

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

旭川医科大学研究フォーラム (2001) 2巻1号:46-55.

マウス卵細胞質内精子注入(ICSI)法を用いたヒト精子染色体研究法の確立

渡邊誠二, 上口勇次郎

投稿論文 (原著・査読済)

マウス卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いた ヒト精子染色体研究法の確立

渡邊 誠二* 上口 勇次郎*

【要 旨】

卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いたヒト精子染色体分析法の確立を目的に以下の検討を行った。すなわち、ICSI法を用いたヒト精子染色体分析法において十分な染色体分析効率が得られるか、採取からICSI操作までに起こる精子・卵子のエイジングが卵の発生率や精子の染色体異常率に影響しないか、の2点である。33頭の雌マウスから得られた965個の未受精卵にICSI法を用いて正常ヒト精子を注入し、得られた胚を第一卵割中期まで培養して染色体標本を作製した。その結果、使用した卵の49.4%で染色体分析が可能であった。この値は以前の研究と比較しても遜色はなく、ICSI法を用いて十分に効率的なヒト精子染色体分析が可能であった。今回、精子と卵はICSI操作までの間最長3時間培養液中に保存され、エイジングを起こした。エイジングの長さが異なる5群 (0~30、30~60、60~90、90~120、120~180分) 間で卵の発生率および精子の構造的染色体異常出現率を比較した結果、エイジングの影響は認められなかった。以上の二つの結果から卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いたヒト精子染色体分析法はヒト精子染色体研究に有効と考えられる。

キーワード 染色体異常、ヒト精子、マウス卵子、卵細胞質内精子注入法

緒 言

1995年、Kimura and Yanagimachi¹⁾は卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いて効率良くマウス受精卵を作出する方法を報告した。その結果、それまで透明帯除去ハムスター卵との体外受精 (IVF) 法が唯一の手段であったヒト精子染色体分析にICSIという新たな手法が利用可能となった。ICSI法を用いてヒト精子染色体研究を行う意義としては次の点があげられる。一つめには、近年、生殖医療において不妊患者の治療にICSI法が導入されるようになったことで、ICSI法で作出した胚に予想される遺伝的リスクを明らかにする必要性が生じたことである。二つ目には、ICSI法の場合、微細なピペットを用いて精子を直接卵細胞質内に注入するため、IVFでは受精が難しいと思われる運動能をもたない精子や奇形をもった精子を受精させ、それらの染色体を分析できるという利点がある。すなわ

ち、精子の個別的特徴と染色体異常の関連を調査できる。一方で、ICSI法では卵細胞に微細なピペットを刺すためにある程度の割合で卵が破損するのは避けられない。また、破損する卵の割合はICSI技術の上達率によっても大きく変わってくる。この点は精子染色体の分析効率に影響する要因となりうる。さらに、ICSI法では精子を卵子に一つ一つ注入していくため、多数の受精卵を作出するには相当の時間を要する。その結果、採取した精子と卵子はICSIに使用するまでの間に培養液中でエイジングを起こすことになる。配偶子のエイジングが受精卵の発生異常や染色体異常を誘発することはよく知られており、この点は正確な染色体分析を妨げる恐れがある。そこで、今回、ICSI法を用いてヒト精子染色体分析を行い、上述の問題点について検証し、ICSI法を用いたヒト精子染色体分析がヒト精子染色体研究法として有効か否かを検討した。

* 旭川医科大学 生物学

材料および方法

1. 培養液

卵子の採取、ヒアルロニダーゼ (Sigma) の溶解およびICSI操作にHEPES-CZB液¹⁾を用いた。一方、ヒト精子の洗浄および精子懸濁液の調製用には、ヒト精子染色体研究に由来から一般的に用いられている0.3%HSA添加BWW液²⁾に20mM HEPESを加えた溶液 (HEPESB-BWW液; 表1)を用いた。ICSIの際の精子不動化処理にはDulbeccoのリン酸緩衝液 (PBS)³⁾にポリビニルピロリドン (PVP, Sigma) を10%添加した溶液を用いた。マウス未受精卵の保存およびICSI後の卵の培養にはCZB液^{4) 5)}を用いた。あらかじめCZB液のドロップ (0.2ml) を35mmペトリ皿の底に4個作り、パラフィンオイルで覆った後、37°C、5%CO₂の条件の培養器内で平衡化しておいた。

表1 HEPES-BWW液の組成

成分	100 ml 中の量
0.05%フェノールレッド	0.4 ml
乳酸ナトリウム (60%)	0.37 ml
ペニシリンGカリウム	10,000 IU
NaHCO ₃	42.0 mg
NaCl	554.0 mg
KCl	35.6 mg
CaCl ₂	18.9 mg
KH ₂ PO ₄	16.2 mg
MgSO ₄ ・7H ₂ O	29.4 mg
グルコース	100.0 mg
ビルビン酸ナトリウム	2.8 mg
ストレプトマイシン	5.0 mg
HEPES-Na	520.6 mg
HSA	0.3 g

