

4002593

ヒト精子の形態・運動能と染色体異常の関連 マウス卵への顕微授精による解析

(研究課題番号：10470339)

平成10年度～平成12年度文部省科学研究費補助金（基盤研究B）

研究成果報告書

平成13年2月

研究代表者 上口 勇次郎

(旭川医科大学医学部教授)

目 次

はしがき	1
研究組織および研究経費	2
研究発表	2
研究成果の概要	5
研究成果	7
I. マウス卵への ICSI を利用したヒト精子染色体分析法の確立	7
II. ヒト正常精子における染色体異常出現率	23
III. 凍結保存精子における染色体異常出現率	27
IV. 染色体異常頻度に及ぼす精子・卵子の <i>in vitro</i> 加齢の影響	31
V. 頭部形態異常精子における染色体異常出現率	38
VI. 不動性精子における染色体異常出現率	46
おわりに	54
謝 辞	55
引用文献	56
参考論文（原著・総説別刷の掲載）	61

は し が き

平成 10 ～ 12 年度文部省科学研究費（基盤研究B）の助成を受けて行われた研究「ヒト精子の形態・運動能と染色体異常の関連：マウス卵への顕微授精による解析」（研究課題番号 10470339）を終え、ここに研究成果をまとめることになった。

最近、生殖補助医療技術の発展に伴い、男性不妊症の治療として卵細胞質内精子注入（ICSI）法が導入されるようになった。この技術では、通常体外受精（IVF）で受精できない奇形精子、不動性精子などによる授精も可能であり、重度の乏精子症、奇形精子症、精子無力症などの男性不妊症も ICSI 治療の対象となって来ている。しかし、それらの精子の遺伝的安全性（染色体異常をどの程度伴うのか）についてはほとんど研究されていない。この研究の目的は、ヒト精子の形態的異常や運動性の異常が遺伝的欠陥（染色体異常）と関連しているか否かをマウス卵細胞質内ヒト精子注入（ICSI）法によって個別精子ごとに直接検討することである。

研究の初年度である平成 10 年度には、ICSI 法に関して国内で最も高い技術をもつ研究室の一つである福島県立医大・産婦人科学教室へ研究分担者を派遣して、技術を修得させた。帰学後、研究機器（ピエゾマイクロマニピュレーターなど）の設置・調整を行い、ICSI 技術の研鑽に努めつつ、精子核の染色体分析という目的に沿って ICSI 法にいくつかの改良を加えた。次いで、形態正常精子（対照群）における染色体異常出現率を調査するとともに、凍結解凍精子（形態は正常）についても染色体異常率を調査した。

平成 11 年度には形態正常精子の染色体分析データをさらに積み上げるとともに、採卵・採精から ICSI までの間に起こる卵子・精子の *in vitro* 加齢（培養液中で起こる卵子・精子の退行変化）が精子染色体異常出現率に影響を及ぼすか否かについて調査した。また、形態異常精子（小形頭部および大形頭部をもつ精子）における染色体異常出現率についても調査した。

研究の最終年度である平成 12 年度には、頭部奇形（尖状奇形および伸長奇形）精子および不動性（運動能力をもたない）精子における染色体異常出現率を調査した。また、不動性精子の場合、ICSI までの保存状態（どのような培養液中に保存するか）によって構造的染色体異常率が著しく変化することを発見し、これ

についても詳細に調査した。

今回の研究によって精子の頭部形態異常・運動能と染色体異常の関連性がある程度明らかにされ、ICSIによる男性不妊治療が染色体異常胚生成のリスクをどの程度伴うのかを推定する基礎データが得られた。しかし、調査個体・調査例数の面でまだ十分とは言えず、今後さらに継続的な研究が必要である。

【研究組織】

研究代表者： 上口勇次郎（旭川医科大学医学部教授）
研究分担者： 立野裕幸（旭川医科大学医学部助教授）
研究分担者： 渡邊誠二（旭川医科大学医学部教務職員）

【研究経費】

平成 10 年度	6,000 千円
平成 11 年度	900 千円
平成 12 年度	1,100 千円
計	8,000 千円

【研究発表】

(1) 学会誌等

1. 上口勇次郎：環境要因とヒト精子染色体異常。産科と婦人科、65: 880-886, 1998.
2. Tateno, H., Iijima, S., Nakanishi, Y., Kamiguchi, Y. and Asaka, A.: No induction of chromosome aberrations in human spermatozoa exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. Mutation Research, 414: 31-35, 1998.
3. 立野裕幸・渡邊誠二・上口勇次郎：ヒト精子の染色体分析。産婦人科の世界、50: 413-422, 1998.

4. 上口勇次郎・石井裕：ダイオキシンの遺伝的影響の問題点：ヒト精子染色体に及ぼす影響の観点から。環境変異原研究、21: 201-205, 1999.
5. Tateno, H. and Kamiguchi, Y.: Improvement of male pronuclear formation during cross-fertilization between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes by nocodazole, and chromosome analysis of hybrid zygotes. *Molecular Reproduction and Development*, 52: 117-124, 1999.
6. Tateno, H. and Kamiguchi, Y.: Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protects against chromosome damage during male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. *Zygote*, 7: 321-327, 1999.
7. Tateno, H., Kimura, Y. and Yanagimachi, R.: Sonication per se is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. *Biology of Reproduction*, 63: 341-346, 2000.
8. 渡邊誠二・上口勇次郎：マウス卵への細胞質内精子注入（ICSI）法を用いたヒト精子染色体研究法の確立。旭川医科大学研究フォーラム、2 巻（1号）、印刷中。

(2) 口頭発表

1. 渡邊誠二・立野裕幸・上口勇次郎：化学物質代謝産物によるヒト精子染色体異常の誘発：肝細胞 S9 を用いた解析。第 45 回日本動物学会北海道支部大会、1998 年 8 月、札幌。
2. 上口勇次郎：精子と染色体異常。第 36 回日本不妊学会東北支部総会、1998 年 10 月、福島。
3. 上口勇次郎・石井裕：ダイオキシンの遺伝的影響の問題点：ヒト精子染色体に及ぼす影響の観点から。第 27 回日本環境変異原学会、1998 年 11 月、大阪。
4. 立野裕幸・飯島純夫・上口勇次郎：ヒト精子染色体に及ぼす既知化学変異原物質と超低周波磁場の複合的影響の評価。第 27 回日本環境変異原学会、1998 年 11 月、大阪。

5. 立野裕幸・上口勇次郎：哺乳動物の異種間受精卵における精子核の発達と染色体異常. 第 49 回染色体学会、1998 年 11 月、広島.
6. 立野裕幸・上口勇次郎：哺乳動物の異種間体外受精卵における精子核脱凝縮のタイミングと染色体異常の関連性. 第 41 回日本不妊学会北海道地方部会、1999 年 3 月、札幌.
7. 渡邊誠二・上口勇次郎：マウス卵への ICSI 法を用いたヒト精子染色体分析法の確立および卵子の加齢と精子染色体異常の関連性の検討. 第 41 回日本不妊学会北海道地方部会、1999 年 3 月、札幌.
8. 上口勇次郎：生殖細胞における染色体異常. 第 6 回臨床細胞遺伝セミナー、1999 年 9 月、東京.
9. 渡邊誠二・上口勇次郎：ICSI 法によりマウス卵に授精させたヒト形態正常精子の染色体異常. 第 44 回日本不妊学会、1999 年 11 月、東京.
10. 上口勇次郎：ヒト精子の染色体異常：環境変異原との関わりは？. 第 50 回染色体学会、1999 年 11 月、西宮.
11. 渡邊誠二・上口勇次郎：Mitomycin C がヒト精子染色体に及ぼす影響. 第 50 回染色体学会、1999 年 11 月、西宮.
12. 渡邊誠二・上口勇次郎：マウス卵への卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を利用した頭部形態異常ヒト精子の染色体分析. 第 41 回日本哺乳動物卵子学会、2000 年 6 月、網走.
13. 槌谷恵子・上口勇次郎・渡邊誠二・小森春美・堀川道晴・田熊直之・千石一雄・石川睦男：体外成熟卵子の細胞遺伝学的検討. 第 41 回日本哺乳動物卵子学会、2000 年 6 月、網走.
14. 渡邊誠二・上口勇次郎：卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法はヒト精子染色体研究の手段として有用か. 第 47 回日本動物学会北海道支部大会、2000 年 8 月、札幌.
15. 立野裕幸・上口勇次郎：チャイニーズハムスター第一卵母細胞染色体に及ぼすトポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシドの影響. 第 29 回日本環境変異原学会、2000 年 11 月、仙台.
16. 渡邊誠二・上口勇次郎：ICSI 法によりマウス卵に授精させたヒト形態異常精子および不動精子の染色体異常. 第 45 回日本不妊学会、2000 年 11 月、神戸.

【研究成果の概要】

I. マウス卵への ICSI を利用したヒト精子染色体分析法の確立

マウス卵細胞質へのヒト精子顕微注入 (ICSI) 法と我々が開発した哺乳類受精卵の染色体標本作製法 (漸進固定空気乾燥法) を組み合わせて、精子の染色体構成を個別に調査する方法の開発を試みた。ICSI 卵の第 1 卵割中期到達率は 70.7%、中期到達卵の核型分析率は 94.6%で、成功率の高い方法が確立された。

II. ヒト正常精子における染色体異常出現率

正常な頭部形態および運動性をもつヒト精子 477 例を上述の方法で染色体分析した結果、異数性と構造異常の出現率は 1.7%および 8.8%であった。これらの頻度はハムスター卵との IVF 法で得た値とほぼ等しかった。2 倍性精子は 1 例も出現せず、頭部のサイズを指標とした選別によりこの異常精子を除外できることが分かった。

III. 凍結保存精子における染色体異常出現率

液体窒素で凍結保存後に解凍した精子 (頭部形態と運動性は正常) 141 例における異数性と構造異常の出現率は 0.5%および 7.8%で、新鮮精子群の異常出現率との間に有意差はなかった。すなわち、精子の凍結保存は染色体異常率に影響を与えないことが分かった。

IV. 染色体異常頻度に及ぼす卵子・精子の *in vitro* 加齢の影響

ICSI 操作の過程で卵子と精子に *in vitro* 加齢が起こることは避けられない。この加齢が精子由来核板の染色体異常出現率に与える影響を調査した。卵子を最大 5 時間、精子を最大 6 時間まで加齢させたが、染色体異常は増加しなかった。しかし、加齢の進行に伴って受精卵の発生率が低下するので、ICSI 操作は 2 時間 (長くても 3 時間) 以内に終了するのが望ましい。

V. 頭部形態異常精子における染色体異常出現率

精子頭部の形態異常と染色体異常の関連性を調査した。(1) 大形精子群では異数性、構造異常とも増加しなかった。2 倍性異常は出現したが、低率 (3.7%) であった。(2) 小形精子群では異数性、構造異常、倍数性のいずれも増加しな

かった。(3)尖状奇形(頭部先端が尖っている)精子群では受精卵の発生率が低下したが、染色体異常の増加は認められなかった。(4)伸長奇形(頭部が細長く伸びている)精子群では卵子の減数分裂再開率が低下し、構造的染色体異常出現率(33.3%)は有意に増加した。

VI. 不動性精子における染色体異常出現率

(1)不動性精子を精漿中に保存しておいた場合には、構造異常出現率(4.5%)は運動精子の場合(3.4%)と比較して増加しなかった。(2)不動性精子を培養液中に2~2.5時間保存したら構造異常が増加した。異常出現率はBWW液中保存(25.8%)およびHTF液中保存(32.6%)で有意に高く、PBS液中保存(14.3%)でも増加傾向を示した。(3)精子の培養液中保存に、精子回収のための遠心洗浄操作を加えると異常率はさらに増加した。(4)正常精子の場合でも、異常率は培養液中保存群(8.8%)より精漿中保存群(3.4%)で低い傾向を示した。

【研究結果】

I. マウス卵への ICSI を利用したヒト精子染色体分析法の確立

種々の性状のヒト精子を個別にマウス卵へ顕微注入してその染色体構成を調査するという研究の重要性については、すでに「はしがき」の項で述べた。

卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いてヒト精子の染色体を分析しようという試みは Martin et al. (1988) によって最初に行われ (ハムスター卵への ICSI)、構造的染色体異常が高率 (39%) に出現すると報告された。しかし、染色体分析の成功率が極めて低く (ICSI された精子の数%が分析されたのみ)、また、染色体異常が実験系そのものから生じている可能性も指摘された。その後、より安定した ICSI 技術がマウスで開発され (Kimura and Yanagimachi, 1995)、この技術を用いて我々はヒト精子 (正常精子および頭部形態異常精子) の染色体分析結果を報告した (Lee et al., 1996)。これと相前後して、同様の研究は Rybouchkin et al. (1996, 1997) によっても報告された。しかし、ICSI-染色体分析の技術はまだ低く、分析例数もかなり少ないというのが現状である。

そこで今回、我々は自ら開発したヒト精子染色体標本作製法 (Kamiguchi and Mikamo, 1986) と Kimura and Yanagimachi (1995) の ICSI 法を組み合わせ、成功率の高い、安定した技術の開発に取り組んだ。平成 10 年、11 年の 2 年間にわたる改良の結果、ほぼ満足のいく技術が確立されたので、以下にその詳細について述べる。

【材料と方法】

1. 培養液

卵の採取、ICSI 操作その他のマウス卵取り扱いのための溶液としては HEPES-CZB 液 (Kimura and Yanagimachi, 1995) を用いた。

一方、ヒト精子の洗浄および精子懸濁液の調製には、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 BWW + 0.3% HSA 液 (Rudak et al., 1978) を用い、今回の実験ではこの培養液に pH 緩衝剤として 20 mM HEPES を添加した (HEPES-BWW 液; 表 1)。ICSI の際の精子不動化処理には Dulbecco の燐酸

緩衝液(PBS)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(Chatot et al., 1989, 1990)を用いた。あらかじめCZB液のドロップ(0.2 ml)をペトリ皿(直径35 mm)の底に4個作り、ミネラルオイル(Sigma)で覆った後、37℃, 5% CO₂の条件の培養器内で平衡化しておいた。

表1 HEPES - BWB 液の組成

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

2. ICSI 実験装置

ホフマン微分干渉装置付き倒立顕微鏡(オリンパス IX-70; 図1, A-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; 図1, A-2 および C-1, 2)を組み込み、2組のピペットホルダー(卵子操作用および精子操作用)を装着した。精子操作側のピペットホルダー(ライツ; 図1, B-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; 図1, B-2)を装着した。ガスタイトシリンジ(ハミルトン)を取り付けた2本のマイクロインジェクター(図1, A-3 および C-3)と精子注入用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℃に設定したマイクロ冷却装置を接続したクールプレート(北里サプライ; 図1, A-4)を装着した。

