

電氣的細胞融合法による受精成立
に 関 す る 基 礎 的 研 究

(研究課題番号：05671346)

平成6年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成果報告書

平 成 7 年 3 月

研究代表者 千 石 一 雄

(旭川医科大学医学部助教授)

精子受精能障害例の治療法として体外受精・胚移植法が期待されたが、実際には受精率が極めて低率であり多くの問題点を有していることが判明した。近年、顕微授精法が導入され受精障害精子の受精率も向上を認めるが、卵細胞質障害、多精子受精率も高く、安全かつ高率な受精獲得法が望まれている。本研究はマウスを使用しマイクロマニピュレーター操作下に単一精子を卵細胞腔内に注入後電気的細胞融合法を応用し、受精の成立を検討するとともに、この方法で得られた受精卵の形態学的、細胞遺伝学的正常性ならびに胚発育能、胎仔発生能に関する基礎的検討を第一の目的とする。さらにハムスター卵を使用し同様にヒト精子の細胞融合による受精成立の検討を第2の目的として検討したので報告する。

研究組織

研究代表者：千石一雄（旭川医科大学医学部産婦人科助教授）

研究分担者：玉手健一（旭川医科大学医学部産婦人科助手）

研究経費

平成5年度：800千円

平成6年度：800千円

計：1600千円

研究発表

イ. 学会誌等

経口避妊剤	医薬ジャーナル	31, S-1, 209-212 1995	千石一雄, 高岡康男
Evaluation of transvaginal color doppler sonography, transvaginal sonography and CA 125 for prediction of ovarian malignancy	Inter. J. Gynecol. & Obstet.	46, 39, 4 1994	K. Sengoku, T. Satoh, S. Satoh, M. Ishikawa
A randomized prospective study of gonadotrophin with or without gonadotrophin-releasing hormone agonist for treatment of unexplained infertility	Human Reprod.	9, 1043-1047 1994	K. Sengoku K. Tamate
Polynuclear fertilization in various stimulation protocols in in vitro fertilization	Inter. J. Fertil.	31, 45-51 1994	K. Sengoku, M. Ishikawa
体外受精における未受精卵	日産婦誌	46, 95-101	西野共子,

の細胞遺伝学的検討		1994	上口勇次郎, 千石一雄, 石川睦男
排卵と活性酸素	Hotmone frontier in gynecology	1, 343-349 1994	石川睦男, 玉手健一, 千石一雄
不妊症治療後の妊婦の 心理的ケア	ペリネイタル ケア	151, 84-88 1994	千石一雄, 石川睦男
婦人科不定愁訴に対する 加味帰稗湯の臨床的有用性	産婦の世界	46, 69-72 1994	千石一雄, 石川睦男
ヒト唾液中プロゲステロン 測定の有用性に関する研究	ホルモンと臨床	42, 81-85 1994	高岡康夫, 玉手健一, 千石一雄, 石川睦男
産婦人科領域における SY 5555 の基礎的, 臨床的検討	産婦の世界	46, 151-163 1994	松田清治, 石川睦男, 千石一雄
排卵と活性酸素- 消去法	活性酸素の臨床 への展望	医薬ジャー ナル社 75-83, 1994	石川睦男, 玉手健一, 千石一雄
超音波検査と胎児心拍の モニタリング	からだの科学	日本評論社 46-51, 1994	清水哲也, 千石一雄
卵胞発育と採卵	超音波診断	医学書院 755-757, 1994	清水哲也, 千石一雄
The use of zona-free aged unfertilized human oocytes as a predictor for successful subzonal insemination	Fertiliti Sterility	(in press)K. Sengoku, K. Tamate Y. Takaoka, M. Ishikawa	
The plasma membrane block	J. of Reprod. Fertili.	(submitted)	K. Sengoku,

to polyspermy in human
oocytes and preimplantation embryos

M. Horikawa,
M. Ishikawa

ロ. 口頭発表

当科における腹腔鏡症例の検討, 第33回日本産科婦人科内視鏡学会, 1993. 8. (名古屋)
山下 剛, 千石一雄, 石川睦男

The use of zona-free unfertilized aged human oocytes as a predictor for successful subzonal insemination, XIVth Asian and Oceanic Congress of Obstetrics & Gynecology, 1993 November, (Manila)

K. Sengoku, K. Tamate, Y. Takaoka, M. Ishikawa

Additional effect of antioxidative enzymes on cryopreservation of ovulated ova and 4-8 cell embryos in mouse, VIIth world congress on in vitro fertilization and alternate assisted reproduction, 1993, 9 (Kyoto, Japan)

K. Tamate, K. Sengoku, M. Isikawa

A cytogenetic study of human unfertilized after in-vitro fertilization, A cytogenetic study of human unfertilized after in-vitro fertilization VII world congress on in vitro fertilization and alternate assisted reproduction, 1993, 9, (kyoto)

