

卵子と精子の融合による低侵襲性ヒト顕微授精法の確立に関する研究

保健科学研究科 博士後期課程 保健科学専攻 医療科学領域

18D103 畠山 将太

研究指導教員 荒木 康久 教授



## 論文要旨（和文）

### 卵子と精子の融合による低侵襲性ヒト顕微授精法の確立に関する研究

保健科学研究科 保健科学専攻 医療科学領域

18D103 畠山 将太

【目的】体外受精（IVF）で受精卵を1個も得られない完全受精障害を回避するため、受精しなかった卵子に卵細胞質内精子注入法（ICSI）を行うレスキューICSIが実施されているが、通常のICSIよりも変性率が高いため、細胞膜を穿破しない方法の開発が望まれている。これには卵子と精子を融合によって受精させる手法が考えられるが、精子が先体反応を起こしている必要がある。そこで、IVF後の卵子透明帯に結合している精子の先体反応率を高精度で明らかにし、卵子と精子の融合による顕微授精法（assisted sperm fusion insemination: ASFI）を確立させ、臨床応用することを目的とした。

【方法】治療目的でIVFを実施したものの、治療に用いられず本研究への参加同意を得られた患者17名の卵子と精子を対象とし、IVF後の透明帯に結合している運動精子をインジェクションピペットで回収した。対照として透明帯に結合していない運動精子を同様に回収した。また、治療目的でIVFを実施し、本研究への参加同意を得られた64名の患者を対象としASFIを実施し、同意を得られなかった患者にはレスキューICSIを実施した。ASFIは、IVFの6時間後に受精を判定し、未受精卵の透明帯から運動精子を回収し、インジェクションピペットを用いて回収した精子の頭部を卵細胞膜に押し付け30秒間保持した。レスキューICSIは定法に従い実施した。ASFIもしくはレスキューICSI由来以外に移植可能な良好胚がなかった51症例に対して、移植を行った。

【結果】透明帯結合精子の先体反応率は98.0%（48/49）であり、対照の28.6%（16/56）と比較し有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。ASFI実施後105個全ての精子で卵細胞膜への接着が確認され、受精率は両群間で有意差は認められなかったが、ASFI胚の3PN率（7.6%）がレスキューICSI群（16.3%）より低い傾向が認められ（ $p = 0.075$ ）、変性率（0%）はレスキューICSI群（4.3%）と比較して有意に低かった（ $p = 0.046$ ）。また、胚発生率および妊娠成績において、両群間に有意差は認められなかったが、ASFI胚の移植によって3人の健児が得られた。

【考察】透明帯結合精子は、高率で先体反応を起こしていることを明らかにした。また、透明帯結合精子を使用して、卵細胞膜を穿破しない顕微授精法である ASFI を確立させ、レスキューICSI と同等の受精率および発生率であることを確認し、胚移植の結果 3 例の生児が得られた。広く臨床応用されるためには、解決すべき問題点が存在するものの、ASFI の確立は不妊治療の発展において大きな一歩をもたらすものであると考えている。

キーワード：先体反応、透明帯、レスキューICSI、卵細胞膜、受精

## 目次

第 1 章 序論 .....	1
1-1. 緒言 .....	1
1-2. 引用文献 .....	4
第 2 章 透明帯結合精子の回収と先体反応率の検討 .....	7
2-1. 緒言 .....	7
2-2. 材料と方法 .....	9
2-3. 結果 .....	18
2-4. 考察 .....	19
2-5. 引用文献 .....	22
第 3 章 押し付け法による顕微授精法の確立 .....	34
3-1. 緒言 .....	34
3-2. 材料と方法 .....	36
3-3. 結果 .....	43
3-4. 考察 .....	45
3-5. 引用文献 .....	48
第 4 章 押し付け法によって受精した胚の発生経過観察 .....	59
4-1. 緒言 .....	59
4-2. 材料と方法 .....	60
4-3. 結果 .....	67
4-4. 考察 .....	69
4-5. 引用文献 .....	70
第 5 章 総括 .....	80
資料 1. 用語集 .....	1
資料 2. 培養液等の組成 .....	6



# 第 1 章 序論

## 1-1. 緒言

1978年に世界で初めて、体外受精（in vitro fertilization: IVF）によるヒトでの出産が報告されてから、不妊治療とりわけ生殖補助医療の技術は大きく発展した(1)。1992年には、1個の精子で卵子を受精させることが可能な卵細胞質内精子注入法（intracytoplasmic sperm injection: ICSI）による妊娠および出産が報告された(2)。これにより、射出精液内に精子が少ない乏精子症などの重度の男性不妊患者夫婦でも、妊娠・出産することが可能となった。通常、生殖補助医療における受精方法の第一選択は IVF であり、日本産科婦人科学会の顕微授精に関する見解にも「男性不妊や受精障害など、本法以外の治療によっては妊娠の可能性がない、あるいは極めて低いと判断される夫婦を対象とする」との記述がある(3)。しかし、受精障害があるか否かは実際に IVF を実施しなければ分からないケースも多いため、IVF を第一選択とした場合であっても、妊娠に期待の持てる受精結果が得られない場合もある(4)。さらに IVF を実施しても受精卵が全く得られない、完全受精障害が IVF 周期の約 4%で起こるとの報告があり、実際このような完全受精障害が起こると患者への精神的および経済的なダメージは大きい(5)。そこで、IVF を実施した

にもかかわらず受精しなかった卵子に対する追加措置として IVF の翌日に ICSI を行う「レスキューICSI」が報告された(6)。これにより、IVF での受精を試みながら完全受精障害を避けることができるようになった。ところが、レスキューICSI による受精率は通常の ICSI と比べて低く、満足のいく治療結果は得られなかった(7-9)。原因の 1 つとして卵子の老化が考えられ、これを改善するために、レスキューICSI を IVF の翌日ではなく、6 時間後に行った結果、受精率が向上した(10)。しかし、IVF から短時間で行うレスキュー ICSI を実施したとしても通常の ICSI と比べると満足のいく受精率は得られず、特に卵子の変性率が上昇することが問題となっている(11)。また、ICSI は卵細胞膜を穿破し、卵細胞質内に精子を注入する方法であることから、細胞膜が脆弱な卵子の場合、ICSI 実施時に穿破した卵細胞膜が修復せずに細胞死(変性)してしまう可能性が高い。そのため、卵細胞膜を穿破せずに ICSI と同等の受精率が得られる顕微授精法の開発が望まれている。

また、卵子と精子の膜融合を利用すれば卵細胞膜を穿破することなく受精させることが可能になると考えられるが、精子が卵細胞膜に接着するには先体反応が必須である(12)。自然の受精過程では、精子は卵細胞の周りを取り囲む透明帯を貫通して卵細胞膜に接着するため、透明帯に結合した精子は高

率で先体反応を起こしていると予想されるが、透明帯に結合した精子の先体反応率は 22～48 %であったとの報告がある(13, 14)。しかし、これらの報告では透明帯に精子が結合した卵子ごと吸引と排出を繰り返して精子を剥がし取っており、確実に透明帯に結合している精子のみを回収しているとは言い難い。

そこで、本研究では卵細胞膜を穿破しない顕微授精法を確立させ、臨床応用することを目的として、第 2 章では透明帯結合精子の先体反応率の検討、第 3 章では、先体反応を起こしたヒト精子を用いた押し付け法による顕微授精法の確立、そして第 4 章では、押し付け法によって受精した胚の発生経過の観察に関する研究を行った。最後に、第 5 章では第 2 章から第 4 章までの研究内容について総合的に考察した。

## 1-2. 引用文献

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. Lancet. 1978, vol.2, no.8085, p.366.
2. Palermo G, Joris H, Devroey P, et al. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet. 1992, vol.340, no.8810, p.17–18.
3. 日本産科婦人科学会. “顕微授精に関する見解”. 更新日時2018-07-13. [http://www.jsog.or.jp/modules/statement/index.php?content\\_id=21/](http://www.jsog.or.jp/modules/statement/index.php?content_id=21/), (参照 2020-09-03).
4. Chen HL, Copperman AB, Grunfeld L, et al. Failed fertilization in vitro: Second day micromanipulation of oocytes versus reinsemination. Fertil Steril. 1995, vol.63, no.6, p.1337–1440.
5. Lee SH, Lee JH, Park Y-S, et al. Comparison of clinical outcomes between in vitro fertilization (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in IVF-ICSI split insemination cycles. Clin Exp Reprod Med. 2017, vol.44, no.2, p.96–104.
6. Nagy ZP, Joris H, Liu J, et al. Fertilization and early embryology:

- Intracytoplasmic single sperm injection of 1-day-old unfertilized human oocytes. *Hum Reprod.* 1993, vol.8, no.12, p.2180–2184.
7. Park KS, Song HB, Chun SS. Late fertilization of unfertilized human oocytes in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles: Conventional insemination versus ICSI. *J Assist Reprod Genet.* 2000, vol.17, no.8, p.419–424.
  8. Lundin K, Sjögren A, Hamberger L. Reinsemination of one-day-old oocytes by use of intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2016, vol.66, no.1, p.118–121.
  9. Goudakou M, Kalogeraki A, Matalliotakis I, et al. Cryptic sperm defects may be the cause for total fertilization failure in oocyte donor cycles. *Reprod Biomed Online.* 2012, vol.24, no.2, p.148–152.
  10. 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, vol.18, no.10, p.2118–2121.
  11. Li M, Ping L, Jie Q, et al. Synchronization between embryo development and endometrium is a contributing factor for rescue ICSI outcome. *Reprod*

Biomed Online. 2012, vol.24, p.527–531.

12. Liu DY, Baker HWG. Acrosome status and morphology of human spermatozoa bound to the zona pellucida and oolemma determined using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Hum Reprod.* 1994, vol.9, no.4, p.673–679.
13. Francavilla F, Marrone V, Romano R, et al. Interference of antisperm antibodies with the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and its relationship with the inhibition of ZP binding. *Fertil Steril.* 1997, vol.67, no.6, p.1128–1133.
14. Liu DY, Garrett C, Baker HWG. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003, vol.18, no.11, p.2382–2389.

## 第2章 透明帯結合精子の回収と先体反応率の検討

### 2-1. 緒言

卵細胞膜を穿破せずに受精させるためには卵子と精子の膜融合とともに、精子が卵細胞膜に接着するには先体反応が必須である(1)。先体反応とは、精子頭部の先端部分にある先体外膜と先体内膜の融合により、先体内部の酵素群が放出される現象であり、通常は卵丘細胞通過時および透明帯進入時に誘起される現象である(2)。先体反応を人為的に誘起する手法に関する報告はいくつかあるものの、全ての精子に対して先体反応を誘起する手法はいまだに確立されていないと思われる(2-4)。自然の受精過程において、精子は卵丘細胞同士の間を通過したのち、卵細胞の周りを取り囲む透明帯を貫通して卵細胞膜に到達し融合する(5)。透明帯に結合した精子の先体反応を観察した報告によると、透明帯結合精子の先体反応率は22~48%であった(1, 6, 7)。しかし、いずれの研究でも透明帯結合精子の回収方法として、ガラスピペットを用いて透明帯に精子が結合した卵子ごと吸引と排出を繰り返すことで精子を剥がし取るというものであった。この方法の場合、透明帯に結合している精子だけを正確に回収しているとは言いがたく、透明帯に付着しているだけの精子や、死滅している精子までも回収している可能性がある。そこで、

本章では ICSI に用いるインジェクションピペットで透明帯結合精子を直接回収し、高い精度で先体反応率を明らかにすることを目的とした研究を行った。

## 2-2. 材料と方法

### 2-2-1. 使用試薬

精子洗浄液、良好精子回収液

精子洗浄には、HTF Medium (FUJIFILM Irvine Scientific) にヒト代替血清 (Serum substitute supplement、FUJIFILM Irvine Scientific) を 10 v/v%濃度となるよう添加した培養液 (以降、精子洗浄液) を使用した。形態および運動性が良好な精子の回収には、市販の密度勾配試薬 (90 % Isolate® Stock solution、FUJIFILM Irvine Scientific) を使用し、密度勾配試薬の希釈液として、MHM™ハンドリングメディウム (FUJIFILM Irvine Scientific) にヒト代替血清を 10 v/v%濃度となるよう添加した培養液 (以降、希釈液) を使用した。

前培養用、IVF 用培養液

採卵後から IVF までの前培養および IVF 用には、市販の培養液 (Universal IVF Medium、CooperSurgical) を使用した。

精子染色液

精子先体の染色には Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin

(FITC-PNA、MilliporeSigma) を使用した(8)。まず、1 mg の FITC-PNA を純水 1 mL で溶解し、カルシウム・マグネシウムイオン不含リン酸緩衝生理食塩水 [PBS (-)] (表 2-1) を 4 mL 加えて希釈し、濃度 200 µg/mL の FITC-PNA 濃縮溶液を作製し、凍結保存 (-30°C) した。使用時に適時融解した FITC-PNA 濃縮溶液 200 µL を 0.5 w/v% ウシ血清アルブミン加 PBS (-) 800µL に溶解し、最終濃度 40 µg/mL の先体染色液として使用した。

精子核の染色には Propidium iodide (PI、富士フイルム和光純薬) を使用した。1 mg の PI を純水 1 mL で溶解後、1 mL の PBS (-) を加え、最終濃度 500 µg/mL の PI 濃縮溶液を作製して凍結保存 (-30 °C) した。使用時に適時融解した PI 濃縮溶液を PBS (-) で 10000 倍に希釈し、最終濃度 0.05 µg/mL の精子核染色液として使用した。

#### 透明帯結合精子回収用培養液

透明帯結合精子回収には、MHM にヒト代替血清を 10 v/v%濃度となるよう添加した培養液 (以降、ハンドリングメディウム) を使用した。

#### 2-2-2. 対象および倫理

2019年1月から2019年6月までに、矢内原ウイメンズクリニックにおいて治療目的で体外受精を実施したものの、異常受精、未受精、未熟ならびに変性等の理由により治療に用いられず、本研究への参加の書面による同意を得られた患者17名の卵子および精子を対象とした。本研究は群馬パース大学（倫理審査承認番号：PAZ18-22）の倫理委員会の審査を受けて実施した。

### 2-2-3. 良好精子回収

まず、密度勾配遠心法と swim up 法を併用し、形態および運動性が良好な精子の回収を行った(9, 10)。良好精子回収を行う前日に、1.5 mL の密度勾配試薬を 15 mL 遠沈管（CORNING）に入れ、さらに別の 15 mL 遠沈管に 0.75 mL の密度勾配試薬と 0.75 mL の希釈液を入れ転倒混和し、1.5 mL の 45 % 密度勾配試薬を作製後、37 °C に加温した。精子洗浄用および swim up 用には、6.0 mL の精子洗浄液を作製し、培養器内で、37 °C、6 %CO<sub>2</sub> の条件下で一晩平衡化した。

精液は3～5日の禁欲期間の後、用手的に採取した。原精液は採取後10分以上静置し液化させたあと、精子計算盤（Makler<sup>®</sup> Counting Chamber、Sefi Medical Instruments Ltd）もしくは精子運動解析装置（Sperm Motility Analysis

System、ディテクト) を用いて世界保健機関による基準 (World Health Organization criteria, 2010) に従い、精子濃度と運動率を計測した (11)。次に、15 mL 遠沈管に入れた密度勾配試薬に 1.5 mL の 45 % 密度勾配試薬を静かに重層し (2 層密度勾配試薬)、2 層密度勾配試薬の層を崩さないように ART キャピラール (ニプロ) を遠沈管内に挿入した。2.5 mL 精子洗浄液に原精液を全量入れ希釈した後に 2 層密度勾配試薬の上部に静かに重層し、 $300 \times g$  で 20 分間遠心分離を行った。遠心分離後、ART キャピラールに 1 mL の注射器 (テルモシリンジ®、テルモ) を接続して沈殿物を回収して、別の遠沈管に入れた 2.5 mL 精子洗浄液に添加し、希釈後、 $300 \times g$  で 5 分間遠心分離を行った。遠心分離後、沈殿物を約 0.2 mL 残して上清を除去し、その沈殿物を攪拌後、0.1~0.2 mL の精子洗浄液を静かに重層して、 $37^{\circ}\text{C}$ 、6% $\text{CO}_2$  の条件で静置し、swim up 処理を行い、20 分後に 0.1~0.2 mL の上層液を回収した。回収した上層液中の精子濃度および運動率を精子計算盤を用いて目視で測定した。

#### 2-2-4. 採卵および IVF

採卵の前日に、IVF 用 2 ウェルディッシュ (ナカメディカル) の内側と外

側それぞれに 1 mL と 3 mL の前培養用培養液 を入れ、内側のウェルのみ 1 mL のオイル (OVOIL™、Vitrolife) で覆い、37 °C、6 %CO<sub>2</sub>、5 %O<sub>2</sub>、89 %N<sub>2</sub> 環境の培養器内で一晩平衡化し、前培養用ディッシュとした。また、4 ウェルディッシュ (Nunc™ 4-Well Dishes for IVF、Thermo Fisher Scientific) の 4 個のウェルに IVF 用培養液を 800 μL ずつ入れてオイルで覆い、37 °C、6 %CO<sub>2</sub>、5 %O<sub>2</sub>、89 %N<sub>2</sub> 環境の培養器内で一晩平衡化し、IVF 用ディッシュとした。