2. 装置

ホフマン微分干渉装置付き倒立顕微鏡 (オリンパス IX-70; Fig. 1, 1) に三次元ジョイスティック型マイクロマニピュレーター (ナリシゲ; Fig. 1, 2) を組み込み、2組のピペットホルダー (精子注入用および卵子保持用) を装着した。精子操作側のピペットホルダー (ライツ; Fig. 2, 1) にはピエゾドライブユニットシステム (プライムテック; Fig. 2, 2) を装着した。ガスタイトシリンジ (ハミルトン) を取り付けした2本のマイクロインジェクター (Fig. 1, 3) と精子注入用

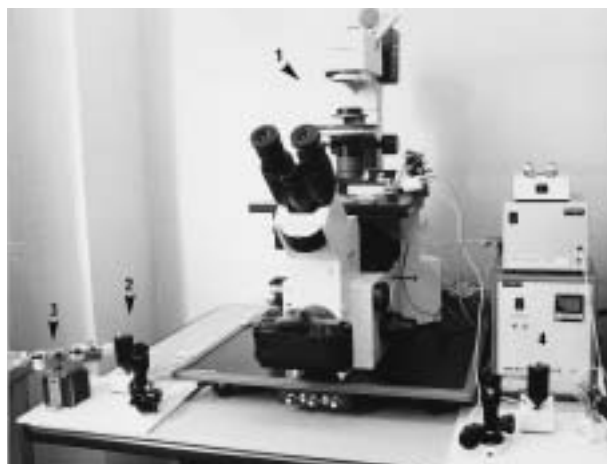


Fig. 1 ICSI装置(全体像)

1. ホフマン微分干渉装置のついた倒立顕微鏡
2. 三次元ジョイスティック型マイクロマニピュレーター
3. ガスタイトシリンジを採用したマイクロインジェクター
4. マイクロ冷却装置

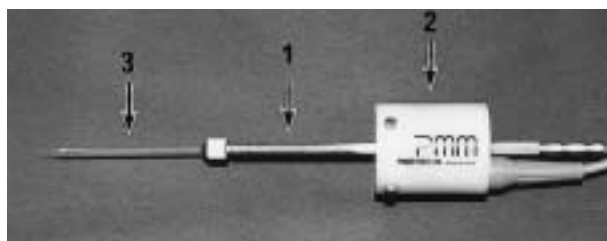


Fig. 2 ピエゾドライブユニット(2)を装着した精子注入用ピペットホルダー(1)に接続した精子注入用ピペット(3)

および卵子保持用ピペットをそれぞれポリエチレンチューブ (蒸留水入り) で接続し、ピペットホルダーに装着した。顕微鏡ステージ上には18°Cに設定したマイクロ冷却装置 (北里サプライ; Fig. 1, 4) を接続したクールプレートを装着した。

3. ICSI用ガラスピペットの作製

ガラス毛细管 (サッター社, B100-75-10) をサッター社製マイクロピペット作製装置 (Fig. 3) で加熱牽引 (Heat: 790, Pull: 50, Vel: 130, Time: 200) し、精子注入用および卵子保持用ピペットの原型を作製した。原型の先端部 (Fig. 4, a) をマイクロフォーシ (Fig. 5) を用いて外径約4 μmに加工した後 (Fig. 4, b)、ICSIの際の卵へのダメージを少なくするため25%フッ化水素酸 (ナカライテスク) で数秒間処理して先端部の管壁を薄くした。蒸留水で洗浄後、ピペット後端に水銀 (ナカライテスク) を約5 μl注入して精子注入用ピペットとした。一方、原型の先端をマイクロフォーシを用いて外径80~100 μm、内径8~10 μmに加工したものを卵子保持用ピペットとした (Fig. 4, c)。



Fig. 3 サッター社製マイクロピペット作製装置

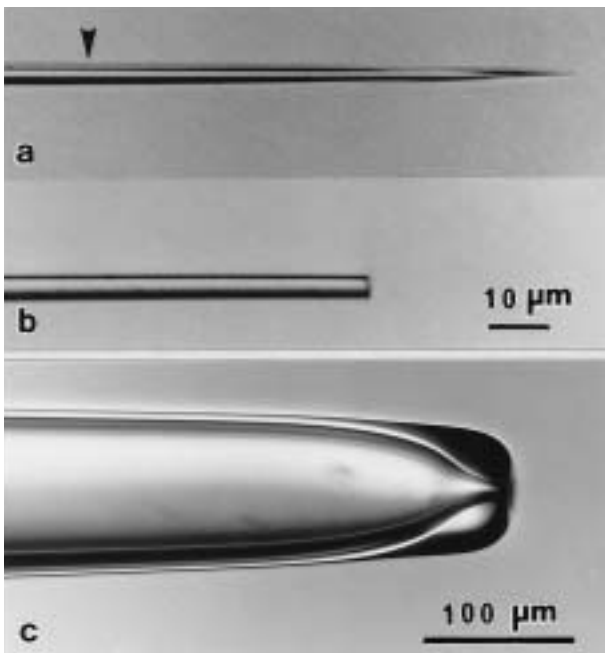


Fig. 4 ICSI用ピペットの作製
 a. ピペット原型の先端拡大図
 b. 精子注入用ピペットの先端拡大図. 原型の先端をaの矢印部分でマイクロフォージにより切り落とした状態
 c. 卵子保持用ピペットの先端拡大図

