

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⁵⁾。

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全であれば、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。不動化処理は精子頭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、精子頭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、精子頭部の脱凝縮、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⁶⁾。そして精子頭部の脱凝縮も 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、精子頭部に近い頸部をしっかりと不動化する必要がある。もちろん精子頭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、先端で精子頭部をしごくときには、しっかりと精子頭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慮して処理を行

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⁷⁾。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、先体が健全な精子を 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⁸⁾。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は本当か？

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 (necrozoospermia) 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）⁹⁾。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[®]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¹⁰⁾。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¹⁰⁾。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。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¹¹⁾。

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できやすい。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¹²⁾。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¹³⁾。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¹³⁾。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はあるが、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¹³⁾。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てもらっていた。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%¹⁴⁾¹⁵⁾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Schlegel¹⁵⁾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か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41¹⁶⁾~72¹⁷⁾%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は局麻下で行っ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 Ca²⁺ 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) Bonduelle 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所保健医療学専攻 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¹⁾。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)²⁾。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)²⁾。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、停留睪丸など、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%)^{3,4)}。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
胎状奇胎	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, <i>GNAS1</i> 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は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。痙攣は臨床上的問題であるので、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⁵⁾。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⁶⁾。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^{KIP2}* 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⁷⁾。

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⁸⁾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⁹⁾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⁹⁾。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¹⁰⁾が、Behboodiら¹¹⁾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¹²⁾も報告している。

Zaitsevaら¹³⁾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¹⁴⁾。2003年、DeBaunら¹⁴⁾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¹⁵⁾が同様にLIT1の異常によると考えられるBWSの6例を、Gicquelら¹⁶⁾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¹⁷⁾。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のどのような技術が関連するかは不明である。

2002年、Coxら¹⁸⁾はICSIで生まれたAngerman syndromeの2例を報告した。また、Orstavikら¹⁹⁾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²⁰⁾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²¹⁾。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²²⁾。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²³⁾。

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)、白血病などと関連する。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 Genet* 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 preimplantation 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 KCN10T 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^{1*}・高山 智子²・菅沼 亮太²・林 章太郎²
柳田 薫¹・佐藤 章²

Haruo Katayose^{1*}, Tomoko Takayama², Ryota Suganuma², Shotaro Hayashi²,
Kaoru Yanagida¹ and Akira Sato²

¹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

²福島県立医科大学医学部産科婦人科 〒960-1295 福島市

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

²Department 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

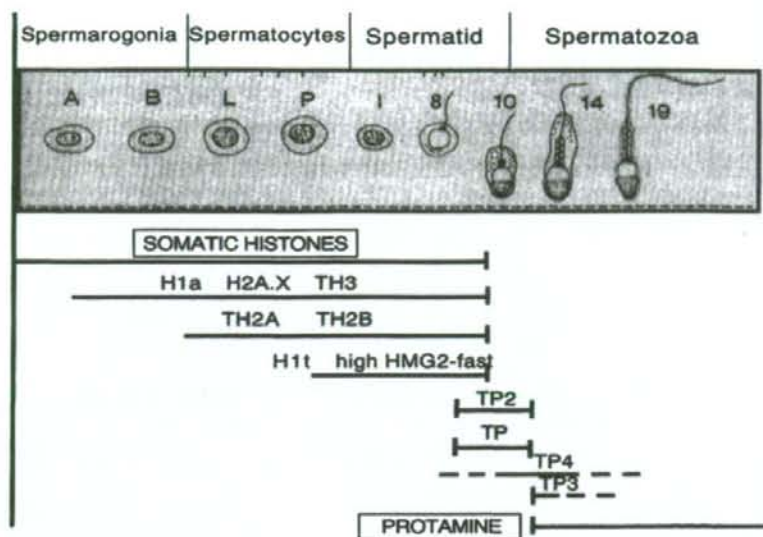


図1 精子形成過程と精子核蛋白置換 (poccia D 1986)