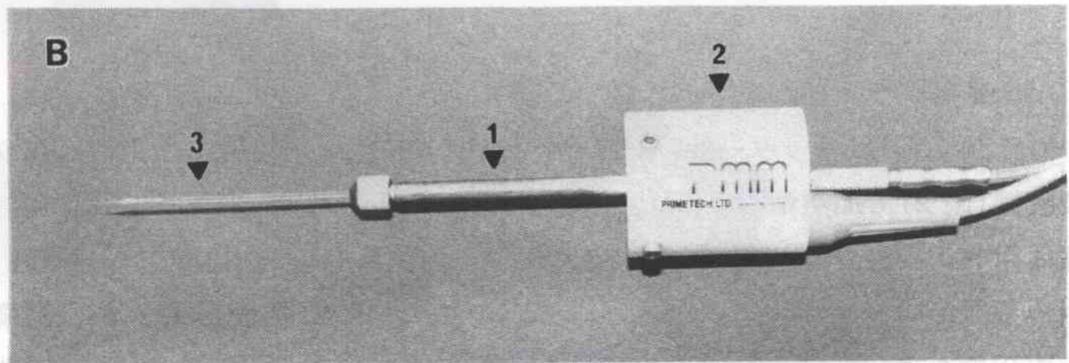
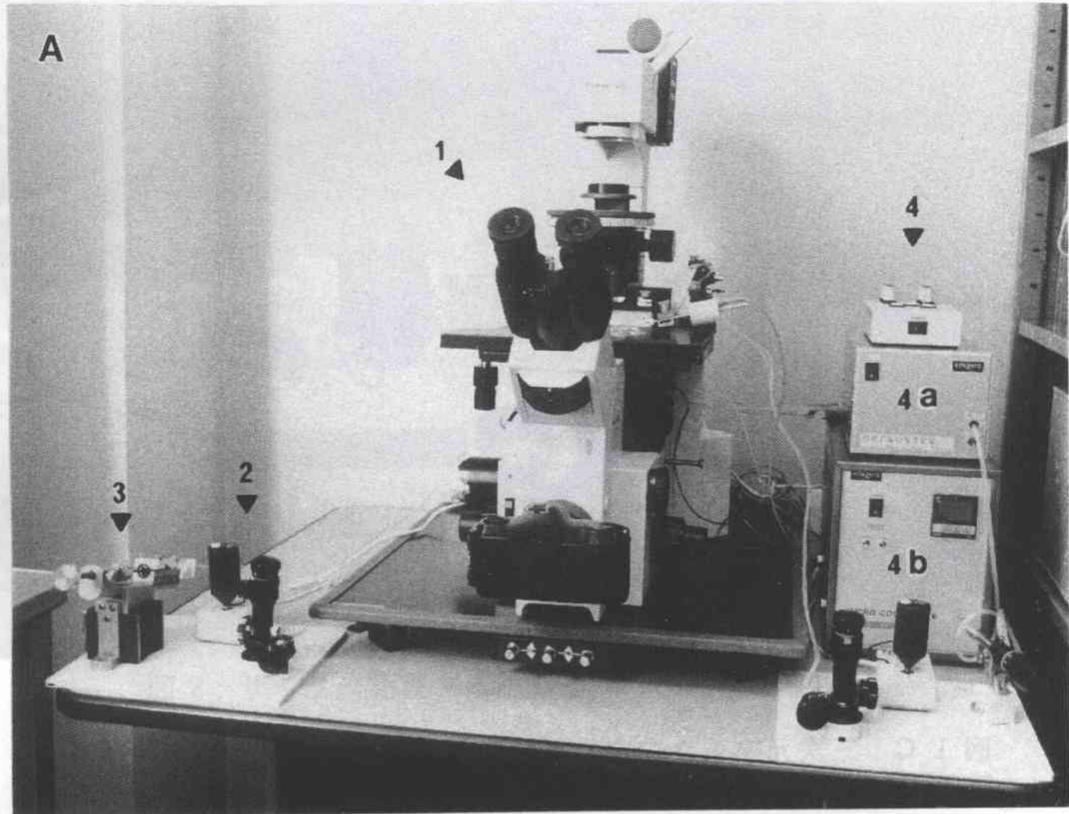


図 1 A : ICSI 装置 (全体像)。1, ホフマン微分干渉装置付きの倒立顕微鏡; 2, 三次元ジョイスティック型マイクロマニピュレーター; 3, ガスタイトシリンジを取り付けたマイクロインジェクター; 4, マイクロ冷却装置 (4a, 結露を防ぐためのデフロスター; 4b, 温度調節ユニット)。

B : ピエゾドライブユニット (2) を装着したピペットホルダー (1) と、それに接続した精子注入用ピペット (3)。

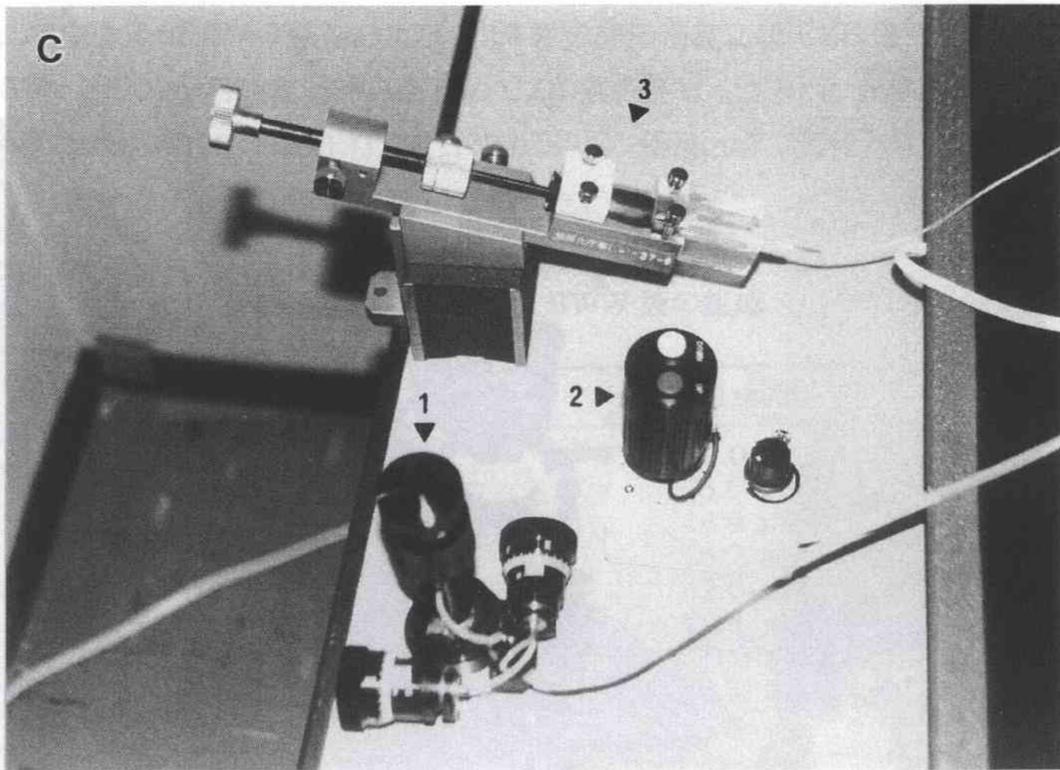


図 1 C : 三次元マイクロマニピュレーター(1, 2)およびマイクロインジェクター(3)

3. ICSI 用ガラスピペットの作製

ガラス毛細管(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(図 2)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形を作製した。マイクロフォージ(図 3)を用いて原形の先端部(図 4, A)を外径約 $4 \mu\text{m}$ に加工した後(図 4, B)、顕微授精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)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)を約 $5 \mu\text{l}$ 注入して精子注入用ピペットとした(図 4, C)。一方、原形の先端をマイクロフォージを用いて外径 $80 \sim 100 \mu\text{m}$ 、内径 $8 \sim 10 \mu\text{m}$ に加工したものを卵子保持用ピペットとした(図 4, D)。

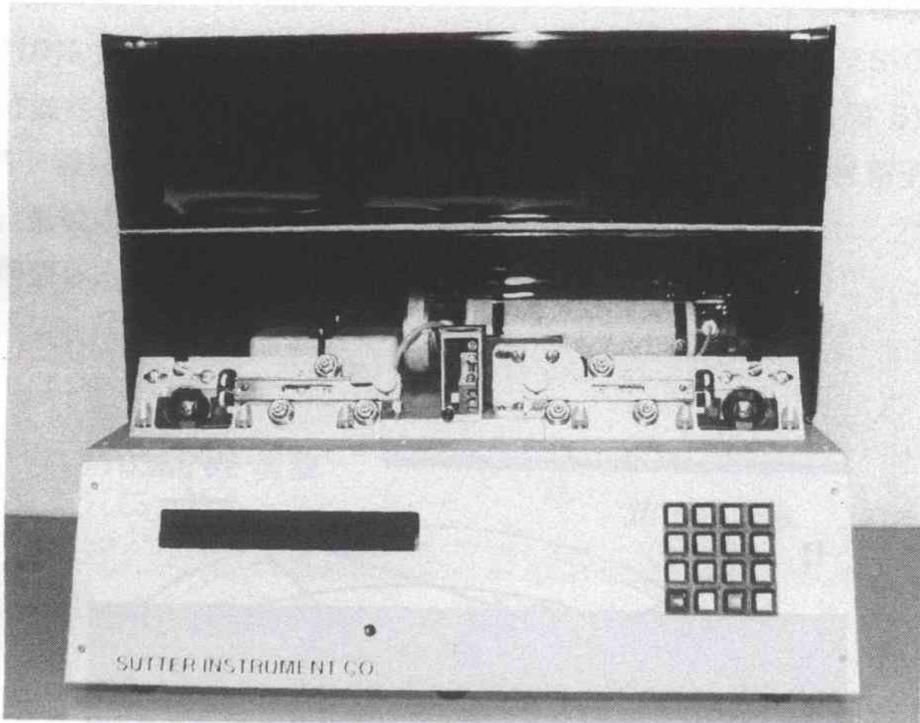


図 2 : サッター社製マイクロピペット作製装置

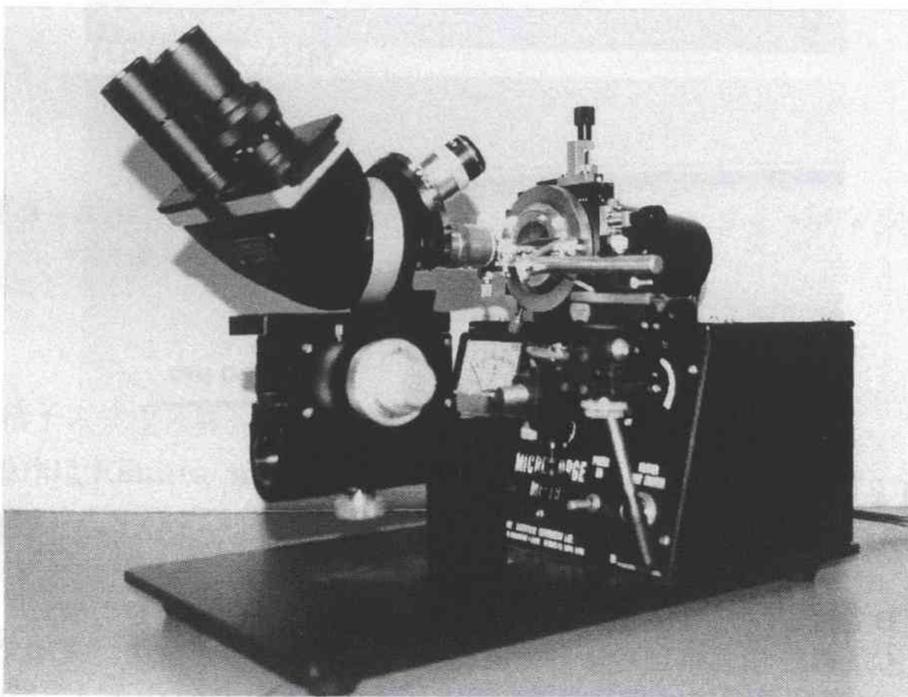


図 3 : マイクロフォージ

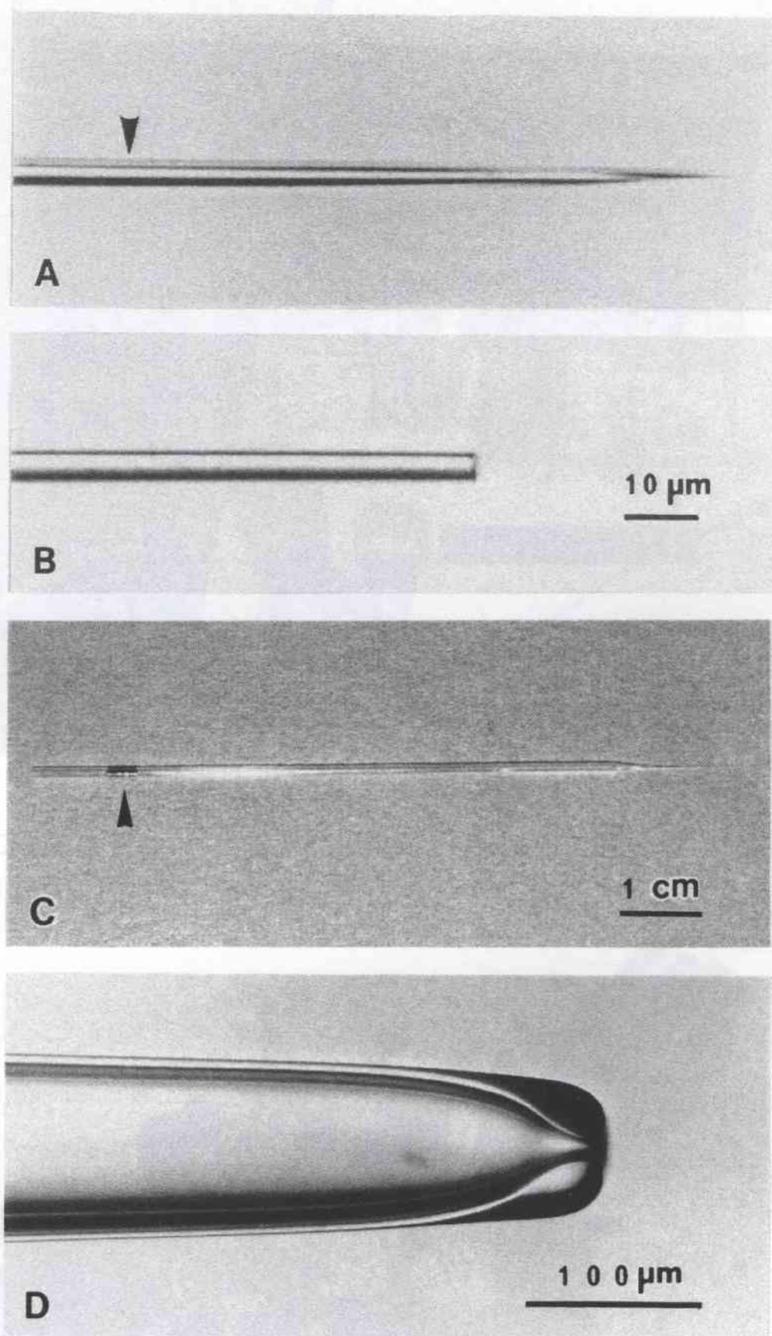


図 4 : ICSI 用ピペットの作製。

- A : マイクロピペット作製装置によって作製した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 (A の矢印部分を切断)。
- C : 精子注入用ピペットの全体像。右側が先端、左側が後端で、矢印部分に水銀を注入した。
- D : 卵子保持用ピペットの先端拡大図。開口部の直径は 8 ~ 10 μm 。

4. ICSI 用チェンバーの準備

ICSI 操作のために 10 cm プラスチックディッシュの上蓋中央に 4 種類の溶液ドロップ(10% PVP 液, 精子選別用精子懸濁液, 10% PVP 液, HEPES-CZB 液)を直線的に並べ、ミネラルオイルで覆ったチェンバーを準備した(図 5)。最初の 10% PVP 液は精子注入用ピペットの洗浄用、次の 10% PVP 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。このチェ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。

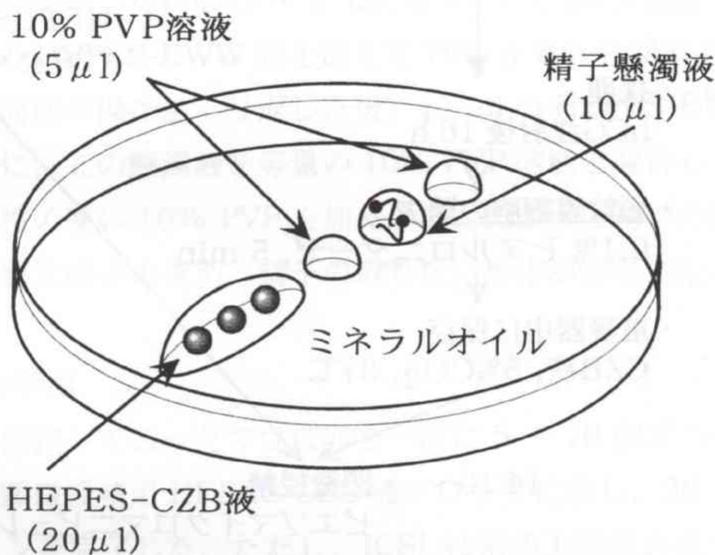


図 5 : ICSI 用チェンバーの模式図。10 cm プラスチックディッシュの上蓋を利用した。

5. ヒト精子のマウス卵への ICSI

ICSI 操作は Kimura and Yanagimachi(1995)に修正を加えて行った。実験手順の概略とスケジュールは図 6 に示した。

(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 7 IU の妊馬性腺刺激ホルモン(帝国臓器)を、48 時間後の第 3 日目 22