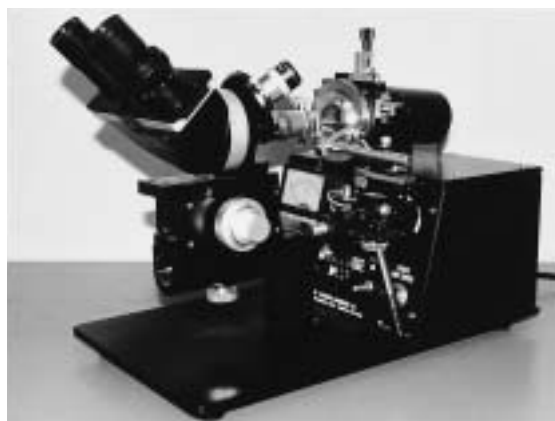


Fig. 5 マイクロフォージ

4. ICSI用チャンバーの準備

ICSI操作のために10cmプラスチック皿の上蓋中央に4種類の溶液ドロップ（10%PVP溶液、精子選別用精子懸濁液、10%PVP溶液、HEPES-CZB液）を直線的に並べ、ミネラルオイルで覆ったチャンバーを準備した(Fig. 6)。最初の10%PVP溶液は精子注入用ピペットの洗浄用、次の10%PVP溶液は精子の不動化処理用、最後のHEPES-CZB液はICSI操作用である。このチャンバーは使用直前に準備し、倒立顕微鏡のステージ上にセットした。

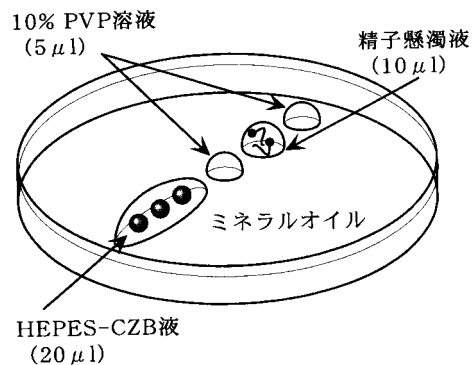


Fig. 6 ICSI用チャンバーの模式図. 10cmプラスチック皿の上蓋を利用

5. ヒト精子のマウス卵へのICSI

ICSI操作はKimura and Yanagimachi¹⁾の方法に修正を加えて行った。実験手順の概略とスケジュールをFig. 7に示した。

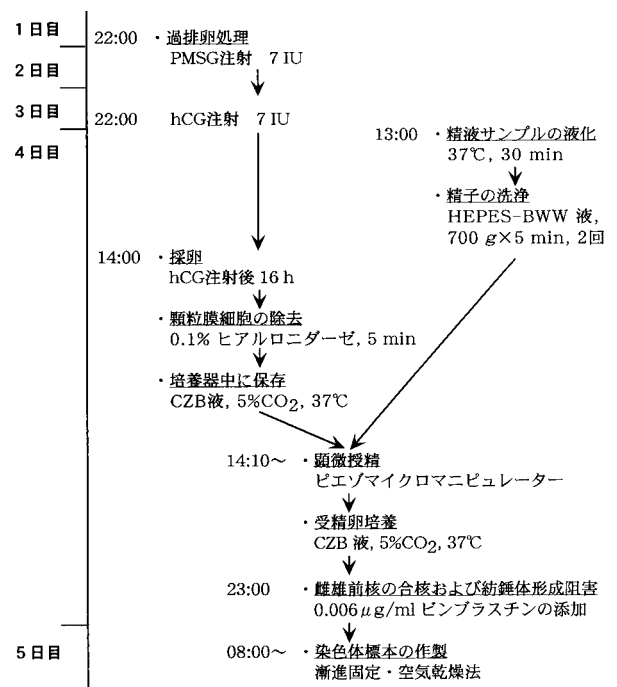


Fig. 7 マウス卵への卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いたヒト精子染色体分析法の概略

1) マウス卵子の準備

実験動物として6~11週齢のB6D2F1雌マウスを用いた。実験第1日目の22:00に7IUの妊馬血清性腺刺激ホルモン(PMSG; 帝国臓器)を、48時間後の第3日目22:00に7IUのヒト絨毛性腺刺激ホルモン(hCG; 持田製薬)を腹腔内に投与して過排卵を誘発した。hCG投与後16時間目(実験第4日目14:00)に頸椎脱臼により屠殺した動物から卵管を取り出し、ホローグラス内の0.1%ヒアルロニダーゼ溶液(HEPES-CZB液に溶解)中に移した。ピンセットを使って卵管膨大部を裂いて卵子を回収し、ヒアルロニダーゼ溶液中で顆粒膜細胞を完全に取り除いた。HEPES-CZB液で二度、卵子を洗浄した後、ICSI操作までの間(最長3時間)卵子保存用CZB液中に保存した。