卵胞液の採取は、担当医師により行った。以下に簡単に手順を述べる。まず、超音波断層装置下で卵巣に採卵針 (OPU20G Needle もしくは OPU21G Needle、北里コーポレーション) を穿刺し、20mL の注射器 (テルモシリンジ®20 mL、テルモ) を用いて卵胞液を吸引した。卵胞液を 90 mm 滅菌プラスチックシャーレ (AGC テクノグラス) に注ぎ、実体顕微鏡を用いて検鏡し、卵丘-卵子複合体をパスツールピペットで回収して前培養用ディッシュの外側で洗浄し、内側のウェルに移動して 37 °C、6 %CO<sub>2</sub>、5 %O<sub>2</sub>、89 %N<sub>2</sub> 環境の培養器内で 3~4 時間の前培養を行った。1 枚の前培養用ディッシュに入れる卵丘-卵子複合体は 10 個までとした。

次に、採卵から 3~4 時間後に、IVF 用ディッシュのウェルに  $1.5 \times 10^5$  細胞/mL の濃度になるよう運動精子を添加した。次いで、前培養の終了した卵

丘-卵子複合体をパスツールピペットで吸引と排出を繰り返して卵丘細胞同士の間隔を広げて精子が進入しやすいよう処理をした後、運動精子を添加した IVF 用ディッシュのウェルに 1~3 個ずつ卵丘-卵子複合体を入れ、37 °C、6 %CO<sub>2</sub>、5 %O<sub>2</sub>、89 %N<sub>2</sub> 環境の培養器内で受精のための培養を行った。

#### 2-2-5. 透明帯結合精子の回収

IVF を実施した翌日の受精確認後、異常受精、未受精、未熟ならびに変性により治療に用いられなかった卵子の透明帯に結合している精子を回収した(12)。卵子操作用に、ガラス管 (Drummond MICROCAPS® 100 µL micropipettes、フナコシ) を 2 時間、180 °C で乾熱滅菌後、ガスバーナーの炎で軟化させた状態で引き延ばして細くし、卵子の径に合わせて内径約 200 µm のガラスピペットを作製した。精子回収用ディッシュは、35mm 径ディッシュ (NUNC™ IVF DISH 35 mm、Thermo Fisher Scientific) の蓋に、ハンドリングメEDIUMで 5 µL の微小滴 1 個、10 µL の微小滴 2 個、30 µL の微小滴 1 個と精子不動化用培養液 (PVP 7 %、CooperSurgical) で 10 µL の微小滴 1 個を作製しオイル (Oil for Embryo Culture、FUJIFILM Irvine Scientific) で覆った (図 2-1)。精子回収操作は倒立顕微鏡 DMI3000B (ライカマイクロシス

テムズ) に設置したマイクロマニピュレーションシステム (ナリシゲ) を使用した。インジェクションピペット (CooperSurgical) を精子回収用ディッシュのオイル部分に浸漬し、オイルをインジェクションピペット先端から約 0.05 mm 吸引した後、インジェクションピペットへの精子付着を防ぐ目的で、精子不動化用培養液をオイルと同量吸引し、さらにオイル、ハンドリングメディアムの順でそれぞれインジェクションピペットの先端から約 0.05 mm ずつ吸引した (図 2-2)。対象の卵子をハンドリングメディアムの微小滴に入れ、卵子透明帯に結合している精子を吸引しないように、ホールディングピペット (サンキョーメディック) で卵子を吸引して固定し、さらに対象の運動精子が 0 時から 3 時の位置に来るよう卵子を回転して固定し直した。回収する精子の尾部先端に焦点を合わせ、インジェクションピペットの高さを調節してインジェクションピペットの先端に焦点を合わせた後、精子尾部の先端より少し離れた位置でインジェクションピペットの吸引を始め (図 2-3-A)、精子尾部がインジェクションピペット内に引っ張られているのを確認しながらインジェクションピペットを精子頭部に近づけ (図 2-3-B)、さらに吸引を加え、精子を完全にインジェクションピペット内に回収し (図 2-3-C)、精子用のハンドリングメディアム微小滴に移動した。同様の方法で複数の透明帯

結合精子を回収した。

#### 2-2-6. 先体反応評価

回収した精子はインジェクションピペットに吸引し、ハンドリングメディウム微小滴でインジェクションピペットの周りのオイルを除去した後、スライドガラス（MAS-GP typeA コートスライドガラス、松浪硝子工業）上に作製した 5  $\mu$ L のハンドリングメディウム微小滴中に排出した。さらに、固定・染色過程での精子紛失を避けるために、インジェクションピペットで精子尾部をスライドガラスに押し付けて付着させた（図 2-4）。対照として、IVF 後の卵子の周りで透明帯に結合していない運動精子を使用した。まず、卵子操作ガラスピペットで卵子周囲の IVF 用培養液を精子と共に吸引し、別のハンドリングメディウム微小滴に移動した。その後、インジェクションピペットで運動精子のみを吸引して透明帯結合精子と同様の方法でスライドガラスに載せ精子を付着させた。それぞれのスライドガラスを風乾後、スライドガラスの裏側に乾燥後のハンドリングメディウムの痕跡を目安に油性ペンで目印をつけ、4 %ホルマリンを 200  $\mu$ L 滴下し室温で 15 分間静置して固定し、蒸留水で洗浄後に室温で乾燥させた。次いで、精子を固定したスライド

ガラスに 15  $\mu$ L の先体染色液を滴下して、さらに蒸発を防ぐためカバーガラスで覆い、湿潤箱内に入れ 37 °C で 30 分間反応させた。その後、27G 注射針（テルモ注射針 27 G、テルモ）を接続した 5 mL の注射器（テルモシリンジ<sup>®</sup> 5 mL、テルモ）を用いて純水をスライドガラスとカバーガラスの隙間に流し込むように掛け、カバーガラスをゆっくり外し、さらに、純水にて洗浄した。洗浄後、染色部分の周りの純水を軽く吸い取り、精子核染色液を 10  $\mu$ L 滴下しカバーガラスで覆い、直ちに Nikon Eclipse Ci-s（ニコン）および Nikon Intensilight Epi-fluorescence Illuminator C-HGF（B-2A フィルター、励起波長 450-490 nm、ダイクロイックミラー 505 nm、吸収フィルター 520 nm、ニコン）を用い、油浸レンズを用いて 1000 倍拡大下で、精子先体の観察を行った。

#### 2-2-7. 統計学的解析

平均値の比較は Welch's t test、割合の比較は Fisher's exact test 用いて両側検定を行った。すべての解析は R software, version 3.5.1（The R Foundation）を使用し、有意水準を  $p < 0.05$  とした(13)。

## 2-3. 結果

### 2-3-1. 精液所見

原精液および swim up 後の精液所見を表 2-2 に示す。原精液の平均精液量 ± 標準偏差は  $3.1 \pm 1.5$  mL、精子濃度は  $1.073 \pm 0.523 \times 10^8$  細胞/mL、運動率は  $52.2 \pm 13.8$  %であった。Swim up 後の平均精液量 ± 標準偏差は  $0.2 \pm 0.1$  mL、精子濃度は  $1.06 \pm 0.46 \times 10^7$  細胞/mL、運動率は  $97.9 \pm 0.5$  %であった。

### 2-3-2. 透明帯結合精子の先体反応率

透明帯結合精子および対照精子の染色写真を図 2-5 に示す。緑色蛍光を発している部分が先体染色液で染色された先体外膜、赤色蛍光部分が精子核を示し、緑色蛍光を発している場合、先体部分の先体外膜が残っている、つまり先体反応が起こっていないと判定した。一方、精子赤道面が若干緑に蛍光しているものの精子頭部先端が赤く発光しているものは、先体外膜の大部分が外れているため、先体反応陽性と判定した。透明帯結合精子の先体反応率は 98.0 % (48/49) であり、対照精子の 28.6 % (16/56) と比較し有意に高かった ( $p < 0.01$ ) (表 2-3)。

## 2-4. 考察

本章では、透明帯結合精子が既存の報告よりも高率（98.0%）で先体反応を起こしていることが明らかとなった(1, 6, 7)。先体反応は、先体外膜と先体内膜の融合によって生じた間隙より先体内部の酵素群が外部へ放出され、次いで先体外膜と先体内膜が溶解し精子頭部先端部が露出する現象で、精子と卵子の膜融合に必須であるため、卵細胞膜に接着している全ての精子が先体反応を起こしていることが明らかになっている(1, 14)。これらの知見と比較して卵細胞膜の外側に位置する透明帯に結合している精子の先体反応率は22~48%と低値であるとの報告があるが、これらの研究ではIVF後の卵子をガラスピペットで吸引したり排出したりすることで、透明帯結合精子を回収していた(1, 6, 7)。したがって、この方法で回収した場合、透明帯に結合していない単に付着しているだけの精子あるいは既に死滅している精子も回収していた可能性があるが、仮に精子が死滅していた場合、生理的な先体反応が起きていたのか、あるいは死滅したことで細胞膜が壊れて先体が除去されていたのか否かの判断ができない可能性が高い。そのため、透明帯結合精子の先体反応を調べる手法として、この回収方法は適していないと考えた。そこで本研究では、この問題点を解決するために、ICSIで使用されるマニピ

ュレーターとインジェクションピペットを用いて透明帯結合精子を直接回収した。その結果、透明帯に確実に結合している運動精子のみを選択回収することができ、軽く付着しているだけの精子や死滅している精子を回収することを回避することが可能となった。インジェクションピペットで回収した精子をスライドグラスに載せ、乾燥固定するのみでは精子を紛失する可能性があるため、精子をスライドグラスに載せた後にインジェクションピペットで精子尾部を押し付けてスライドグラスに付着させたことで、尾部細胞膜を破壊することにより先体反応が擬陽性になることが懸念された。しかし、対照群でも同様の方法でスライドグラスに付着させたにもかかわらず、透明帯結合精子の方が有意に先体反応率は高く、尾部を押し付けることによるスライドグラスへの付着操作は先体反応に影響を与えないことが確認された。

先体反応は、瞬時に全ての反応が起こる現象ではなく、段階的に進んでいく反応として知られている(15)。本研究で観察した透明帯結合精子 49 個のうち 1 個だけ先体反応が起こっていなかったのは、透明帯に確実に結合していない精子を回収していた可能性も考えられるが、先体反応のごく初期の段階の精子を回収した可能性も考えられる。ヒトの透明帯は 4 種類の糖タンパク (ZP1、 ZP2、 ZP3 ならびに ZP4) から構成されており、ZP2-ZP4 が一本

鎖のように結合し、さらに ZP2 同士を ZP1 が架橋して立体構造を構成している(16)。受精時、精子はまず ZP3 に結合し、先体反応が誘起された後に ZP2 に結合すると考えられているが、大腸菌を用いて作製したリコンビナント ZP3 では、精子と 18 時間共培養した時にだけ先体反応が生じるとの報告がある一方で、大腸菌によって作製したリコンビナント ZP3 は、受精能を獲得した精子の外膜と結合するが先体反応を誘起しないとの報告もあり、一定の見解は得られていない(17-20)。そのため、透明帯に結合している精子であっても全ての精子が先体反応を完了させているのではなく、先体反応が進行している途中である可能性も考えられる。したがって、今後、透明帯への結合度合（精子頭部先端のみ、頭部の 50%が透明帯に進入あるいは頭部全体が透明帯に進入等）の違いによる、先体反応率の違いを明らかにするためのさらなる研究が必要と考えられる。

## 2-5. 引用文献

1. Liu DY, Baker HWG. Acrosome status and morphology of human spermatozoa bound to the zona pellucida and oolemma determined using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Hum Reprod.* 1994, vol.9, no.4, p.673–679.
2. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol cell.* 2000, vol.92, no.3–4, p.255–266.
3. Harper C V., Barratt CLR, Publicover SJ, et al. Kinetics of the Progesterone-Induced Acrosome Reaction and Its Relation to Intracellular Calcium Responses in Individual Human Spermatozoa. *Biol Reprod.* 2006, vol.75, no.6, p.933–939.
4. Harper C V., Cummerson JA, White MRH, et al. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci.* 2008, vol.121, no.13, p.2130–2135.
5. Kim E, Yamashita M, Kimura M, et al. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol.* 2008, vol.52, no.5–6, p.677–682.
6. Francavilla F, Marrone V, Romano R, et al. Interference of antisperm

- antibodies with the induction of the acrosome reaction by zona pellucida (ZP) and its relationship with the inhibition of ZP binding. *Fertil Steril.* 1997, vol.67, no.6, p.1128–1133.
7. Liu DY, Garrett C, Baker HWG. Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Hum Reprod.* 2003, vol.18, no.11, p.2382–2389.
  8. Aoki Y, Tsujimura A, Nagashima Y, et al. Effect of *Lepidium meyenii* on in vitro fertilization via improvement in acrosome reaction and motility of mouse and human sperm. *Reprod Med Biol.* 2019, vol.18, no.1, p.57–64.
  9. Chen MJ, Bongso A. Comparative evaluation of two density gradient preparations for sperm separation for medically assisted conception. *Hum Reprod.* 1999, vol.14, no.3, p.759–764.
  10. Adiga SK, Kumar P. Influence of swim-up method on the recovery of spermatozoa from different types of semen samples. *J Assist Reprod Genet.* 2001, vol.18, no.3, p.160–164.
  11. WHO. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen - Fifth Edition. World Health. 2010, 271p. ISBN978-92-4-

- 154778-9.
12. Hatakeyama S, Araki Y, Ohgi S, et al. Fertilization with human sperm bound to zona pellucida by pressing onto the oocyte membrane. *Hum Cell.* 2020, vol.33, no.3, p.521–527.
  13. R Core Team. "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria". <https://www.R-project.org/>, (参照 2020-09-03).
  14. Buffone MG, Rodriguez-Miranda E, Storey BT, et al. Acrosomal exocytosis of mouse sperm progresses in a consistent direction in response to zona pellucida. *J Cell Physiol.* 2009, vol.220, no.3, p.611–620.
  15. Carlos Martín Zoppino F, Hal on ND, Bustos MA, et al. Recording and sorting live human sperm undergoing acrosome reaction. *Fertil Steril.* 2012, vol.97, no.6, p.1309–1315.
  16. Huang H-L, Lv C, Zhao Y-C, et al. Mutant ZP1 in Familial Infertility. *N Engl J Med.* 2014, vol.370, no.13, p.1220–1226.
  17. Chakravarty S, Suraj K, Gupta SK. Baculovirus-expressed recombinant human zona pellucida glycoprotein-B induces acrosomal exocytosis in

- capacitated spermatozoa in addition to zona pellucida glycoprotein-C. *Mol Hum Reprod.* 2005, vol.11, no.5, p.365–372.
18. Chakravarty S, Kadunganattil S, Bansal P, et al. Relevance of glycosylation of human zona pellucida glycoproteins for their binding to capacitated human spermatozoa and subsequent induction of acrosomal exocytosis. *Mol Reprod Dev.* 2008, vol.75, no.1, p.75–88.
19. Chiu PCN, Wong BST, Lee CL, et al. Native human zona pellucida glycoproteins: Purification and binding properties. *Hum Reprod.* 2008, vol.23, no.6, p.1385–1393.
20. Chapman NR, Kessopoulou E, Andrews PD, et al. The polypeptide backbone of recombinant human zona pellucida glycoprotein-3 initiates acrosomal exocytosis in human spermatozoa in vitro. *Biochem J.* 1998, vol.330, no.2, p.839–845.