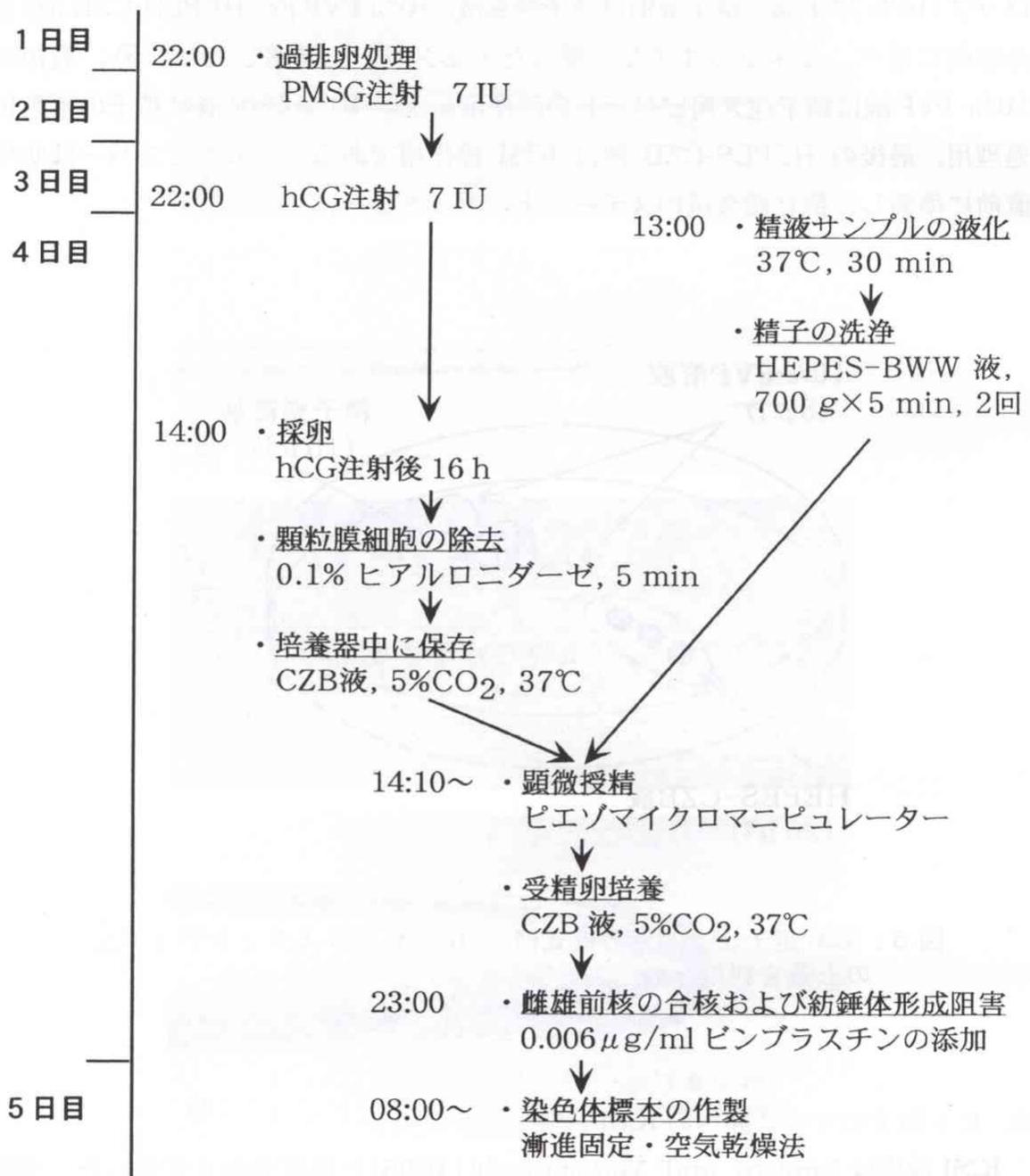


図 6 : マウス卵への卵細胞質内精子注入 (ICSI) 法を用いたヒト精子染色体分析法の概略。

14:00 に 7 IU のヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (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 (Sigma, St Louis, MO; 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 ~ 3 ml) を 37 °C で 30 分放置して液化させた。これに 6 ml の HEPES-BWW 液を加えて 700 g 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、1 ml 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 10% PVP を加えることによって精子の運動速度が遅くなり、頭部形態異常精子の選別、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顕微授精用 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。ただし、ICSI 技術の上達度の違いから一度の取り扱い卵数を平成 10 年度には 5 ~ 6 卵、平成 11 年度以降には 10 卵とした。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 ドロップ中に移した。あらためて精子を尾部側からピペ

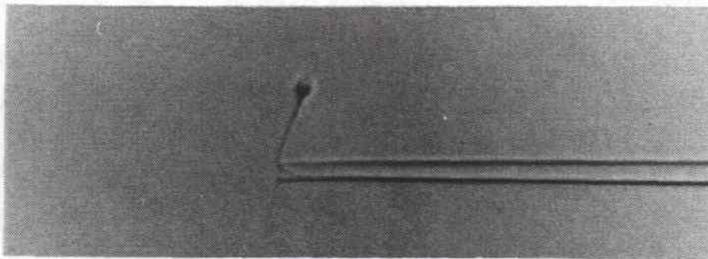


図 7: 不動化処理中のヒト精子

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; 図 7)。

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方向に位置するように(卵の 6 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、これを指標にして卵の固定位置を決定した(図 8, A)。不動化した精子を吸引した注入用ピペットを透明

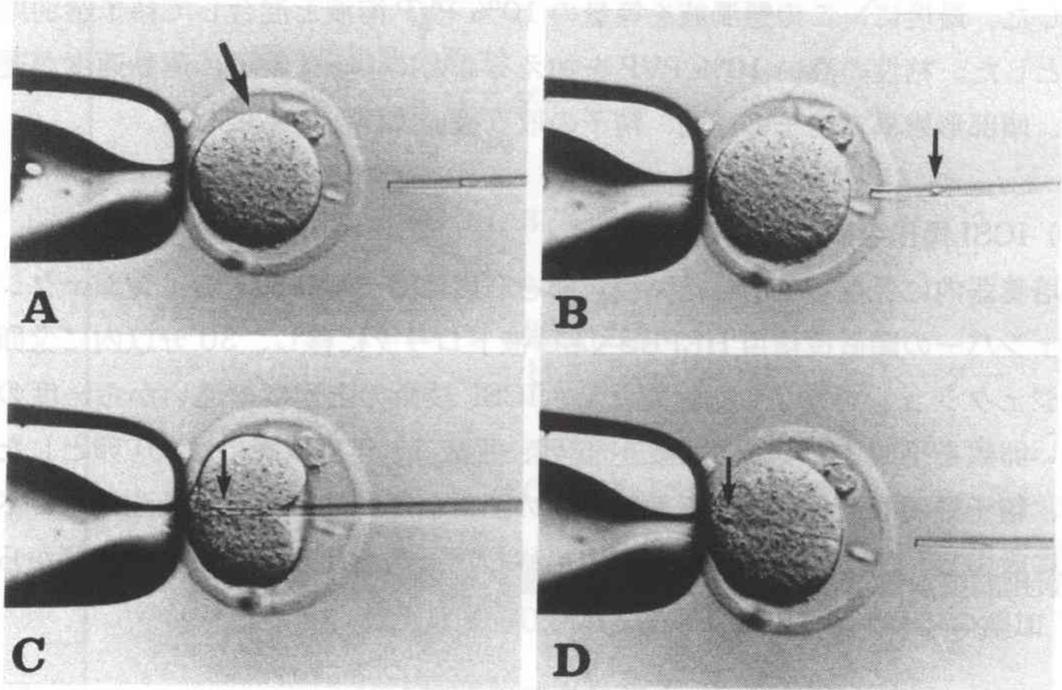


図 8 : マウス卵へのヒト精子の注入。

- A : 保持用ピペットに固定したマウス卵。細胞表面が少し隆起している部分(矢印)に紡錘体があるので、ここが卵の 12 時または 6 時方向になるように保持する。
- 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)。

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(図 8, 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辺りまで押し込み(図 8, 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(図 8, 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、卵を顕微授精用 HEPES-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すべてに精子を注入した。全行程は Kimura and Yanagimachi (1995)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。Kimura and Yanagimachi (1995)は、インジェクション後に卵をすぐに 37 °C に移すよりも室温に 10 分置く(室温処理)と生存率が高くなることを報告しているが、我々は発生への影響を考慮して低温処理を行わなかった。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ピンブラスチン(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% プロナーゼ溶液で 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(1% クエン酸ナトリウム 1 容 + 30% FBS 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(Mikamo and Kamiguchi, 1983)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全てを発生学的調査のために標本化した。

【結果と考察】

上述の通りに確立された方法を用いて行ったヒト精子染色体分析の成功率を表 2 に示した。ICSI には正常な頭部形態、正常な運動能をもつ精子を用い、後述する形態異常精子、不動性精子の対照群データとしても利用できるようにした。また、ヒト精子染色体異常自然発生率に著しい個人差のあることが分かっているので(Kamiguchi et al., 1994)、今回の研究では正常な精液性状をもつ特定の 1 個人を精液提供者として諸実験を行い、結果を比較した。

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	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 1 卵割中期到達卵数***	分析精子数****
10 年度調査	14	408	343 84.1%	333 97.1%	329 98.8%	241 72.4%	213 64.0%	201 94.4%
11 年度調査	19	557	396# 71.1%	380 96.0%	376 98.9%	316# 83.2%	291# 76.6%	276 94.8%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数

****分母=第 1 卵割中期到達卵数 #: 両年度間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.001$)

平成 10 年度には 14 頭の雌マウスから得られた第二成熟分裂中期卵(MII 卵) 408 個が、そして平成 11 年度には 19 頭から得られた 557 の MII 卵が、ヒト精子の ICSI 実験に用いられた。ICSI 後 16 時間後も破損せずに形態が良好だった生存卵の頻度(生存率)は、10 年度(84.1%)と比較して 11 年度(71.1%)に有意に低下していた($P < 0.001$)。しかし、後述するように平成 11 年度後半～平成 12 年度に行われた実験では生存率(平均値)が 76.2%(表 15), 84.5%(表 18),

91.2% (表 20)と次第に上昇したので、この有意差は技術的不安定さを反映したものと考えている。すなわち、平成 11 年度には、ある程度 ICSI 操作に慣れたので単位時間(30 分)当たりの ICSI 卵数を 10 年度の 2 倍に増やしたが、そのために個々の卵の ICSI 操作がかえって乱雑になったのではないかと考えられる。特に、精子の注入終了後にピペットを卵から引き抜く操作が早すぎると卵細胞膜の修復が悪く、卵の崩壊につながったと思われる。

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 10 年度と 11 年度でそれぞれ 97.1%および 96.0%と非常に高率で、両者の間に有意差はなかった。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)の原因に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)の頻度は両年度とも非常に高率であった(10 年度, 98.8%; 11 年度, 98.9%)。減数分裂再開が起こ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(図 9)で発生を停止していた。

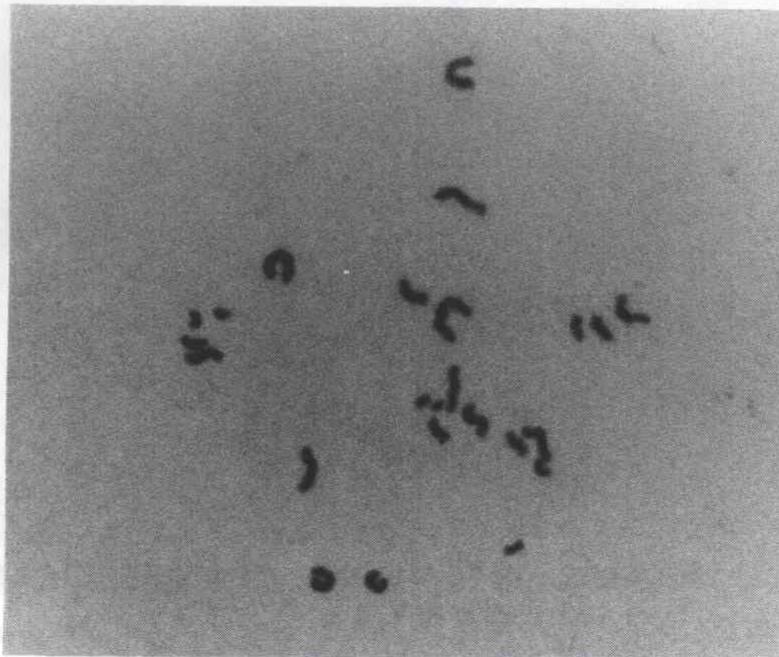


図 9：早期染色体凝縮異常(PCC)を起こしたヒト精子染色体。

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(図 10)で発生を停止していた。残りの卵は雌性および雄性の両前核を形成し、その頻度は 10 年度と 11 年度でそれぞれ 72.4%および 83.2%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 1 卵割中期到達卵(図 11)は 10 年度と 11 年度でそれぞれ 64.0%および 76.6%であった。平成 11 年度の前核形成率および第 1 卵割到達率が 10 年度の場合に比べて有意に高かったことから、ICSI 技術の上達に伴って良好な胚発生率が得られるようになったと考えられる。

第 1 卵割中期到達卵のうち最終的に精子由来染色体の核型分析に成功した卵の割合は 10 年度(94.4%), 11 年度(94.8%)とも非常に高率で、両年度間に有意差はなかった。

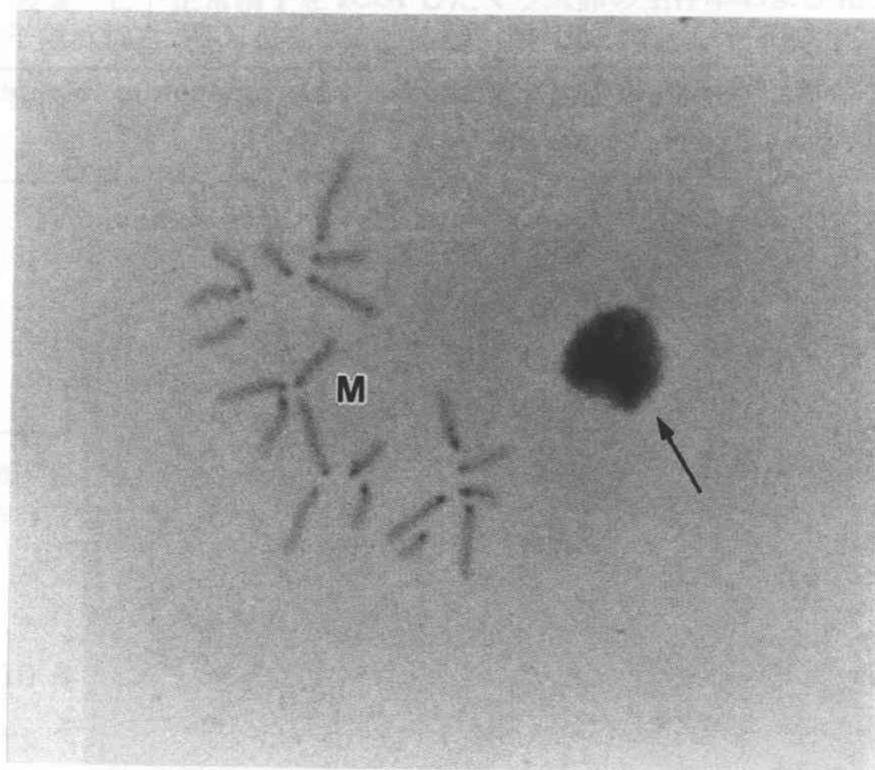


図 10 : 膨化したヒト精子頭部(矢印)。 マウス卵子由来染色体(M)は分裂中期染色体像を示している。C-バンド染色によりマウス染色体の端部が濃染している。

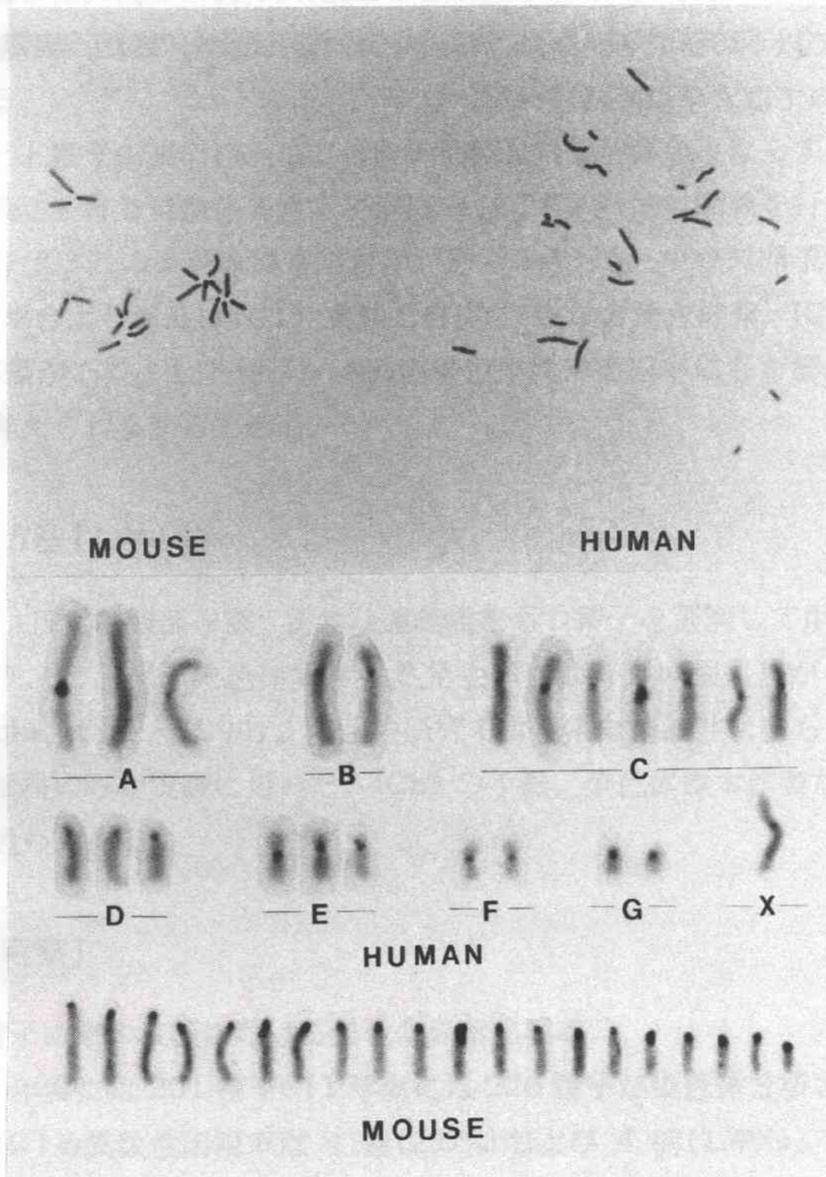


図 11 : ヒト精子由来およびマウス卵子由来核板とそれらの核型。
 C-バンド染色。 ヒト精子由来染色体の C-バンドはマウス
 卵子由来染色体の場合に比べて薄く染色されるので、両核
 板は容易に区別できる。