大きく変わってきた¹⁻³⁾。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^{4,5)}。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^{6,7)}。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)⁸⁾。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。精巢から遊離された精巢内精子は精巢上皮へ転送され、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 (-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⁹⁾。近年、phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 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¹⁰⁻¹³⁾。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^{10,11)}。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¹⁰⁻¹³⁾。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¹³⁾。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¹¹⁾。

霊長類を除く哺乳動物射出精子あるいは精巢上皮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)¹⁴⁾。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¹⁵⁾、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¹⁶⁾。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^{17, 18)}。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¹⁹⁾。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¹⁹⁾。

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。未活性的場合、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、標化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²⁰⁾。卵細胞質内での精子核の時間的変化は、S-S 結合の還元で 20 分、核膨化 (蛋白置換) にさらに 40 分を要することが示されている (ゴールドンハムスター)²⁰⁾。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延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²¹⁻²⁴⁾。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²⁵⁾。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²⁶⁾。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²⁷⁾。

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[®]) が紹介されている^{28, 29)}。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¹⁴⁾。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³⁰⁾。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²⁷⁾。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[®] 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²⁹⁾。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[®] 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 assay³¹⁾, *in situ* nick translation assay³²⁾, comet assay³³⁾, TUNEL assay³⁴⁾, sperm chromatin dispersion (SCD) test³⁵⁾)。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[®] として市販もされている³⁶⁾。

【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³⁷⁾。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。Protamin 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³⁸⁾。

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³⁹⁾。

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⁴⁰⁾。

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²⁵⁾。しかし、ヒトでは精液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⁴¹⁾。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^{28, 30)}。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²⁷⁾。

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⁴²⁾。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²⁶⁾。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[®] 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

表1 IVFおよびICSI後の胚盤胞形成能の差に関する報告

報告者	胚盤胞形成率 (% , mean)		
	IVF (cycle) I	CSI (cycle)	p value
Shoukir <i>et al.</i> ⁴²⁾ (1998) ^a	45.6 (28)	30.0 (18)	0.03
Dumoulin <i>et al.</i> ⁴³⁾ (2000) ^b	31.8 (274)	23.0 (429)	< 0.001
Griffiths <i>et al.</i> ⁴⁴⁾ (2000) ^c	23.5 (101)	8.9 (96)	< 0.001
Miller <i>et al.</i> ⁴⁵⁾ (2001) ^d	51.9 (31)	30.3 (32)	0.003
Bungum <i>et al.</i> ⁴⁶⁾ (2003) ^d	60.3 (25)	51.0 (36)	< 0.001
Hsieh <i>et al.</i> ⁴⁷⁾ (2000) ^d	47.2 (85)	50.9 (116)	NS
Westphal <i>et al.</i> ⁴⁸⁾ (2003) ^d	78.0 (131)	73.0 (75)	NS
Landuyt <i>et al.</i> ⁴⁹⁾ (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: 全卵胚盤胞培養, 移植法 (対培養受精卵).

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。

精子核クロマチンと胚発生の相関

Conventional-IVF (c-IVF) と異なりICSIの場合、通常注入される精子は運動性、形態の正常性により選択され、精子核クロマチン構造に関しては常にheterogeneousであると考えられる。受精率はICSIがc-IVFより低下するというevidence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)⁴²⁻⁴⁹⁾。Shoukir, Dumoulin, Griffithsらなど初期の報告では統計的に明らかに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が、これらはday2あるいはday3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、同時に授精モード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Landuytらの報告の詳細を見ると、対象は条件が精液所見正常例であることと、統計学的には有意差はないも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ことに注意が必要である⁴⁹⁾。

