発現に影響を与えることで、特定の遺伝子(インプリンティング遺伝子)に遺伝的刷り込み(ゲノムインプリンティング)が行われる。このような刷り込みはDNAのシトシンのメチル化や核蛋白であるヒストンのメチル化・アセチル化によって行われている。

最近、動物モデルで、マウス胚をFCS(fetal calf serum)を含む培養液で培養すると、インプリンティング遺伝子異常を来し、胎児発育遅延を起こすことが報告された⁷⁾。ARTにおいて

も、生まれた子どもたちにエピジェネティクスの異常に関連する疾患[Beckwith-Wiedemann症候群(BWS)、Angelman症候群(AS)、網膜芽細胞腫など]が発症したという報告がされた⁸⁾。イギリスでの大規模な調査(BWS:213例、AS:384例を含む)では、BWSとASの発症とARTとの関連性が報告された¹⁰⁾。

おわりに

日本で生まれたIVFやICSI由来の児は、2005年には15万4,000名を超えた。体外受精や顕微授精の技術は皆が知り、行える一般的なレベルまで来たが、遺伝的リスクの実態すら明らかになっていない。さらに、エピジェネティクス異常のリスクまで浮上してきたが、エピジェネティクス異常に関与する因子の解析は現時点で不可能に近い。多くの子どもたちがARTにより生まれてきたが、子どもたちを守るためにも正しい適応で、必要な治療を提供することが重要である。

…………… 文 献 ……………

- 1) Steptoe PC, et al: *Lancet* 1978; 12(8085): 366.
- 2) Palermo G, et al: *Lancet* 1992; 340(8810): 17-18.
- 3) 平成18年度日本産科婦人科学会倫理委員会・登録・調査小委員会報告. *産婦人科誌* 2007; 59: 1717-1739.
- 4) 菅原 稔: 各種不妊原因に応じた最適な不妊治療の選択指針の確立に関する研究. 平成15年度厚生労働科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)「配偶子・胚提供を含む総合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究」(主任研究者: 吉村泰典)報告書. 2004; 63-106.
- 5) Bonduelle M, et al: *Hum Reprod* 1998; 13: 781-782.
- 6) Ericson A, et al: *Hum Reprod* 2001; 16: 504-509.
- 7) Khosla S, et al: *Hum Reprod Update* 2001; 7: 419-427.
- 8) DeBaun MR, et al: *Am J Hum Genet* 2003; 72: 156-160.
- 9) Cox GF, et al: *Am J Hum Genet* 2002; 71: 162-164.
- 10) Sutcliffe AG, et al: *Hum Reprod* 2006; 21: 1009-1011.

顕微授精での受精障害

Fertilization failure in ICSI



柳田 薫(写真) 高田智美

Kaofu YANAGIDA^{1,2} and Satomi TAKADA³

国際医療福祉大学臨床医学研究センター¹、同病院リプロダクションセンター²、山王病院リプロダクションセンター³

◎顕微授精では体外受精での受精障害も適応となり、受精の成立を強力に図る。不妊治療のなかでは受精成立にもっとも信頼がおける治療方法である。この方法をもってしても1~8%の頻度で受精障害が発生してしまう。その場合の原因は卵子側と精子側に存在する。現時点である程度解析されている原因としては、精子がもっている卵活性化因子の異常があり、受精障害例の約50%にその原因が考えられる。その場合には卵活性化因子の作用を補完する意味で、卵活性化処理を行う臨床試験が試みられている。現時点ではカルシウムイオンフォア処理、電気刺激処理、ストロンチウム処理などによる妊娠分娩例が報告されている。この卵活性化併用の顕微授精は過去の顕微授精で受精障害となったケースに適応となるが、遺伝的安全性はいまだ十分に確立されていない。



顕微授精、卵細胞質内精子注入法、受精障害

体外受精の受精障害は約10%の頻度で認められるが、顕微授精では約3%程度とまれである。しかし、受精障害が発生したときの対応策がなく、難治性不妊症といえる。本稿では、受精障害の原因と対策について考察する。

顕微授精のなかでも、ここでは卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)での受精障害について述べる。ICSIの受精率は生殖補助医療のなかでもっとも高い受精率が得られる。しかし、なかにはまれであるが、ICSIを行っても受精卵が得られない症例が存在する。受精の成立は精子と卵子の相互作用によって成立するので、精子と卵子のそれぞれに原因の存在した可能性がある。また、受精障害例への対処も今後の課題である。

受精障害にはtotal(complete)fertilization failureとlow fertilization rateとがある。前者はICSIを行った卵子すべてに受精が成立しなかった場合で、後者は受精率が10~25%以下の低率である場合である。ここでは前者の場合の受精障害について述べる。

ICSIでの受精障害の現状

ICSIの結果を調べると、ICSIの治療周期当り7.9%(2,066治療周期, 2006.1~2007.12, 山王病院リプロダクションセンター)に認められた。2,066治療周期での受精率を分布図で示すと図1のようになり、受精率100%の例が57.0%を占めていた。また、ICSIを行った卵子数も受精率と密接な関連がある。ICSIを行った卵子が1個の場合、受精障害の頻度は13.3%となり、受精障害のリスクがきわめて高い。2個では3.1%、3個で0.9%、4個で1.3%となり、3個以上ではほぼ1%以下で、6個以上での受精障害はなかった(図2)。平均ICSI卵数は3.7個であった。自験例の既報と比べると数値は異なるが¹⁾、傾向は同一で、1個ICSIでの受精障害のリスクはきわめて高い。その原因は不明であり、卵巣刺激法の種類などの分析が必要であるが、卵巣刺激に対して低反応であったことは事実で、そのような状況下で採卵された卵子の質が不良であったこと、技術的なこと(最初のICSI後に、ICSI関連機器の不調があれば再調整が行われるなども含まれる)が推測される。