2) ヒト精子の準備

用手法により採取した精液(2~3ml)を37°Cで30分間放置して液化させた。これに6mlのHEPES-BWW液を加えて700gで5分間遠心し、精漿を取り除いた。再度、同様の操作をくり返した後、1mlのHEPES-BWW液に精子を懸濁した。最後に、この懸濁液を等量の10%PVP溶液と混合して精子選別用懸濁液とした。粘性の高いPVPを加えることによって精子の運動速度が遅くなり、精子の取り扱い操作が容易になる。

3) ICSI 操作手順

培養器内に保存してあったマウス卵を一度に5~10個ずつインジェクションチェンバーのICSI操作用HEPES-CZB液ドロップに移し、30分以内に全卵のインジェクションを完了した。まず、精子懸濁液ドロップから頭部形態の正常な運動性精子を精子注入用ピペット内に吸引し、10%PVP溶液ドロップ中に移した。あらためて、精子を尾部側からピペット内に吸引し、中片部分をピペット先端に接触させた状態でピエゾドライブで発生させたピエゾパルス(速度1, 強度6~11)という物理刺激を加えて精子の鞭毛運動を停止させた(不動化処理; Fig. 8)。続いて、卵を保持用ピペットに吸引固定した。この際、卵内の紡錘体がピペットの長軸方向に対して直角に位置するように(卵の6

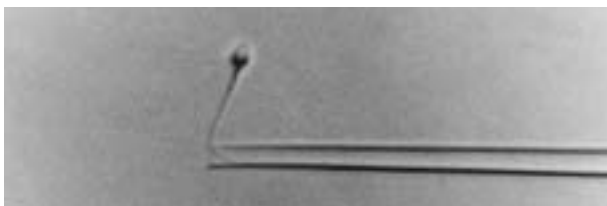


Fig. 8 精子の不動化

時または12時方向に位置するように)卵の角度を調整した。卵内に挿入された精子注入用ピペットによって紡錘体が損傷を受けないようにするためである。マウス卵の場合、紡錘体が存在する部位の卵細胞表面が少し隆起しているのを、これを指標に卵の固定位置を決定した(Fig. 9, A)。不動化した精子を吸引した精子

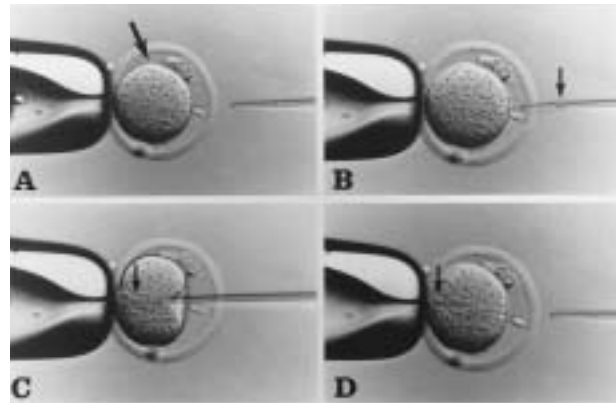


Fig. 9 マウス卵へのヒト精子の注入

- A. 保持用ピペットに固定したマウス卵。細胞表面が隆起している部分(矢印)に紡錘体が存在
 B. 透明帯を貫通した精子注入用ピペット。矢印は精子
 C. 卵細胞質に押し込んだ精子注入用ピペット。精子(矢印)はあらかじめピペット先端部に移動させられている
 D. 卵細胞質内に注入し終えた精子(矢印)

注入用ピペットを透明帯に接触させ、ピエゾパルス(速度1, 強度6~10)を数回付加して穴を開けた(Fig. 9, B)。一旦、精子をピペット先端まで押し出したところで、注入用ピペットをマウス卵の直径の4分の3辺りのところまで押し込み(Fig. 9, C)、ピエゾパルス(速度1, 強度1~2)を1回加えて卵細胞膜に穴を開けた。この状態で精子全体をマウス卵細胞質内に押し出し、余分に押し出した溶液を再吸引した後、ピペットを卵から引き抜いた(Fig. 9, D)。精子の吸引からの操作をくり返してHEPES-CZB液ドロップ中の全卵(5~10個)に精子を注入した後、卵を培養器(37°C, 5%CO₂)内のCZB液に移した。以後は、卵をICSI操作用CZB液ドロップに移し、精子を注入し、CZB液に移すという行程をくり返して、保存したマウス卵の全てに精子を注入した。全行程はKimura and Yanagimachi¹⁾の方法に従って顕微鏡ステージ上を18~20°Cに保って行われた。ICSI後の卵の破損を防ぐためである。

4) 卵の培養

精子注入を終えた卵をCZB液で一度洗浄し、培養

器内 (37°C, 5% CO₂) で平衡化しておいたCZB液に移して培養した。約6時間後に雌雄前核の合核と紡錘体形成を阻害する目的でビンブラスチン (0.006 μg/ml) を添加したCZB液に卵を移し、前核が消失する第一卵割中期まで培養を継続した。