T. Nishino, Y. Kamiguti, H. Tateno, K. Sengoku, M. Ishikawa

ラット黄体におけるManganase-Superoxide Dismutase(Mn-SOD)蛋白の動態及びmRNAの発現, 第46回日産婦学術講演会, 1994. 4. (東京)

玉手健一, 千石一雄, 石川睦男

ヒト透明帯除去卵を用いた透明帯開口術の受精成立予知に関する検討, 第46回日本産婦人科学会, 1994, 4 (東京)

片山英人, 千石一雄, 石川睦男

卵細胞膜の多精子受精防御機構に関する検討, 第46回日本産婦人科学会, 1994, 4 (東京)
玉手健一, 千石一雄, 石川睦男

ヒト及びマウス未受精卵凍結保存における抗酸化酵素の有用性に関する検討, 第46回日本産婦人科学会, 1994, 4, (東京)

堀川道晴, 千石一雄, 玉手健一, 石川睦男

ヒト透明帯除去卵精子貫通試験による卵細胞内精子注入法の受精成立予知に関する検討
第39回不妊学会総会・学術講演会, 1994, 10, (富山)

高岡康男, 堀川道晴, 田熊直之, 玉手健一, 千石一雄, 石川陸男

当科体外受精症例における受精不成功例の検討, 第12回日本受精着床学会学術講演会, 1994, 7, (鹿児島)

堀川道晴, 田熊直之, 高岡康男, 玉手健一, 千石一雄, 石川陸男

体外受精-胚移植時の poor responder に対する排卵誘発の試み, 第12回日本受精着床学会, 1994, 7, (鹿児島)

高岡康男, 堀川道晴, 田熊直之, 玉手健一, 千石一雄, 石川陸男

Evaluation of transvaginal color doppler sonography, transvaginal sonography and CA 125 for prediction of ovarian malignancy, The 7th congress of world federation of ultrasound in medicine and biology, 1994, 7, (sapporo)

K. Sengoku, T. Satoh, M. Ishikawa

研究成果

1. 研究目的

精子受精能障害例の治療法として体外受精・胚移植法が期待されたが, 実際には受精率が極めて低率であり多くの問題点を有していることが判明した。近年, 顕微授精法が導入され受精障害精子の受精率も向上を認めるが, 卵細胞質障害, 多精子受精率も高く, 安全かつ高率な受精獲得法が望まれている。本研究はマウスを使用しマイクロマニピュレーター操作下に単一精子を卵胞腔内に注入後電氣的細胞融合法を応用し, 受精の成立を検討するとともに, この方法で得られた受精卵の形態学的, 細胞遺伝学的正常性ならびに胚発育能, 胎仔発生能に関する基礎的検討を第一の目的とする。さらにハムスター卵を使用し同様にヒト精子の細胞融合による受精成立の検討を第2の目的とした。

2. 研究成績

(1) 電氣的細胞融合法による受精成立に関する検討

精子受精能障害例に対する受精法として卵胞腔内精子注入法が臨床応用されているが受精率はいまだ低率であり, 複数の精子を注入するため多精子受精頻度も高率である。一方, 卵細胞質内精子注入法による妊娠成立が報告されているが卵実質障害率が高い問題点を有している。今回, 単一精子を卵胞腔内に注入後, 電氣的細胞融合法を応用した受精法の検討を行った。

研究方法

C57BLxCBA F1マウスを使用し, PMSG51U, hCG51Uにより過排卵処理施行後15時間後に未受精卵を採取した。精子卵胞腔内注入は0.1M sucrose添加PBS溶液中でマイクロマニピュレーター操作下に複数および単一精子を注入した。精子注入後至適細胞融合条件を検討するため各種融合用培地, 雪圧, パルス中, パルス処理時間を変更し受精成立の有無を検討した。さらに細胞融合後の胚発育率, recipientへの移植後の着床率を検討した。また電氣的細胞融合法により得られた受精卵の形態学的, 細胞遺伝学的正常性の検討を試みた。染色体標本は, gradual fixation method(上口, 美甘)を応用し, hypotonic solutionとして0.9% sodium citrateを用い60秒処理し3段階で固定し解析した。

さらに、ヒト精子をゴールデンハムスター卵の卵胞腔内に挿入し電気的細胞融合法による前核形成能に関し検討した。

結果

イ) マウス卵胞腔内へ複数(3~10)の精子注入後の細胞融合条件の検討では、3.5kV/cmの直流電圧を10 μ sec印加後2MHz、100V/cmの交流電圧を20秒間印加条件時の受精率が25.5%と最も高率であった。しかし受精卵の大部分に多精子受精を認め精子核の膨化も不十分であった。また電気処理による卵細胞質障害も15.5%と高率に認められた。