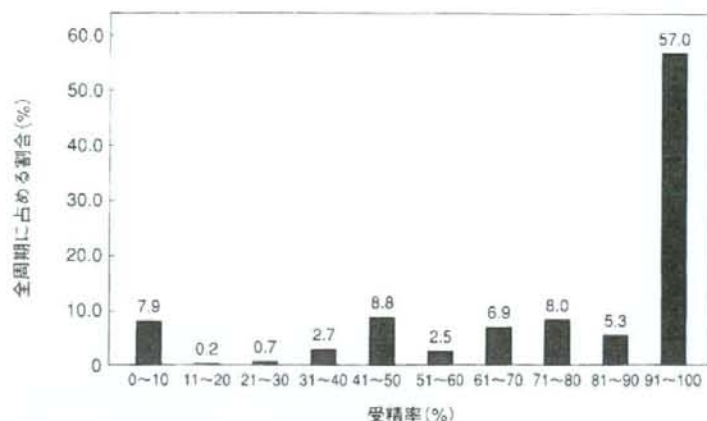


図 1 各ICSI治療周期の受精率の分布

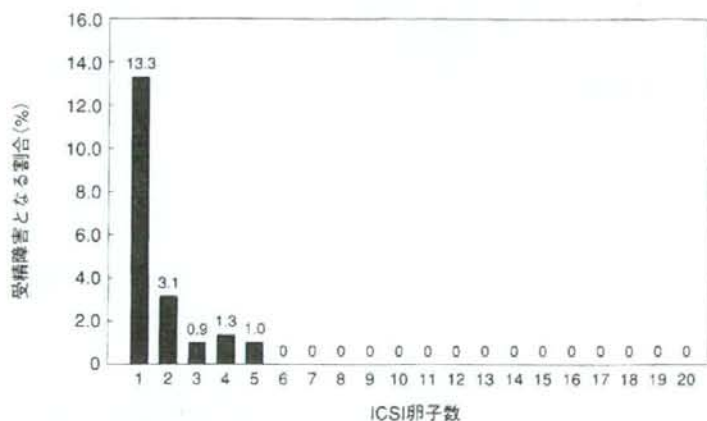


図 2 ICSIを行った卵子数と受精障害となる割合の関係

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¹⁾。

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²⁾ (「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。

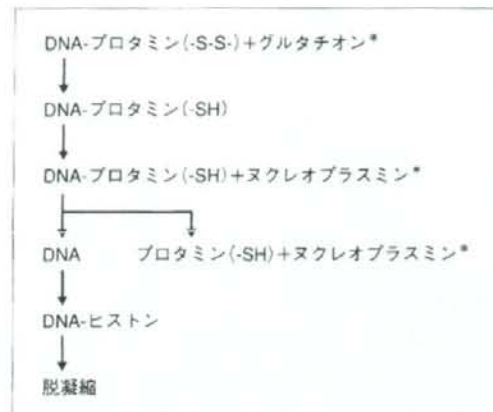


図4 精子核脱凝縮のメカニズム(文献³⁾より改変)

* : 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高いス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³⁾。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⁴⁾。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か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。このように考えられる。このような場合の ICSI された精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⁵⁾、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⁶⁾。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⁶⁾。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 を妊娠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¹⁾。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⁷⁾、電気刺激法(electroporation, electrostimulation ともいう)⁸⁾、およびストロンチウム処理などがある⁹⁾。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

1. A23187 を DMSO に溶解して 1 mM の stock solution をつくる (暗所, 冷凍保存)
2. Stock solution 10 μ l を regular medium 990 μ l に添加し, 10 μ M の処理液をつくる
3. 卵を処理液に 10 分間 (7~15 分) 浸ける
4. Regular medium で 3 回洗浄する

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好ましいと思われる。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¹⁰⁾、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動態処理の完遂度である。しっかりと不動態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.

卒業研修プログラム3 ARTの最近の話題

1) ICSIの位置づけ

座長：関西医科大学
神崎 秀陽国際医療福祉大学病院
リプロダクションセンター
柳田 薫聖マリアンナ医科大学
石塚 文平

はじめに

卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)は1992年に初めての成功が報告されたばかりであるが、現在では不妊治療の重要な柱になっている。受精障害例に適応されており、短期間で普及した現状を考えると、それだけのニーズがあると考えられる。ICSIは生殖補助医療(assisted reproductive technology, ART)の中で、in vitroでの操作が最も多い手技の一つであり、卵細胞をマイクロニードルで穿刺するので、卵子が受けるダメージはより大きなものになる。この場合、注意すべきは遺伝的リスクである。ここでは、現在収集できるICSIの成績を踏まえてICSIの適応について再検証したい。