精子は自然受精過程あるいはc-IVFではcapacitationおよびacrosome reactionを完了しており、卵細胞質膜と精子頭部赤道領域細胞質膜が膜融合することで卵細胞質内に侵入する。その際に卵細胞質膜上のG蛋白を介したシグナル伝達機構により細胞質内カルシウムイオンの周期的増減(オシレーション)が生じ、卵が減数分裂を再開する(卵活性化)。一方、ICSIの場合、精子はcapacitationやacrosome reactionなど重要な過程を経ず、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⁵⁰⁾。従って、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⁵¹⁾。精子核についてはヒトの場合AOを用いた検討から、蛋白質構造上不均一な、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質構造による受精・胚発生過程への影響が想定される。B6D2F1マウス配偶子を用いたICSIによる検討では、S-S結合の豊富な精巢上体尾部精子核と乏しい精巢内精子核を顕微授精させた場合では精子核膨化および雄性前核形成過程に形態学的差異(精巢内精子核注入卵の方が速い)を観察することができ(自験)。また、胚盤胞形成過程でもinner cell mass (ICM) 細胞比(ICM細胞数/ICM+trophoblast(TE)細胞数)を指標に検討すると、精巢内精子注入卵の発生が速い(自験)。受精・胚発生の過程で雄性genomeの発現は一定の時期まで抑制され、ヒトの場合は4から8細胞胚以上の発生段階でpaternal expressionが確認されるようになる⁵²⁾。その間、精子核はDNAの脱メチル化によるepigeneticな修飾解除を卵細胞質内侵入後極めて早期に受けることが確認されている⁵³⁾。従って、実験動物で確認された精子核膨化過程の時間差は、雌性前核のDNA合成能とのdyssynchronyも考えあわせると³⁾、以後の胚発生に形態学的には評価しえない質的異常の発生を想定させる。

ICSI施行患者(n=113)における体外胚発生の検討によれば、夫年齢(r=0.010, p=0.919)、夫人年齢(r=0.131, p=0.167)、不妊期間(r=0.050, p=0.609)、採卵数(r=0.069, p=0.465)、WHO一般精液所見(精子濃度;r=0.051, p=0.603、運動率;r=0.175, p=0.082、奇形率;r=0.269, p=0.009)と胚盤胞形成率の間に確実に有意な相関は観察されない(自験)。選択注入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

因を調査する上で有意義であると考えられる。AOを用いた flow cytometry 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ることが示された(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 ($r=0.616$, $p=0.043$, $n=11$ (35歳以下の夫かつ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⁵⁴⁾。従ってICSIでは精子核蛋白protamine内S-S結合の少ない、DNA損傷のない精子を注入すべきであり、そのための新しい精子選別法の開発が今後必要になると考えられる。

S-S結合が少なくDNA断片化がないという条件を満たす精巣内精子による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ひとつとして有効である。精子DNA断片化が一重鎖(single strand break)の場合、卵による修復がある程度可能でerrorも少ないが、アポトーム精子核のような断片化が二重鎖(double strand break)の場合は修復が完全ではなくerrorも多いといわれている^{55,56)}。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)⁵⁴⁾。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⁵⁷⁾。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⁵⁷⁾。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更なる検討が期待される⁵⁸⁾。

おわりに

ヒト射出精子核クロマチンの未熟性は体外受精では受精障害と相関するが、射出精子の全てが未熟と判定されることはない。実際運動性良好精子選別法により回収された精子の成熟性は良好である⁵⁹⁾。また、卵透明帯に接する精子の成熟性も高い³⁰⁾。受精能が成熟精子を十分回収しても低下していることに対する説明は困難だが、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。これは射出精子核のDNA断片化率と受精・胚発生に関する相関についても同様のことが言え、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停止する頻度が高い(late paternal effect)^{54,57)}。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露見した場合、その根底には精子の全体的な傷害が存在するはずであるが、当該検査法では異常を捉えられない(水面下)という考え方である。

現代では不妊治療にICSIは欠かせないtool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が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をより正確に分析す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。