5) 染色体標本の作製

ICSI後、約16時間を経過する頃から前核の消失した卵 (第一卵割中期に到達した卵) が出現し始めるので、順次、染色体標本作製を行った。まず、卵を0.5%アクチナーゼ (科研製薬) 溶液で5分間処理して透明帯を除去した。次いで、透明帯除去卵を低張液 (30%FBS 1容 + 1%クエン酸ナトリウム溶液 1容) で一度洗浄し、同液中で10分間室温下にて低張処理を行った。これらの卵を漸進固定・空気乾燥法⁶⁾を用いて染色体標本化した。標本を2%ギムザ液で4分間染色した後、個々の卵について発生段階を調べると共に、第一卵割中期卵については一度目の染色体分析を行った。更に、ヒト精子由来染色体とマウス卵子由来染色体を明瞭に区別するためにC-バンド染色を施した上で二度目の染色体分析を行った。

ICSI後24時間を経過した時点で受精卵の培養を打ち切り、前核消失の有無に関わらず残った卵の全てを発生学的調査のために標本化した。

結 果

1. ICSI法を用いたヒト精子染色体分析の成功率

ヒト精子を注入したマウス卵の生存率および発生率を各ステップごとに算出した (表2)。33頭の雌マウス

表2 ヒト正常精子をICSIしたマウス卵の生存率および発生率

動物数	33	
使用卵数	965	
生存卵数	739	(76.6%) *
標本作製卵数	713	(96.5%) **
減数分裂再開卵数	705	(98.9%) ***
前核形成卵数	557	(78.1%) ***
第一卵割中期到達卵数	504	(70.7%) ***
分析精子数	477	(94.6%) ****

*分母=使用卵数

**分母=生存卵数

***分母=標本作製卵数

****分母=第一卵割中期到達卵数

から得られた良好な MII 卵965個にヒト精子を注入した結果、標本作製時点 (ICSI 後16~24時間目) まで破損せずに形態が良好だった生存卵の頻度 (生存率) は76.6%であった。生存卵のうち標本作製過程で破損せずに標本化に成功した卵の頻度 (標本作製率) は96.5%と非常に高率であった。すなわち、生き残った卵はICSI 直後の細胞膜損傷から完全に回復しており、以後の標本作製過程での障害 (低張処理中での卵の破裂や固定卵の乾燥・伸展過程での崩壊) の原因とはならないと考えられる。標本化に成功した卵の発生段階を調査した結果、減数分裂を再開した卵 (卵子ゲノムが前核像や中期染色体像を示したもの) の頻度は98.9%と非常に高率であった。減数分裂の再開が起らなかったごく一部の卵では卵子ゲノムが MII 期に留まっており、ICSIされた精子は頭部膨化あるいは早期染色体凝縮異常 (premature chromosome condensation : PCC) の状態で発生を停止していた。減数分裂を再開した卵のうち一部の卵では、卵子ゲノムが前核あるいは中期染色体を形成したにもかかわらず、精子頭部が膨化した状態やPCCの状態で発達を停止していた。残りの卵は雄性および雌性の両前核を形成し、その頻度は78.1%であった。また、最終的に精子および卵子由来染色体が形成された卵、すなわち、第一卵割中期到達卵は70.7%であった。第一卵割中期到達卵のごく一部の卵では染色体同士が重なっていたため分析に不相当であったが、最終的にヒト精子由来染色体の核型分析に成功した卵の割合は94.6%と非常に高率であった。分析成功卵ではヒト精子およびマウス卵子由来染色体の核板は明瞭に分離していた。また、C-バンド染色に対する染色性の違いからも両核板を容易に区別できた (Fig. 10)。

2. 卵子・精子の in vitro エイジングと発生率の関連

効率良い精子染色体分析のためには一度に多数の受精卵を作出することが重要である。今回、1頭の雌から採取される30~50の未受精卵を一度にICSIに使用した。ICSI法では精子を1卵づつ注入していくため、ICSIを完了するのに最長3時間を要した。したがって、卵によってはICSIに使用されるまで3時間もの間、培養液中に保存された。同じことは精子にも当てはまる。この培養液保存中に起こるin vitroエイジングが卵の発生や精子染色体異常に影響した場合、染色体分析の効率や正確性が損なわれる恐れがある。そこで、卵子および精子のエイジングの長さとの発