1. ICSIの適応の現状

平成4年1月に顕微授精法の臨床実施に関する見解が日本産科婦人科学会から出され、「顕微授精法は、きわめて高度の技術を要する不妊症の治療行為であり、対象は難治性の受精障害でこれ以外の治療によっては妊娠の見込みがきわめて少ないと判断される夫婦のみに実施する(抜粋)」と記載されている。不妊治療上の具体的な適応は、体外受精で受精障害が起きた場合と体外受精で受精障害が起きることが予測される場合である。後者には、重症男性不妊症例、精子死滅症例、不動精子だけの例、精巣精子や精巣上体精子を用いる場合が含まれる。ここでいう受精障害は狭義には完全受精障害を指し、広義には受精率が25%以下の場合を指す。発表されている論文を検索すると受精障害と呼ばれている低受精率は25%以下であることから、そのように定義した。

ICSIの適応となる状況を具体的に検証する。IVFでの受精障害の発現頻度は10~20%と報告されており、自験例でも13.5%であった。初回に実施したIVFで(完全)受精障害が起きた場合、2回目のIVFで受精障害となる確率は40%(4/10)となった。初回以外のIVFで受精障害となった場合、引き続きIVFで受精障害となる確率は29%(7/24)となっ

Indication of ICSI

Kaoru YANAGIDA

International University of Health and Welfare, Infertility and IVF Center, Tochigi

Key words: IVF・ICSI・fertilization failure・rescue ICSI

た。したがって、IVFで受精障害となった場合は、ICSIの適応であると考えられる。

IVFで受精障害となることが予測される場合については、「重症男性因子例」以外は判断に苦慮することはないが、ICSIの適応となる重症男性因子を客観的に精液パラメーターで規定することが難しい。媒精の方法は、媒精に使用する培養皿、精子前培養時間(媒精時間)、用いる培養液、精子処理法などを考慮すると、多様な方法があり、媒精結果への影響が考えられる。日本生殖医学会のガイドライン(第二版)では、IVFの適応となるパラメーターは、原精液の総運動精子数が 10×10^6 未満で適応となり、 1×10^6 が限界とされている。精液処理後の総運動精子数では $0.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 未満で適応になる。

IVFとICSIの実施施設でICSIが行われている割合は、平成15年厚生労働省の科学研究の報告書によれば、ICSIの割合が80%以上を越える施設も存在する。症例が偏しているとも考えられるが、受精障害を考える根拠には乏しいが、適応を緩く考えてICSIを実施することがあるのかもしれない。また、split ICSIが受精障害を回避する対策として多用されていることを反映しているのかもしれない。いずれにせよ、ICSIの適応を考える上での客観的判断基準が定められていないこと、受精障害対策が確立されていないことが背景にある。

2. ICSIに伴うリスク

ICSIを行う場合の遺伝的リスクについては、まだ十分な調査が行われているとはいえないが、エピジェネティクスの異常も含めて、現在考えられていることをまとめると以下のようである。

1) 遺伝的リスク

ICSIによってできた児の染色体異常のリスクについては、出生前診断ではコントロールと比較して有意に高いと Bonduelle et al.(2002)によって報告されている。この時の異常は *de novo* の性染色体異常についてである。しかし、同報告では、新生児についてはコントロールと比較して有意差を認めていない。この報告では乏精子症夫婦での異常率が2.1%で、コントロールの0.24%と比較して高値であり、染色体異常のリスクへの男性因子の関与も示唆されている¹⁾。

DAZなどの造精機能関連遺伝子に異常がある乏精子症例や無精子症例から、男児が誕生する場合も、それらの遺伝子異常が児へ伝搬されることは周知の事実である。

2) 遺伝外的リスク

後天的遺伝子修飾(エピジェネティクス)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)が行われている。エピジェネティクスは環境因子から影響を受け、DNAのメチル化やヒストン修飾の異常を来し遺伝子発現を変化させることが知られている。エピジェネティクスの異常の動物モデルの報告では、マウス胚をFCS(fetal calf serum)を含むM16で培養し胚盤胞移植すると、低体重児となることが報告されている。それらの場合では、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²⁾。ヒツジでマニピュレーションや胚の体外培養が胎児形成異常(Large offspring syndrome: LOS)と関連が指摘され、*Igf2R*のインプリンティング制御部位のメチル化の欠如が判明した³⁾。ヒトでも癌、行動異常、先天異常の種々の疾患に関与することが報告されており、ARTとエピジェネティクス異常の関連性も示唆されている。IVF/ICSI例に Beckwith-Wiedemann 症候群が多いこと⁴⁾、ICSI例に Angerman syndrome が多いことなどが報告された⁵⁾。

このような種々のリスクを考慮すると、治療法としてのICSIの評価については以下の

ように考えられる。ICSIの臨床成績はIVFと同等であり、多くの子供が生まれているが、マニピュレーションなど *in vitro* 操作がより顕著であり、遺伝的リスクについては十分に配慮する必要があるが、その評価は十分にできていない。また、配偶子や初期胚が *in vitro* 操作によりエピジェネティクスの異常を生じている可能性もある。よって、ICSIはまだ臨床研究のレベルと考えられるので、その適応を拡大しないで、必要があるときにのみ実施することが肝要と考えられる。

3. ICSIの適応を適正に選択するために

1) Normozoospermia 例ではIVFとICSIのどちらが成績がよいか

Severe male factor に対してはIVFが成績不良である。しかし、male factor でない場合ではICSIの方が成績がよいかということについては、コクランレビューに報告がある。それによれば、ICSIの妊娠率についてはIVFと差を認めなかった。しかし、生産率、流産率、児の形態異常率については比較した研究成果がない。よって、ICSIの成績はIVFを越えるものではないので、男性因子でない例に対しては、IVFはICSIより好ましいと考えられる²⁾。