文 献

- 1) Uehara, T. and Yanagimachi, R. (1977): Activation of hamster eggs by pricking. *J. Exp. Zool.*, 199, 269-274.
- 2) Yanagida, K., Yanagimachi, R., Perreaut, S.D. and Kleinfeld, R.G. (1991): Thermostability of sperm nuclei assessed by microinjection into hamster oocytes. *Biol. Reprod.*, 44, 440-447.
- 3) Katayose, H., Matsuda, J. and Yanagimachi, R. (1992): The ability of dehydrated hamster and human sperm nuclei to develop into pronuclei. *Biol. Reprod.*, 47, 277-284.
- 4) Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995): Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52, 709-720.
- 5) Sasagawa, I., Kuretake, S., Eppig, J.J. and Yanagimachi, R. (1998): Mouse primary spermatocytes can complete two meiotic divisions within the oocyte cytoplasm. *Biol. Reprod.*, 58, 248-254.
- 6) Terada, Y. (2004): Human sperm centrosomal function during fertilization, a novel assessment for male sterility. *Hum. Cell.*, 17, 181-186.
- 7) Tesarik, J., Greco, E. and Mendoza, C. (2004): Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.*, 19, 611-615.
- 8) Poccia, D. (1986): Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis fertilization and early development. *Int. Rev. Cytol.*, 105, 1-65.
- 9) Bedford, J.M. (1988): The bearing of epididymal function in strategies for *in vitro* fertilization and gamete intrafallopian transfer. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 541, 284-291.
- 10) Diaconu, M., Tangat, Y., Bohm, D., Kuhn, H., Michelmann, H.W., Schreiber, G., Haidl, G., Glander, H.J., Engel, W. and Nayernia, K.A. (2006): Failure of phospholipids Hydroperoxide glutathione peroxidase expression in oligoasthenozoospermia and mutations in the PHGPx gene. *Andrologia.*, 38, 152-157.
- 11) Imai, H., Suzuki, K., Ishizaka, K., Ichinose, S., Oshima, H., Okayasu, I., Emoto, K., Umeda, M. and Nakagawa, Y. (2001): Failure of the expression of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. *Biol. Reprod.*, 64, 674-683.