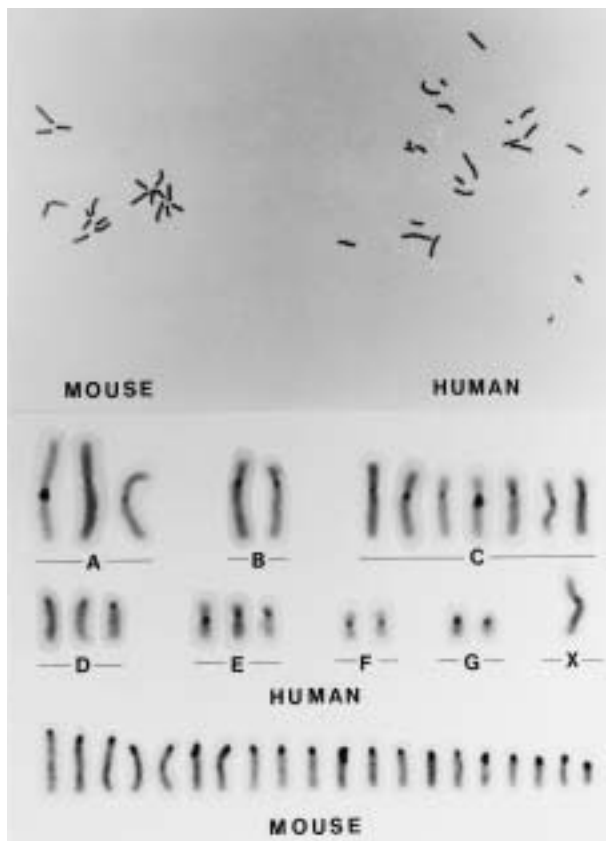


Fig. 10 ヒト精子由来およびマウス卵子由来核板とそれらの核型. C-バンド染色

生率および精子染色体異常率が関連するか調査した。表2のデータをICSI開始から使用までのエイジングの長さにより0~30分、30~60分、60~90分、90~120分、20~180分の5群に区切り、各群ごとに生存率および発生率を算出した(表3)。ただし、エイジングの時間が把握できなかった一部のデータについては除外

した。最もエイジングの度合いが少なかったI群と比較してII~V群における減数分裂再開率、前核形成率、第一卵割中期到達率はいずれも有意差を示さなかった。一方、ICSI卵の生存率はI群に比べてV群のみで有意に低い値を示した。

3. 卵子・精子のin vitroエイジングと染色体異常の関連

精子および卵子のエイジングの度合いと精子の構造的染色体異常出現率が関連するか調査した。表3のI~V群について精子由来の核板における構造的染色体異常出現率を比較した結果(表4)、いずれも有意差は認められなかった。また、エイジングの長さ按比例した異常率の上昇も認められなかった。ただし、I群の

表4 卵子・精子のin vitroエイジングとヒト精子由来の核板における構造的染色体異常出現率の関連性

実験群	精子・卵子のエイジング(分)	精子核板分析数	構造異常をもつ核板数
I	精子 0~30 卵子 0~30	65	3 (4.6%)
II	精子 30~60 卵子 30~60	82	6 (7.9%)
III	精子 60~90 卵子 60~90	64	6 (9.4%)
IV	精子 90~120 卵子 90~120	48	5 (10.4%)
V	精子 120~180 卵子 120~180	14	1 (7.1%)

表3 卵子・精子のin vitroエイジングと受精卵の生存率および発生率の関連

実験群	精子・卵子のエイジング(分)	使用卵数	生存卵数*	標本作製卵数**	減数分裂再開卵数***	前核形成卵数***	第一卵割中期到達卵数***
I	精子 0~30 卵子 0~30	112	91 81.3%	89 97.8%	87 97.8%	73 82.0%	69 77.5%
II	精子 30~60 卵子 30~60	152	120 78.9%	118 98.3%	116 98.3%	99 83.9%	88 74.6%
III	精子 60~90 卵子 60~90	141	103 73.0%	99 96.1%	99 100.0%	75 75.8%	66 66.7%
IV	精子 90~120 卵子 90~120	105	78 74.3%	74 94.9%	74 100.0%	59 79.7%	50 67.6%
V	精子 120~180 卵子 120~180	47	24# 51.1%	22 91.7%	22 100.0%	17 77.3%	16 72.7%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数
#, χ^2 , $P < 0.001$

表5 卵子・精子の in vitro エイジングとマウス卵子由来の核板における染色体異常出現率の関連性

実験群	精子・卵子の エイジング (分)	卵子 核板 分析数	染色体異常をもつ核板数						
			異数性			倍数性			構造異常
			低数性	高数性	計	0 倍性	2 倍性	計	
I	精子 0~30	64	0	2	2	0	2	2	3
	卵子 0~30		0.0%	3.1%	3.1%	0.0%	3.1%	3.1%	4.7%
II	精子 30~60	82	1	1	2	1	3	4	1
	卵子 30~60		1.2%	1.2%	2.4%	1.2%	3.7%	4.9%	1.2%
III	精子 60~90	64	1	1	2	2	3	5	0
	卵子 60~90		1.6%	1.6%	3.1%	3.1%	4.7%	7.8%	0.0%
IV	精子 90~120	48	0	0	0	2	5	7	1
	卵子 90~120		0.0%	0.0%	0.0%	4.2%	10.4%	14.6%	2.1%
V	精子 120~180	13	0	0	0	0	1	1	0
	卵子 120~180		0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	7.7%	7.7%	0.0%

異常率はII~V群の場合にくらべて特に低い傾向にあったのに対し、II群以降の異常率には大きな差はなかった。精子の場合、異数性および倍数性は減数分裂の際に起こる異常なので、今回の比較の対象からは除いた。

ヒト精子ゲノムに加えてマウス卵子ゲノムについてもエイジングと構造的染色体異常、異数性および倍数性出現率(表5)の関連を調査したが、I~V群間で異常率に有意差はなく、エイジングの長さ按比例した異常率の上昇も認められなかった。