結局、今回確立された方法では実験に使用された卵の 50%でヒト精子染色体分析が成功したことになる。従来論文には染色体分析の成功率を記載しているものが見当たらず、他の研究者の方法との比較はできない。しかし、過去の報告における精子染色体分析の例数がわずかに数十にしか達していないことから推測して、従来技術の成功率はかなり低いものと思われる。一方、我々は今回の技術改良によって以下の研究をかなり効率よく進めることができた。実際の染色体分析結果については次項以降に述べる。

II. ヒト正常精子における染色体異常出現率

上述の通り、ICSI を利用したヒト精子染色体分析法が確立したので、まず最初に正常精子における染色体異常自然発生率を調査した。このデータは形態異常精子、不動性精子における染色体異常出現率(後述)の対照群データとして重要なものである。

また、ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率のみならず、マウス卵子由来の核板における染色体異常出現率についても並行的に調査を行った。もし、マウス卵子ゲノムの染色体異常出現率が通常の受精卵(マウス卵子とマウス精子の受精)の場合よりも高ければ、実験系自体(マウスの誘発排卵, ICSI, 体外培養など)に不備があり、ヒト精子ゲノムの染色体異常出現率にも影響を与えている可能性が考えられるからである。

【材料と方法】

ICSI には正常な頭部形態、正常な運動能をもつ精子を選別して用いた。また、前述の通り、ヒト精子染色体異常自然発生率には著しい個人差がみられるので(Kamiguchi et al., 1994)、今回の研究では正常な精液性状をもつ特定の1個人の精液試料のみを実験に用いた。ICSI の手順、染色体標本作製などは第1章で述べた通りである。

【結果と考察】

1. ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率

平成10年度には201精子、11年度には276精子が染色体分析された(表3)。両年度における異数性出現率は4例(2.0%)および4例(1.4%)、構造異常出現率は19例(9.5%)および23例(8.3%)で、両年度間に有意差は認められなかった。また、観察された構造的染色体異常を染色体型切断、染色体型交換、染色分体型切断 および染色分体型交換 に分類し、それらの頻度を比較しても両年度間に有意差はなかった。

表3 ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率

	分析数 (分析率*)	染色体異常をもつ精子核板数 (%)				構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)				
		異数性		計	倍数性 (2n)	構造異常	chb	che	chtb	chte
		低数性	高数性							
10年度 調査	201 94.4	4 2.0	0 0.0	4 2.0	0 0.0	19 9.5	14 0.070	2 0.010	5 0.025	2 0.010
11年度 調査	276 94.8	1 0.4	3 1.1	4 1.4	0 0.0	23 8.3	17 0.062	2 0.007	4 0.014	3 0.011
合計	477 94.6	5 1.0	3 0.6	8 1.7	0 0.0	42 8.8	31 0.065	4 0.008	9 0.019	5 0.010

chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換

*分析率=精子核板分析数/第一卵割中期到達卵数 × 100

平成10年度と11年度の間でICSI技術の習熟度に差があり、それが受精卵の発生率の違いとして表れたことは第I章ですでに述べた。構造的染色体異常は、受精卵内での雄性前核と雌性前核の発達度のずれ(Tateno and Kamiguchi, 1999a, b)や卵のもつ精子DNA損傷修復能の変化などによっても影響を受けることが知られている。したがって、ICSI技術の未熟さは受精卵にこれらの発生的悪影響を与え、構造異常を増加させる可能性がある。しかし、構造異常出現率が両年度間で違わなかったため、今回はこの可能性を除外して考えてもよいと思われる。

一方、異数性はICSI操作以前から精子に生じている異常であるから、その頻度が両年度間で(ICSI技術の習熟度の差によって)変わらないことは当然である。また、両年度合わせて477精子を染色体分析したが、2倍性精子は1例も出現しなかった。今回の実験では精子頭部のサイズを計測して正常な精子のみを選別しており、この方法がICSI治療の際に2倍性精子を排除する方法として有効であることが細胞遺伝学的にも証明された。

ICSIという実験系自体が精子染色体異常を増加させるか否かを検討するもう一つの方法として、今回の実験結果を別の実験系による結果、すなわち透明帯除

去ハムスター卵との異種間体外受精 (IVF) 法での染色体分析結果と比較した (表 4)。両群とも同一精液提供者から得られた精子を用いて比較実験を行った結果、染色体異常出現率は両群の間ではほぼ等しかった。

**表 4 正常ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率：
ICSI 法と IVF 法間の比較**

実験方法	精子核板 分析数	染色体異常をもつ核板数	
		異数性	構造異常
マウス卵への ICSI 法	477	8 1.7%	42 8.8%
ハムスター卵 への IVF 法	514	11 2.1%	44 8.6%

もちろん、本来なら ICSI と IVF を同じ実験動物卵で行って結果を比較すべきであるが、マウス卵は体外受精条件下ではヒト精子を受け入れない (Quinn, 1979)。一方、ハムスター卵は体外培養環境に弱く ICSI には不向きである。また、卵は精子 DNA 損傷を一部修復できるが、この能力は動物種によって異なる (Tateno et al., 1996)。したがって、今回の比較は厳密なものとはいえないが、ICSI 操作そのものによって精子染色体異常が誘発される危険はそれほど高くはないと考えられる。

2. マウス卵子由来の核板における染色体異常出現率

平成 10 年度には 200 個、11 年度には 274 個のマウス卵子由来核板が染色体分析された (表 5)。

異数性、倍数性、構造異常の出現頻度には両年度の間で有意差が認められず、また、4 つのタイプの構造異常 (染色体型切断、染色体型交換、染色分体型切断および染色分体型交換) の比較でも有意差がなかった。両年度の結果を合わせて得た染色体異常頻度 (異数性 2.1%、構造異常 1.5%) を従来マウス受精卵で得られている異常頻度 (Santaló et al., 1986; Badenas et al., 1989) と比較しても有意差

はなかった。すなわち、ICSI 実験系はマウス卵子ゲノム側からみても染色体異常を増加させていなかった。

表 5 マウス卵子由来の核板における染色体異常出現率

	分析数 (分析率*)	染色体異常をもつ精子核板数 (%)						構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)				
		異数性**			倍数性***			構造 異常	chb	che	chtb	chte
		(-)	(+)	計	0n	2n	計					
10年度 調査	200 93.9	3 1.5	2 1.0	5 2.5	8 4.0	12 6.0	20 10.0	2 1.0	1 0.005	0 0.000	1 0.005	0 0.000
11年度 調査	274 94.2	2 0.7	3 1.1	5 1.8	3 1.1	16 5.8	19 6.9	5 1.8	3 0.011	0 0.000	0 0.000	2 0.007
合計	474 94.0	5 1.1	5 1.1	10 2.1	11 2.3	28 5.9	39 8.2	7 1.5	4 0.008	0 0.000	1 0.002	2 0.004

chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換

*分析率=精子核板分析数/第一卵割中期到達卵数 × 100

**(-), 低数性; (+), 高数性

***0n, 0倍性(卵核なし); 2n, 二倍性

Ⅲ. 凍結保存精子における染色体異常出現率

凍結解凍ヒト精子をヒト卵子に ICSI して子供を得たという報告はすでになされているが、凍結解凍精子の使用が染色体異常児生成という点でどの程度のリスクをもつかは詳しく研究されていない。

Martin et al. (1991)は、ハムスター卵へのヒト精子 IVF 法を用いて、凍結保存と染色体異常の関連性を調査した。同一の精液試料を液体窒素で凍結する前と後で染色体分析した結果、両群の構造的染色体異常頻度に有意差はなかった(異数性頻度は凍結後に有意な減少を示したが、著者らは染色体標本作製時の人為産物と考えている)。しかし、IVF 法では凍結解凍後も生き残った精子のみが調査の対象となるので、染色体異常をもつ精子はなんらかの理由で生存能が低かったり、受精能力が低いのではないかという考えから、凍結保存精子の ICSI を行う場合のリスク推定のデータにならないという主張もある。

そこで我々は凍結解凍精子をマウス卵へ ICSI して、この点に関する直接的なデータを得ようと計画した。

【材料と方法】

精液提供者は前章(第Ⅱ章)の場合と同じである。採取された精液試料を 37℃で 30 分間液化した後に等量の KS-II 耐凍剤(Kobayashi et al., 1991)と混合し、10 ~ 20 分間液体窒素の蒸気に暴露した後、液体窒素中に約 1 週間保存した。実験当日、凍結試料を 37℃で解凍した後、新鮮精液と同様の方法でマウス卵に ICSI し、染色体分析を行った。

【結果と考察】

凍結解凍した精子をマウス卵に ICSI した場合のマウス卵の生存率は新鮮精子を用いた場合との間で有意差を示さなかった(表 6)。しかし、第 1 卵割中期への到達率は凍結解凍精子群で有意に高い値を示した。その理由は次のように考えられる。すなわち、通常受精環境では精子は先体反応を起こした後に卵細胞膜と融合するが、ICSI 法ではこれらの過程をバイパスして精子細胞膜が完全な状

態のまま卵細胞質内に注入されるために精子の膨化に時間がかかると思われる。今回、凍結解凍処理によって精子の細胞膜がなんらかの損傷を受け、これが頭部の膨化や雄性前核形成にプラスの作用を及ぼして第 1 卵割中期への良好な発生に貢献したものと考えられる。事実、界面活性剤で細胞膜を破損させたマウス精子を ICSI すると、未処理精子の場合に比べて頭部の膨化が促進される (Kasai et al., 1999)。

表 6 凍結・解凍ヒト精子を ICSI したマウス卵の生存率および発生率

	動物数	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 1 卵割中期 到達卵数***
新鮮精子	33	965	739 76.6%	713 96.5%	705 98.9%	557 78.1%	504 70.7%
凍結解凍 精子	7	242	190 78.5%	187 98.4%	186 99.5%	155 82.9%	149# 79.7%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数

#：新鮮精子群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.05$)

凍結融解した精子の染色体分析の結果は表 7 および図 12 に示した通りである。凍結解凍精子 141 例における染色体異常出現率(異数性 0.7%、倍数性 0.0%、構造異常 7.8%)は新鮮精子の場合との間で有意差を示さなかった。タイプ別の構造異常頻度で比較しても両者の間に有意差はなかった。すなわち、精子の凍結保存、解凍処理は染色体異常を増加させないことが分かった。ただし、今回調査した精子は、凍結解凍後にも正常の運動能を保持している精子(頭部形態も正常)のみである。凍結解凍の過程で運動能を失う精子もかなりの数にのぼり、これらの不動化した精子で染色体異常出現率がどうなっているのかは大変興味深い問題である。しかし、この研究までは手が回らず、今後の課題として残された。また、精子の耐凍性(解凍後の運動性回復率)にはかなりの個人差があるが、今回はたった 1 人の精液提供者(このドナーでは解凍精子の運動性は良好)についてしか調査を行っていないので、解凍後に著しく運動性が低下する精液試料についても今

後調査を行って比較してみる必要がある。

表7 凍結・解凍ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率

	分析数 (分析率*)	染色体異常をもつ精子核板数 (%)					構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)			
		異数性			倍数性 計 (2n)	構造異常	chb	che	chtb	chte
		低数性	高数性	計						
新鮮精子	477 94.6	5 1.0	3 0.6	8 1.7	0 0.0	42 8.8	31 0.065	4 0.008	9 0.019	5 0.010
凍結解凍精子	141 94.6	0 0.0	1 0.7	1 0.7	0 0.0	11 7.8	7 0.050	0 0.000	3 0.021	4 0.028
合計	618 94.6	5 0.8	4 0.6	9 1.5	0 0.0	53 8.6	38 0.061	4 0.006	12 0.019	9 0.015

chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換
*分析率=精子核板分析数/第一卵割中期到達卵数 × 100

表8 マウス卵子由来の核板における染色体異常出現率：新鮮精子 ICSI 群 (I) と凍結解凍精子 ICSI 群 (II) の間の比較

実験群	分析数 (分析率*)	染色体異常をもつ精子核板数 (%)							構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)			
		異数性**			倍数性***			構造異常	chb	che	chtb	chte
		(-)	(+)	計	0n	2n	計					
I	474 94.0	5 1.1	5 1.1	10 2.1	11 2.3	28 5.9	39 8.2	7 1.5	4 0.008	0 0.000	1 0.002	2 0.004
II	141 94.6	1 0.7	1 0.7	2 1.4	1 0.7	4 2.8	5 3.5	1 0.7	1 0.007	0 0.000	0 0.000	0 0.000

chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換

*分析率=精子核板分析数/第一卵割中期到達卵数 × 100

**(-), 低数性; (+), 高数性

***0n, 0倍性(卵核なし); 2n, 二倍性

前章(第Ⅱ章)の実験と同様に、念のためにマウス卵子核板における染色体異常出現率も調査してみた(表 8)。凍結融解した精子を ICSI した場合のマウス卵子の染色体異常出現率は新鮮精子を ICSI した卵子の場合とほぼ等しく、卵子側にも特別問題となる点は見当たらなかった。