2) 媒精卵子が1個の場合はICSIの方が有利か

IVFの媒精卵子数毎の受精障害の発現頻度を調べると、媒精卵子が1個では26%、2個では19%、3個では19%、4個では6%となる。ICSIの場合は、ICSI卵が1個では29%、2個では16%、3個では9%、4個では7%となる(表1)。いずれの方法でも受精障害が起こる頻度は同じであった。単純に比較するとICSI卵子で高い。したがって、明らかなICSIの適応がない限りは、IVFを行うことを選択すべきと考えられる。

3) 男性因子例での考え方

男性因子例で不必要なICSIを避けるためには、IVFでの受精障害対策が必要である。精液パラメーターによるIVFの守備範囲の適応値の設定は、統一的に基準値を設定できないことが問題である。培養皿、媒精時間、培養液、配偶子前培養時間、精子処理法などによって受精成績が影響されるので、各施設での精液パラメーターのデータ解析より、各施設のIVF実施基準を作成することが必要である。筆者らの施設で作成した基準を表に示した。自施設では、媒精はFalcon 3037を用い、1 dishに最多4個の卵子まで媒精する。媒精時の最終運動精子濃度は原則 2×10^6 ml/とし、精子処理法はswim up法である。

(表1) 媒精卵子数と受精障害発現の頻度(IVF, ICSI)

媒精卵子数	受精障害の発現頻度 (%)	
	IVF	ICSI
1	25.9	28.7
2	18.5	16.2
3	19.4	9.3
4	6.5	7.0
5	8.3	2.0
6	8.3	3.8
7	3.8	2.1
8	5.0	2.8
9	0.0	2.2
10	7.7	1.4
11	9.1	3.9
12	8.3	4.4
13	0.0	2.9
14	6.7	0.0
15	0.0	0.0
16	0.0	0.0
17	0.0	0.0
18	0.0	0.0
19	0.0	0.0
22	0.0	0.0
30	0.0	0.0

(表2) IVF 媒精のための精液パラメーター基準例

精子回収処理後のパラメーター	IVF 実施の条件 (すべてを満たす場合- 自施設の基準)
精子濃度	$10 \times 10^6 / \text{ml}$ 以上
精子運動率	60% 以上
媒精精子浮遊液量	20 μl 未満
Kruger's strict criteria	4% 以上

この場合、精子処理後の精子パラメーター(精子濃度、精子運動率、奇形率(kruger's strict criteria))および媒精精子浮遊液量と IVF 受精率との関係より、表2に示した基準値を外れると受精が成立していないという事実が得られた。この基準で52例に IVF を実施し、正常受精率73.1%(M II 卵に対しては86.8%)であり、split ICSI を実施した例はない。受精障害例もないが、症例を重ねて必要があればこの基準値を修正する必要がある。

4) IVF 媒精後の受精障害対策

例えば一つの工夫として、IVF 媒精後の早期に受精の評価を行い、受精障害があると判断されたら ICSI を追加することがある。いわゆる rescue ICSI と呼ばれている手法であるが、ICSI の時期が遅くなると卵子の ageing のために有効性が低下する。IVF の媒精後 17~22 時間では ageing の影響が顕著であり有効性が低い(22 時間では有効性はない)が、媒精後 6 時間に受精を判定し、完全受精障害時に ICSI を行う方法が紹介された¹⁾。この方法では、通常の ICSI と妊娠率は同レベルで、受精卵に 3 個の前核を認めた頻度は 6.6% であった。これらの卵には第二極体の放出障害も含まれるので、余計な精子を注入した確率はもっと低いと思われる。なお、IVF での多精子受精率は 5~6% である。媒精から 6 時間程度では ageing の影響がないと言える。もっとも、通常の ICSI でも 6 時間程度の卵子前培養を行っているのが現状である。もちろんこの方法では、余計な ICSI を避けるために、完全受精障害の時だけ rescue ICSI を行っている。この方法を実際に適用すると、培養室の業務時間が 10 時間程度になり、通常の勤務時間内では実施困難である。これを解消するために筆者らは IVF 初回例と前回受精率 30% 以下の例に対してだけ、媒精後 4.5 時間で第二極体の有無で受精の判定を行い、受精障害を回避する方法を実践している。受精判定時に第二極体や断片化している極体が確認された場合は、98% の卵子が受精していた。第一極体のみ確認できた場合でも 83% の卵子が受精していた。よって、すべての卵子で第二極体を確認できない場合だけ、さらに 2 時間培養し再評価を行う。そのときにすべての卵子に第二極体を確認できない場合に rescue ICSI を行う。このような流れにすることによって培養室の負担が軽減される。

まとめ

ICSI は容易に受精を図れ、受精障害の発生も低い。しかし、その安全性については今なお不十分な理解であり、ICSI は臨床研究の範囲を出ていない。したがって、不必要な ICSI を避ける必要があるが、そのためには以下の努力が必要と思われる。

- 1) IVF の適応となる精液パラメーターなどは、自施設の結果を解析し、自施設のパラメーター基準値を求める必要がある。
- 2) IVF の受精障害への対応策(rescue ICSI など)を立てておく。