表 2-1. PBS (-) の組成 (100 mL 中)

試薬	量
NaCl	0.800628 g
KCl	0.0201290 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.141960 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0239520 g

表 2-2. 原精液と swim up 後の所見

	原精液	Swim up 後
精液量 (mL)	3.1 ± 1.5	0.2 ± 0.1
精子濃度 (10 <sup>6</sup> 細胞/mL)	107.3 ± 52.3	10.6 ± 4.6
運動率 (%)	52.2 ± 13.8	97.9 ± 0.5

表 2-3. 透明帯結合精子および対照精子の先体反応率

	透明帯結合	対照
症例数（例）	17	
精子数（個）	49	56
先体反応陽性率	98.0 %*（48）	28.6 %*（16）

\*  $p < 0.01$

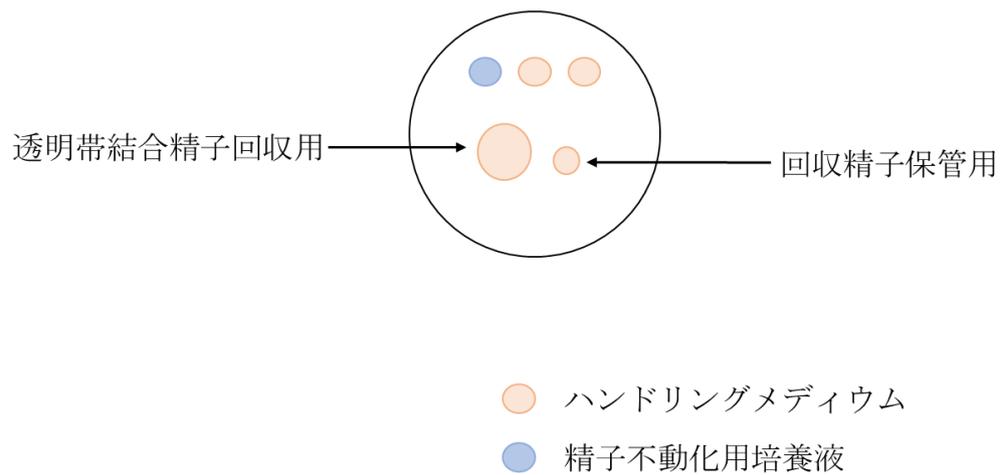


図 2-1. 透明帯結合精子回収用ディッシュ作製方法

35 mm 径ディッシュの蓋に、ハンドリングメディウムで 5  $\mu\text{L}$  の微小滴 1 個、10  $\mu\text{L}$  の微小滴 2 個、30  $\mu\text{L}$  の微小滴 1 個と精子不動化用培養液で 10  $\mu\text{L}$  の微小滴 1 個を作製しオイルで覆った。

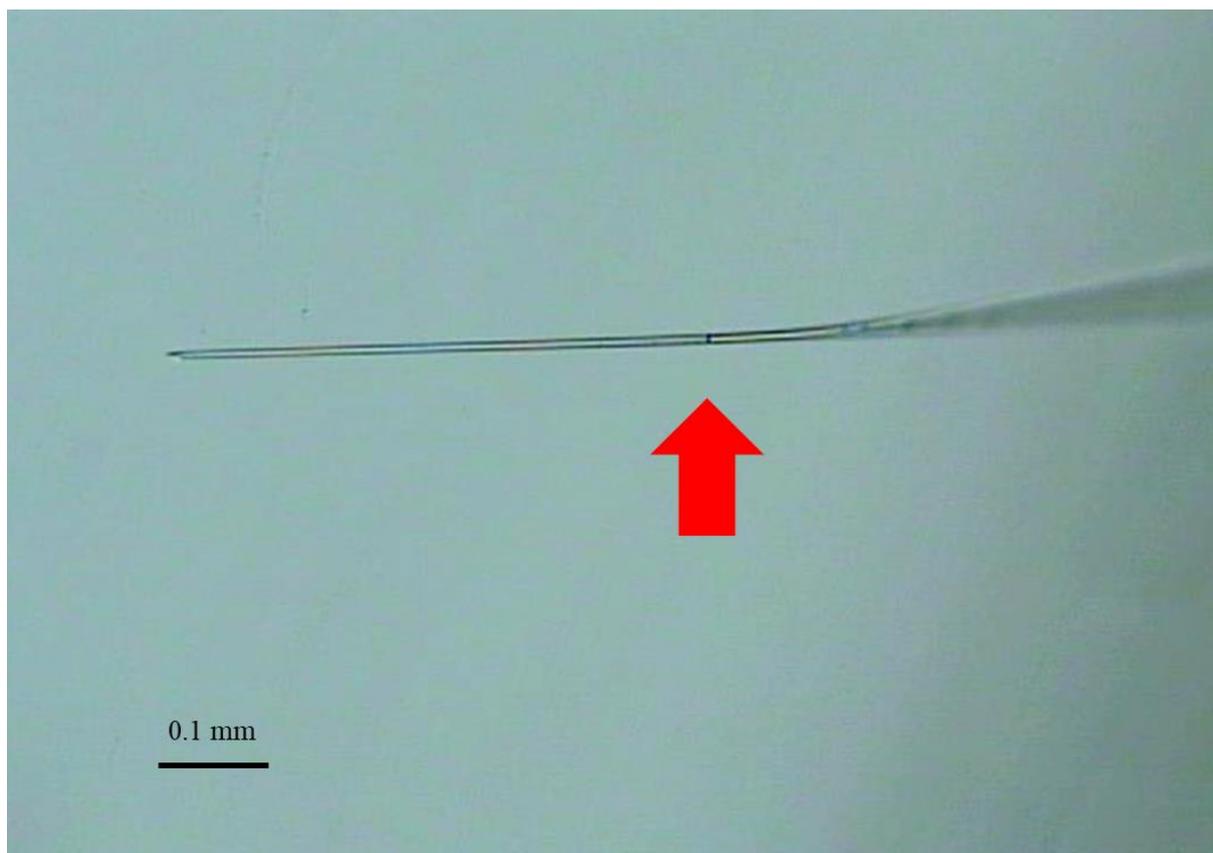


図 2-2. インジェクションピペットの準備方法

オイル、精子不動化用培養液、オイル、ハンドリングメデイウムの順で吸引し、オイルとハンドリングメデイウムの境界面（赤矢印）が顕微鏡視野で視認できる位置で吸引を止めた。

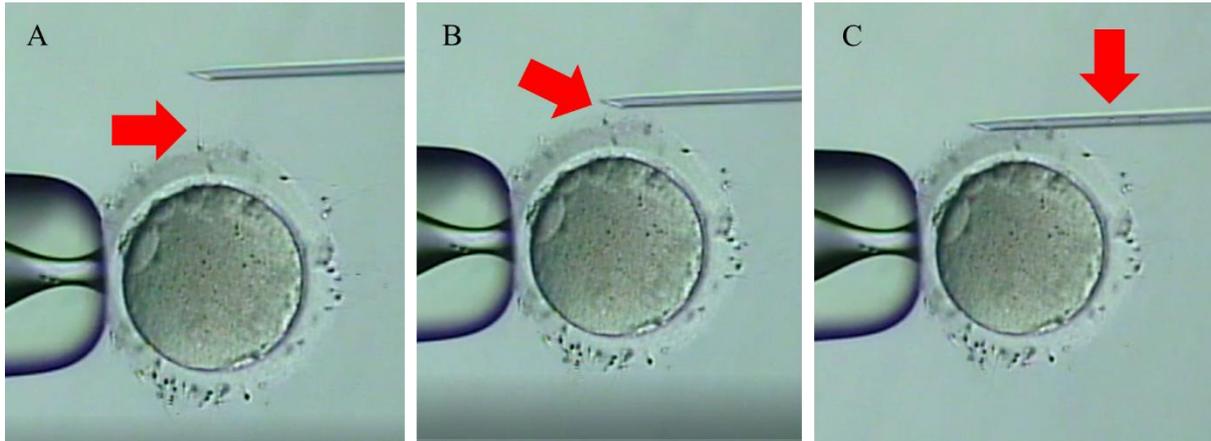


図 2-3. 透明帯結合精子の回収

A: 精子尾部の先端にインジェクションピペットを近づけ、吸引を開始した。B: 吸引しながらインジェクションピペットを近づけ、インジェクションピペット内へ精子尾部を取り込んだ。C: 透明帯から精子が外れインジェクションピペット内へ回収した。

赤矢印: 透明帯結合精子。

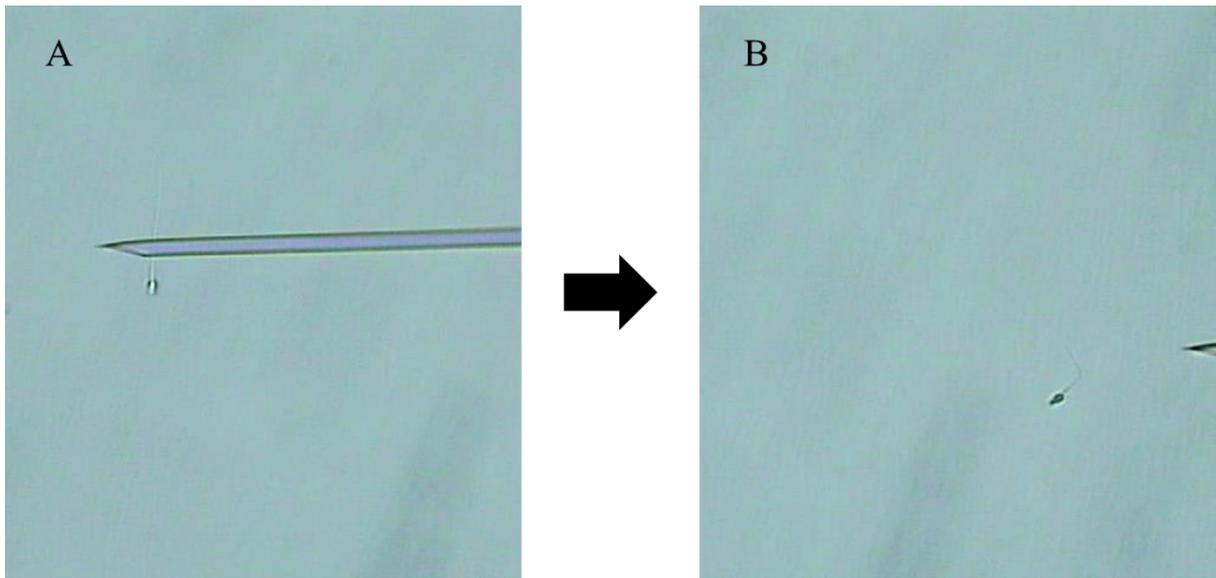


図 2-4. 回収した精子のスライドガラスへの付着操作

A: 精子尾部をインジェクションピペット先端で押し付けた。B: 押し付けた後にインジェクションピペットを右側に引き、精子尾部をスライドガラスに付着させた。

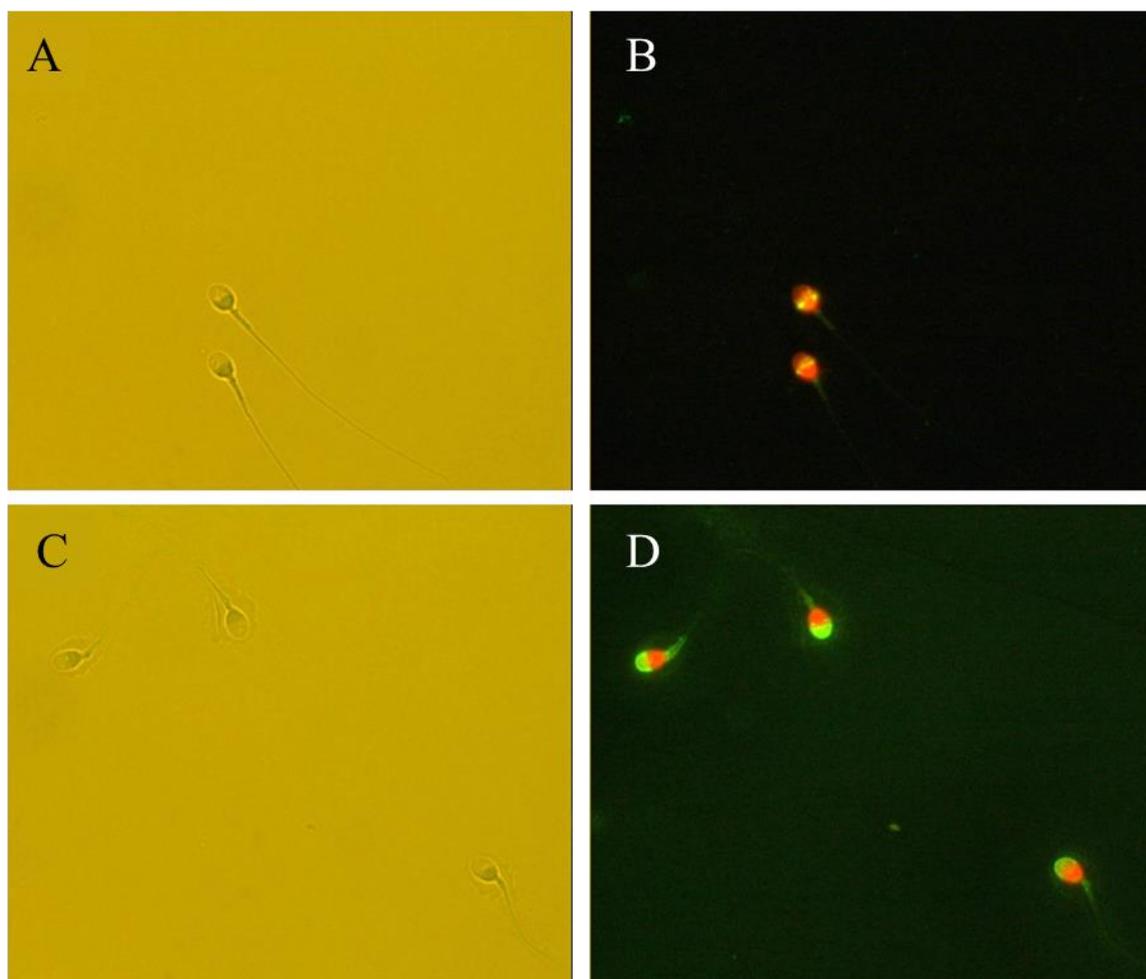


図 2-5. 先体染色結果

透明帯結合精子および対照精子の先体状態を示した。精子核は精子核染色液で蛍光を発し（赤）、先体外膜は先体染色液で発光している（緑）。A: 透明帯結合精子の明視野。B: 透明帯結合精子の先体状態。C: 対照精子の明視野。D: 対照精子の先体状態。

先体部分が緑に蛍光を発していない精子を先体反応陽性と判定した。

## 第3章 押し付け法による顕微授精法の確立

### 3-1. 緒言

卵細胞膜を穿破しない顕微授精法として囲卵腔内精子注入法がある(1)。これは、卵細胞とそれを取り囲む透明帯との間隙である囲卵腔に運動精子を注入する手法であるが、ICSI と比べて受精率が有意に低いとされている(2)。その原因として、囲卵腔に注入された精子が先体反応を起こしていないことがあげられる。また、IVF での受精の場合、透明帯を貫通した精子は囲卵腔を遊走することなく卵細胞膜に接着・融合していることが報告されているが、囲卵腔内精子注入法では囲卵腔に注入した精子が遊走してしまうため、卵細胞膜に接着する前に運動停止あるいは透明帯内側に付着してしまうことも受精率を下げる要因として考えられる(3)。そこで、マウスにおける検討で、単純に囲卵腔に精子を注入するのではなく、先体反応を誘起した精子を卵細胞膜に押し付けて受精を試みたところ受精卵が得られたことが報告されているが、ヒトでの報告は今まで見当たらないと思われる(4)。また、この報告で先体反応を誘起するために用いた Ca イオノフォアでの先体反応率にはバラツキがあるため、臨床応用には不向きであると考えられる(5, 6)。その一方で、本研究の第2章において、透明帯結合精子が非常に高率で先体反応を起

こしていることが明らかになった。

そこで、本章では卵細胞膜を穿破しない顕微授精法の確立を目的として、高率で先体反応を起こしている透明帯結合ヒト精子を用いた、押し付け法による顕微授精を試みた。また、この押し付け法を **Assisted sperm fusion insemination (ASFI)** と命名した(7)。

## 3-2. 材料と方法

### 3-2-1. 使用試薬

精子洗浄液、良好精子回収液

第2章 2-2-1 と同様に準備した。

前培養用、IVF 用培養液

第2章 2-2-1 と同様に準備した。

ASFI およびレスキューICSI 用培養液

ASFI およびレスキューICSI 実施用には、MHM™ハンドリングメディウムにヒト代替血清が 30 v/v%濃度となるよう添加した培養液（ハンドリングメディウム）を使用した。

胚培養用培養液

ASFI およびレスキューICSI 後の胚培養用には市販の培養液（global® total®, LifeGlobal）を使用した。

### 3-2-2. 対象および倫理

2019年1月から2020年7月までに、矢内原ウイメンズクリニックにおいて治療目的で体外受精を実施し、書面で本研究への参加の同意を得られた64名の患者を対象とし、レスキューICSIの代わりにASF Iを試みた。ASF I実施への同意のない症例、もしくは透明帯に結合した運動精子が得られなかった場合には通常のレスキューICSIを実施した。IVFからASF IおよびレスキューICSIまでのフローチャートを図3-1に示した。本研究は、矢内原ウイメンズクリニック（倫理審査承認番号：YW18-02）の倫理委員会の審査を受けて実施した。

### 3-2-3. 良好精子回収

第2章2-2-3と同様の方法で良好精子を回収した。

### 3-2-4. 採卵およびIVF

第2章2-2-4と同様の方法で採卵およびIVFを行った。

### 3-2-5. ASF I

ASFI 実施の前日に、胚培養用ディッシュ（EmbryoSlide+ culture dish、Vitrolife）のメディウム容器に 180  $\mu$ L、洗浄用ウェルに 40  $\mu$ L の胚培養用培養液を入れ、全体を 1.6 mL のオイルで覆い、37  $^{\circ}$ C、6 %CO<sub>2</sub>、5 %O<sub>2</sub>、89 %N<sub>2</sub> 環境の培養器内で一晩平衡化し、胚培養用ディッシュとした（図 3-2）。卵子操作用にガラス管を 180  $^{\circ}$ C、2 時間で乾熱滅菌後、ガスバーナーの炎で軟化させた状態で引き延ばして細くし、卵子の径に合わせて内径 270  $\mu$ m、200  $\mu$ m ならびに 150  $\mu$ m の 3 種類のガラスピペットを作製した（図 3-3）。

IVF から ASFI およびレスキュー ICSI までのフローチャート（図 3-1）に従い、IVF 実施の 3 時間後にまず内径 200  $\mu$ m の卵子操作ガラスピペットで卵子の周りの卵丘細胞を剥離し、さらに 150  $\mu$ m の卵子操作ガラスピペットを使用して、極体の状態を確認できる程度に卵丘細胞と緩く付着している精子を剥離した。卵子は極体の有無を確認後、新しい IVF 用培養液に移動し、これ以降の卵子内への過剰な精子進入を防ぐため、精子浮遊液とは分離した状態でさらに培養を行った。3 時間後つまり IVF から 6 時間後に第二極体の有無を確認して、IVF から 3 時間後に第二極体の放出が認められなかった成熟卵の内、6 時間後に再観察するも第二極体の放出が認められなかった卵子を、最終的に未受精と判断し ASFI の対象とした。