考 察

人為的に精子を卵子に授精させるICSI法が開発される以前は、ヒト精子染色体を観察する手段は透明帯除去ハムスター卵との異種間体外受精に限られていた。この方法を用いたヒト精子染色体分析において最もよい成績をおさめているKamiguchi and Mikamo⁷⁾の場合、使用した卵の54% (465/862) で染色体分析が可能であったと報告している。ICSI法を用いた今回の研究の場合、最終的に染色体分析が可能であった卵の割合は49.4% (477/965) であった。この値はKamiguchi and Mikamoのデータと比べても遜色はなく、ICSI法を用いた場合でも効率良いヒト精子染色体分析が可能であった。また、今後、ICSI技術の上達によって卵の生存率が上がると思われ、更に高い染色体分析成功率が期待される。

ICSI法を利用した受精卵の作出にはある程度の精子・卵子のin vitroエイジングは避けられない。今回

の実験では精子および卵子のin vitroエイジングは最長3時間にのぼった。精子および卵子のエイジングが受精率や受精後の発生率の低下を招くことは多くの研究者によって報告されており⁸⁾⁻¹⁴⁾、これは染色体分析の成功率を大きく左右する要因になりうる。しかしながら、今回、精子および卵子のエイジングは第二減数分裂再開率およびそれ以降の胚発生率に影響しなかった。したがって、3時間のエイジングの長さであれば染色体分析の効率を低下させずに高いままに維持できることが示された。

一方、エイジングが最も長いV群においてICSI卵の生存率が低下した。この原因は次のように考えられる。ICSI操作では同一の精子注入用ピペットを多数の卵に使用するため、次第に管壁に精子懸濁液中の不純物や卵細胞質物質が付着する。このことにより、ピペットを卵から引き抜く際に卵細胞膜がピペットに付着し、卵の破損を招きやすくなる。V群では、すでに多数の卵子に使用したピペットを使用しがちになり、特にこの影響が強く表れた可能性が高い。したがって、実験の成功率をさらに向上させるためには精子注入用ピペットのこまめな交換が必要であろう。

今回、精子のin vitroエイジングが3時間までは精子染色体異常の増加が起らないことが明らかになった。一方、マウス精子では室温で6時間保存した場合、構造的染色体異常出現率が保存しない場合に比べ6倍に上昇することが報告されている¹³⁾。同様に、Munne and Estop¹⁴⁾はヒト精子において室温での24時間保存により構造的染色体異常出現率が2~3倍に増

加することを観察している。さらには、これらの研究は IVF 法を用いて行われたものであり、エイジングにより IVF では受精できなくなったような精子を ICSI した場合には異常頻度がさらに高まる可能性も考えられる。現実の ICSI 治療の場面では、ヒト精子を培養液中で何時間まで安全に保存できるかということが大きな問題となるので、今後、より長時間のエイジングの影響について調査することも重要と考えられる。

卵子のエイジングが精子由来染色体へ及ぼす影響に関しては、卵管内で *in vivo* エイジングさせた卵とエイジングさせない卵に受精させた精子で染色体異常率に差がないことが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。我々の結果でも卵子の3時間までのエイジングと精子染色体異常の関連は認められなかった。以上のことから、ICSI法をヒト精子染色体研究に導入する場合、精子および卵子のエイジングの長さが3時間以内であれば精子染色体異常出現率への影響はなく、染色体異常検出の精度は損なわれまいと考えられる。

今回、エイジングの長さや精子の構造的染色体異常出現率の比較から、非常に短い時間で精子に構造的染色体異常を引き起こす要因が存在する可能性が示唆された。というのも、30分以内のエイジング(表4, I群)では精子染色体異常出現率が4.6%と低いのにに対し、30分以降(表4, II~V群)では8~10%前後と異常率が高い傾向にあった。たとえば、今回は採取直後に遠心操作や培養液の添加といった急激な環境変化を受けている。僅かではあるが、これらの操作に極端に弱い精子の集団が存在し、短時間のうちに染色体異常につながるような変化を受けている可能性も否定できない。以前のIVF法を用いた染色体研究法では精子の受精能獲得のために数時間の培養が不可欠であったため、今回のような短時間で起こる異常率の変化は捕らえることができなかった。この点で、ICSI法を用いた精子染色体研究により、これまで知られていなかった精子染色体異常形成のメカニズムが見つかるかもしれない。

卵子の場合、精子と受精してから第二減数分裂を完了するため、エイジングにより数的異常が誘引される可能性がある。そこで、今回、精子由来染色体に加えて卵子由来染色体の分析も行ったが、精子および卵子のエイジングと卵子染色体異常出現率の間に関連性は認められなかった。実験動物において卵子のエイジ

ングが卵子由来染色体異常、とくに倍数性異常につながることを多くの研究者が報告している⁸⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾。これらの報告では6時間以上卵子をエイジングさせているが、今回はエイジングが3時間と比較的短かったため、影響が出なかったものと考えられる。

マウス卵へのICSI法をヒト精子染色体分析に導入した結果、染色体分析の効率も十分高く、3時間以内にICSIを終えればエイジングも問題とはならなかった。今回は注入精子を形態的に正常な運動性精子に限ったが、ICSIを用いれば特定の形態をもつ精子のみを注入して染色体異常との関連を調査したり、受精能をもたない精子の染色体を分析することも可能である。現在、医療現場では、不妊患者から得られた奇形精子率の高いサンプルや精子運動率の極めて低いサンプルでも治療が行われており、ICSI法を用いたヒト精子染色体分析はこのような場合の遺伝的リスクを推し量るための重要なデータを提供するであろう。