- 12) Conrad, M., Moreno, S.G., Sinowatz, F., Ursini, F., Kölle, S., Roveri, A., Brielmeier, M., Wurst, W., Maiorino, M. and Bornkamm, G.W. (2005): The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase contributing to sperm chromatin stability. *Mol. Cell Biol.*, 25, 7637–7644.
- 13) Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G.W. and Behne, D. (2001): Identification of a specific sperm nuclei Selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB. J.*, 15, 1236–1238.
- 14) Kosower, N.S., Katayose, H. and Yanagimachi, R. (1992): Thioldisulfide status and acridine orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl.*, 13, 342–348.
- 15) Bench, G.S., Fritz, A.M., Cotzetz, M.H., Morse, D.H. and Balhorn, R. (1996): DNA and total protamine masses in individual sperm from fertile mammalian subjects. *Cytometry*, 23, 263–271.
- 16) Jager, S. (1990): Sperm nuclear stability and male infertility. *Arch. Androl.*, 25, 253–259.
- 17) de Yebra, L., Balleca, J.L., Vanrell, J.A., Corzett, M., Balhorn, R. and Oliva, R. (1998): Detection of P2 precursors in the sperm cells of infertile patients who have reduced protamine P2 levels. *Fertil. Steril.*, 69, 755–759.
- 18) Evenson, D.P., Jost, L.K., Corzett, M. and Balhorn, R. (2000): Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *J. Androl.*, 21, 739–746.
- 19) Zini, A., Gabriel, M.S. and Zhang, X. (2007): The histone to protamine ratio in human spermatozoa: comparative study of whole and processed semen. *Fertil. Steril.*, 87, 217–219.
- 20) Katayose, H., Yanagida, K., Hashimoto, S., Yamada, H. and Sato, A. (1999): Acridine orange fluorescence staining as a mean of detecting sperm-egg fusion in mammals. *J. Mamm. Ova. Res.*, 16, 141–147.
- 21) Krzanowska, H. (1982): Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *J. Reprod. Fertil.*, 64, 97–101.
- 22) Miller, M.A. and Masui, Y. (1982): Changes in the stainability and sulfhydryl level in the sperm nucleus during sperm-oocyte interaction in mice. *Gamete Res.*, 5, 167–179.
- 23) Auger, J., Mesbah, M., Huber, C. and Dadoune, J.P. (1990): Aniline blue staining as a marker of sperm chromatin defects associated with different semen characteristics discriminates between proven fertile and suspected infertile men. *Int. J. Androl.*, 13, 452–462.
- 24) Esnault, C. (1973): Reactivation of the feulgen reaction of ram spermatozoa by dithiothreitol. *J. Reprod. Fert.*, 32, 153–157.
- 25) Shalgi, R., Seligman, J. and Kosower, N.S. (1989): Dynamics of the thiol status of rat spermatozoa during maturation; analysis with the fluorescent labeling agent monobromobimane. *Biol. Reprod.*, 40, 1037–1045.
- 26) Zuccotti, M., Katayose, H., Matsuda, J., Redi, C.A., Bottiroli, G. and Yanagimachi, R. (1994): Fluorescence energy transfer shows that various physical and chemical treatments of human sperm induce unpacking of chromatin. *Andrologia*, 26, 225–230.
- 27) Katayose, H., Yanagida, K., Hashimoto, S., Yamada, H. and Sato, A. (2003): Use of diamide-acridine orange fluorescence staining to detect aberrant protamination of human-ejaculated sperm nuclei. *Fertil. Steril.*, 79, 670–676.
- 28) Tejada, R., Mitchell, J.C., Norman, A., Marik, J.J. and Friedman, S. (1984): A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. *Fertil. Steril.*, 42, 87–91.
- 29) Evenson, D.P., Jost, L.K., Bear, R.K., Turner, T.W. and Schrader, S.M. (1991): Individuality of DNA denaturation patterns in human sperm as measured by the sperm chromatin structure assay. *Reprod. Toxicol.*, 5, 115–125.
- 30) Hoshi, K., Katayose, H., Yanagida, K., Kimura, Y. and Sato, A. (1996): Relationship between acridine orange fluorescence of sperm nuclei and the fertilizing ability of human sperm. *Fertil. Steril.*, 66, 634–639.
- 31) Fernandez, J., Vazquez-Gundin, F., Delgado, A., Goyanes, V., Ramiro-Diaz, J., de La Torre, J. and Gosalvez, J. (2000): DNA breakage detection-FISH (DBD-FISH) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat. Res.*, 453, 77–82.
- 32) Gorczyza, W., Gong, J. and Darzynkiewicz, Z. (1993): Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.*, 53, 1945–1951.
- 33) Singh, N., McCoy, M., Tice, R. and Schneider, E. (1988): A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 175, 184–191.
- 34) Barroso, G., Morshedi, M. and Oehninger, S. (2000): Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 15, 1338–1344.
- 35) Fernandez, J., Muriel, L., Rivero, M., Goyanes, V., Vazquez, R. and Alvarez, J. (2003): The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.*, 24, 59–66.
- 36) Fernandez, J., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosalvez, J., Enciso, M., LaFromboise, M. and Jonge, C.D. (2005): Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.*, 84, 833–842.
- 37) Santiso, R., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosalvez, J. and Fernandez, J.L. (2007): Evidence of