ASFI用のディッシュは、35 mm 径ディッシュの蓋に 37 °C に加温したハンドリングメEDIUMで 10 μL の微小滴 2 個、20 μL の微小滴を楕円形で 2 個、精子不動化用培養液で 10 μL の微小滴 1 個を作製し 37 °C に加温したオイルで覆った (図 3-4)。「2-2-5. 透明帯結合精子の回収」の項と同様に、インジェクションピペット内にオイル、精子不動化用培養液、オイルならびにハンドリングメEDIUMの順にそれぞれインジェクションピペットの先端から約 0.05 mm ずつ吸引し、透明帯結合精子をインジェクションピペットで回収した。基本的には ASFI を実施しようとする卵子自体の透明帯に結合している精子を使用した。対象卵の透明帯に運動精子が結合していない場合は、同一患者の未熟卵もしくは変性卵の透明帯に結合している運動精子を回収した。インジェクションピペット内に精子を回収した後、囲卵腔の広い部分が 11 時から 1 時の位置になるよう卵子を回転させホールディングピペットで固定し直し、卵細胞に当たらないようにインジェクションピペットを 1 時の位置から透明帯に突き刺し、インジェクションピペット先端を囲卵腔に挿入した (図 3-5-A, B)。インジェクションピペット先端穴部分の曲面と卵細胞膜の曲面が一致するように押し当て、精子頭部が卵細胞膜に触れるまで排出した (図 3-5-C)。インジェクションピペット先端を卵細胞側に卵細胞膜

が約 5～10  $\mu\text{m}$  移動する程度押し付け、精子頭部が卵細胞膜に触れた状態で約 30 秒間保持した。その後、インジェクションピペットの卵細胞膜への押し付けを緩ませ、精子がひっかからないようにインジェクションピペットをゆっくりと引き抜いた。精子頭部が卵細胞膜に触れている状態で尾部の運動性が見られていることが確認できた場合、卵細胞膜への接着ありと判定した（図 3-5-D）(7)。ASF I 後の卵子を、胚培養用ディッシュの洗浄用ウェルで洗浄し、各マイクロウェルに 1 個ずつ入れてタイムラプスインキュベーター（EmbryoScope+ time-lapse system、Vitrolife）で培養した。

### 3-2-6. レスキューICSI

IVF 実施の 6 時間後に未受精卵と判定した卵子の内、ASF I を実施しなかった卵子にはレスキューICSI を行った。「3-2-5. ASF I」の項と同様にレスキューICSI 用のディッシュを作製し、卵子および精子をレスキューICSI 用のディッシュに移動した後、「2-2-5. 透明帯結合精子の回収」の項と同様に、インジェクションピペット内にオイル、精子不動化用培養液、オイルならびにハンドリングメデイウムの順にそれぞれインジェクションピペットの先端から約 0.05 mm ずつ吸引した。運動精子の尾部をインジェクションピペット

で上から押さえ付け尾部の動きを止めた後、精子尾部を押さえ付けた状態でインジェクションピペットを左右に動かし尾部に確実に傷をつけ不動化を行い、尾部からインジェクションピペット内に吸引した。第一極体が 0 時の位置に来るよう卵子をホールディングピペットで固定し、精子頭部がインジェクションピペットの先端に来るまで排出し、インジェクションピペットを卵細胞質の中央まで穿刺し、卵細胞膜を少量の細胞質と共に吸引して卵細胞膜を破膜した。吸引した細胞質の半量を排出し、インジェクションピペット先端をさらに卵細胞の奥まで差し込み、精子を卵細胞質内に排出した後、インジェクションピペットをゆっくりと引き抜いた。レスキューICSI 後の卵子は「3-2-5. ASFI」の項と同様に胚培養用ディッシュの洗浄用ウェルで洗浄し、各マイクロウェルに 1 個ずつ入れてタイムラプスインキュベーターで培養した（図 3-2）。ASFI およびレスキューICSI 実施 16~19 時間後にタイムラプスインキュベーターで受精の確認を行い、前核の有無と数を記録した。

### 3-2-7. 統計学的解析

平均値の比較は Welch's t test、割合の比較は Fisher's exact test 用いて両側検定を行った。すべての解析は R software, version 3.5.1 (The R Foundation)

を使用し、有意水準を  $p < 0.05$  とした(8)。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 精液所見

原精液および swim up 後の精液所見を表 3-1 に示す。原精液の平均精液量 ± 標準偏差は  $2.7 \pm 1.0$  mL、精子濃度は、 $8.34 \pm 6.82 \times 10^7$  細胞/mL、運動率は、 $51.5 \pm 15.1$  %であった。Swim up 後の平均精液量 ± 標準偏差は、 $0.2 \pm 0.1$  mL、精子濃度は  $9.0 \pm 4.5 \times 10^6$  細胞/mL、運動率は、 $96.0 \pm 8.1$  %であった。

#### 3-3-2. 受精結果

ASF I 実施後、卵細胞膜に押し付けた精子は約 30 分後に頭部が卵細胞質内に取り込まれる様子が観察された (図 3-6)。ASF I により受精し発生した胚 (ASF I 胚) とレスキュー ICSI により受精し発生した胚 (レスキュー ICSI 胚) の受精率の比較結果を表 3-2 に示した。女性平均年齢 ± 標準偏差は、ASF I 群が  $36.1 \pm 3.8$  歳、レスキュー ICSI 群が  $36.3 \pm 4.1$  歳であり、両群間に有意差は認められなかった。ASF I 群において、ASF I 実施後 105 個全ての精子で卵細胞膜への接着が確認された。受精率は両群間で有意差は認められなかったが、ASF I 胚の 3 前核率 (7.6 %) がレスキュー ICSI 胚と比較して低い傾向

であり、変性率（0 %）は有意に低かった。

### 3-4. 考察

本章では、透明帯結合精子を卵細胞膜に押し付ける手法により、卵細胞膜を穿破せずに卵子と精子を融合させ、受精卵を得ることに成功した。通常の ICSI は卵細胞膜を穿破するのに対し、ASF I は細胞膜を穿破することなく 1 個の精子で受精させる顕微授精法であり、このことが可能になることは、不妊治療の技術革新において非常に重要な意味を持つと思われる。

卵細胞膜を吸引して穿破する通常の ICSI の場合、ICSI 後の卵子の変性率は約 5%と臨床上、容認できる値ではないことから、変性率を下げて受精率を向上させる目的で、近年ではピエゾ ICSI が注目されている(9)。ピエゾ ICSI とは、卵細胞膜を吸引することなく、微細な振動によって卵細胞膜を穿破することが可能な手法であり、通常の ICSI よりも変性率が減少したとの報告がある(9)。しかし、35 歳以上の女性の卵子では正常受精率が向上したものの、変性率に差は認められなかったとの報告もあり、ピエゾ ICSI を用いたとしても完全に変性を回避することはできないのが現状である(10)。一方、本研究で実施した ASF I では卵細胞膜を穿破せずに受精が可能のため、透明帯を穿刺する際に誤ってインジェクションピペットを卵細胞膜に刺すことや精子を押し付ける時に卵細胞膜にインジェクションピペット先端を刺し

込むなどの技術的な失敗がない限り、通常の ICSI と比較して卵子が変性する可能性は極めて低い。実際、本研究での ASF1 後の変性率は 0 % と極めて低く、レスキュー ICSI と比較して有意に低値であることから、臨床上非常に大きな利点であると考えられる。

また、もう 1 つの ASF1 の利点として、先体反応を起こした精子で受精させているという点があげられる。卵子と精子が膜融合するためには精子の先体反応が完了していることが必須であるため、通常の IVF で卵子に進入した精子は必ず先体反応が起こっていると思われる。一方、ICSI では先体反応の有無を確認せず精子を卵細胞質内に注入している。ICSI 時の先体状態を調べた研究では、卵細胞質内に注入する前に精子の尾部を人為的に傷つける「不動化処理」を行った後、17%の精子では先体外膜の除去が見られるがその大半（83%）では先体外膜が残ったままであったという報告もあり、実際に臨床での ICSI でも卵細胞質内に注入された大部分の精子が先体は残った状態であると予想される(11)。また、先体反応を起こしていない精子を注入した場合、先体内部にある酵素群も一緒に卵子内に注入されることになるが、精子頭部が比較的大きいハムスターでは先体反応を起こしていない精子で ICSI を行くと、3 時間以内に全ての卵子が変性するという報告もある(12)。

ヒトでは卵細胞の体積に対して先体部に含まれる酵素の量が少ないため、変性しないと考えられているが、自然では起こりえない状態の精子で受精していることは事実であり、胚や胎児に影響を与えている可能性を完全に否定することはできない。したがって、ICSIで精子を卵子に注入する前に、先体反応の有無を見分けることが可能であれば、この問題を解決することができるが、先体反応の有無を見分けるためには現状では精子を染色する方法しかなく、染色精子を治療に用いることはできない。一方、先体反応を起こした精子のみが卵子と膜融合するASFは、ICSIよりも自然な受精方法であるといえる。しかし、透明帯結合精子を使用したASFには欠点もある。例えば、透明帯に運動精子が結合していない場合に実施できない点やIVFを実施できる数の運動精子が確保できない場合にも実施することができない。したがって、今後、人為的に先体反応を誘起する研究をさらに進めることも必要であろう。

### 3-5. 引用文献

1. Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, et al. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fertil Steril*. 1987, vol.48, no.4, p.637–642.
2. Palermo G, Joris H, Derde M-P, et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1993, vol.59, no.4, p.826–835.
3. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol*. 2008, vol.199, no.6, p.660.e1–5.
4. Kobayashi K, Okuyama M, Fujimoto G, et al. Subzonal insemination with a single spermatozoon using manipulation assisted sperm adhesion onto the ooplasmic membrane in mouse ova. *Mol Reprod Dev*. 1992, vol.31, no.3, p.223–229.
5. Köhn F-M, Mack SR, Schill W-B. Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, *Pisum sativum* agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy.

- Hum Reprod. 1997, vol.12, no.4, p.714–721.
6. Jaiswal BS, Eisenbach M, Tur-Kaspa I. Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: which inducers and probes to use? Mol Hum Reprod. 1999, vol.5, no.3, p.214–219.
  7. Hatakeyama S, Araki Y, Ohgi S, et al. Fertilization with human sperm bound to zona pellucida by pressing onto the oocyte membrane. Hum Cell. 2020, vol.33, no.3, p.521–527.
  8. R Core Team. "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria". <https://www.R-project.org/>, (参照 2020-09-03).
  9. Fujii Y, Endo Y, Mitsuhashi S, et al. Evaluation of the effect of piezo-intracytoplasmic sperm injection on the laboratory, clinical, and neonatal outcomes. Reprod Med Biol. 2020, vol.19, no.2, p.198–205.
  10. Furuhashi K, Saeki Y, Noritoshi, et al. Piezo-assisted ICSI improves fertilization and blastocyst development rates compared with conventional ICSI in women aged more than 35 years. Reprod Med Biol. 2019, vol.18, no.4, p.357–361.

11. Takeuchi T, Colombero LT, Neri Q V, et al. Does ICSI require acrosomal disruption? An ultrastructural study. *Hum Reprod.* 2004, vol.19, no.1, p.114–117.
12. Yamauchi Y, Yanagimachi R, Horiuchi T. Full-term development of golden hamster oocytes following intracytoplasmic sperm head injection. *Biol Reprod.* 2002, vol.67, no.2, p.534–539.

表 3-1. 原精液と swim up 後の所見

	原精液	Swim up 後
精液量 (mL)	2.7 ± 1.0	0.2 ± 0.1
精子濃度 (10 <sup>6</sup> 細胞/mL)	83.4 ± 68.2	9.0 ± 4.5
運動率 (%)	51.5 ± 15.1	96.0 ± 8.1

表 3-2. ASFI 胚とレスキューICSI 胚の受精率の比較

	ASFI	レスキューICSI	<i>p</i> 値
周期数 (周期)	69	39	
女性平均年齢(歳)	36.1 ± 3.8	36.3 ± 4.1	0.95
施行卵数 (個)	105	92	
精子接着率	100% (105)	-	
2 前核率	70.5% (74)	68.5% (63)	0.88
1 前核率	4.8% (5)	5.4% (5)	1.0
3 前核率	7.6% (8)	16.3% (15)	0.075
変性率	0% (0)	4.3% (4)	0.046

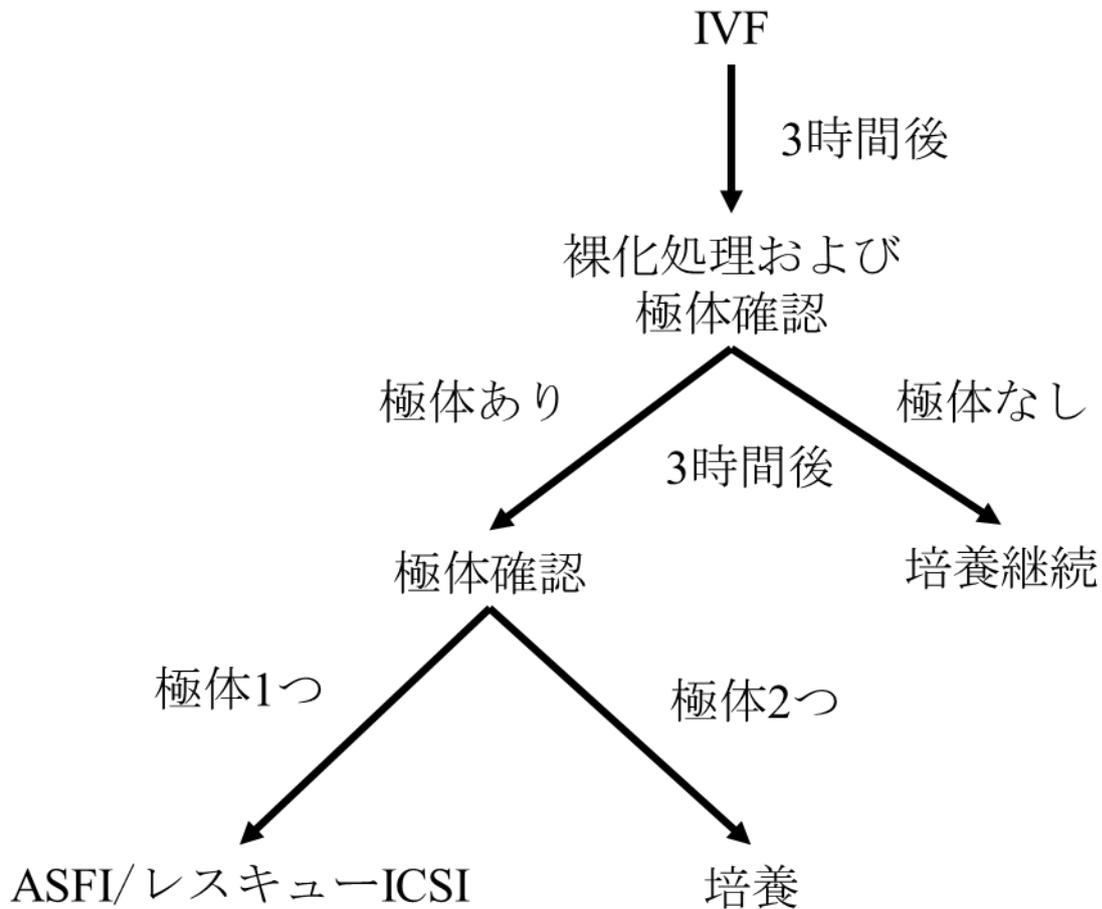


図 3-1. IVF から ASFI およびレスキューICSI 施行までのフローチャート

IVF 実施 3 時間後に卵子周囲の卵丘細胞を剥離し、極体の有無を確認した。極体放出の見られた卵子は 3 時間後に再度極体の有無を確認し、極体が 2 個認められた卵子は精子進入ありと判定し、培養を継続する一方、極体が 1 個しか認められなかった卵子は精子進入なしと判定し ASFI もしくはレスキューICSI を実施した。

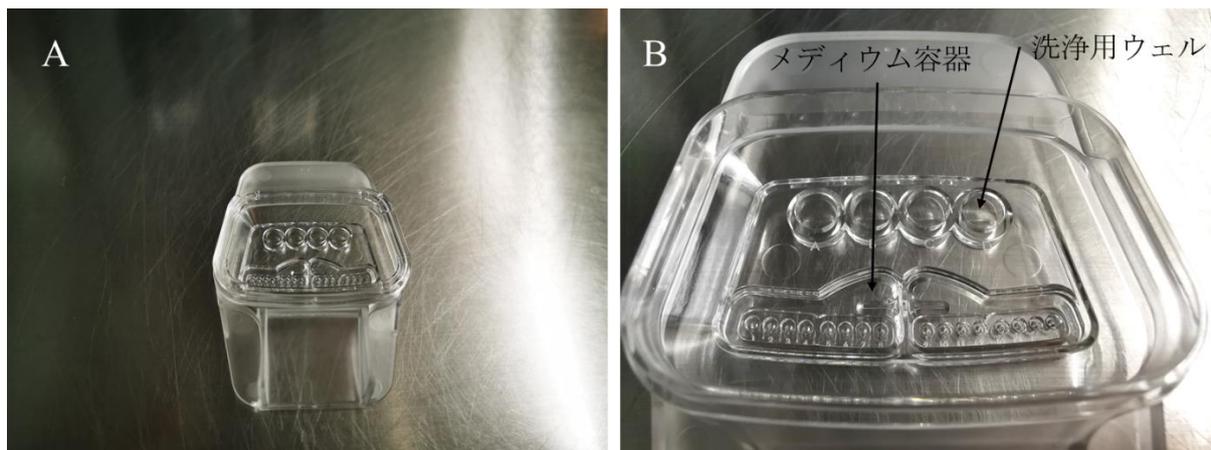


図 3-2. 胚培養用ディッシュの作製方法

胚培養用ディッシュのメディウム容器に 180  $\mu\text{L}$ 、洗浄用ウェルに 40  $\mu\text{L}$  の胚培養用培養液を入れ、全体を 1.6 mL のオイルで覆った。