《参考文献》

1. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Prenatal testing in ICSI pregnancies : incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 2600—2614
2. Khosla S, Dean W, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update* 2001 ; 7 : 419—427
3. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001 ; 27 : 153—154
4. 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* 2003 ; 72 : 156—160
5. Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002 ; 71 : 162—164
6. van Rumste MME, Evers JLH, Farquhar CM. Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in patients with non-male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003 ; Issue 2. Art. No. : CD001301
7. Chen C, Kattera S. Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. *Hum Reprod* 2003 ; 18 : 2118—2121

特集

生殖補助医療をめぐる諸問題

6. ARTにおける 受精・発生障害

片寄治男・岩本晃明・柳田 薫
国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター

Key Words/ ICSI, sperm chromatin, DNA fragmentation

要旨

ヒト射出精子の場合、核蛋白プロタミン内SS結合の豊富な成熟あるいは過熟精子や、SS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い。選択される精子核蛋白構造が受精・胚発生過程へ影響することが指摘された一方、精子DNA断片化は胚発生異常と相関することも確認された。ICSIではSS結合の少ない、DNA損傷のない精子核を注入すべきであり、今後、精子核の質に着眼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。

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大きく変わってきた。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 をするうえでは必須ではなく、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雌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¹⁾。一方、精子側に存在し受精・胚発生に影響を与える因子については多くの検討がなされ原因解明が確実に進行している²⁾。本稿では、受精・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紹介する。

精子核形成の基礎

spermiogenesis の過程で精子核蛋白は、体細胞型核蛋白ヒストンからアルギニン、システインを多く含む塩基性蛋白プロタミンへと置換されていく(図1)³⁾。プロタミンの存在により精子核DNAは線状配列およびトロイド形成し密に凝集され、遺伝情報保存に有利な形態を獲得する(図2)。精巣から遊離された精巣内精子は

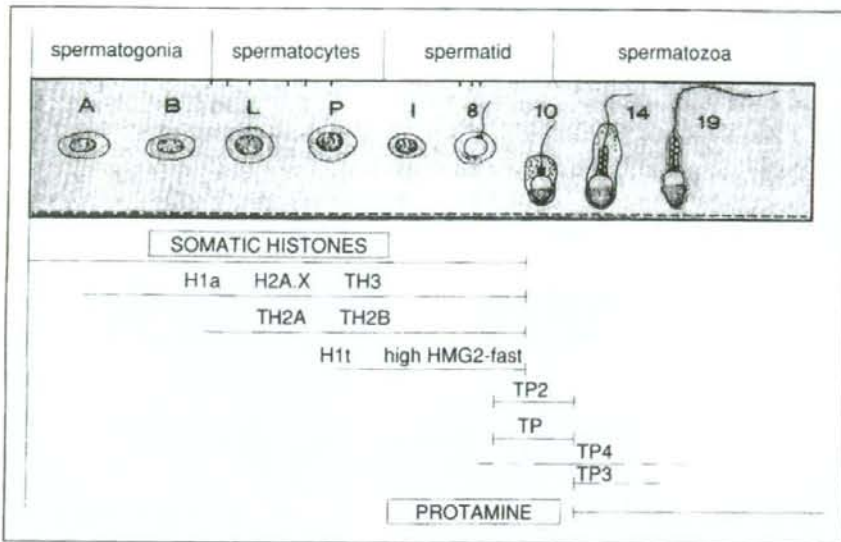


図1 精子形成と精子核蛋白の成熟変化

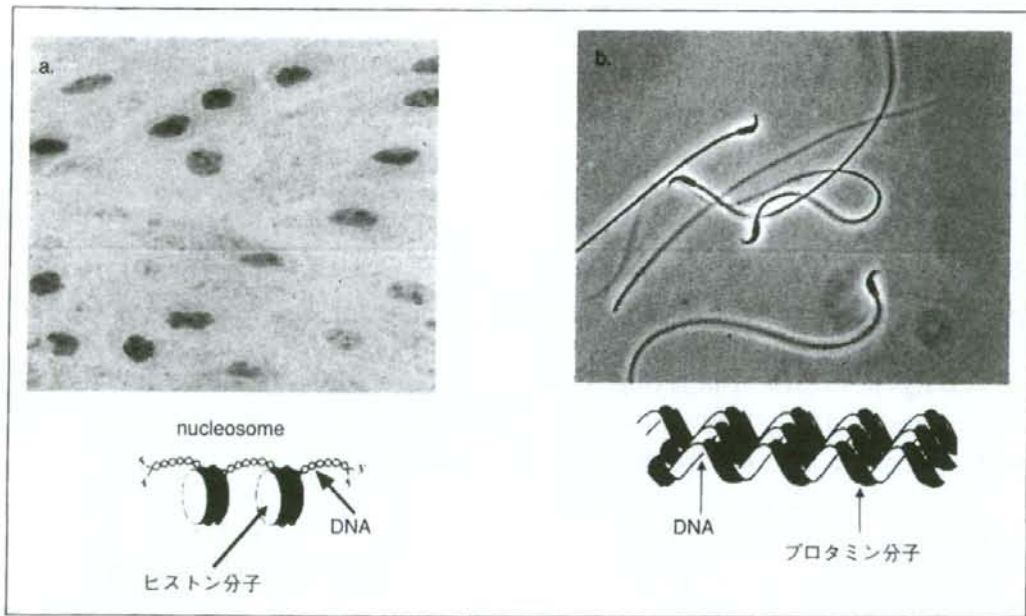


図2 核クロマチンの構造

a: 体細胞核 (単層ウシ卵管上皮細胞) b: 精子核 (ゴールデンハムスター精子)