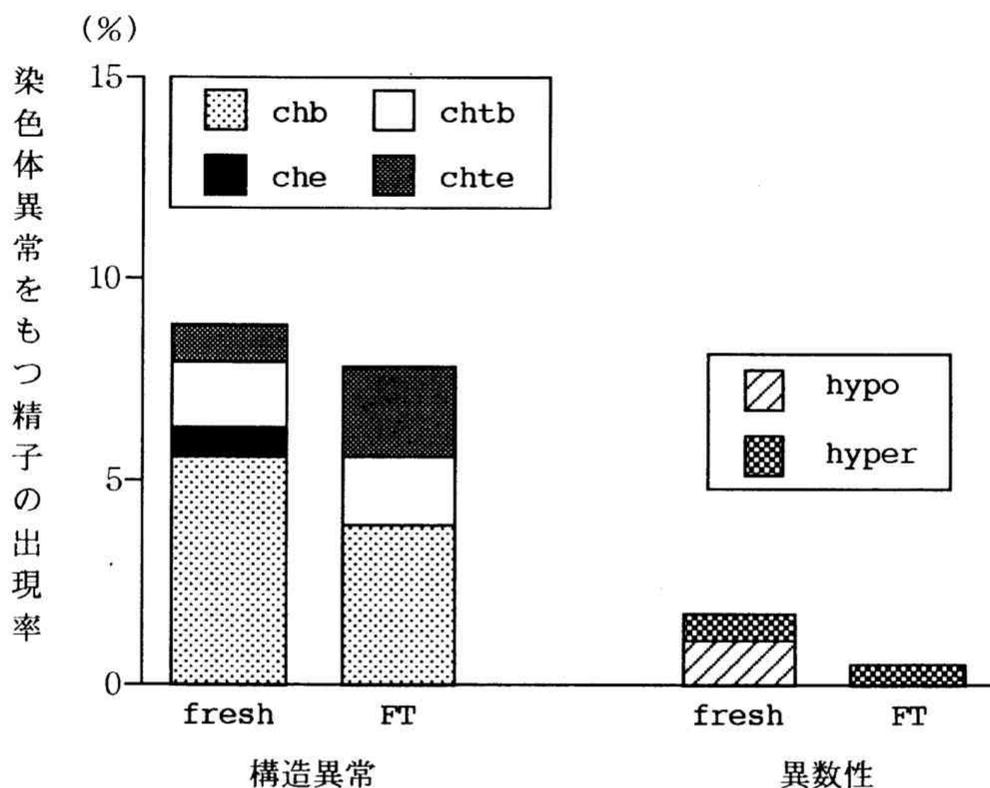


図 12 : 染色体異常をもつ精子の出現率 (%) : 新鮮精子群と凍結解凍精子群の間の比較。fresh, 新鮮精子 ; FT, 凍結解凍精子 ; hypo, 低数性 ; hyper, 高数性 ; chb, 染色体型切断 ; che, 染色体型交換 ; chtb, 染色分体型切断 ; chte, 染色分体型交換

IV. 染色体異常頻度に及ぼす精子・卵子の *in vitro* 加齢の影響

この研究では実験を効率よく行うために雌マウスに過排卵処理を行い、1頭から採卵される30～50の未受精卵を一度に使用している。ICSI法では1卵ずつ精子を注入していくため、受精卵を作製するのに1.5～3時間を要する。その間、遅くICSIされる卵は2時間以上も未受精のまま培養液中で待たされることになる。同じことは精子についても当てはまる。そのため、一部の卵子や精子は*in vitro*で加齢することになる。

卵子が未受精のまま輸卵管または培養液中で加齢すると受精卵に発生異常や染色体異常が増加することは古くから知られている(Vickers, 1969; Austin, 1970; O'Neill and Kaufman, 1988; Badenas et al., 1989)。同様に精子が輸卵管あるいは培養液中で加齢しても発生異常や染色体異常が増加する(Shaver and Martin-DeLeon, 1975; Santaló et al., 1992; Estop et al., 1993; Munné and Estop, 1993)。

そこで、このような精子・卵子の*in vitro*加齢がヒト精子由来ゲノムの染色体異常を増加させるか否か(実験系自体が染色体異常を誘発する可能性)について検討した。

【材料と方法】

前章(第三章)の研究によって、ヒト精子およびマウス卵子の染色体異常出現率はいずれも新鮮精子ICSI群と凍結解凍精子ICSI群の間で差を示さないことが分かったので(表7, 8)、両群のデータをプールしてこの研究に用いた。

ICSI開始から30分ごとに区切って受精卵(ICSI卵)をまとめて培養し、発生学的、細胞遺伝学的データを集計してあるので、それに基づいて精子・卵子の加齢時間群を設定した。すなわち、実験群Iは、精子・卵子の加齢時間が0～30分の群(精子・卵子の準備後30分以内にICSIを完了した群)である。同様に、II群は30～60分の加齢群、III群は60～90分の加齢群、IV群は90～120分の加齢群、V群は120～180分の加齢群である。ただし、精子・卵子がどれだけ加齢したかの時間を特定できなかつた一部のデータについては集計から除外した。また、比較のために、卵子と精子のいずれかの加齢時間だけを極端に長くす

る(養液中に長時間放置しておく)という実験も行った。

【結果と考察】

1. 精子・卵子の加齢と受精卵の発生率

精子・卵子の加齢と受精卵の生存率・発生率の関連性を調査した結果(表 9)、最も加齢の度合いの少なかった 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 1 卵割中期到達率はいずれも有意差を示さなかった。したがって、精子・卵子の *in vitro* 加齢は 3 時間以内であれば、受精卵の発生に悪影響を及ぼさないことが分かった。例外的に III 群における第 1 卵割中期到達率のみが有意に低かったが、その理由は不明である。

一方、ICSI 卵の生存率は I 群に比べて III～V 群で有意に低い値を示し、V 群では特に著しかった。そ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ものと考えられる。今後、実験の成功率を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などの措置が必要であろう。

また、卵子の加齢だけをさらに長時間(180～300 分)にした場合(表 10、VI 群)、加齢が 120 分以内の対照群(表 9、I～IV 群の合計値)に比べて雄性前核形成率および第 1 卵割中期到達率が有意に低下し、また、雄性前核が第 1 卵割中期へ到達できない卵が有意に増加した(表 10 に示した「第 1 卵割中期到達卵」は雌雄の前核が両方とも分裂中期に達した卵を表している。雌性前核は、卵子の長時間加齢にもかかわらず対照群とほぼ等しい率で第 1 卵割中期へ到達しており、中期到達卵の有意な低下は、雄性前核側の発生停止卵の増加ということを意味している)。マウスでは卵子の加齢に伴って単為発生的附活が起こりやすくなるという報告があり(Pinyopummin et al., 1993)、この現象が、今回の雌雄前核形成の不同調や雄性前核の発生停止の原因になっているものと思われる。いずれにしても長時間加齢した卵子を実験に用いるのはよくない。

さらに、精子だけを長時間(120～240 分)加齢させた場合(表 10、VII 群)にも、減数分裂再開率、雄性前核形成率、第 1 卵割中期到達率の有意な低下が認められた。精子頭部には卵子を附活する因子が含まれるということが知られているの

表9 精子・卵子の加齢と受精卵の生存率・発生率の関連性〔1〕

実験群	精子・卵子 の加齢 (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1卵割中期 到達卵数***
I	精子 0~30	142	120	118	116	100	96
	卵子 0~30		84.5%	98.3%	98.3%	84.7%	81.4%
II	精子 30~60	209	162	159	157	133	120
	卵子 30~60		77.5%	98.1%	98.7%	83.6%	75.5%
III	精子 60~90	179	134#	130	130	101	90#
	卵子 60~90		74.9%	97.0%	100.0%	77.7%	69.2%
IV	精子 90~120	145	106#	102	102	82	73
	卵子 90~120		73.1%	96.2%	100.0%	80.4%	71.6%
V	精子 120~180	80	50##	46	46	37	34
	卵子 120~180		62.5%	92.0%	100.0%	80.4%	73.9%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数
 # : I群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.05$)
 ## : I群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.001$)

表10 精子・卵子の加齢と受精卵の生存率・発生率の関連性〔2〕

実験群	精子・卵子 の加齢 (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1卵割中期 到達卵数***
I~IV 合計	精子 0~120	675	522	509	505	416	379
	卵子 0~120		77.3%	97.5%	99.2%	81.7%	74.5%
VI	精子 0~120	169	134	118	115	62#	58#
	卵子 180~300		79.3%	88.1%	97.5%	52.5%	49.2%
VII	精子 120~240	203	153	150	144#	107#	95#
	卵子 0~120		75.4%	98.0%	96.0%	71.3%	63.3%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数
 # : I~IV群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.001$)

で (Parrington et al., 1996)、精子の加齢によってこの因子が不活性化したことが減数分裂再開率低下の原因となっているかもしれない。このように精子の加齢もまた受精卵に発生障害をもたらすことが確かめられた。

以上の結果から、ヒト精子を注入したマウス卵を正常に発生させるためには、採卵後 120 分以内に ICSI 操作を終了することが望ましいと考えられる。

2. 精子・卵子の加齢とヒト精子由来ゲノムの染色体異常

次に、精子・卵子の加齢度合いと精子の構造的染色体異常出現率の関連性を調査した(表 11)。その結果、I 群の異常率が他群に比べ低い傾向を示しものの、全ての群間で有意差は認められなかった。また、加齢時間の長さ按比例した異常率の上昇も認められなかった。これらのことから、180 分程度の精子および卵子の *in vitro* 加齢は精子由来染色体に構造異常を誘発しないと考えられる。I 群異常率が低い傾向を示した理由については第 VI 章で論議するので、そちらを参照いただきたい。

表 11 精子・卵子の *in vitro* 加齢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 [1]

実験群	精子・卵子の加齢 (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	90	3 (3.3)
II	精子 30~60 卵子 30~60	111	11 (9.9)
III	精子 60~90 卵子 60~90	88	7 (8.0)
IV	精子 90~120 卵子 90~120	70	6 (8.6)
V	精子 120~180 卵子 120~180	31	3 (9.7)

また、卵子の加齢時間のみをさらに長くした場合(180 ~ 300 分、表 12、VI 群)および精子の加齢時間のみをさらに長くした場合(120 ~ 240 分、表 12、VII 群)にも、精子由来核板における構造的染色体異常出現率は対照群(加齢 120 分以内、I ~ IV 群の合計値)と比べて有意差を示さなかった。すなわち、表 10 に示したように精子・卵子の加齢が大幅に進むと受精卵に種々の発生障害が現れるが、それにもかかわらず、第 1 卵割中期に到達できた卵のみについていえば、精子由来ゲノムに構造的染色体異常の増加はないということが分かった。

表 12 精子・卵子の *in vitro* 加齢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 [2]

実験群	精子・卵子の加齢 (分)	精子核板 分析数	構造異常をもつ 核板数 (%)
I ~ IV 合計	精子 0~120 卵子 0~120	359	27 (7.5)
VI	精子 0~120 卵子 180~300	56	5 (8.9)
VII	精子 120~240 卵子 0~120	90	8 (8.9)

本研究によりヒト精子の *in vitro* 加齢 4 時間までは染色体異常の増加がないということが明らかになった。一方、マウス精子の場合には 6 時間の加齢で精子の構造的染色体異常が有意に増加し、48 時間後には染色体異常精子の出現率が 60%にも達すると報告されている(Estop et al., 1993)。また、*in vitro* でヒト精子を 24 時間加齢させると構造的染色体異常頻度が対照群の 3 ~ 4 倍に高まるということが報告されている(Munné and Estop, 1993)。しかし、これらの研究は IVF 法を用いて行われたものであり、加齢精子を ICSI した場合には異常頻度がさらに高まるという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、我々の研究をさらに発展させて、ICSI 用精子の *in vitro* 加齢

と染色体異常の関係を検討して行かなければならない。

3. 精子・卵子の加齢とマウス卵子ゲノムの染色体異常

ヒト精子由来ゲノムの染色体分析と並行してマウス卵子ゲノムの染色体分析も行った(表 13)。卵子ゲノムの異数性、倍数性、構造異常の各出現率はいずれも I～V 群の間で有意差を示さなかった。すなわち、卵子・精子の加齢が3時間以内であれば、受精卵における卵子側ゲノムにも染色体異常は誘発されないということが分かった。

表 13 精子・卵子の *in vitro* 加齢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 [1]

実験群	精子・卵子の 加齢 (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	
			(-)	(+)	計	0n	2n		計
I	精子 0~30	89	0	2	2	1	2	3	3
	卵子 0~30		0.0	2.2	2.2	1.1	2.2	3.4	3.4
II	精子 30~60	111	1	1	2	1	4	5	2
	卵子 30~60		0.9	0.9	1.8	0.9	3.6	4.5	1.8
III	精子 60~90	88	2	1	3	2	4	6	0
	卵子 60~90		2.3	1.1	3.4	2.3	4.5	6.8	0.0
IV	精子 90~120	70	0	0	0	2	6	8	1
	卵子 90~120		0.0	0.0	0.0	2.9	8.6	11.4	1.4
V	精子 120~180	30	0	1	1	0	2	2	0
	卵子 120~180		0.0	3.3	3.3	0.0	6.7	6.7	0.0

*(-), 低数性; (+), 高数性

**0n, 0 倍性 (卵核なし); 2n, 二倍性

また、卵子の加齢のみをさらに長くした場合(180～300分, 表14, VI群)および精子の加齢のみをさらに長くした場合(120～240分, 表14, VII群)の卵子ゲノムにおける構造的染色体異常および倍数性出現率はいずれも対照群(I～IV群の合計値)と比較して有意差を示さなかった。つまり、卵子側の染色体分析の結果からも、実験系自体が受精卵の構造的染色体異常頻度に影響を与えないということが確かめられた。

表14 精子・卵子の *in vitro* 加齢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 [2]

実験群	精子・卵子の 加齢 (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	
			(-)	(+)	計	0n	2n		計
I～IV 合計	精子 0~120 卵子 0~120	358	3 0.8	4 1.1	7 2.0	6 1.7	16 4.5	22 6.1	6 1.7
VI	精子 0~120 卵子 180~300	54	4 7.4	4 7.4	8# 14.8	2 3.7	2 3.7	4 7.4	0 0.0
VII	精子 120~240 卵子 0~120	90	1 1.1	1 1.1	2 2.2	4 4.4	6 6.7	10 11.1	1 1.1

*(-), 低数性; (+), 高数性

**0n, 0倍性(卵核なし); 2n, 二倍性

#: I～IV(合計)群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.001$)

一方、異数性出現率はVI群(卵子の長時間加齢群)で有意に増加し、3時間以上の加齢は卵子の第二成熟分裂期染色体に不分離を起こさせることが示唆された。この可能性については古くから多くの研究者によって指摘されてはいたが、卵子染色体標本作製技術の不備などから明確な証明はこれまでなされていなかった。排卵後の卵子の加齢と染色体不分離の関連性は大変興味深い検討課題であるが、今回の研究テーマから外れるのでこれ以上は実験を進めなかった。

V. 頭部形態異常精子における染色体異常出現率

ICSI 技術の開発によって、通常の IVF では受精できない奇形精子の授精が可能となり、重度の乏精子症、奇形精子症なども不妊治療の対象となって来ているということについては、すでに「はしがき」で述べた。また、精子の頭部形態異常と染色体異常の関連性についてはこれまで 2, 3 の報告がなされているが (Lee et al., 1996; Rybouchkin et al., 1996, 1997)、この分野の研究はまだ端緒についたばかりで、論文数そしてその中で報告されている染色体分析例数がかかなり少ないということも第 I 章の「緒言」で述べた。また、マウスでも頭部形態異常をもつ精子で構造的染色体異常頻度が高いと報告されている (Kishikawa et al., 1999)。

そこで、本研究ではヒト精子頭部の形態異常を出現頻度の比較的高い 4 つのタイプに分類し、それらが染色体異常と関連するか否かについて染色体分析例数を増やしてより詳細に検討した。

【材料と方法】

精液提供者は前章までの実験の場合と同一である。Menkveld et al. (1990) の基準を参考にしつつ、頭部形態異常をもつ精子を 4 つのタイプ (小形精子、大形精子、尖状奇形精子、伸長奇形精子) に分類した (図 13)。精液試料中から各奇形精子 (運動能は正常) を探し出してマウス卵へ ICSI した。手順の詳細は下記の通りである。精子・卵子の *in vitro* 加齢の影響を考慮して、各奇形精子の選別から ICSI までの作業を 2 時間以内に完了させ、また、下記以外の実験条件は前章の場合と同じにした。

- (1) 小形精子 (図 13, b) : 顕微鏡下でマイクロメーターを用いて精子頭部の長径および短径を測定し、両径の値がともに $3 \mu\text{m}$ 以下の小形精子を選別した。注入用ピペットの先端径を $3 \mu\text{m}$ に加工し、これを用いてマウス卵への ICSI を行った。
- (2) 大形精子 (図 13, c) : ミクロメーターで精子頭部のサイズを測定し、長径が $5 \mu\text{m}$ 以上、短径が $3 \mu\text{m}$ 以上の大形精子を選別した。注入用ピペットの先端径を $5 \mu\text{m}$ に加工し、これを ICSI に用いた。大形精子の出現頻度は低く、

精子選別に時間がかかるため、ステージ上に置く卵子の数を 5 個に制限して 30 分以内にそれらの ICSI を完了させた。

(3) 尖状奇形精子(図 13, d) : 頭部サイズが正常範囲 (長径 3 ~ 5 μm 、短径約 3 μm) でかつ頭部先端が尖状の精子を選別した。精子注入には正常精子の場合と同じ口径のピペットを用いた。大型精子の場合と同様、このタイプの奇形精子の選別にも時間がかかるので、ステージ上に置く卵の数を 5 個に減らして 30 分以内に ICSI を終了させた。