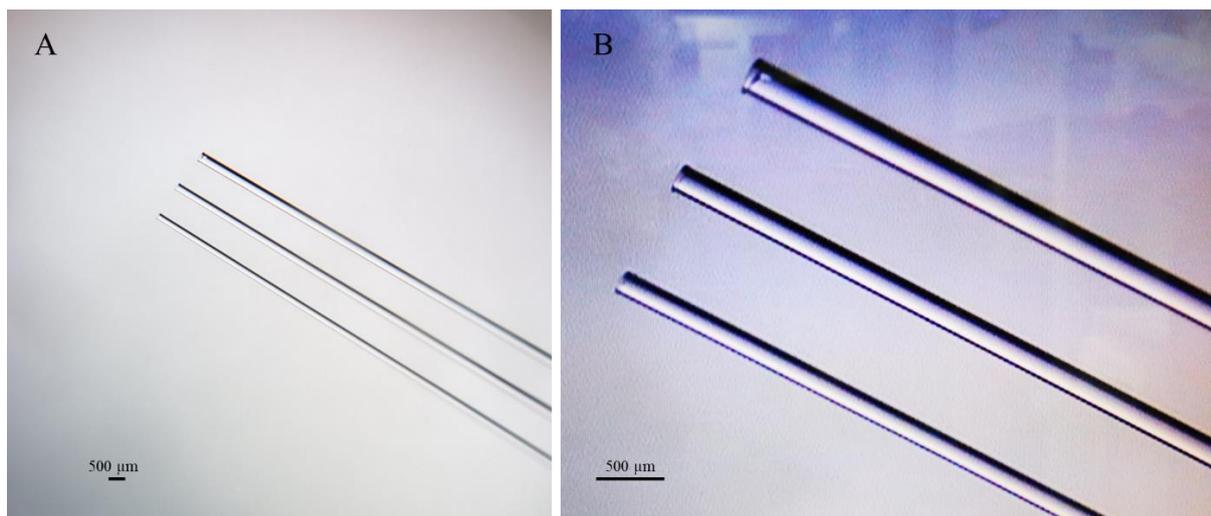
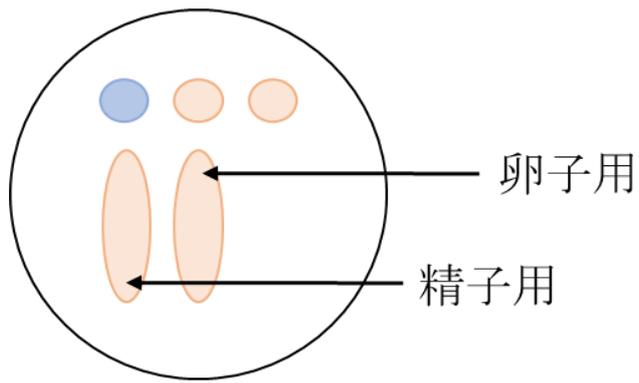


図 3-3. 卵子および胚操作用ガラスピペット

A: ガラス管をガスバーナーの炎で軟化させた状態で引き延ばして細くし、先端を折ることで作製した卵子および胚操作用ガラスピペット。B: 卵子および胚操作用ガラスピペット先端の拡大写真。ガラスピペット内径は上段：約 270  $\mu\text{m}$ 、中段：約 200  $\mu\text{m}$ 、下段：約 150  $\mu\text{m}$ 。



- ハンドリングメディウム
- 精子不働化用培養液

図 3-4. ASFI 用ディッシュ作製方法

35 mm 径ディッシュの蓋に、ハンドリングメディウムで 10  $\mu$ L の微小滴 2 個、20  $\mu$ L の微小滴を楕円形で 2 個、精子不働化用培養液で 10  $\mu$ L の微小滴 1 個を作製し 37  $^{\circ}$ C に加温したオイルで覆った。

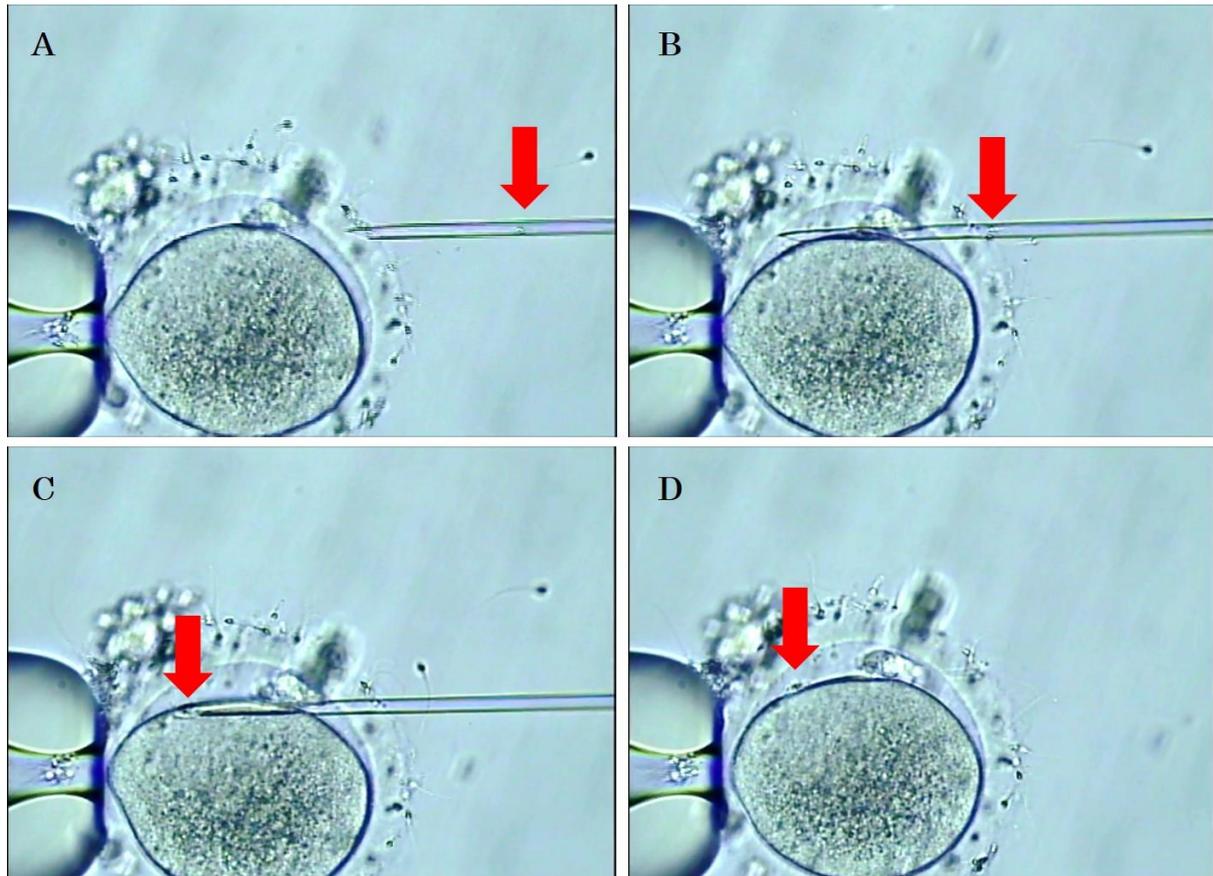


図 3-5. ASFI 方法

A, B:インジェクションピペット先端を囲卵腔に向け、卵細胞を避けながら透明帯を貫通させた。C: 精子頭部を卵細胞膜に押し付け 30 秒間保持した。

D: インジェクションピペットを引き抜いた後、卵細胞膜に接着した精子。

赤矢印: 透明帯から回収した精子。

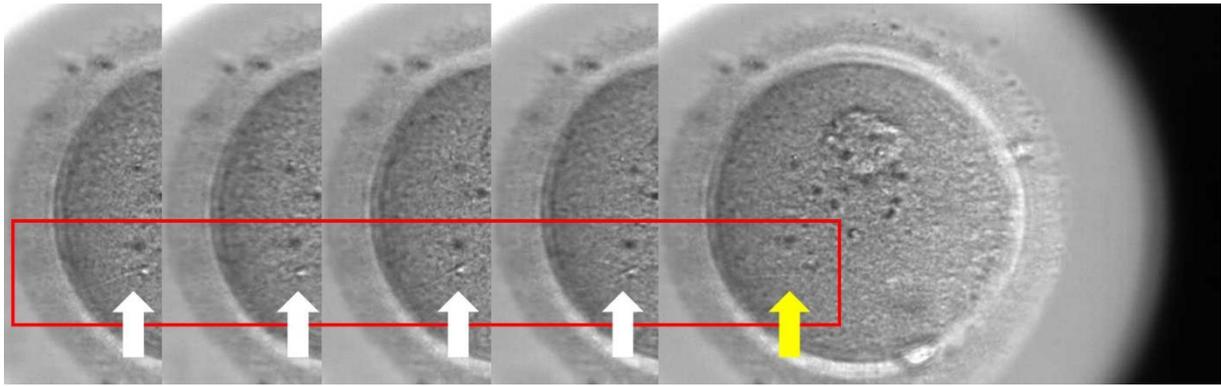


図 3-6. ASFI 後の卵細胞膜接着精子

赤い四角で囲った部分は精子の状態を示した。精子は卵細胞膜に取り込まれるまで約 30 分間その位置に留まり、その後に頭部が卵細胞に取り込まれた。

白矢印：精子頭部と尾部。

黄色矢印：精子頭部と卵子の融合後に精子尾部だけが卵細胞膜表面に残った。

## 第4章 押し付け法によって受精した胚の発生経過観察

### 4-1. 緒言

不妊治療において、受精した胚を子宮に移植したとしても全ての胚が着床するとは限らず、移植あたりの臨床妊娠率は約 35 %に留まっている(1)。また、複数個の移植候補胚がある場合には、移植を行う優先順位を決めなければならず、移植前にその胚の妊孕能を予測する必要があるため、受精してから3日目までの初期胚に対しては Veeck 分類が、受精してから5日目、6日目の胚盤胞に対しては Gardner 分類が指標として用いられてきた(2, 3)。しかし、従来の形態観察は定点的であることに加え、観察者の主観に頼るところが多く、胚評価システムの標準化が望まれてきた。近年、タイムラプスインキュベーターの普及によって、動的で客観的な胚評価を行い、それを点数化することで従来の定点的な形態的評価と同等かそれ以上の妊娠予測ができるようになった(4-6)。

そこで本章では、第3章で確立した新しい顕微授精法である ASFI が、従来の顕微授精法であるレスキューICSI と比べて胚発生において差違が認められるかどうかを明らかにすることを目的として、従来の定点的な評価に加えて、タイムラプスインキュベーターを用いた動的な観察を行った。

## 4-2. 材料と方法

### 4-2-1. 使用試薬

胚培養用および胚融解後の回復培養用培養液

ASF1 およびレスキューICSI 後の胚培養用と胚融解後の回復培養用には市販の培養液（global<sup>®</sup> total<sup>®</sup>）を使用した。

胚凍結・融解液

胚凍結には卵子・胚ガラス化液（VT507、北里コーポレーション）を使用し、胚融解には卵子・胚融解液（VT508、北里コーポレーション）を使用した。

胚移植用培養液

胚移植用には、MHM<sup>™</sup>ハンドリングメディウムにヒト代替血清が 10 v/v% 濃度となるよう添加した培養液（ハンドリングメディウム）を使用した。

### 4-2-2. 対象および倫理

第 3 章で実施した ASF1 胚およびレスキューICSI 胚を対象とし、受精およ

び胚発生 の成績を 検討した。また、ASF I を試みた 64 名のうち、13 名 16 個の胚については、タイムラプスイ ンキュベーター (EmbryoScope+ time-lapse system) を用いて胚盤胞まで培養し、その形態学的な動態を比較した。さらに、ASF I 胚およびレスキュー ICSI 胚以外に胚移植可能な良好胚が得られなかった 51 症例に対しては、書面で患者の同意を得たうえで ASF I 胚もしくはレスキュー ICSI 胚の移植を行った。

本研究は矢内原ウイメンズクリニック (倫理審査承認番号 : YW18-02) の倫理委員会 の審査を受けて実施した。

#### 4-2-3. 胚評価と治療方針

ASF I およびレスキュー ICSI 実施後、3 日目 (Day3) の初期胚の評価は Veeck 分類に従い、細胞の数と均一性およびフラグメンテーションの量により評価し、7 細胞グレード 2 以上を良好胚とした(2)。受精数あたりの Day3 良好胚数の割合を Day3 良好胚率として算出した。5 日目の胚盤胞の評価は Gardner 分類に従い、胞胚腔の拡張具合を 1~6 段階に分類し、内細胞塊および栄養外胚葉をそれぞれ A~C の 3 段階で評価し、3BB 以上を良好胚盤胞と定義した(3)。また、患者が希望した場合は、Day3 で良好胚を凍結保存し、Day3 で

凍結しなかった非移植胚は胚盤胞期まで培養を継続して、5日目もしくは6日目で完全胚盤胞以上に発生し、かつグレードCCよりも良好な胚を凍結保存した。胚盤胞期まで培養を継続した胚のうち、胚盤胞に到達した胚の割合を胚盤胞率、良好胚盤胞に到達した胚の割合を良好胚盤胞率とした。

#### 4-2-4. 胚のタイムラプス観察

受精確認後、患者が希望する場合に限り、タイムラプスインキュベーターで培養を継続し、タイムラプスシステムによる胚形態の動的観察を行った。胚は培養器内において自動的に10分間隔で撮影され、断続的な静止画として記録に残した。解析は胚盤胞まで到達した胚のみを対象とし、媒精からの前核形成時間 (tPNa)、前核消失時間 (tPNf)、2~8細胞までの発生時間 (t2~t8)、胞胚腔形成時間 (tSB)、完全胚盤胞到達時間 (tB) を算出した (図 4-1)。タイムラプスインキュベーターでの培養を行わない胚については、卓上ドライ培養器 (EZ-CULTURE、アステック) にて培養した。

#### 4-2-5. ASFI 使用精子の由来卵子成熟度別の成績比較

第3章で実施した ASFI において使用した精子の由来卵子を成熟卵、未熟

卵、変性卵に分けて記録し、それぞれの受精および胚発生成績を比較した。

第一極体が認められる卵子を成熟卵、極体が認められない卵子を未熟卵、卵細胞膜が壊れている卵子を変性卵と定義した。

#### 4-2-6. 胚凍結

胚凍結を行う 30 分前に卵子・胚ガラス化液を冷蔵庫から取り出し室温に戻してから使用した。胚凍結はガラス化凍結法の手順に従い、室温に戻した平衡化液およびガラス化液を 4 ウェルディッシュの別々のウェルにそれぞれ全量 (1.0 mL) 投入した(7)。凍結する胚を最小限の培養液と共に平衡化液の液面に排出し 11~13 分間静置させた後、最小限の平衡化液と共に胚をガラス化液の液面に排出して移動した。ガラス化液中でガラスピペットを用いて胚の吸引と排出を繰り返すことによって胚周囲の平衡化液をガラス化液に置換して収縮させ、胚凍結デバイス (Cryotop<sup>®</sup>、北里コーポレーション) のシート先端に少量のガラス化液と共に胚を排出し、胚が確実に排出されたことを確認してから液体窒素に直接浸漬することによって凍結した。

#### 4-2-7. 胚融解

胚融解を行う前日に、35mm 径ディッシュに回復培養用培養液で 30  $\mu$ L の微小滴を 5 個作製し、オイルで覆った後（図 4-2）、37 °C、6 %CO<sub>2</sub>、5 %O<sub>2</sub>、89 %N<sub>2</sub> 環境の培養器内で一晩平衡化し、胚融解後の回復培養用ディッシュとした。また、融解液を 37 °C に加温した。