精巣上体へ転送され、この間にプロタミン分子内のジスルフィド結合 (SS 結合) の形成が惹起される。プロタミン分子内システイン thiol 基 (-SH) 同士が主に phospholipid hydroperox-

ide glutathione peroxidase (PHGPx) などグルタチオンペルオキシダーゼ (glutathione peroxidase) の酸化作用により SS 結合を形成する反応である (図3)。

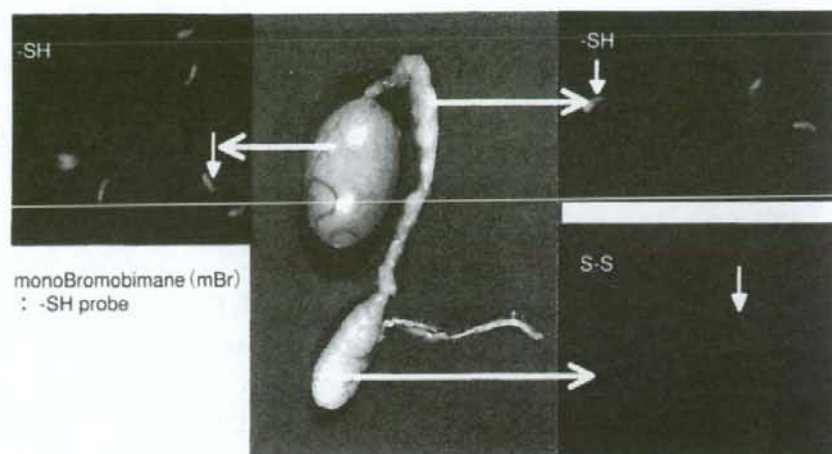


図3 精巣上体における精子核成熟

-SH probeであるmonobromobimane (mBr)により精巣内および精巣上体頭部精子核は染色されるが、ジスルフィド結合を形成した精巣上体尾部精子核では染色されない(動物:ゴールデンハムスター)

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(heterogeneity)¹⁾。ヒトではDNA核蛋白複合体全体に占めるプロタミン分子総量の割合がほかの哺乳類と比較して少ないことが知られているほか、プロタミンがP1だけの種(ウシ、ラット、ヒツジ、ブタ、モルモットなど)と異なり、システイン残基のないP2も存在する。そのため、ヒトでは不安定な核クロマチンを有することになる。総じてヒト射出精子核蛋白は85%がプロタミンであり、残り15%はヒストンを含む未熟な蛋白で構成されている²⁾。ヒト精子の核蛋白に占めるヒストンの割合は不妊患者で有意に高いことも知られている³⁾。

受精過程における精子核クロマチンの変化

精子核は精子-卵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グルタチオン(GSH)が主体となり精子核内SS結合が還元され、精子核膨化の間に核蛋白はヒストン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。卵細胞質内での精子核の時間的変化は、SS結合の還元で20分、核膨化(蛋白置換)にさらに40分を要する(動物:ゴールデンハムスター)⁴⁾。

精子核クロマチン検査法

1. 精子核蛋白の構造解析

精子核蛋白の解析には、構成される蛋白の組成とプロタミン内のSS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。Monobromobimaine (mBr)はプロタミン

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。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とどまっている。

核酸蛍光色素アクリジンオレンジ (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 とフローサイトメトリーにより判定する sperm chromatin structure assay (SCSA[®]) が紹介されている^{10,11)}。染色の原理は酸処理による精子核 DNA の変性 (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 (図 4)¹⁰⁾。妊孕性の確認された男性の射出精子は 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 (AO test)¹⁰⁾。

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, in situ nick translation assay, comet assay, TUNEL assay, sperm chromatin dispersion (SCD) test 等)。SCD test は比較的簡易で多くの検体の判定に適している。Halosperm[®]として市販もされている¹²⁾。

【SCD test】精子浮遊液 100 μ 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 μ L を滴下、カバーガラスで被覆する。これを 4°C で 4 分間以上冷却したのち、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、0.4 M Tris, 2 M NaCl, 1% SDS (pH 7.5) で 5 分間処理し、0.4 M 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

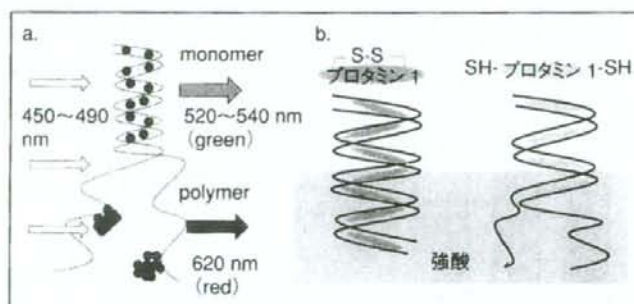


図 4 アクリジンオレンジの化学的性質

- a: 核酸の場合、二重鎖では monomer、一重鎖では polymer で結合する。
 b: 精子核クロマチンの場合、ジスルフィド結合が酸処理による DNA 変性の程度を規定する。したがって、アクリジンオレンジ分子は未熟精子核では polymer を形成する。

and small halo sperm head の割合 (%) を指標にする (図5)。

精子核クロマチン異常と受精・胚発生能

1. 動物モデル

精子核蛋白異常 (変異) が受精・胚発生に影響する2種の遺伝子改変マウスを紹介する。プロタミン内の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ガリン (galline)