- modified nuclear protein matrix in human spermatozoa with fragmented deoxyribonucleic acid. *Fertil. Steril.*, 87, 191–194.
- 38) Maleszewski, M., Kuretake, S., Evenson, D., Yanagimachi, H., Bjordahl, J. and Yanagimachi, R. (1998): Behavior of transgenic mouse spermatozoa with galline protamine. *Biol. Reprod.*, 58, 8–14.
- 39) Zhao, M., Shirley, C.R., Hayashi, S., Marcon, L., Mohapatra, B., Suganuma, R., Behringer, R.R., Boissonneault, G., Yanagimachi, R. and Meistrich, M.L. (2004): Transition nuclear proteins are required for normal chromatin condensation and functional sperm development. *Genesis.*, 38, 200–213.
- 40) Suganuma, R., Walden, C.M., Butters, T.D., Platt, F.M., Dwek, R.A., Yanagimachi, R. and van der Spoel, A.C. (2005): Alkylated imino sugars, reversible male infertility-inducing agents, do not affect the genetic integrity of male mouse germ cells during short-term treatment despite induction of sperm deformities. *Biol. Reprod.*, 72, 805–813.
- 41) Kvist, U., Kjellberg, S., Bjorn Dahl, L., Hammar, M. and Roomans, G. (1988): Zinc in sperm chromatin and chromatin stability in fertile and men in barren unions. *Scand. J. Urol. Nephrol.*, 22, 1–6.
- 42) Shoukir, Y., Chardonens, D., Campana, A. and Sakkas, D. (1998): Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: a paternal influence? *Hum. Reprod.*, 13, 1632–1637.
- 43) Dumoulin, J.C., Coonen, E., Bras, M., van Wissen, L.C., Ignoul-Vanvuchelen, R., Bergers-Jansen, J.M., Derhaag, J.G., Geraedts, J.P. and Evers, J.L. (2000): Comparison of *in-vitro* development of embryos originating from either conventional *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 15, 402–409.
- 44) Griffiths, T.A., Murdoch, A.P. and Herbert, M. (2000): Embryonic development *in vitro* is compromised by the ICSI procedure. *Hum. Reprod.*, 15, 1592–1596.
- 45) Miller, J.E. and Smith, T.T. (2001): The effect of intracytoplasmic sperm injection and semen parameters on blastocyst development *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 16, 918–924.
- 46) Bungum, M., Bungum, L., Humaidan, P. and Andersen, C.Y. (2003): Day 3 versus day 5 embryo transfer: a prospective randomized study. *RBM. Online.*, 7, 98–104.
- 47) Hsieh, Y.Y., Tsai, H.D. and Chang, F.C. (2000): Routine blastocyst culture and transfer: 201 patients' experience. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 17, 405–408.
- 48) Westphal, L.M., Hinckley, M.D., Behr, B. and Milki, A.A. (2003): Effect of ICSI on subsequent blastocyst development and pregnancy rates. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 20, 113–116.
- 49) Landuyt, V.L., De Vos, A., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P. and Van Steirteghem, A. (2005): Blastocyst formation in *in vitro* fertilization versus intracytoplasmic sperm injection cycles: influence of the fertilization procedure. *Fertil. Steril.*, 83, 1397–1403.
- 50) Swann, K., Larman, M., Saunders, C. and Lai, F. (2004): The cytosolic sperm factor that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals is a novel phospholipase C: PLCzeta. *Reproduction*, 127, 431–439.
- 51) Katayose, H., Yanagida, K., Kimura, Y., Shinoki, T., Kawahara, T. and Sato, A. (1999): Efficient injection of bull sperm into oocyte using a Piezo driven pipette. *Theriogenology*, 52, 1215–1224.
- 52) Braude, P., Bolton, V. and Moore, S. (1988): Human gene expression first occurs between the four and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*, 332, 459–461.
- 53) Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W. and Walter, J. (2000): Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr. Biol.*, 20, 475–478.
- 54) Tesarik, J., Greco, E. and Mendoza, C. (2004): Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. *Hum. Reprod.*, 19, 611–615.
- 55) Costa, R.M., Chiganças, V., Galhardo, R.S., Carvalho, H. and Menck, C.F. (2003): The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie.*, 85, 1083–1099.
- 56) Nagata, S. (2000): Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.*, 256, 12–18.
- 57) Greco, E., Scarselli, F., Iacobelli, M., Rienzi, L., Ubaldi, F., Ferrero, S., Franco, G., Anniballo, N., Mendoza, C. and Tesarik, J. (2004): Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICSI with testicular spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 20, 226–230.
- 58) Menezo, Y.J., Hazout, A., Panteix, G., Robert, F., Rollet, J., Cohen-Bacrie, P., Chapuis, F., Clement, P. and Benkhalifa, M. (2007): Antioxidants to reduce sperm DNA fragmentation: an unexpected adverse effect. *RBM. Online*, 14, 418–421.
- 59) Nakaki, J., Katayose, H., Hoshi, K. and Sato, A. (1995): Evaluation of a discontinuous Nycodenz gradient method for the preparation of good human spermatozoa. *Jpn. J. Fertil. Steril.*, 40, 40–44.