胚融解を行う 30 分前に希釈液、洗浄液 1、洗浄液 2 を冷蔵庫から取り出し室温に戻して使用した。胚融解はメーカーの手順に従い、37 °C に加温した 1.0 mL の融解液を IVF 用 2 ウェルディッシュの内側のウェルに分注し、4 ウェルディッシュの 2 番ウェルに希釈液を 1.0 mL、3 番ウェルに洗浄液 1 を 0.8mL 分注して、残りの洗浄液 1 で 4 ウェルディッシュの中央部に微小滴を作製し、4 番ウェルに洗浄液 2 を 1.0 mL 分注した(8)。液体窒素より取り出した胚凍結デバイスの先端シート部分を即座に融解液内に投入し、シートから胚を剥がした。融解液に投入してから 1 分後に、ガラスピペット先端から約 2 mm 分（約 0.02  $\mu$ L）の融解液と共に胚を希釈液の入ったウェルの底部に排出し、さらに 3 分後、ガラスピペット先端から約 2mm 分（約 0.02  $\mu$ L）の希釈液と共に胚を 4 ウェルディッシュ中央部の洗浄液 1 の微小滴の底部に排出した。この洗浄液 1 内で孵化補助法を全ての融解胚に対して行った。まず、胚をホールディングピペットで固定し、胚の 1 時方向から PZD Needle

(北里コーポレーション) を穿刺し、ホールディングピペットと PZD Needle で透明帯を挟み込み擦り付けるようにしながら透明帯に切れ込みを入れ、最終的には透明帯の半周を切開した。孵化補助法実施後の胚を 3 番ウェルの洗浄液 1 に移動し、初めの洗浄液 1 への浸漬から 5 分後、洗浄液 2 に胚を移動させ、37 °C に設定したヒートプレートによる加温を行った。洗浄液 2 への投入から 5 分後に胚を回復培養用のディッシュに移動し、37 °C、6 %CO<sub>2</sub>、5 %O<sub>2</sub>、89 %N<sub>2</sub> 環境の培養器内で胚移植までの 5 時間、回復培養を行った。

#### 4-2-8. 胚移植

37 °C に加温した 4 mL のハンドリングメディウムを IVF 用 2 ウェルディッシュの内側に 1 mL、外側に 3 mL 分注し、回復培養後の胚をディッシュ外側で洗浄した後に内側のウェルに移した。1mL の注射器で IVF 用 2 ウェルディッシュ外側のハンドリングメディウムを 0.1 mL 吸引し、胚移植用カテーテル (キタザト ET カテーテル、北里コーポレーション) に接続してからハンドリングメディウムを排出し、胚移植用カテーテル内をハンドリングメディウムで満たした後、胚移植用カテーテルの先端から約 2.0 mm 分の空気を吸引し、胚移植用カテーテル先端を IVF 用 2 ウェルディッシュの内側に入

れて、胚移植用カテーテルの先端から約 7.0 mm 分のハンドリングメディウムを吸引し、さらに約 2.0 mm 分の空気を吸引してから約 7.0 mm 分のハンドリングメディウムを胚と共に吸引し、最後に約 2.0 mm 分の空気を吸引した。

(図 4-3)。医師が胚移植用カテーテルを子宮腔に挿入し、ゆっくりと胚を注入した。胚移植の約 2~3 週間後に超音波検査を行い、子宮腔に胎嚢が確認された場合に臨床的妊娠陽性と判定した(9)。胚移植件数あたりの臨床妊娠件数の割合を臨床妊娠率、臨床妊娠件数あたりの流産件数の割合を流産率、胚移植件数あたりの生児出産件数の割合を生産率として算出した。

#### 4-2-9. 統計学的解析

平均値の比較は Welch's t test、割合の比較は Fisher's exact test 用いて両側検定を行った。すべての解析は R software, version 3.5.1 (The R Foundation) を使用し、有意水準を  $p < 0.05$  とした(10)。

## 4-3. 結果

### 4-3-1. 培養成績

胚発生率の比較を表 4-1 に示した。女性平均年齢  $\pm$  標準偏差は ASF1 群が  $36.1 \pm 3.8$  歳、レスキューICSI 群が  $36.3 \pm 4.1$  歳であり、両群間に有意差は認められなかった。胚発生率において両群間で有意差は認められなかった。

### 4-3-2. タイムラプス撮影による胚の形態学的観察

ASF1 胚とレスキューICSI 胚の形態学的発生速度の比較結果を表 4-2 に示した。女性平均年齢  $\pm$  標準偏差は ASF1 群が  $38.0 \pm 3.8$  歳、レスキューICSI 群が  $35.3 \pm 4.4$  歳であり、両群間に有意差は認められなかった。ASF1 群およびレスキューICSI 群の発生速度はそれぞれ、前核形成時間 ( $4.8 \pm 2.2$  vs.  $5.2 \pm 1.9$  時間)、前核消失時間 ( $21.2 \pm 2.9$  vs.  $21.1 \pm 2.7$  時間)、8 細胞到達時間 ( $56.0 \pm 9.1$  vs.  $56.7 \pm 8.7$  時間)、胞胚腔形成時間 ( $93.1 \pm 7.7$  vs.  $95.4 \pm 6.6$  時間)、完全胚盤胞到達時間 ( $102.1 \pm 8.3$  vs.  $104.1 \pm 7.6$  時間) であり、いずれにおいても有意差は認められなかった。

#### 4-3-3. ASFI 使用精子の由来卵子成熟度別の成績比較

ASFI 使用精子の回収由来卵子成熟度（成熟卵、未熟卵あるいは変性卵）別の受精培養結果を表 4-3 に示した。女性平均年齢  $\pm$  標準偏差は成熟卵群が 36.5  $\pm$  3.9 歳、未熟卵群が 35.7  $\pm$  3.8 歳、変性卵群が 34 歳であり、いずれの群間においても有意差は認められなかった。ASFI 実施後いずれの成熟度の卵子透明帯に結合していた精子でも、全て卵細胞膜への接着が確認された。受精率および胚発生率いずれにおいても 3 群間で有意差は認められなかった。

#### 4-3-4. 胚移植結果

胚移植後の結果を表 4-4 に示した。ASFI 群およびレスキューICSI 群の臨床妊娠率は 43.8 % (7/16) および 48.6 % (17/35)、流産率は 14.3 % (1/7) および 23.5 % (4/17)、生産率は 18.8 % (3/16) および 20.0 % (7/35) であり、いずれの妊娠成績においても両群間に有意差は認められなかった。

#### 4-4. 考察

本章では、ASF I およびレスキューICSI 後の胚発生を比較し、タイムラプスインキュベーターを使用してタイムラプス撮影による観察を行った。受精以降の胚発生において、ASF I 群とレスキューICSI 群の間に有意な差は認められなかった。また、回収した透明帯結合精子の由来卵子成熟度別の成績を比較した結果、成熟卵、未熟卵、変性卵にかかわらず透明帯に結合している精子は、ASF I に利用可能であることが明らかとなった。IVF 由来胚と ICSI 由来胚の発生速度を比較した研究によると、初期胚での発生は IVF よりも ICSI 胚のほうが速いという報告や、前核が消失した時間を基準に調べると初期胚の発生速度は変わらないものの、胚盤胞期以降の発生は ICSI よりも IVF 胚の方が速いとの報告など、見解は一致していない(11-13)。本研究で実施した ASF I は、精子と卵細胞膜が融合する点で、従来の ICSI よりも IVF に近い受精方法であるが、ASF I 胚とレスキューICSI 胚の発生速度に有意な差は認められなかった。また、ASF I 由来の胚を移植した 16 例の内 3 例で健児分娩例が報告されたが、検討数が少ないため ASF I の臨床的な有用性を明らかにするためには、さらに検討を重ねる必要がある(9)。

#### 4-5. 引用文献

1. 日本産科婦人科学会登録・調査小委員会. 令和元年度倫理委員会登録・調査小委員会報告（2018年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および2020年7月における登録施設名. 日産婦誌. 2020, vol.72, no.10, p.1229–1249.
2. Veeck LL. Oocyte assessment and biological performance. *Ann N Y Acad Sci.* 1988, vol.541, no.1, p.259–274.
3. Thorir H, Lisbet VL, Gayle J. The blastocyst. *Hum Reprod.* 2012, vol.27, p.i72–i91.
4. Petersen BM, Boel M, Montag M, et al. Development of a generally applicable morphokinetic algorithm capable of predicting the implantation potential of embryos transferred on Day 3. *Hum Reprod.* 2016, vol.31, no.10, p.2231–2244.
5. Diamond MP, Suraj V, Behnke EJ, et al. Using the Eeva Test™ adjunctively to traditional day 3 morphology is informative for consistent embryo assessment within a panel of embryologists with diverse experience. *J Assist Reprod Genet.* 2015, vol.32, p.61–68.

6. Adolfsson E, Porath S, Andershed AN. External validation of a time-lapse model; a retrospective study comparing embryo evaluation using a morphokinetic model to standard morphology with live birth as endpoint. *JBRA Assist Reprod.* 2018, vol.22, no.3, p.205–214.
7. Kuwayama M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology.* 2007, vol.67, no.1, p.73–80.
8. Kitazato Corporation. "Cryotop Safety Kit Protocol". 更新日時2018-02-27. [https://www.kitazato.co.jp/ja/pdf/cryo/cryotop\\_protocol.pdf/](https://www.kitazato.co.jp/ja/pdf/cryo/cryotop_protocol.pdf/) (参照 2020-09-03).
9. Hatakeyama S, Araki Y, Araki Y, et al. First birth following assisted sperm fusion insemination using sperm bound to zona pellucida. *J Assist Reprod Genet.* 2020, vol.37, no.8, p.1849–1851.
10. R Core Team. "R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria". <https://www.R-project.org/>, (参照 2020-09-03).
11. Lemmen JG, Agerholm I, Ziebe S. Kinetic markers of human embryo

- quality using time-lapse recordings of IVF/ICSI-fertilized oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2008, vol.17, no.3, p.385–391.
12. Dal Canto M, Coticchio G, Mignini Renzini M, et al. Cleavage kinetics analysis of human embryos predicts development to blastocyst and implantation. *Reprod Biomed Online*. 2012, vol.25, no.5, p.474–480.
  13. Bodri D, Sugimoto T, Serna JY, et al. Influence of different oocyte insemination techniques on early and late morphokinetic parameters: retrospective analysis of 500 time-lapse monitored blastocysts. *Fertil Steril*. 2015, vol.104, p.1175-1181.

表 4-1. ASFI 胚とレスキューICSI 胚の胚発生率の比較

	ASFI	レスキューICSI	<i>p</i> 値
周期数 (周期)	69	39	
女性平均年齢(歳)	36.1 ± 3.8	36.3 ± 4.1	0.95
受精数 (個)	74	63	
Day3 良好胚率	58.1% (43)	54.0% (34)	0.73
胚盤胞率	64.2% (43)	54.4% (37)	0.29
良好胚盤胞率	40.3% (27)	29.4% (20)	0.21

表 4-2. ASFI 胚とレスキューICSI 胚の形態学的発生速度の比較

	ASFI 胚	レスキューICSI 胚	<i>p</i> 値
観察胚数 (個)	16	20	
女性平均年齢(歳)	38.0 ± 3.8	35.3 ± 4.4	0.10
tPNa (時間)	4.8 ± 2.2	5.2 ± 1.9	0.31
tPNf (時間)	21.2 ± 2.9	21.1 ± 2.7	0.87
t2 (時間)	23.7 ± 3.2	23.6 ± 2.8	0.84
t3 (時間)	34.7 ± 3.5	34.7 ± 3.7	0.98
t4 (時間)	35.4 ± 3.8	35.9 ± 3.5	0.65
t5 (時間)	48.6 ± 5.1	47.8 ± 6.8	0.71
t8 (時間)	56.0 ± 9.1	56.7 ± 8.7	0.83
tSB (時間)	93.1 ± 7.7	95.4 ± 6.6	0.39
tB (時間)	102.1 ± 8.3	104.1 ± 7.6	0.47

tPNa: 前核形成時間、tPNf: 前核消失時間、t2～t8: 2～8 細胞までの発生時間、tSB: 胞胚腔形成時間、tB: 完全胚盤胞到達時間。

表 4-3. ASFI 使用精子の回収由来卵子成熟度（成熟卵、未熟卵あるいは変性卵）別の受精培養結果

	成熟卵	未熟卵	変性卵	<i>p</i> 値
周期数（周期）	58	12	1	
女性平均年齢（歳）	36.5 ± 3.9	35.7 ± 3.8	34	ns
施行卵数（個）	88	16	1	
精子接着率	100% (88)	100% (16)	100% (1)	ns
2 前核率	71.6% (63)	62.5% (10)	100% (1)	ns
1 前核率	4.5% (4)	6.3% (1)	0% (0)	ns
3 前核率	6.8% (6)	12.5% (2)	0% (0)	ns
変性率	0% (0)	0% (0)	0% (0)	ns
Day3 良好胚率	55.6% (35)	70.0% (7)	100% (1)	ns
胚盤胞率	62.7% (37)	71.4% (5)	100% (1)	ns
良好胚盤胞率	39.0% (23)	57.1% (4)	0% (0)	ns

ns: not significant

表 4-4. 胚移植後の妊娠成績

	ASFI	レスキューICSI	<i>p</i> 値
胚移植周期数 (周期)	16	35	
臨床妊娠率	43.8% (7)	48.6% (17)	0.77
流産率	14.3% (1)	23.5% (4)	1.0
生産率	18.8% (3)	20.0% (7)	1.0

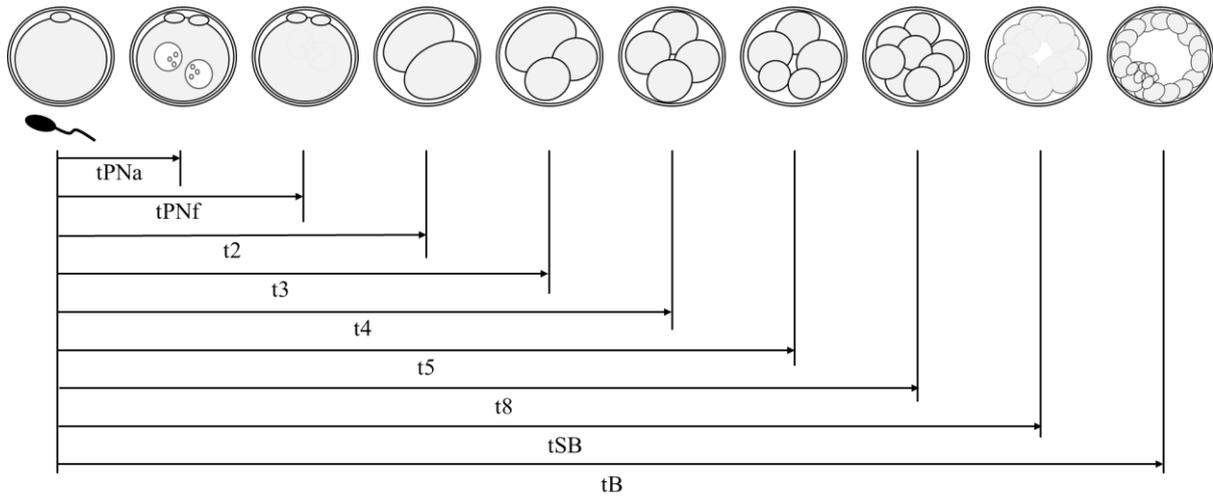


図 4-1. タイムラプス撮影観察による胚形態学的観察時間

ASFI およびレスキューICSI 実施時間を起点として各成長段階への到達時間を記録した。tPNa: 前核形成時間、tPNf: 前核消失時間、t2~8: 2~8 細胞までの発生時間、tSB: 胞胚腔形成時間、tB: 完全胚盤胞到達時間。