(4) 伸長奇形精子(図 13, e) : 細長く伸びた頭部(長径が 6 μm 以上、短径 3 μm 以下)をもつ精子を選別し、正常精子の場合と同じ注入用ピペットを用いてマウス卵へ ICSI した。このタイプの精子の選別にも時間がかかるので、一度に使用するマウス卵を制限し、30 分以内に ICSI を終了させた。

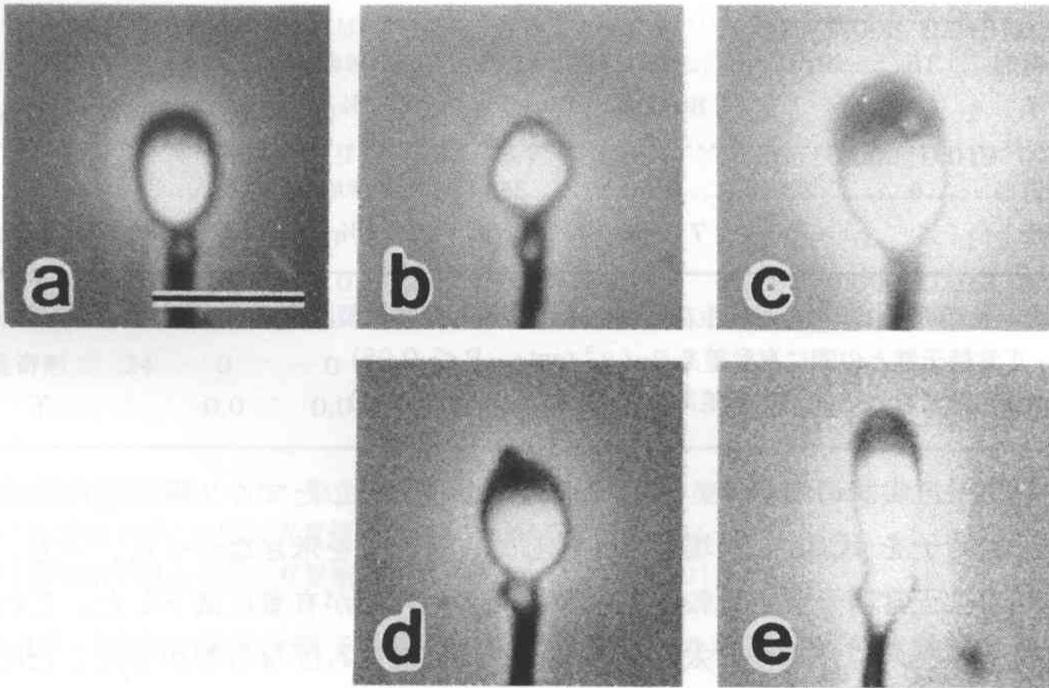


図 13 : 頭部形態異常をもつヒト精子。図中の横線は 5 μm を表す。
a, 正常精子; b, 小形精子; c, 大形精子; d, 尖状奇形精子; e, 伸長奇形精子。

【結果と考察】

1. 頭部形態異常精子 ICSI 卵の発生的調査

頭部形態異常精子を ICSI したマウス卵の生存率および発生率は表 15 に示した通りである。

表 15 頭部形態異常ヒト精子を ICSI したマウス卵の生存率および発生率

実験群	動物数	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 1 卵割中期到達卵数***
正常精子	40	1207	929 77.0%	900 96.9%	891 99.0%	712 79.1%	653 72.6%
小形精子	9	227	173 76.2%	166 96.0%	159 95.8%	130 78.3%	120 72.3%
大形精子	11	289	162## 56.1%	150 92.6%	145 96.7%	121 80.7%	112 74.7%
尖状奇形精子	16	160	128 80.0%	122 95.3%	110## 90.2%	83## 68.0%	79# 64.8%
伸長奇形精子	4	53	38 71.6%	34 89.5%	32## 94.1%	26 76.5%	24 70.6%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数

: 正常精子群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.05$)

: 正常精子群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.01$)

小形精子、尖状奇形精子、伸長奇形精子を ICSI したマウス卵の生存率はいずれも正常精子を ICSI した場合と比較して有意な差を示さなかった。一方、大形精子群では正常精子群と比較して ICSI 卵の生存率が有意に低下した。これは、大形精子の注入に先端径の太いピペットを用いなければならなかったことに起因していると考えられる。

小形および大形精子群における減数分裂再開率は正常精子群の場合と比較して有意差を示さず、これらの奇形精子においても卵子を附活化する機能は正常精子の場合と変わらないことが示唆された。その後の前核形成率、第 1 卵割中期到達率も 3 精子群の間ではほぼ等しかった。一方、尖状奇形精子および伸長奇形精子群では減数分裂再開率が正常精子の場合に比べて有意に低かった。すなわち、これらの奇形精子では卵子の附活能が低下あるいは喪失しているものと思われ

る。この減数分裂再開率の低下がその後の前核形成率、第 1 卵割中期到達率の低下にもつながっていた。

2. 頭部形態異常精子の染色体分析

各奇形精子群における染色体異常出現率は表 16 および図 14 に、また、各奇形精子群で観察された構造的染色体異常の核型リストは表 17 に示されている。

表 16 頭部形態異常ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率

実験群	分析数	染色体異常をもつ精子核板数 (%)					構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)			
		異数性		計	倍数性 (2n)	構造異常	chb	che	chtb	chte
		低数性	高数性							
正常精子	618	5	4	9	0	53	38	4	12	9
		0.8	0.6	1.5	0.0	8.6	0.061	0.004	0.019	0.015
小形精子	112	2	0	2	0	7	5	0	2	0
		1.8	0.0	1.8	0.0	6.8	0.045	0.000	0.018	0.000
大形精子	108	2	1	3	4#	9	7	1	2	0
		1.9	0.9	2.8	3.7	8.3	0.065	0.009	0.019	0.000
尖状奇形 精子	77	2	0	2	0	8	7	0	1	0
		2.6	0.0	2.6	0.0	10.4	0.091	0.000	0.013	0.000
伸長奇形 精子	24	0	0	0	0	8##	11	0	1	0
		0.0	0.0	0.0	0.0	33.3	0.458	0.000	0.042	0.000

chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換

: 正常精子群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.01$)

: 正常精子群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.001$)

表 17 頭部形態異常精子由来の核板に観察された構造的染色体異常のリスト

頭部形態異常	異常核型のタイプ × 観察核板数
小形	23, 1 csb × 5; 23, 1 ctf × 2
大形	23, 1 csb × 5; 23, 2 csf × 1; 23, 1 ctf 23, 1 dic + 1 csf × 1
尖状奇形	23, 1 csb × 5; 23, 1 ctf × 3
伸長奇形	23, 1 csb × 4; 23, 1 ctf × 1; 23, 3csf × 2

csb, 染色体型切断; csf, 染色体型断片; ctf, 染色分体型断片; dic, 二動原体染色体

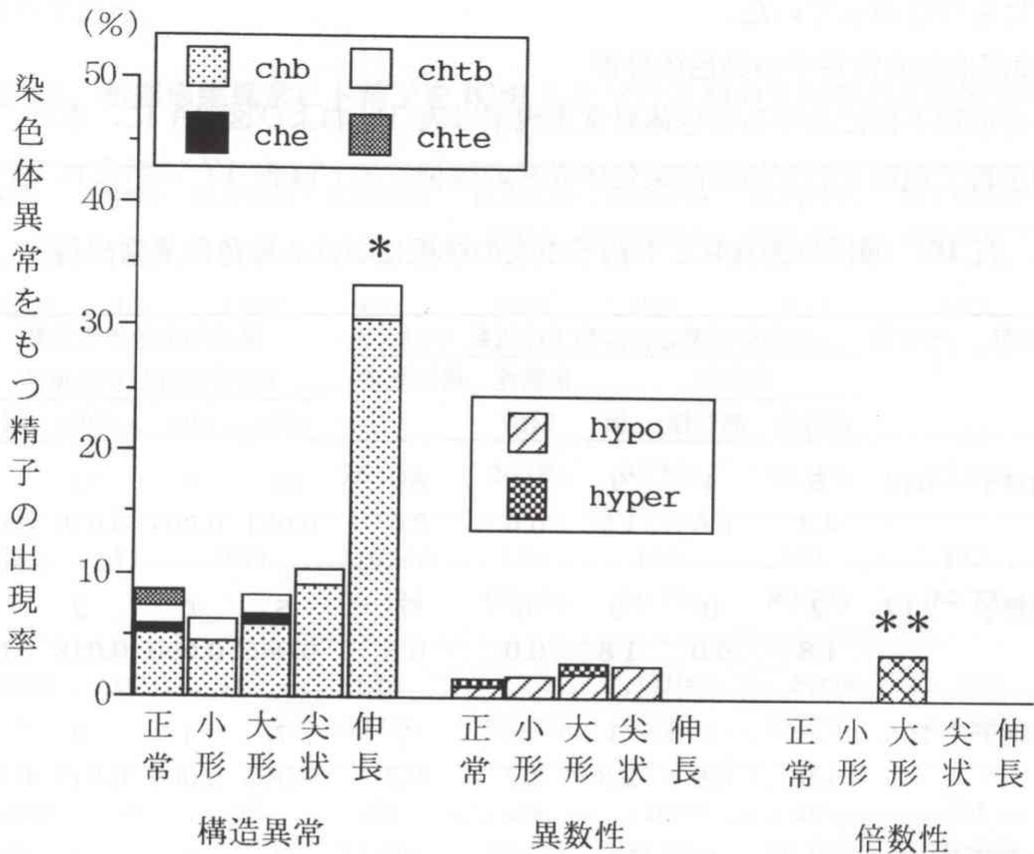


図 14 : 染色体異常をもつ精子の出現率 : 各奇形精子群および正常精子群間の比較。chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換; hypo, 低数性; hyper, 高数性。

*正常精子群との間に有意差あり (P < 0.001)

**正常精子群との間に有意差あり (P < 0.01)

- (1) 小形精子 : この精子群における染色体異常出現率、すなわち、異数性、倍数性 (2n)、構造異常の頻度はいずれも正常精子群と比較して有意差を示さず、また、構造異常頻度をタイプ別 (染色体型切断、染色体型交換、染色分体型切断、染色分体型交換) に比較しても有意差はなかった。すなわち、精子頭部の小形化は染色体異常と関連しないことが分かった。したがって、頭部の小形化は従来推定されていたような染色体数の減少 (低数性) によるものではなく、精子核凝縮の異常によるものと考えられる。

(2) 大形精子：この精子群における異数性および構造異常の出現頻度はいずれも正常精子群との間で有意差を示さなかった。構造異常のタイプ別比較でも差がなかった。したがって、精子頭部の大型化もまた、染色体数の増加（高数性）によるものではなくて精子核凝縮の異常によるものと考えられる。ただし、たった1例ではあるが、染色体数が極端に多い異数性も観察された(図 15)。

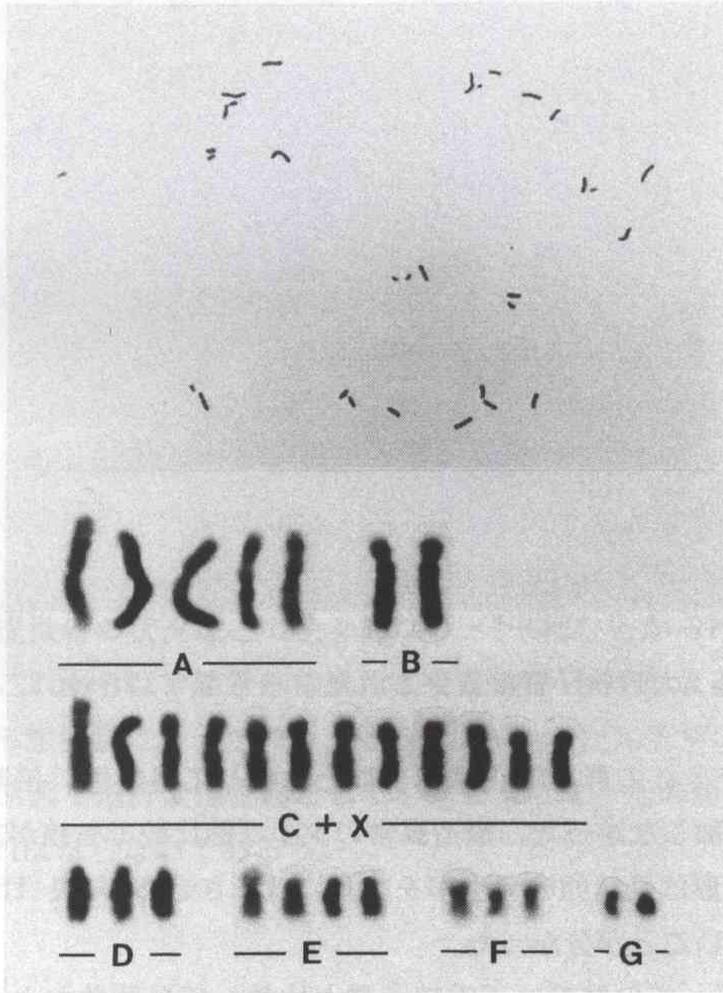


図 15：大形精子群で観察された高数性の1例。染色体核板(上段)
およびその核型：31, X, +2,+3,+4C,+18,+F

一方、倍数性(2n, 図 16)の頻度は正常精子群の場合と比較して有意に増加していた。しかし、その値は 3.7%と低率であった。すなわち、2 倍性や極端な高数性などの染色体異常が原因で精子の大型化が起こっているケースもごく

一部存在すると思われるが、大部分の精子の大型化は精子核凝縮の異常によって生じているものと考えられる。

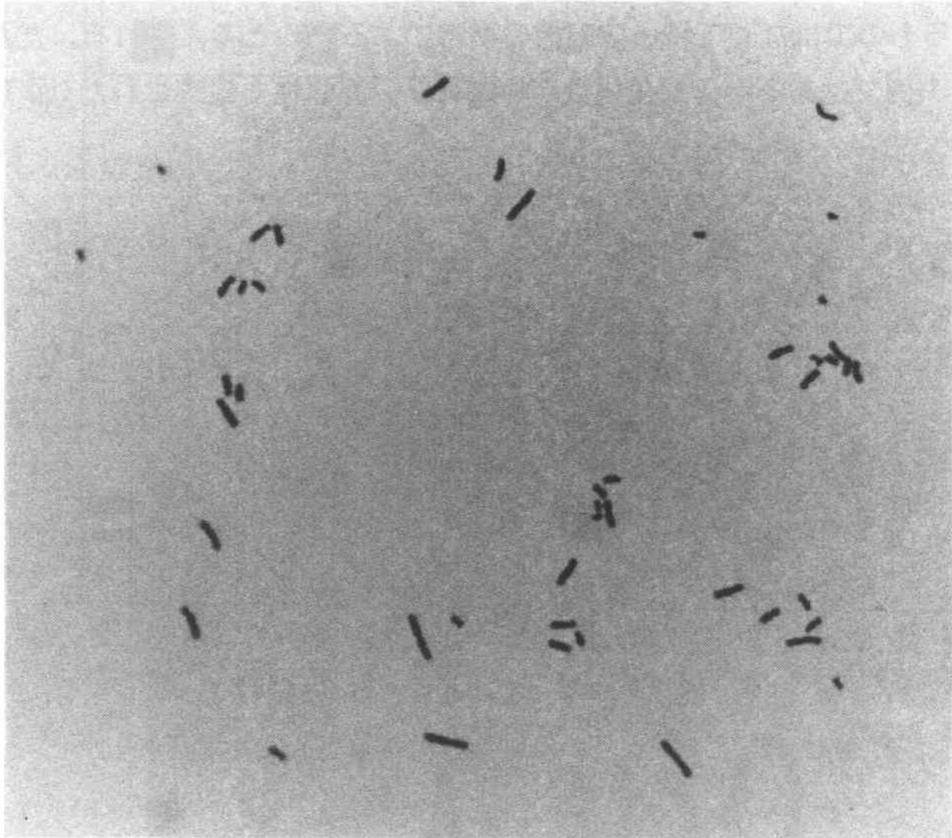


図 16：大形精子群で観察された 2 倍性異常 ($2n=46$)。

- (3) 尖状奇形精子：この群では正常精子群と比較して異数性、倍数性、構造異常のいずれも増加しなかった。構造異常のタイプ別比較でも差がなかった。すなわち、尖状奇形は受精卵の発生率を有意に低下させるが(表 15)、染色体異常とは関連しないことが分かった。
- (4) 伸長奇形精子：この群では正常精子群と比較して異数性および倍数性の頻度に有意差はなかった。しかしながら、構造異常をもつ精子の頻度は対照群よりはるかに高かった。このことは、伸長奇形に伴う精子核の変形により染色体異常につながるような DNA の損傷あるいはクロマチン構造の変化が起っていることを示唆している。これと類似の結果はすでに我々のこれまでの研究でも観察されている (Lee et al., 1996)。