Review

Ghrelin deficiency does not influence feeding performance

Takahiro Sato ^{a,*}, Mamoru Kurokawa ^b, Yoshiki Nakashima ^a, Takanori Ida ^a, Tomoko Takahashi ^a,
Yoshihiko Fukue ^a, Masahito Ikawa ^d, Masaru Okabe ^d, Kenji Kangawa ^c, Masayasu Kojima ^{a,*}

^a Molecular genetics, Institute of Life Sciences, Kurume University, B-3, Kurume research center building, 1-1, Hyakunen-koen, Kurume, 839-0864, Japan

^b Department of Anatomy, Nagasaki University School of Medicine, Nagasaki 852-8523, Japan

^c Department of Biochemistry, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita 565-8565, Japan

^d Department of Experimental Genome Research, Genome Information Research Center, Osaka University, Suita 565-0871, Japan

Available online 18 September 2007

Abstract

Ghrelin is an endogenous ligand for the growth hormone secretagogue receptor that is synthesized predominantly in the stomach. Previous studies demonstrated that ghrelin stimulates growth hormone release and food intake. These data suggested that antagonism of ghrelin could serve as a useful treatment for eating disorders and obesity. To study the role of endogenous ghrelin in feeding performance further, we generated ghrelin-deficient (*ghrl*^{-/-}) mice. Unexpectedly, *ghrl*^{-/-} mice exhibited normal growth, cumulative food intake, reproduction, histological characters, and serum parameters. There were no differences in feeding patterns between *ghrl*^{+/+} and *ghrl*^{-/-} mice. *Ghrl*^{-/-} mice displayed normal responses to scheduled feedings as seen for *ghrl*^{+/+} mice. Memory-related feeding performances of *ghrl*^{-/-} mice were indistinguishable from *ghrl*^{+/+} littermates. These data indicate that ghrelin is not critical for feeding performance.

© 2007 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Ghrelin knockout mouse; Feeding pattern; Memory

Contents

1. Introduction	8
2. Materials and methods	8
2.1. Animal care	8
2.2. Generation of <i>ghrl</i> ^{-/-} mice	8
2.3. Preparation to tissue and ELISA	8
2.4. Immunohistochemistry	8
2.5. The analysis of feeding performance and memory	8
2.6. Statistical analysis	8
3. Results	8
3.1. Target disruption of the <i>ghrl</i> locus	8
3.2. Feeding pattern of <i>ghrl</i> ^{-/-} mice	9
3.3. Adaptation capability to negative energy states of <i>ghrl</i> ^{-/-} mice	9
3.4. Memory-related feeding performances of <i>ghrl</i> ^{-/-} mice	10
4. Discussion	10
Acknowledgments	11
References	11

* Corresponding authors. Tel.: +81 942 37 6313; fax: +81 942 31 5212.
E-mail address: mkojima@lsci.kurume-u.ac.jp (M. Kojima).