図5 sperm chromatin dispersion (SCD) test

を核蛋白として遺伝子改変されたマウスがある。システイン残基を持たないガリン蛋白内ではS-S結合は形成されず、核蛋白比 (ガリン/プロタミン1) がそれぞれ0 (野生型), 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。In vitro では卵透明帯貫通能に障害があるが、ICSIにより産仔が得られたことから精子核には遺伝的障害はない。また、ICSI後の精子核脱凝縮のスピードはT77マウスで最も速かった (図6)¹⁴⁾。

Transitional protein (Tnp) は精巣内で体細胞型ヒストンがプロタミン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。双方の生合成がノックアウトされたTnp mutantマウス (TP1/TP2 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、精巣上体を通じた精子の受精は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

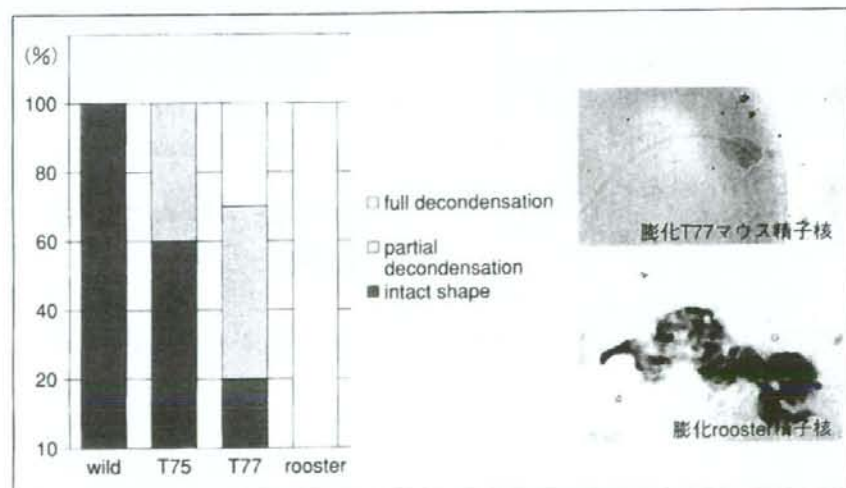


図6 ガリン含有マウス精子核脱凝縮 (ICSI後40分)
〔文献14)より引用〕

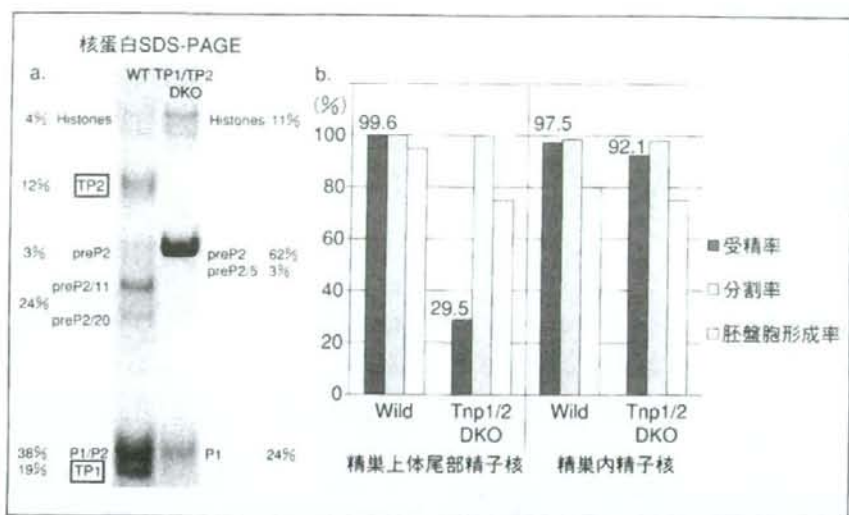


図7 Transitional protein (Tnp) knock-out mouse 精子核のICSI後受精・発生能

a: Tnp1/Tnp2 double knock-out マウスの核蛋白組成

b: 精巣上体尾部および精巣内精子核をICSIした際の受精・胚発生能

[文献15]より引用

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(図7)¹⁵⁾。

2. ヒト

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。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¹⁶⁾。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基に乏しいヒストン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。

ヒト射出精子DNA断片化は、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ストレスによって惹起される。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[®]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よる精子DNA損傷はクロマチン構造に関係なく惹起されると考えられる。

ヒト精子核クロマチンと胚発生の相関

受精率はICSIがc-IVFより低下するというエビデンスはないが、胚発生についてはICSI後の受精卵でc-IVFに比較して低下する報告が多く見受けられる(表1)¹⁷⁻²⁰⁾。Shoukir, Dumoulin, Griffithsらなど初期の報告ではday 2あるいはday 3胚移植後に余剰となった胚を検討しているという弱点がある。その後、授精モードによ