本研究は文部省科学研究費(基盤研究B)の援助を受けたものである。

文 献

- 1) Kimura Y. and R. Yanagimachi. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod*, 52:709-720, 1995.
- 2) Rudak E., P.A. Jacobs and R. Yanagimachi. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 274:911-913, 1978.
- 3) Dulbecco R. and M. Vogt. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *J Exp Med*, 99:162-182, 1954.
- 4) Chatot C.L., A. Ziomek, B.D. Bavister, et al. An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil*, 86:679-688, 1989.
- 5) Chatot C.L., L. Lewis, I. Torres, et al. Development of 1-cell mouse embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol Reprod*, 42:432-440, 1990.
- 6) Mikamo K. and Y. Kamiguchi. A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of Chinese hamster, in: *Radiation-Induced Chromosome Damage in Man*, Ishihara T. and M.S. Sasaki (Eds.), New York, Alan R. Liss, pp411-432, 1983.
- 7) Kamiguchi Y. and K. Mikamo. An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am J Hum Genet*, 38:724-740, 1986.
- 8) Yamamoto M. and T.H. Ingalls. Delayed fertilization

- and chromosome anomalies in the hamster embryo. *Science*, 176:518-521, 1972.
- 9) Juetten J. and B.D. Bavister. Effects of egg aging on in vitro fertilization and first cleavage division in the hamster. *Gamete Res*, 8:219-230, 1983.
 - 10) Smith A.L. and J.R. Lodge. Interaction of aged gametes: in vitro fertilization using in vitro-aged sperm and in vivo-aged ova in the mouse. *Gamete Res*, 16:47-56, 1987.
 - 11) Boerjan M.L. and P.D. Boer. First cell cycle of zygotes of the mouse derived from oocytes aged postovulation in vivo and fertilized in vivo. *Mol Reprod Develop*, 25:155-163, 1990.
 - 12) Munne S. and A. Estop. The effect of in-vitro ageing on mouse sperm chromosomes. *Hum Reprod*, 6:703-708, 1991.
 - 13) Estop A.M., S. Munne, L.K. Jost, et al. Studies on sperm chromatin structure alteration and cytogenetic damage of mouse sperm following in vitro incubation. Studies on in vitro-incubated mouse sperm. *J Androl*, 14:282-288, 1993.
 - 14) Munne S. and A.M. Estop. Chromosome analysis of human spermatozoa stored in vitro. *Hum Reprod*, 8:581-586, 1993.
 - 15) Boerjan M.L. and L.A. Saris. The effects of spermatozoal irradiation with X-ray on chromosome abnormalities and on development of mouse zygotes after delayed fertilization. *Mutat Res*, 256:49-57, 1991.
 - 16) Sakurada K., H. Ishikawa and A. Endo. Cytogenetic effects of advanced maternal age and delayed fertilization on first-cleavage mouse embryo. *Cytogenet Cell Genet*, 72:46-49, 1996.
 - 17) Vickers A.D. Delayed fertilization and chromosomal anomalies in mouse embryos. *J Reprod Fert*, 20:69-76, 1969.
 - 18) Zackowski J.L. and P.A. Martin-DeLeon. Second meiotic nondisjunction is not increased in postovulatory aged murine oocytes fertilized in vitro. *In vitro Cell Dev Biol*, 24:133-137, 1988.
 - 19) Badenas J., J. Santalo, J.M. Calafell, et al. Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: a source of chromosome imbalance. *Gamete Res*, 24:205-218, 1989.

Establishment of Human Sperm Chromosome Assay Using Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) into Mouse Oocytes

WATANABE Seiji* KAMIGUCHI Yujiroh*

Summary

To ascertain whether a human sperm chromosome assay using intracytoplasmic sperm injection (ICSI) is useful for the cytogenetic study of human spermatozoa, the success rate of chromosome analysis in this method and effects of sperm and oocyte aging (which caused by their storage in culture medium before ICSI) on embryo development and sperm chromosome aberrations were examined. Motile human spermatozoa with normal head morphology were injected into 965 mouse oocytes obtained from 33 female mice and their chromosomal complements were cytogenetically analyzed at first-cleavage metaphase. The rate of sperm chromosome complements successfully karyotyped was 49.4% of the oocytes used for ICSI. The rate compared favorably with the rates in previous studies with IVF, suggesting that the human sperm chromosome assay with ICSI is applicable to analyze human sperm chromosomes efficiently. In the present study, sperm and oocytes were stored (aged) in culture medium for 3 h maximum before ICSI. Then, embryo development and incidence of chromosomally abnormal spermatozoa were compared in 5 groups in which periods of sperm and oocytes aging were different (0-30, 30-60, 60-90, 90-120 and 120-180 min). However, aging of 3 h maximum was not detrimental to either embryo development or sperm chromosomes. These results indicate that human sperm chromosome assay using ICSI is a useful method for investigating human sperm chromosomes.

key words

chromosome aberrations, human spermatozoa, intracytoplasmic sperm injection, mouse oocytes

* Asahikawa Medical College Biological Sciences