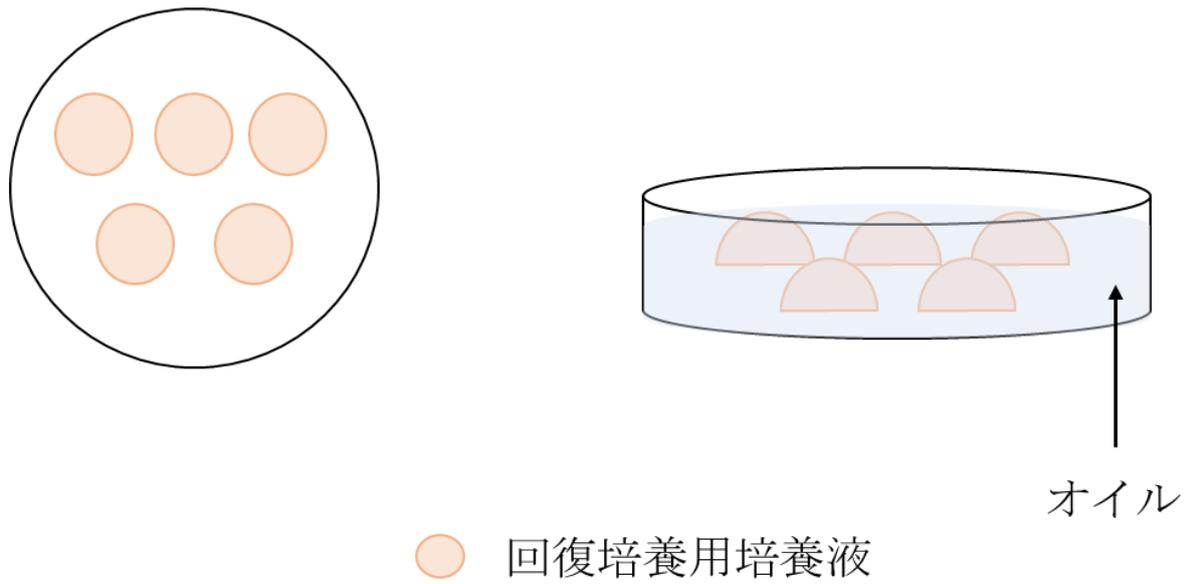


図 4-2. 胚融解後の回復培養用ディッシュ作製方法

35 mm 径ディッシュに、回復培養用培養液で 30  $\mu$ L の微小滴を 5 個作製し、オイルで覆った

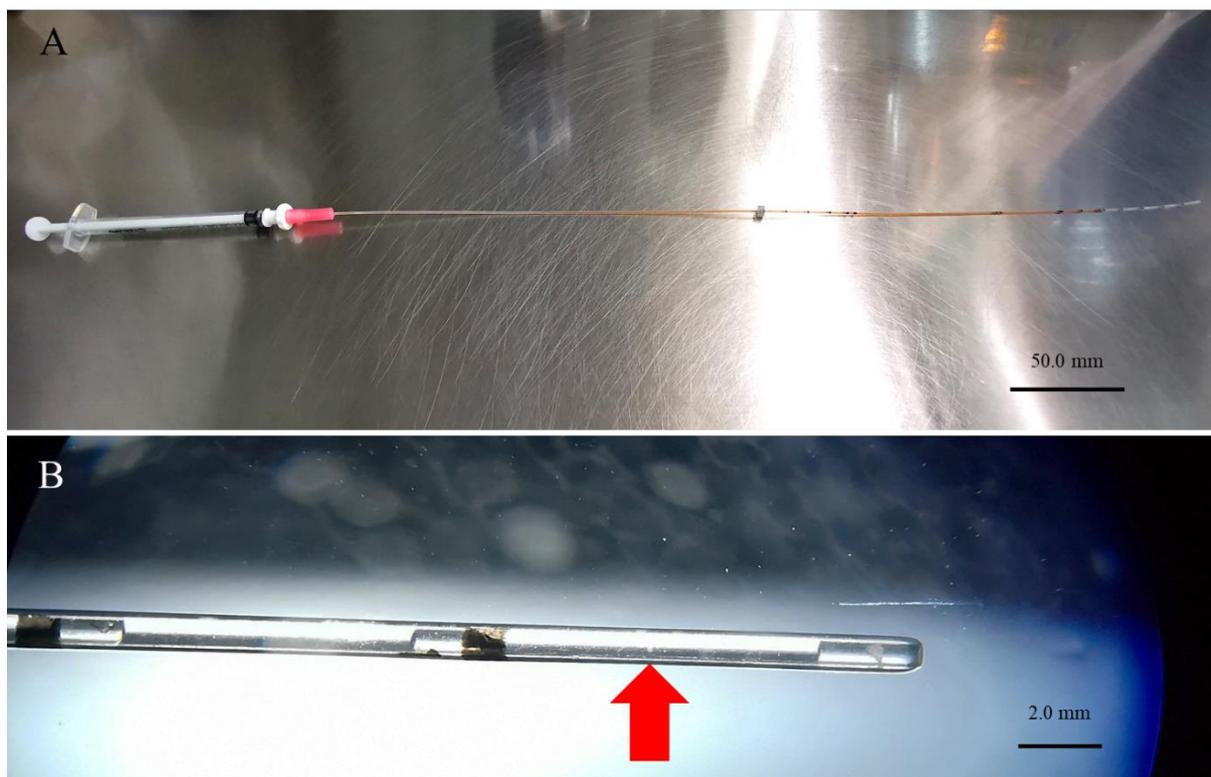


図 4-3. 胚移植カテーテルの胚吸引方法

A: 胚移植用カテーテルに 1 mL の注射器を接続した様子。B: 胚を吸引した後の胚移植用カテーテルの先端拡大図。空気、培養液、空気、胚を含む培養液、空気の順に吸引した。

赤矢印：吸引した胚。

## 第 5 章 総括

本研究において、卵細胞膜を穿破せずに、1 個の精子を卵子との融合によって受精させる顕微授精法の確立に成功した。

精子と卵子を融合させるためには精子が先体反応を起こしている必要がある。現在、人為的な先体反応誘起方法としてはプロゲステロン、Ca イオノフォアである A23187、卵胞液、ペントキシフィリン、カフェイン、triton-X-100 および lysolecithin などを用いる手法が報告されているが、特定の精子に対して高率に先体反応を誘起させる手法はいまだ確立されていない(1-15)。

また、人為的に先体反応を誘起させる処理を加えた結果、先体反応陽性率が低い場合には IVF の受精率が低いという報告があることから、そもそも先体反応を起こすことができない精子も存在している可能性があるため、人為的に先体反応を誘起させる手法を確立させるだけでなく、先体反応を起こした精子か否かを見分ける手法を確立させることも必要である(16)。現状で先体反応の有無を見分けるには、本研究で実施したように精子を何らかの試薬で染色する必要があるが、染色した精子は治療に用いることができない。一方で、先体反応を起こした精子の頭部には CD46 が発現しており、CD46 を認識する MH61 抗体でコーティングしたビーズを利用して先体反応陽性精

子を識別する方法が報告されている(17, 18)。具体的には、MH61 抗体でコーティングされたアクロビーズテスト（扶桑薬品工業）という製品が精子先体状態を検査する目的で利用されているが、本製品はマウス由来のモノクローナル抗体である MH61 を使用しており、異種動物由来の抗体が介在することから、アクロビーズに結合したヒト精子を治療に使用することはできない(19, 20)。そのため、生物由来物を臨床で治療に使用する場合、少なくとも受精を試みる患者の検体を使用することが望ましい。卵細胞膜に接着している精子は全て先体反応を起こしていたという報告から、卵細胞膜の直前に通過する透明帯に結合している精子であれば、先体反応を起こしている可能性が高いのではないかと考え、本研究では透明帯結合精子の先体反応率を検討した(21, 22)。その結果、ICSI に使用するインジェクションピペットを用いて透明帯結合精子を直接回収したところ、98%という高い率で精子が先体反応を起こしていることが明らかとなった。

ICSI が臨床応用される以前は運動精子を囲卵腔に注入する囲卵腔内精子注入法が行なわれていたものの、囲卵腔内精子注入法での受精率は ICSI と比べて有意に低く、その原因の一つとして先体反応を起こしていない精子を囲卵腔に注入していることが考えられたが、先述したように先体反応の有無

を調べるには精子頭部を染色する必要があるため、先体反応を起こした精子を選択して用いることはできない(23)。Kobayashi らはこの問題点を解決するため、マウスをモデルに Ca イオノフォアで精子先体反応を誘起し、1 個の精子による膜融合による顕微授精を試みた(24)。Kobayashi らの報告は、先体反応を誘起した精子を卵細胞膜に押し付けて受精を試みたものであったが、使用された Ca イオノフォアは、先体反応率が約 60 % であり、高率に誘起することができるわけではないことが明らかとなっている(25, 26)。実際、Kobayashi らの報告では囲卵腔内精子注入法よりも受精率は向上したものの、卵細胞膜へ接着したのは Ca イオノフォアで処理した精子の内約 80 % だけであった。一方、本研究では卵細胞膜への接着率は 100 % (105/105) であり、Ca イオノフォアよりも透明帯の方が先体反応誘起方法および先体反応の有無を見分ける方法としては適していると考えられる。また、囲卵腔内精子注入法は運動精子を囲卵腔に注入する方法であることから、注入後の精子が囲卵腔を遊走してしまうため、精子が卵細胞膜に接着する前に運動を停止してしまう可能性も否定できない。通常の IVF では透明帯貫通後の精子は囲卵腔を遊走することなく卵細胞膜と融合することが報告されており、この点も囲卵腔内精子注入法での受精率が低かった要因として考えられる(27)。一方、

ASFI では運動精子が囲卵腔を遊走することなく卵細胞膜に押し付けて接着させるため、1個の精子であっても囲卵腔内精子注入法より高率で受精させることができたと考えられる。しかし、透明帯結合精子は全て卵細胞膜に接着できたものの、受精しない卵子も存在していたことから、透明帯に結合している精子であっても、透明帯構成タンパクである ZP2 や ZP3 などの結合部位によっては先体反応の進行具合が異なることが予想され、そのことが受精の可否を分けている可能性もあるため、さらなる研究が必要である。

透明帯結合精子つまり先体反応を起こした精子を用いた ASFI には、精子以外の物質を卵細胞質内に注入する危険性を回避する利点がある。通常の ICSI では精子以外の物質、例えば精子不動化用培養液である Polyvinylpyrrolidone (PVP) や培養液も一緒に卵細胞質に注入せざるを得ない。精子の運動性を緩慢にし、インジェクションピペットで吸引しやすくするため、PVP 溶液と精子を混和して使用方法が一般的であったが、最近では PVP の卵子内への注入量を減らすケースも増えてきた(28)。しかし、いずれの方法であっても卵子内への PVP の注入を完全になくすことはできていない。PVP を注入することで胎児に影響を与えるという報告や、PVP の濃度が低い方が発生率は向上するという報告もあることから、可能な限り卵子

内への精子以外の物質の注入はなくすべきである(29, 30)。本研究で行った ASFI では、インジェクションピペット内壁への精子の付着防止のために PVP を使用したものの、卵細胞膜と精子頭部との膜融合により受精させたため、PVP の卵細胞質への注入はないと考えられる。また、ASFI では先体反応を起こした精子で受精するため、卵子へ精子先体内物質が注入されることはない。精子先体にはヒアルロニダーゼやアクロシンなどの酵素群が含まれていることから、通常の ICSI の場合では精子と共に先体内酵素も卵子内へ注入されている可能性が高い(13, 31)。3 個までの精子では異常はなかったものの、4 個以上のヒト精子をマウス卵子に注入した場合に変性率の上昇や発生率の低下が認められたことから、卵子へ精子先体内物質を注入することは避けるべきであり、この点に関しても ASFI は通常の ICSI よりも優れていると考えられる(32)。

通常の ICSI では、胚培養士が卵細胞質内に注入する 1 個の精子を形態や運動性を基準に主観で選んでいる。しかし、透明帯に結合した精子を回収して ICSI を行った結果、通常の ICSI と比べ胚発生や着床率が向上したという報告があることから、透明帯に結合した精子は受精に適している可能性がある(33-37)。つまり、胚培養士の主観による精子選別よりも、自然に透明帯に

結合した精子の方が良好な精子であると考えることができる。通常、ICSIに用いる精子を200~400倍の顕微鏡下で選別しているが、光学顕微鏡で精子DNAの状態を判断するのは不可能である上、形態的に良好な精子であってもDNAに障害のある精子も存在し、肉眼的精査ではDNAが正常な精子を選別するのは困難である(38)。しかし、透明帯に結合した精子は高率で正常な二本鎖DNAを持っていたという報告があるため、透明帯に結合した精子を使用するASFJでは、目視により形態で選別された精子を用いるICSIよりも、DNAが正常な精子で受精させられる可能性があると考えている(39)。

ASFJは先体反応を起こした精子で卵細胞膜を穿破することなく受精させる顕微授精法であるが、本研究では先体反応を起こした精子の回収方法として透明帯結合精子を使用した。ASFJを行った卵子透明帯に複数の運動精子が結合している場合、ASFJに使用した精子以外の精子が透明帯に結合したままであるため、押し付けた精子とは別の精子がその後に囲卵腔に進入して受精した可能性を完全には否定できないが、これはレスキューICSIであっても同じである。しかし、ASFJでの多精子受精を減らすためには、IVF後3時間の時点で透明帯に結合している運動精子は全て除去することが理想であり、さらに透明帯結合精子以外での先体反応精子の選別方法を確立する必要

がある。

レスキューICSIはIVF後の卵子に精子注入を行うため、多精子受精の危険性がある。IVFで受精する卵子の90%が6時間後までに第二極体を放出することが報告されており、ChenらはIVFの6時間後にレスキューICSIを行うことで多精子受精の可能性のある3前核率は上昇しなかったと報告しているが、完全に防ぐことはできていないため、人為的に多精子受精を起こしてしまうことは避けなければならない(40-42)。本来、卵子には多精子受精を防ぐ機構が備わっており、第一段階の反応として膜反応があげられ、この反応は精子が卵細胞膜に接着すると即座に起こり、その後の精子進入を阻止する(43, 44)。第二の機構は透明帯反応であり、精子が卵細胞膜に接着するとカルシウムオシレーションが誘導され卵細胞質内での $Ca^{2+}$ の上昇が起こり、それがトリガーとなって卵細胞膜直下の酵素群が囲卵腔に放出され、この酵素群が透明帯の構造を変化させてそれ以降の精子進入を防ぐ(45, 46)。しかし、レスキューICSIでは人為的に精子を卵細胞質内に注入するため、これらの多精子受精防御機構は意味を成さない。一方で、ASF1は精子を卵細胞膜に押し付け受精させるため、既に精子が卵細胞質内に進入していると多精子受精防御機構、特に膜反応の働きにより精子は卵細胞膜と融合することがで

きず、多精子受精を回避することが可能と考えられる。実際、本研究では有意差は認められなかったものの、レスキューICSI と比べ ASFI の方が多精子受精の可能性のある 3 前核胚率は低い傾向にあった。したがって、多精子受精防御という点においてもレスキューICSI より ASFI は優れた受精方法であると言える。

本研究で行った ASFI では透明帯に運動精子が結合している必要があったため、対象卵の透明帯に運動精子が結合していない場合は、同一患者の未熟卵もしくは変性卵の透明帯に結合している運動精子を使用して ASFI を行った。成熟卵である対象卵と比較して、未熟卵および変性卵いずれの透明帯結合精子を使用しても卵細胞膜への接着率や受精・発生成績に有意差は認められなかった。未熟卵の透明帯結合精子は成熟卵の透明帯結合精子と同様に正常な形態や正常な DNA を持っていることが確認されており、ASFI においても未熟卵の透明帯結合精子が成熟卵の透明帯結合精子と同様に使用できると思われる(21, 39, 47)。

顕微授精の治療に対して心理的に抵抗のある夫婦は 45 %に及ぶとの報告があり、実際に臨床の場において、「夫婦以外の第三者の手が加わるのが嫌だ」、「卵子に針を刺すことが怖い」、「将来の子供への影響が心配」という

患者からの声を聞くことがある(48)。実際、IVFを行うには精子の数が少なく顕微授精の適応になる患者においても、あえてIVFを希望する例も少なくない。そのため、ASF Iのように1個の精子で卵子の実質細胞に直接微細ガラス管を刺すことなく受精させられる顕微授精法の確立は、このような患者への精神的負担を軽減することにもつながると期待している。

最後になるが、本研究では患者の同意のもとでASF I胚を移植して、3症例で健児が得られた(49)。症例数が少なく、レスキューICSIと比較して妊娠成績での有意差は認められなかったため、ASF Iの臨床的な有用性を確認するためにさらなる検討を考えている。

## 結論

透明帯結合精子をインジェクションピペットで回収し、これらの精子が高率で先体反応を起こしていることを明らかにした。また、透明帯結合精子を使用して、卵細胞膜を穿破することなく、より自然に近い状態で受精させる顕微授精法であるASF Iを確立させ、レスキューICSIと同等の受精率および発生率であることを確認した。さらに、症例数は少ないものの3例の生児獲得例が得られた。従来のICSIに代わる顕微授精法として広く臨

床応用されるためには、解決すべき問題点が存在するものの、ASFIの確立は不妊治療、特に生殖補助医療の発展において大きな一歩をもたらすものであると考えている。

## 引用文献

1. Sagare-Patil V, Galvankar M, Satiya M, et al. Differential concentration and time dependent effects of progesterone on kinase activity, hyperactivation and acrosome reaction in human spermatozoa. *Int J Androl*. 2012, vol.35, no.5, p.633–644.
2. Sagare-Patil V, Bhilawadikar R, Galvankar M, et al. Progesterone requires heat shock protein 90 (HSP90) in human sperm to regulate motility and acrosome reaction. *J Assist Reprod Genet*. 2017, vol.34, no.4, p.495–503.
3. Aitken RJ, Thatcher S, Glasier AF, et al. Relative ability of modified versions of hamster oocyte penetration test, incorporating hyperosmotic medium or the ionophore A23187, to predict IVF outcome. *Hum Reprod*. 1987, vol.2, no.3, p.227–231.
4. Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, et al. A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge: relationship to fertility and other seminal parameters. *J Androl*. 1991, vol.12, no.2, p.98–103.
5. Pampiglione JS, Tan SL, Campbell S. The use of the stimulated acrosome reaction test as a test of fertilizing ability in human spermatozoa. *Fertil*

- Steril. 1993, vol.59, no.6, p.1280–1284.
6. Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL. Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: A prospective, double-blind, randomized controlled study. Fertil Steril. 1994, vol.61, no.5, p.902–910.
  7. Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, et al. Predicting the fertilizing potential of human sperm suspensions in vitro: Importance of sperm morphology and leukocyte contamination. Fertil Steril. 1995, vol.63, no.6, p.1293–1300.
  8. Calvo L, Vantman D, Banks SM, et al. Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis. Fertil Steril. 1989, vol.52, no.6, p.1048–1054.
  9. Calvo L, Dennison-lagos L, Banks SM, et al. Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success at in-vitro fertilization. Hum Reprod. 1994, vol.9, no.10, p.1880–1886.
  10. Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, et al. Pentoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro. Hum Reprod. 1993, vol.8, no.12, p.2102–2107.

11. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Effects of phosphodiesterase inhibitors caffeine and pentoxifylline on spontaneous and stimulus-induced acrosome reactions in human sperm. *Fertil Steril*. 1992, vol.58, no.6, p.1185–1190.
12. Morozumi K, Shikano T, Miyazaki S, et al. Simultaneous removal of sperm plasma membrane and acrosome before intracytoplasmic sperm injection improves oocyte activation/embryonic development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006, vol.103, no.47, p.17661–17666.
13. Patrat C, Serres C, Jouannet P. The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol cell*. 2000, vol.92, no.3–4, p.255–266.
14. Harper C V., Barratt CLR, Publicover SJ, et al. Kinetics of the Progesterone-Induced Acrosome Reaction and Its Relation to Intracellular Calcium Responses in Individual Human Spermatozoa. *Biol Reprod*. 2006, vol.75, no.6, p.933–939.
15. Harper C V., Cummerson JA, White MRH, et al. Dynamic resolution of acrosomal exocytosis in human sperm. *J Cell Sci*. 2008, vol.121, no.13, p.2130–2135.
16. Xu F, Guo G, Zhu W, et al. Human sperm acrosome function assays are

- predictive of fertilization rate in vitro: A retrospective cohort study and meta-analysis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2018, vol.16, no.1, p.81.
17. Okabe M, Ying X, Nagira M, et al. Homology of an acrosome-reacted sperm-specific antigen to CD46. *J Pharmacobiodyn*. 1992, vol.15, no.8, p.455–459.
  18. Ohashi K, Saji F, Wakimoto A, et al. Selection of acrosome-reacted sperm with MH61-immunobeads. *J Androl*. 1994, vol.15, no.1, p.78–82.
  19. Ohashi K, Saji F, Kato M, et al. Acrobeads test: A new diagnostic test for assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril*. 1995, vol.63, no.3, p.625–630.
  20. Sharma RK, Padron OF, Agarwal A. Usefulness of the acrobead test in evaluating human acrosome function in fresh and cryopreserved sperm. *J Urol*. 1997, vol.157, no.5, p.1692–1696.
  21. Liu DY, Baker HWG. Acrosome status and morphology of human spermatozoa bound to the zona pellucida and oolemma determined using oocytes that failed to fertilize in vitro. *Hum Reprod*. 1994, vol.9, no.4, p.673–679.

22. Kim E, Yamashita M, Kimura M, et al. Sperm penetration through cumulus mass and zona pellucida. *Int J Dev Biol.* 2008, vol.52, no.5–6, p.677–682.
23. Palermo G, Joris H, Derde M-P, et al. Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1993, vol.59, no.4, p.826–835.
24. Kobayashi K, Okuyama M, Fujimoto G, et al. Subzonal insemination with a single spermatozoon using manipulation assisted sperm adhesion onto the ooplasmic membrane in mouse ova. *Mol Reprod Dev.* 1992, vol.31, no.3, p.223–229.
25. Köhn FM, Mack SR, Schill WB, et al. Detection of human sperm acrosome reaction: Comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy. *Hum Reprod.* 1997, vol.12, no.4, p.714–721.
26. Jaiswal BS, Eisenbach M, Tur-Kaspa I. Detection of partial and complete acrosome reaction in human spermatozoa: Which inducers and probes to use? *Mol Hum Reprod.* 1999, vol.5, no.3, p.214–219.
27. Mio Y, Maeda K. Time-lapse cinematography of dynamic changes occurring

- during in vitro development of human embryos. *Am J Obstet Gynecol.* 2008, vol.199, no.6, p.660.e1-5.
28. Roychoudhury S, Maldonado-Rosas I, Agarwal A, et al. Human sperm handling in intracytoplasmic sperm injection processes: In vitro studies on mouse oocyte activation, embryo development competence and sperm oxidation–reduction potential. *Andrologia.* 2018, vol.50, no.4, p.e12943.
  29. Feichtinger W, Obruca A, Brunner M. Sex chromosomal abnormalities and intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 1995, vol.346, no.8989, p.1566.
  30. Ding D, Wang Q, Li X, et al. Effects of different polyvinylpyrrolidone concentrations on intracytoplasmic sperm injection. *Zygote.* 2020, vol.28, no.2, p.148–153.
  31. Takeuchi T, Colombero LT, Neri Q V, et al. Does ICSI require acrosomal disruption? An ultrastructural study. *Hum Reprod.* 2004, vol.19, no.1, p.114–117.
  32. Morozumi K, Yanagimachi R. Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005, vol.102, no.40,

p.14209–14214.

33. Liu DY, Bourne H, Baker HWG. Fertilization and pregnancy with acrosome intact sperm by intracytoplasmic sperm injection in patients with disordered zona pellucida-induced acrosome reaction. *Fertil Steril.* 1995, vol.64, no.1, p.116–121.
34. De Almeida Ferreira Braga DP, Iaconelli A, De Cássia Sávio Figueira R, et al. Outcome of ICSI using zona pellucida-bound spermatozoa and conventionally selected spermatozoa. *Reprod Biomed Online.* 2009, vol.19, no.6, p.802–807.
35. Black M, Liu DY, Bourne H, et al. Comparison of outcomes of conventional intracytoplasmic sperm injection and intracytoplasmic sperm injection using sperm bound to the zona pellucida of immature oocytes. *Fertil Steril.* 2010, vol.93, no.2, p.672–674.
36. Liu F, Qiu Y, Zou Y, et al. Use of zona pellucida-bound sperm for intracytoplasmic sperm injection produces higher embryo quality and implantation than conventional intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2011, vol.95, no.2, p.815–818.

37. Jin R, Bao J, Tang D, et al. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection using the zona pellucida-bound sperm or manually selected sperm. *J Assist Reprod Genet.* 2016, vol.33, no.5, p.597–601.
38. Papaligoura Z, Panopoulou-Maratou O, Solman M, et al. Cognitive development of 12 month old Greek infants conceived after ICSI and the effects of the method on their parents. *Hum Reprod.* 2004, vol.19, no.6, p.1488–1493.
39. Liu DY, Baker HWG. Human sperm bound to the zona pellucida have normal nuclear chromatin as assessed by acridine orange fluorescence. *Hum Reprod.* 2007, vol.22, no.6, p.1597–1602.
40. Nagy ZP, Liu J, Joris H, et al. Fertilization and early embryology: Time-course of oocyte activation, pronucleus formation and cleavage in human oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1994, vol.9, no.9, p.1743–1748.
41. Payne D, Flaherty SP, Barry MF, et al. Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod.* 1997, vol.12, no.3, p.532–541.

42. 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, vol.18, no.10, p.2118–2121.
43. Gould-Somero M, Jaffe LA, Holland LZ. Electrically mediated fast polyspermy block in eggs of the marine worm, *Urechis caupo*. *J Cell Biol.* 1979, vol.82, no.2, p.426–440.
44. Jaffe LA, Gould-Somero M, Holland LZ. Studies of the mechanism of the electrical polyspermy block using voltage clamp during cross-species fertilization. *J Cell Biol.* 1982, vol.92, no.3, p.616–621.
45. Gwatkin RB, Williams DT, Hartmann JF, et al. The zona reaction of hamster and mouse eggs: production in vitro by a trypsin-like protease from cortical granules. *J Reprod Fertil.* 1973, vol.32, no.2, p.259–265.
46. Miller DJ, Gong X, Decker G, et al. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. *J Cell Biol.* 1993, vol.123, no.6 I, p.1431–1440.
47. Liu DY, Garrett C, Baker HWG. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in in vitro fertilization-embryo transfer and

intracytoplasmic sperm injection programs. *Fertil Steril*. 2004, vol.82, no.5, p.1251–1263.

48. 門尾, 三城子. 生殖補助医療における患者の倫理観と葛藤: 患者アンケートからの考察. *医療・生命と倫理・社会*. 2012, no.11, p.33–48.
49. Hatakeyama S, Araki Y, Araki Y, et al. First birth following assisted sperm fusion insemination using sperm bound to zona pellucida. *J Assist Reprod Genet*. 2020, vol.37, no.8, p.1849–1851.

## 謝辞

本研究の実施の機会を与えていただき、その遂行および本論文を作成するにあたり、終始ご指導、ご助言をくださいました群馬パース大学大学院保健科学研究科教授荒木康久先生に深く感謝申し上げます。

また、本研究についてのご助言や論文作成にあたり、お忙しい中細部にわたってご指導いただきました群馬パース大学保健科学部検査技術学科講師荒木泰行先生に深く感謝申し上げます。

また、本論文の作成にあたり中間審査および最終審査では、主査の群馬パース大学保健科学部検査技術学科教授木村博一先生、副査の群馬パース大学保健科学部検査技術学科教授古田島伸雄先生、群馬パース大学保健科学部検査技術学科講師木村鮎子先生より、細部にわたって貴重なご指導とご助言を賜りました。心より感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、施設やデータの提供とご支援をいただきました医療法人社団守巧会理事長矢内原敦先生、矢内原ウィメンズクリニック院長黄木詩麗先生に心より感謝申し上げます。

また、本研究を遂行するにあたり、サポートをしていただきました矢内原ウィメンズクリニックの職員皆様に感謝申し上げます。

## 資料 1. 用語集

**1 前核**：卵子内に 1 個の前核がある状態。正常受精な場合と異常受精な場合がある。

**2 前核**：卵子内に 2 個の前核がある状態。正常受精と判断できる。

**3 前核**：卵子内に 3 個の前核がある状態。多精子受精などの異常受精と判断できる。

**ART キャピラール**：遠心分離後の沈殿した濃縮精子を回収する器具。

**Ca イオノフォア**：細胞膜のカルシウムイオンの透過性を亢進する物質。

**FITC-PNA**：Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin. 先体外膜の糖鎖に特異的に結合するレクチンを使用した蛍光標識試薬。

**Gardner 分類**：胚盤胞の胞胚腔の拡張具合、細胞数に基づく胚評価方法。

**Lysolecithin**：界面活性剤。

**PI**：Propidium iodide. 死細胞の核酸染色色素。

**PZD Needle**：Partial zona dissection needle. 孵化補助法に用いられる、透明帯を切開するためのガラス針。

**Swim up 法**：精子の運動性を利用し、運動性の高い精子を選別する方法。

**Triton-X-100**：非イオン系界面活性剤。

**Veck 分類**：初期胚の細胞の数、均一性、細胞が断片化したフラグメントの量に基づく胚評価方法。

**ZP1-ZP4**：透明帯（zona pellucida）を構成する糖タンパク。

**異常受精**：IVF や ICSI 実施後、卵子内に 3 個以上の前核が確認できた場合。

**囲卵腔**：卵細胞と透明帯との間隙。

**囲卵腔精子注入法**：囲卵腔に運動精子を注入し、受精させる顕微授精方法。

**インジェクションピペット**：卵子に精子を注入する際に用いられる微細なガラス管。

**ガラス化凍結**：細胞内の水分を結晶化させずに凍結する手法。

**カルシウムオシレーション**：精子進入により卵子内で起こるカルシウムイオン濃度の反復した上昇・下降の振動。これにより受精が進行する。

**極体**：減数分裂に伴い、卵細胞外に放出された半分の染色体を含む細胞。

**顕微授精**：倒立顕微鏡に設置された微細操作用機器（マニピュレーションシステム）を使用し、受精させる方法。

**初期胚**：受精後 1 日目～3 日目の胚。

**精子運動解析装置**：Sperm Motility Analysis System. 顕微鏡に取りつけたカメラにより、自動で精子濃度や運動率を測定する機器。

**精子計算盤**：Makler<sup>®</sup> Counting Chamber. 精液を希釈せずに精子濃度および運動率が測定可能な計算盤。

**精子先体**：精子頭部先端を覆い、内部に種々の酵素を含む。

**精子不動化用培養液**：Polyvinylpyrrolidone (PVP). 精子の運動を緩慢にし、ICSI を行う際、精子の操作を容易にする働きと、インジェクションピペットに精子が付着するのを防ぐ働きがある。

**生殖補助医療**：体外で受精させ、受精卵を子宮に移植する一連の治療とその付随技術を用いた医療。

**先体反応**：先体外膜と内膜の融合により生じた間隙より内部の酵素群を放出する反応。

**前培養**：採卵後、IVF もしくは ICSI 実施までの培養。

**第一極体**：第一減数分裂の際に放出される 2 倍体の染色体を含む細胞。第一極体が放出されると成熟卵となる。

**体外受精**：In vitro fertilization (IVF). 同一ディッシュ内に卵子と精子を入れ、自然に近い状態で受精させる方法。

**第二極体**：第二減数分裂の際に放出される半数体の染色体を含む細胞。受精前の卵子は第二減数分裂中期で停止しており、精子進入によって減数分裂が再開し、第二極体が放出される。

**胎嚢**：胎児を包む嚢状物。

**タイムラプスインキュベーター**：カメラと培養器が一体となった機器。培養しながら卵子や胚の状態が観察可能。

**透明帯**：卵細胞を取り囲む糖タンパクで構成された膜様物質。

**胚**：受精卵。

**胚移植**：胚を体内に注入すること。

**媒精**：IVF もしくは ICSI を実施することによって卵子と精子を受精させる作業。

**胚盤胞**：受精後 5 日目～6 日目の胚で、胚の中心に腔が出現した状態。

**発生**：胚が細胞分裂をし、成長すること。

**ピエゾ ICSI**：特別な装置を用いた微細な振動によって、透明帯及び卵細胞膜を穿破する ICSI 方法。

**孵化補助法**：人為的に透明帯の一部を切開し、内部の胚細胞が透明帯外に脱出するのを補助する手法。

**不動化**：精子尾部をインジェクションピペットで押さえ付け、精子尾部の細胞膜を破壊する操作。ICSI で受精させるために必須となっている。

**フラグメンテーション**：細胞が分裂する際に細胞質が断片化することで生じる、核を含まない物質。

**プロゲステロン**：排卵後の卵巣に形成される黄体から放出されるホルモン。

**変性**：卵細胞膜が破壊され細胞死した状態。

**ペントキシフィリン**：ホスホジエステラーゼ阻害薬。精子の運動性を向上させる効果がある。

**乏精子症**：精液 1mL あたりの精子濃度が 1500 万個未満の症例。

**胞胚腔**：胚盤胞の中央部に存在する細胞がなく、水分が貯留した空間。

**ホールディングピペット**：ICSI の際、卵子を保持するために使用するガラス管。

**マイクロマニピュレーションシステム**：ICSI などの顕微操作を実施するための微細操作用機器。

**未熟卵**：囲卵腔に極体が認められない卵子。

**未受精**：IVF や ICSI 実施後、卵子内に前核が確認できない状態。

**密度勾配遠心法**：密度勾配試薬と精子の密度の違いを利用し、密度の高い精子を選別する手法。

**卵丘細胞**：排卵時に透明帯の周囲に多数存在している直径約 10 $\mu$ m の細胞。

**卵丘-卵子複合体**：卵子とそれを取り囲む多数の卵丘細胞群。

**卵細胞質内精子注入法**：Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)。微細なガラス管で 1 個の精子を卵子に注入する受精方法。

**卵胞液**：卵子が含まれる卵巣内の胞状物質（卵胞）中の貯留液。

## 資料 2. 培養液等の組成

本研究で使用した培養液等の組成を以下に記した。詳細な量や割合は公表されていないため、試薬名のみを列記した。

### **HTF Medium**

塩化ナトリウム

塩化カリウム

硫酸マグネシウム

塩化カルシウム

重炭酸ナトリウム

グルコース

ピルビン酸ナトリウム

乳酸ナトリウム

ゲンタマイシン硫酸塩

フェノールレッド

### **Serum substitute supplement**

ヒト血清グロブリン

ヒト血清アルブミン

### **90 % Isolate<sup>®</sup> Stock solution**

塩化ナトリウム

塩化カリウム

硫酸マグネシウム

リン酸カリウム

塩化カルシウム

重炭酸ナトリウム

### **HEPES**

グルコース

ピルビン酸ナトリウム

乳酸ナトリウム

コロイダルシリカ

## **MHM™**ハンドリングメディウム

塩化ナトリウム

塩化カリウム

硫酸マグネシウム

リン酸カリウム

塩化カルシウム

グリシン

タウリン

ゲンタマイシン硫酸塩

フェノールレッド

重炭酸ナトリウム

**HEPES**

**MOPS**

乳酸ナトリウム

グルコース

ピルビン酸ナトリウム

## **Universal IVF Medium**

塩化カルシウム

ゲンタマイシン硫酸塩

グルコース

ヒト血清アルブミン

硫酸マグネシウム

フェノールレッド

塩化カリウム

重炭酸ナトリウム

塩化ナトリウム

リン酸ナトリウム

ピルビン酸ナトリウム

## **global® total®**

生理食塩

エネルギー基質

pH 緩衝剤

必須アミノ酸

グルタミンジペプチド

ヒト血清アルブミン

ヒト血清グロブリン

EDTA

フェノールレッド

ゲンタマイシン

1 . 主論文（博士論文）

Shota Hatakeyama, Yasuyuki Araki, Shirei Ohgi, Atsushi Yanaihara, Yasuhisa Araki. Fertilization with human sperm bound to zona pellucida by pressing onto the oocyte membrane. *Human Cell*. 2020, 33, 3, p.521-527.

2 . 副論文

Shota Hatakeyama, Yasuyuki Araki, Yasuhisa Araki, Shirei Ohgi, Atsushi Yanaihara. First birth following assisted sperm fusion insemination using sperm bound to zona pellucida. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2020, 37, 8, p.1849-1851.