表1 胚盤胞形成に関するEBM

報告者	胚盤胞形成率 (% , mean)		
	IVF (cycle)	ICSI (cycle)	p value
Shoukir, et al. (1998) ^a	45.6 (28)	30.0 (18)	0.03
Dumoulin, et al. (2000) ^b	31.8 (274)	23.0 (429)	< 0.001
Gritliths, et al. (2000) ^c	23.5 (101)	8.9 (96)	< 0.001
Miller, et al. (2001) ^d	51.9 (31)	30.3 (32)	0.003
Bungum, et al. (2003) ^d	60.3 (25)	51.0 (36)	< 0.001
Hsieh, et al. (2000) ^a	47.2 (85)	50.9 (116)	NS
Westphal, et al. (2003) ^d	78.0 (131)	73.0 (75)	NS
Landuyt, et al. (2005) ^d	45.7 (104)	41.5 (104)	NS

a : 胚移植 (Day 2) 後余剰受精卵 (3 個以上) の胚盤胞培養の成績 (対 培養受精卵)

b : 胚移植 (Day 3) 後余剰受精卵 (1 個以上) の胚盤胞培養の成績 (対 周期)

c : 胚移植 (Day 2 or 3) 後余剰受精卵 (1 個以上) の胚盤胞培養の成績 (対 培養受精卵)

d : 全胚盤胞培養, 移植法 (対 培養受精卵)

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が、Landuyt らの報告の詳細は、対象が精液所見正常例であること、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。

ICSI の場合精子は受精能獲得や先体反応過程を経ず、先体酵素および精子原形質膜を保持したまま卵に注入される。原形質膜の損傷の程度により精子由来の卵活性化因子 (精子型 phospholipase C- ζ : PLC ζ) が卵細胞質内に拡散し、G 蛋白を介さないカルシウムオシレーションが誘起され卵活性化が起こる²⁰。したがって、精子原形質膜の状態により精子型 PLC ζ 放出が遅延し、受精・胚発生に影響が及ぶ可能性も考えられる。一方、精子核に関してはヒトの場合、蛋白構造上不均一な、すなわち 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。

精子に関する質的評価は、ICSI が c-IVF に比較して胚発生が不良といわれる原因を調査する

うえで有意義であり、AO を用いたフローサイトメトリーにより c-IVF ($r = 0.030, p = 0.899, n = 21$) と異なり、ICSI において COMP 値で正の相関が観察され ($r = 0.477, p = 0.025, n = 22$)。S-S 結合の少ない症例において胚発生が良好であった (自験)。一方、胚盤胞形成率は精子 DNA 断片化の程度と相関して障害されることが確認され ($r = 0.796, p < 0.001, n = 12$ (35 歳以下の夫人かつ 5 個以上の前核期胚が獲得された症例))。既報とも一致した²¹。ICSI では精子核蛋白プロタミン内 S-S 結合の少ない、DNA 損傷のない精子を注入することが良好胚獲得の鍵であることが示唆された。

S-S 結合が少なく DNA 断片化がないという条件を満たすと考えられる精巣内精子を用いた ICSI は、射出精子を用いた ICSI 反復不成功例の胚盤胞形成率を改善する方法の一つとして有効である。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)²²。過去の ICSI 臨床成績と DNA 断片化検出により予後が不良と判断された患者には、

十分なインフォームドコンセントを得たうえで精巣内精子回収 (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²⁴⁾。精巣内精子の 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²⁵⁾。DNA 断片化に代表される射出精子障害は主に酸化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、β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²⁶⁾。

おわりに

成熟精子を十分回収しても受精能が低下することに対する明確な説明は困難だが、現在までの知見からは射出精子核に占める成熟精子の割合が、対象とする個体の精子成熟性を反映していると解釈するのが一般的である。射出精子核の DNA 断片化率と受精・胚発生の相関に関しても同様のことがいえる。断片化していないと思われる精子を用いても、射出精子全体に占める断片化率が高ければ胚発生は有意に障害される (late paternal effect)。最近ではこれらの現象は "tip of the iceberg (氷山の一角)" という概念で説明されている。すなわち AO や SCD test などを用いた解析によって異常が指摘された場合、その根底には程度の差はあるものの射出精子全体に障害が存在し、当該検査法ではその異常を捉えることができない (水面下) という考え方である。

不妊治療に ICSI は欠かせないツールであるが、注入される精子の質が受精・胚発生を左右する重要な因子であることも次第に明らかになってきた。胚発生能を end point とした精子核クロマチンに関する既存の解析法はより正確

に分析される必要性が指摘され、さらに新しい検査技術の開発も今後望まれる時期になった。

文 献

- 1) Kimura Y, Yanagimachi R: Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 52:709-720, 1995.
- 2) Sasagawa I, et al.: Mouse primary spermatocytes can complete two meiotic divisions within the oocyte cytoplasm. *Biol. Reprod* 58:248-254, 1998.
- 3) Terada Y: Human sperm centrosomal function during fertilization, a novel assessment for male sterility. *Hum Cell* 17:181-186, 2004.
- 4) Tesarik J, et al.: Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum Reprod* 19:611-615, 2004.
- 5) Poccia D: Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis fertilization and early development. *Int Rev Cytol* 105:1-65, 1986.
- 6) Kosower NS, et al.: Thioldisulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J Androl* 13:342-348, 1992.
- 7) Zini A, et al.: The histone to protamine ratio in human spermatozoa: comparative study of whole and processed semen. *Fertil Steril* 87:217-219, 2007.
- 8) Katayose H, et al.: Acridine orange fluorescence staining as a mean of detecting sperm-egg fusion in mammals. *J Mamm Ova Res* 16:141-147, 1999.
- 9) Katayose H, et al.: Use of diamide-acridine orange fluorescence staining to detect aberrant protamination of human-ejaculated sperm nuclei. *Fertil Steril* 79:670-676, 2003.
- 10) Tejada R, et al.: A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil Steril* 42:87-91, 1984.
- 11) Evenson DP, et al.: Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Toxicol* 5:115-125, 1991.