以上の結果をまとめると、精子頭部の大型化はわずかながら倍数性と関連性を

もち、伸長奇形は構造的染色体異常と強い関連性をもつといえる。また、4種の奇形とも異数性には関連しなかった。全体としては、実験を始める前に予想していたよりも精子の奇形と染色体異常の関連性は低かった。しかし、今回の結果は、正常な精液性状をもつ1男性の精子を用いて得られた結果であり、これが重度の男性不妊症の患者の精子にも当てはまるか否かについては今後さらに検討して行かなければならない。

最近、精子核 FISH 法により、精子染色体分析なしに異数性の頻度を検討できるようになった。その結果では、男性不妊症患者の精子で異数性が増加するという報告(Pang et al., 1995)と、しないという報告(Miharu et al., 1994)がなされている。いずれにしても、精子核 FISH 法による異数性頻度と精子染色体分析による異数性の頻度の間には数値上の差が大きくあり、精子核 FISH 法自体の信頼性はいまだ高くない(上口・秋山, 1995)

Rybouchkin et al. (1996)は男性不妊症患者の精液から得た球形精子をマウス卵に ICSI して染色体分析を行い、この頭部形態異常が染色体異常と関連しないことを報告している。一方、In't Veld et al. (1997)は男性不妊症患者の精液中にみられた巨大頭部精子の精子核 FISH を行い、奇形精子のほとんどが2倍性あるいは3倍性の染色体異常だったという症例を報告している。

以上述べてきたように精子頭部の形態異常と染色体異常の関連は頭部奇形のタイプや精子提供者の状況などで色々異なり、“一把ひとからげ”で論ずることができない。これからは、精子形態異常の生成機序(精子形成過程のどの段階に不備があって形態異常になったのか、あるいは、いったん正常に形成された精子がなんらかの原因で退行変性を起こして形態異常になったのかなど)にも目を向けて行かなければならないであろう。

VI. 不動性精子における染色体異常出現率：精漿中保存の効果

男性不妊症患者には、奇形精子ばかりではなく運動能をもたない精子の出現頻度が著しく高い例も少なくない。このようなケースも ICSI 治療の対象となり得るので、不動性精子と染色体異常の関連性を明らかにすることは重要な研究課題である。

Rybouchkin et al. (1997)は、射精精液中の不動性ヒト精子の染色体分析を試み、不動性精子群の中に占める死亡精子の割合が高い精液の場合ほど発生停止卵の割合や精子由来染色体異常(構造異常)率が高かったと報告している。

今回我々は、彼らの結果を確認すべく不動性精子の染色体分析を行った。その結果、後述するように構造的染色体異常の増加は認められなかった。そこで、この正反対の結論の理由を探るために 2 者の研究方法の比較検討を進め、ICSI に至るまでの不動性精子の処理・保存方法が染色体異常率に大きく関係することを見出したので報告する。

1. 不動性精子の染色体異常出現率

【材料と方法】

- (1) 精液提供者は前章までの実験の場合と同一である。射精精液中ですでに不動性であった精子のみを実験に用いた。今回の研究では、不動性精子が死亡精子か生存精子かの確認は行わなかった。
- (2) 不動性精子の ICSI：精子注入用ピペットには正常精子の場合と同じ口径のものを用いた。精子の遠心・洗浄操作により二次的に生じた不動性精子が混入するのを避けるため、液化した精液そのものを精子選別用ドロップとして用いた。顕微鏡下で頭部形態の正常な不動性精子を選んで 10% PVP 液に移した。この溶液中でピペッティングにより精漿をできるだけ取り除き、ピエゾパルスを与えた後に(1分以内)、マウス卵に注入した。不動性精子の選別には時間がかかるので、ステージ上に置く卵の数を 5 個に制限し、30 分以内にこれらの卵の ICSI を終了させた。5 卵ずつの ICSI を繰り返し、2 時間が経過した時点で残った未受精卵すべてを廃棄した。卵子の *in vitro* 加齢の影響を除外するためである。その他の実験条件は前章までの実験に準じた。

(3) 対照群として頭部形態が正常な運動性精子を精液中から選別し、マウス卵に注入した(前章までの実験では、精漿を除去するために精子の遠心洗浄を行ったが、ここでは実験群と精子処理条件を同一にするために精子の遠心洗浄を行わなかった)。

【結果と考察】

不動性精子を ICSI したマウス卵の生存率および発生率は運動性精子の場合と比較して有意差を示さなかった(表 18)。すなわち、不動性精子は正常精子と同様の卵子附活化能をもつということが示唆された。また、両群の間で第 1 卵割中期到達率に差が認められなかったので、実験系自体が不動性精子由来ゲノムの染色体異常を増加させる可能性は少ないと思われる。

表 18 不動性ヒト精子を ICSI したマウス卵の生存率および発生率

実験群	動物数	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 1 卵割中期 到達卵数***
運動性 精子	6	201	170 84.6%	165 97.1%	165 100.0%	150 90.9%	139 84.2%
不動性 精子	10	239	202 84.5%	198 98.0%	195 98.5%	186 93.9%	174 87.9%

*分母=使用卵数

**分母=生存卵数

***分母=標本作製卵数

不動性精子群の染色体異常出現率を運動性精子群と比較した結果(表 19 および図 17)、異数性、倍数性、構造異常のいずれにも両群間で有意差が認められなかった。すなわち、我々の実験では、精子の運動能の有無は染色体異常と関連しなかった。しかし、前述のように Rybouchkin et al. (1997) は不動性精子で高率の構造的染色体異常を観察している。彼等は精液試料を遠心・洗浄した後に精子を培養液中に保存したのに対して、我々は射精精液から直接不動性精子を選別して ICSI を行った。そこで、不動性精子の培養液中保存および遠心洗浄処理が

構造的染色体異常を増加させるか否かの検討を次に行った。

表 19 不動性ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率

実験群	分析数	染色体異常をもつ精子核板数 (%)					構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)			
		異数性			倍数性 (2n)	構造異常	chb	che	chtb	chte
		低数性	高数性	計						
運動性 精子	116	0 0.0	1 0.9	1 0.9	0 0.0	4 3.4	4 0.034	0 0.000	0 0.000	0 0.000
不動性 精子	157	0 0.0	2 1.3	2 1.3	0 0.0	7 4.5	9 0.057	0 0.000	2 0.013	2 0.013

chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換

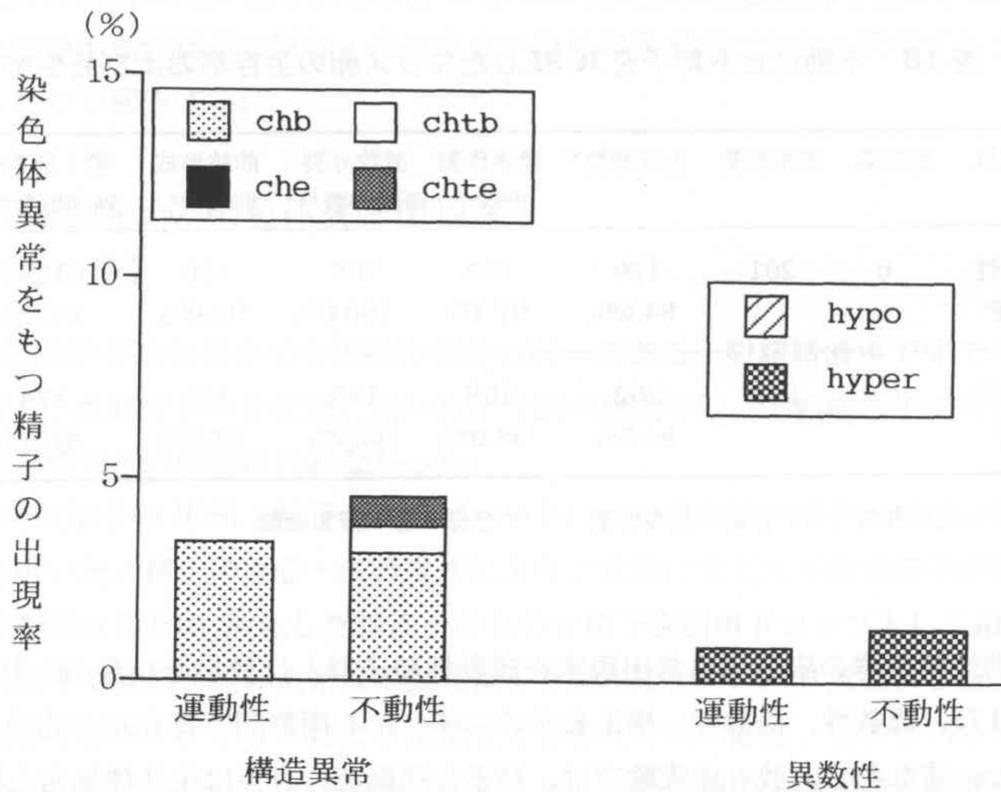


図 17 : 染色体異常をもつ精子の出現率 : 運動性精子群と不動性精子群の間の比較。chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換; hypo, 低数性; hyper, 高数性。

2. 不動性精子の染色体異常出現率に及ぼす培養液中保存の影響

【材料と方法】

- (1) 精液提供者は前述の実験の場合と同一である。射精精液中ですでに不動性だった精子のみを実験に用いた。
- (2) 液化精液から選別した不動性精子(頭部形態は正常)40 個を 3 種類の培養液ドロップ(HEPES-BWW 液、modified HTF 液、PBS 液; 各 5 μ l)に移した。この際、精子とともに持ち込まれた精漿の量は合計約 40 μ l 程度で、精漿は培養液によって約 125 分の 1 に希釈される計算となった。そのまま培養液中で 2 ~ 2.5 時間保存した後、精子をマウス卵に ICSI した。対照群としては、フィルター(孔径 0.8 μ m)で細胞を取り除いた精漿中に実験群と同時間(2 ~ 2.5 時間)保存した不動性精子を用いた。その他の条件は前述の実験に準じた。
- (3) Rybouchkin et al. (1997)の結果との比較のために、彼らと同様に精子の遠心洗浄・培養液保存処理も行った。すなわち、①液化精液を HEPES-BWW 液で 2 回遠心・洗浄した後、HEPES-BWW 液 1 ml に精子を懸濁した。②精子懸濁液を試験管中の 80%パーコール溶液(4 ml)の上に積層し、L字型の棒を 2, 3 度上下させて密度勾配を作った後、600 g で 20 分間遠心した。③不動性精子を多く含む上層部分 1 ml を回収し、HEPES-BWW 液で 2 回遠心洗浄してパーコールを除去したものを精子懸濁液とした。④精子懸濁液より選別した不動性精子を 2 時間以内にマウス卵に ICSI した。精子懸濁液の調製に 1 時間を要したため、精子は ICSI までの間に 1 ~ 3 時間(平均 2 時間)、HEPES-BWW 液に暴露されることになった。

【結果と考察】

培養液中保存の不動性精子を ICSI されたマウス卵の発生率は表 20 に示した通りである。ICSI 卵の生存率はいずれの培養液群でも低下しなかった。しかし、減数分裂再開率は対照群(精漿中保存)と比較して PBS 液群で有意に低下した。また、雄性前核形成率は PBS 液群に加えて HEPES-BWW 液群でも有意に低下した。さらに第 1 卵割中期到達率は 3 培養液群すべてで対照群より有意に低下した。すなわち、不動性精子は培養液に曝されることによって ICSI 卵の発生に障害をもたらすことが示された。

表 20 培養液保存した不動性ヒト精子を ICSI したマウス卵の生存率及び発生率

精子 保存液	動物数	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1卵割中期 到達卵数***
精漿	7	161	143 88.8%	140 97.9%	137 97.9%	132 94.3%	126 90.0%
HEPES -BWW	9	143	133 93.0%	133 100%	128 96.2%	116# 87.2%	104## 78.2%
Modified HTF	3	73	65 89.0%	63 96.9%	61 96.8%	60 95.2%	50# 79.4%
PBS	2	65	61 93.8%	61 100%	55## 90.2%	51# 83.6%	46## 75.4%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数

: 正常精子群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.05$)

: 正常精子群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.01$)

表 21 各種培養液中に保存した不動性ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率

実験群	分析数	染色体異常をもつ精子核板数 (%)					構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)			
		異数性		計	倍数性 (2n)	構造異常	chb	che	chtb	chte
		低数性	高数性							
精漿	112	0 0.0	2 1.8	2 1.8	0 0.0	6 5.4	6 0.054	0 0.000	2 0.018	1 0.009
HEPES -BWW	97	1 1.0	0 0.0	1 1.0	0 0.0	25# 25.8	26 0.268	8 0.082	19 0.196	0 0.000
Modified HTF	46	2 4.3	0 0.0	2 4.3	0 0.0	15# 32.6	20 0.435	1 0.022	12 0.261	4 0.087
PBS	42	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	6 14.3	6 0.143	0 0.000	1 0.024	0 0.000

chb, 染色体型切断 ; che, 染色体型交換 ; chtb, 染色分体型切断 ; chte, 染色分体型交換

: 精漿中保存群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.01$)

培養液中に保存した不動性精子の染色体分析結果は表 21 および図 18 に示されている。3 つの培養液群における異数性および倍数性の出現率はいずれも精漿群と比較して有意差を示さなかった。一方、HEPES-BWW 液群および modified HTF 液群における構造的染色体異常出現率は精漿群と比較して有意に増加した。また、PBS 液群でも構造異常頻度の増加傾向が認められた。構造異常のタイプ別に出現頻度を比較すると、培養液中保存により染色体型切断および染色分体型切断が顕著に増加していた。すなわち、培養液中に保存することによって、構造的染色体異常につながる変化が不動性精子に引き起こされることが示された。したがって、Rybouchkin et al. (1997) が不動性精子で観察した高率の構造的染色体異常は、精子の培養液中保存の間に生じた人為産物の可能性が高い。

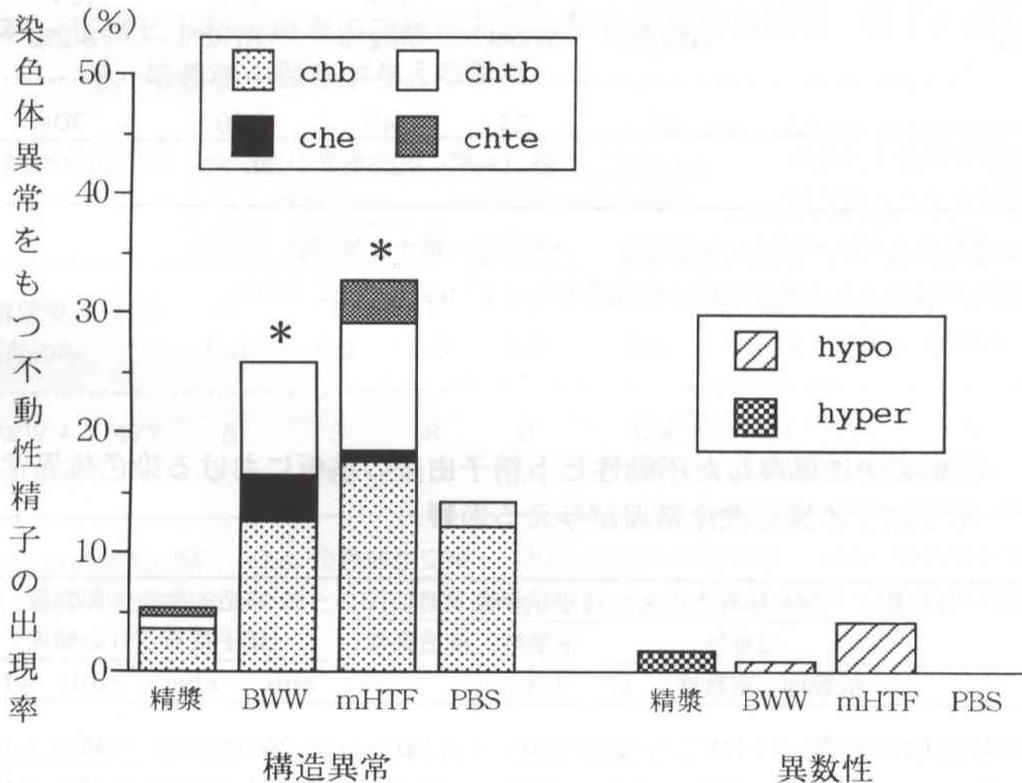


図 18 : 精漿および 3 種類の培養液中に保存された不動性精子における染色体異常出現率。chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換; hypo, 低数性; hyper, 高数性。*精漿中保存群との間に有意差あり (P < 0.01)

次に、HEPES-BWW 液中での精子保存の前に、同液による精子の遠心・洗浄処理を付加してその影響を調査した。

BWW + 遠心洗浄群では BWW 液保存のみの群と比較して第一卵割中期到達率が有意に低かった(表 22)。すなわち、BWW 液保存が ICSI 卵に与える発生障害(表 20)は、不動性精子の遠心洗浄処理の付加によってさらに強められるということが示された。

表 22 遠心洗浄した不動性ヒト精子を ICSI したマウス卵の生存率及び発生率

実験群	動物数	使用卵数	生存卵数*	標本作製	減数分裂	前核形成	第 1 卵割中期
				卵数**	開卵数***	卵数***	到達卵数***
BWW 中 保存のみ	9	143	133 93.0%	133 100%	128 96.2%	116 87.2%	104 78.2%
BWW + 遠心洗浄	2	65	54 83.1%	53 98.1%	49 92.5%	46 86.8%	30# 56.6%

*分母=使用卵数 **分母=生存卵数 ***分母=標本作製卵数

: BWW 中保存のみの群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.01$)

表 23 培養液中に保存した不動性ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率：精子の遠心洗浄処理が与える影響

実験群	分析数	染色体異常をもつ精子核板数 (%)					構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)			
		異数性		計	倍数性 (2n)	構造異常	chb	che	chtb	chte
		低数性	高数性							
BWW 中 保存のみ	97	1 1.0	0 0.0	1 1.0	0 0.0	25 25.8	26 0.268	8 0.082	19 0.196	0 0.000
BWW + 遠心洗浄	27	0 0.0	0 0.0	0 0.0	0 0.0	13# 48.1	13 0.481	7 0.259	5 0.185	6 0.222

chb, 染色体型切断; che, 染色体型交換; chtb, 染色分体型切断; chte, 染色分体型交換

: BWW 中保存のみの群との間に有意差あり (χ^2 test, $P < 0.01$)

また、BWW + 遠心洗浄群における不動性精子の構造的染色体異常出現率は、BWW 液保存のみの群と比較して大きく上昇し、48%にも達した(表 23)。構造異常の増加をタイプ別にみると、染色体型切断と染色体型および染色分体型交換の増加が顕著であった。すなわち、BWW 液保存による不動性精子の構造的染色体異常の増加(表 21)は、精子の遠心洗浄処理の付加によってさらに強められることが明らかになった。

今回の研究では、まず最初に正常精子における染色体異常頻度の調査を行った(第 II 章)、その実験では精子の遠心洗浄および培養液(BWW)中保存を行っているので、正常精子もこれらの処理の影響を受けているかもしれない。そこで、正常精子についても不動性精子の場合と同様の比較を行ってみた(表 24)。

表 24 正常ヒト精子由来の核板における染色体異常出現率：精子の遠心洗浄処理、培養液中保存が与える影響

実験群	分析数	染色体異常をもつ精子核板数 (%)					構造的染色体異常数 (精子核当たりの頻度)			
		異数性		計	倍数性 (2n)	構造異常	chb	che	chtb	chte
		低数性	高数性							
精漿中 保存のみ	116	0 0.0	1 0.9	1 0.9	0 0.0	4 3.4	4 0.034	0 0.000	0 0.000	0 0.000
BWW + 遠心洗浄	477	5 1.0	3 0.6	8 1.7	0 0.0	42# 8.8	31 0.065	4 0.008	9 0.019	5 0.010

chb, 染色体型切断； che, 染色体型交換； chtb, 染色分体型切断； chte, 染色分体型交換

#：精漿中に保存のみの群との間に有意差傾向あり (χ^2 test, $0.05 < P < 0.10$)

遠心洗浄して BWW 液中に保存した正常精子における構造的染色体異常出現率(第 II 章、表 3 のデータ)は、遠心洗浄せずに精漿中保存をした正常精子における異常出現率(本章、表 19 のデータ)と比較して増加傾向が認められた。すなわち、形態および運動能からみて正常と判定された精子のなかにも、不動性精子と同様に遠心洗浄や培養液中保存の影響を受ける精子が一部含まれていることが分かった。

精子・卵子の in vitro 加齢が 0 ~ 30 分の群(第 IV 章、表 11)では構造的染色

体異常率が 3.3%で、精漿中保存をした正常精子における異常出現率(3.4%)と同様に低率だったが、その後、加齢時間が長くなると異常率は 8 ~ 10%に上昇した。すなわち、精子が遠心洗浄処理を受けても、培養液中での保存時間が短い間は染色体異常につながる障害起こらないものと思われる。マウスにおいても精子の死亡(雄個体の死亡に伴う精子の精巣上体内死亡)後、時間の経過につれて構造的染色体異常出現率が増加すると報告されている(Kishikawa et al., 1999)。

現在、ICSI を利用したヒト不妊治療では培養液で洗浄した精子が一般的に用いられているが、今回の研究によって精漿中に保存した精子で染色体異常が最も少ないことが明らかにされた。このことは今後の ICSI 治療技術の改良に資するきわめて重要な知見といえる。

おわりに

研究助成の申請段階で計画していた実験のほぼ八割方を実行に移すことができ、研究そのものはかなり順調に進んだと思っている。しかし、当初の計画のうち、男性不妊症患者から得た精子の染色体分析、凍結解凍後に不動性となった精子の染色体分析などについては実験に着手できず、今後の課題として残された。また、実施された研究の中には染色体分析の例数が必ずしも十分ではない部分もあり、今後の補充実験が必要である。

研究の進行には上述のように若干の遅れが出たが、この3年の研究期間には本成果報告書の数字には表れない大きな成果があった。その一つは、分担研究者の立野裕幸が文部省の長期在外研究員としてハワイ大学へ留学し(10ヶ月間: 1999年4月~2000年2月)、染色体異常に関する研究を行ったことである。彼は共同研究により、(1) ICSIの際に精子を不動化するために行う超音波処理そのものが従来云われているほど傷害(構造的染色体異常)を与えない(研究発表リスト7)、(2) 4℃に保存した死亡雄マウスの精子を卵子にICSIした場合、雄の保存期間が長くなるにつれて構造的染色体異常をもつ精子が増加する(引用文献12)、(3) 頭部形態異常をもつマウス精子では構造的染色体異常が有意に増加する(引用文献13)ということを明らかにした。これらの研究はヒト精子を用

いた本研究を側面から強力にサポートしてくれた。

もう一つの成果は、本課題による研究その他の研究活動を認められて、分担研究者の渡邊誠二が本学教務職員から弘前大学医学部解剖学教室の助手として昇任、転出することになったということである(この研究報告書提出の直前の3月1日付け)。

このような事情もあり、本課題の研究成果の公表が遅れているが、できるだけ早く論文として発表するつもりである。

謝 辞

本研究報告書をまとめるに当たって、数多くのご指導・助言を賜った福島県立医科大学・産婦人科学教室の諸先生方に厚く御礼申し上げます。柳田 薫 助教授には本科学研究助成の申請段階から、マイクロマニピュレーターその他、研究に必要な機器類の選定に色々なご助言をいただきました。佐藤 章 教授は分担研究者の渡邊誠二を ICSI 技術研修のために快く研究室へ受け入れて下さり、また、同研究室の片寄治男、木村康之、阿久津英憲、矢澤浩之の諸先生は ICSI 技術を実際に指導して下さいました。

また、ハワイ大学解剖学・生殖生物学研究室の柳町隆造教授は、研究分担者の立野裕幸を文部省在外研究員として受け入れ、ICSI 胚の発生学的・細胞遺伝学的研究の指導をして下さいました。ここに深く感謝申し上げます。

引用文献

1. Austin CR: Ageing and reproduction: Postovulatory deterioration of the egg. *J. Reprod. Fertil.*, 12(Suppl.): 39-53, 1970.
2. Badenas J, Santaló J, Calafell JM, Estop AM and Egozcue J: Effect of the degree of maturation of mouse oocytes at fertilization: a source of chromosome imbalance. *Gamete Res.*, 24: 205-218, 1989.
3. Chatot CL, Ziomek A, Bavister BD, Lewis JL and Torres I: An improved culture medium supports development of random-bred 1-cell mouse embryos in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 86: 679-688, 1989.
4. Chatot CL, Lewis JL, Torres I and Ziomek CA: Development of 1-cell embryos from different strains of mice in CZB medium. *Biol. Reprod.*, 42: 432-440, 1990.
5. Estop AM, Munné S, Jost LK and Evenson DP: Studies on sperm chromatin structure alterations and cytogenetic damage of mouse sperm following in vitro incubation. *Studies on in vitro-incubated mouse sperm. J. Androl.*, 14: 282-288, 1993.
6. In't Veld PA, Broekmans FJK, De France HF, Pearson PL, Pieters MHEC and Van Kooij RJ: Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and chromosomally abnormal spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 12: 752-754, 1997.
7. Kamiguchi Y and Mikamo K: An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosomes using zona-free hamster ova. *Am. J. Hum. Genet.*, 38: 724-740, 1986.

8. Kamiguchi Y, Tateno H and Mikamo K: Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in humans. *Cong. Anom.*, 34: 1-12, 1994.
9. 上口勇次郎・秋山建兒：ヒトの異数性精子出現頻度：染色体分析法と FISH 法の比較. *Mol. Med.*, 32: 886-888, 1995.
10. Kasai T, Hoshi K and Yanagimachi R: Effect of sperm immobilisation and demembration on the oocyte activation rate in the mouse. *Zygote*, 7: 187-193, 1999.
11. Kimura Y and Yanagimachi R: Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52: 709-720, 1995.
12. Kishikawa H, Tateno H and Yanagimachi R: Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers maintained at 4 °C. *J. Reprod. Fertil.*, 116: 217-222, 1999.
13. Kishikawa H, Tateno H and Yanagimachi R: Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Biol. Reprod.*, 61: 809-812, 1999.
14. Kobayashi T, Kaneko S, Hara I, Park JY, Sato H, Ohno T and Nozawa S: Concentrating human sperm before cryopreservation. *Andrologia*, 23: 25-28, 1991.
15. Lee JD, Kamiguchi Y and Yanagimachi R: Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 11: 1942-1946, 1996.
16. Martin RH and Rademaker A: The relationship between sperm

- chromosomal abnormalities and sperm morphology in humans. *Mutation Res.*, 207: 159-164, 1988.
17. Martin RH, Chernos JE and Rademaker AW: Effect of cryopreservation on the frequency of chromosomal abnormalities and sex ratio in human sperm. *Mol. Reprod. Develop.*, 30: 159-163, 1991.
 18. Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJW, Kruger TF and Van Zyl JA: The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum. Reprod.*, 5: 586-592, 1990.
 19. Miharu N, Best RG and Young SR: Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridization. *Hum. Genet.*, 93: 502-506, 1994.
 20. Mikamo K and Kamiguchi Y: A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In "Radiation-Induced Chromosome Damage in Man", Ishihara T & Sasaki MS (eds.), Alan R. Liss, New York, pp. 411-432, 1983.
 21. Munné S and Estop AM: Chromosome analysis of human spermatozoa stored in vitro. *Hum. Reprod.*, 8: 581-586, 1993.
 22. O'Neill GT and Kaufman MH: Influence of postovulatory aging on chromosome segregation during the second meiotic division in mouse oocytes: a parthenogenetic analysis. *J. Exp. Zool.*, 248: 125-131, 1988.
 23. Pang MG, Zackowski JL and Hoegerman SF: Detection by fluorescence in situ hybridization of chromosome 7, 11, 12, 18, X, and Y abnormalities in sperm from oligoasthenoteratozoospermic patients of

- an in vitro fertilization program. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12 (Suppl.): OC-105 (Abstr.), 1995.
24. Parrington J, Swann K, Shevchenko VI, Sesay AK and Lai FA: Calcium oscillations in mammalian eggs triggered by a soluble sperm protein. *Nature*, 379: 364-368, 1996.
25. Pinyopummin A, Takahashi Y, Hishinuma M and Kanagawa H: Development of haploid and diploid mouse parthenogenones: effect of oocyte aging in vivo. *Jap. J. Veter. Res.*, 41: 81-97. 1993.
26. Quinn P: Failure of human spermatozoa to penetrate zona free mouse and rat ova in vitro. *J. Exp. Zool.*, 210: 497-506, 1979.
27. Rudak E, Jacobs PA and Yanagimachi R: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 274: 911-912, 1978.
28. Rybouchkin A, Dozortsev D, Pelinck MJ, De Sutter P and Dhont M: Analysis of the oocyte activating capacity and chromosomal complement of round-head human spermatozoa by their injection into mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 11: 2170-2175, 1996.
29. Rybouchkin A, Benijts J, De Sutter P and Dhont M: Disintegration of chromosome in dead sperm cells as revealed by injection into mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 12: 1693-1698, 1997.
30. Santaló J, Estop AM and Egozcue J: The chromosome complement of first-cleavage mouse embryos after in vitro fertilization. *J. in vitro Fertil. Emb. Trans.* 3: 99-105, 1986.
31. Santaló J, Badenas J, Calafell JM, Catala V, Munné S, Egozcue J

- and Estop AM : The genetic risks of in vitro fertilization techniques: the use of an animal model. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 9: 462-472, 1992.
32. Shaver EL and Martin-DeLeon PA: Effects of aging of sperm in the female and male reproductive tracts before fertilization on the chromosome complement of the blastocysts. In "Aging Gametes", Blandau RJ (ed.), S. Karger, Basel, pp. 151-165, 1975.
33. Tateno H, Kamiguchi Y, Shimada M and Mikamo K: Difference in types of radiation-induced structural chromosome aberrations and their incidences between Chinese and Syrian hamster spermatozoa. *Mutation Res.*, 350: 339-348, 1996.
34. Tateno H and Kamiguchi Y: Improvement of male pronuclear formation during cross-fertilization between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes by nocodazole, and chromosome analysis of hybrid zygotes. *Mol. Reprod. Develop.*, 52: 117-124, 1999.
35. Tateno H and Kamiguchi Y: Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protects against chromosome damage during male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. *Zygote*, 7: 321-327, 1999.
36. Vickers AD: Delayed fertilization and chromosomal anomalies in mouse embryos. *J. Reprod. Fertil.*, 20: 69-76, 1969.

参考論文 (原著・総説別刷の掲載)

1. 上口勇次郎：環境要因とヒト精子染色体異常. 産科と婦人科, 65(7): 880-886, 1998.
2. Tateno H, Iijima S, Nakanishi Y and Kamiguchi Y: No induction of chromosome aberrations in human spermatozoa exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. Mutation Res., 414: 31-35, 1998.
3. 立野裕幸・渡邊誠二・上口勇次郎：ヒト精子の染色体分析. 産婦人科の世界, 50(6): 413-422, 1998.
4. 上口勇次郎・石井裕：ダイオキシンの遺伝的影響：ヒト精子染色体に及ぼす影響の観点から. Environ. Mutagen Res., 21: 201-205, 1999.
5. Tateno H and Kamiguchi Y: Improvement of male pronuclear formation during cross-fertilization between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes by nocodazole, and chromosome analysis of hybrid zygotes. Mol. Reprod. Develop., 52: 117-124, 1999.
6. Tateno H and Kamiguchi Y: Dithiothreitol induces sperm nuclear decondensation and protects against chromosome damage during male pronuclear formation in hybrid zygotes between Chinese hamster spermatozoa and Syrian hamster oocytes. Zygote, 7: 321-327, 1999.
7. Tateno H, Kimura Y and Yanagimachi R: Sonication *per se* is not as deleterious to sperm chromosomes as previously inferred. Biol. Reprod., 63: 341-346, 2000.
8. 渡邊誠二・上口勇次郎：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. 旭川医科大学研究フォーラム, 印刷中.