ロ) 細胞融合前の卵のactivationの必要性に関する検討では、2MHz、50V/cmの交流電圧を10秒間印加し、つづいて1.5kV/cm、50 μ sec直流電圧処理後高率に卵のactivationが誘起された。卵のactivation誘起後卵胞腔内に精子を注入し細胞融合処理を施行した場合20.5%の卵が前核期までの発育を示したが、その後の発育は認められなかった。

ハ) 卵胞腔内単一精子注入実験では、前述した卵の誘起処理、細胞融合条件下で12.5%と低率であるが受精成立、前核期までの発育を認めた。しかしその後の発育は認められず、電子顕微鏡による形態学的観察、染色体分析は不能であった。

ニ) ヒト精子とハムスター卵の検討では、同様の条件下で3.5%に受精が成立したが、卵細胞質障害も15.0%に認められた。

考察

2MHz、50V/cm、10秒間の交流電圧印加後、1.5kV/cm、50 μ sec直流電圧負荷により卵のactivationを誘起し、つづいて直流電圧3.5kV/cm、10 μ sec、交流電圧2MHz、100V/cm、20秒間の処理条件下で電気的細胞融合法による受精が成立した。したがって本操作により多精子受精、卵細胞質障害を防止しうる安全な受精法確立の可能性が示唆された。しかし、現在のところ前核期以降の発育に成功しておらず、まだ受精率も低率であることより、今後、卵のactivation、細胞融合条件、融合用培地等さらなる至適条件の検討の必要性を認めた。また、電気的細胞融合により受精した卵の正常性に関する基礎的検討の集積が必要であると考えられる。

(2) ヒト未受精卵の細胞遺伝学的検討

体外受精・胚移植法の着床率はいまだ低率であり、その主要因の一つに卵子及び胚の染色体異常が上げられる。また、体外受精時の受精不成立の要因として胚偶子の染色体異常が直接関与している可能性も否定できない。その観点から、体外受精時にえられた未受精卵の染色体分析を行い、ヒト卵子の染色体異常発現率、染色体異常生成機構の解明を試みた。

研究方法

52症例、72週期の体外受精で得られた未受精卵260卵を対象としてgradual fixation methodにより染色体標本を作成し解析した。

結果

イ) 260卵中183個の卵が第二減数分裂中期の染色体を示し、そのうち149卵の核型分析が可能であった。

ロ) 染色体異常頻度は異数性異常15卵(10.1%)、構造異常9卵(6.0%)、倍数性異常5卵(3.4%)であり、異数性異常の内訳は高数性8卵(5.4%)、低数性7卵(4.7%)の結果であった。

ハ) 異数性異常を示した15卵のうちdyadの数の異常は8卵で、残りの7卵はmonadの過不足を示し

た。また、分析可能であった149卵中23卵（15.4%）でdyadのsplittingが認められた。

考察

体外受精時の未受精卵では比較的高率に染色体異常が観察された。しかし、対象が受精が成立しなかった卵子であり、また排卵誘発剤、培養環境など種々の環境要因の関与も否定できないことから、ヒト卵子の染色体異常率に関してはさらなる検討の必要性が示唆された。また、母体年齢とsplitting発現との間に相関が認められたが、splittingの異数性生成機構への関与を含め今後の検討が必要であることが示された。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。

西野共子, 上口勇次郎, 立野裕幸, 千石一雄, 石川睦男
体外受精における未受精卵の細胞遺伝学的検討

日本産婦人科学会雑誌：46, 95-101, 1994

（資料1）

(3) ヒト卵の多精子受精発生に関する検討

体外受精時の多精子受精防止は重要な課題である。したがって、多精子受精防止法の確立を目的として、体外受精卵の多精子受精発生に関与する諸因子を検討することにより、ヒト卵の多精子受精発生機序の解明を試みた。

研究方法

121症例、148周期の体外受精において受精が成立した530卵を対象として、多精子受精発生に関与する諸因子を解析した。

結果

排卵誘発法別の多精子受精発生頻度はCC/hMG, hMG単独, GnRHa/hMG 周期の3群間に有意差は認められなかった。また母体年齢と多精子受精にも相関は認められず、一方、卵成熟度ならびに媒精精子数と多精子発生頻度に関連性が認められた。すなわち、媒性精子数が20万/ml以上で有意な多精子受精の増加が認められた。

考察

以上の検討より、体外受精時の多精子受精発生予知のための正確なparameterの同定は不能であったが、卵子成熟度、媒精精子数と多精子受精頻度に相関が認められ、多精子受精発生に精子の受精能そのものが大いに関与していることが示唆された。このことから、体外受精、顕微授精時の正常な受精成立のために、精子受精能の正確な評価法の確立が重要であることが明らかにされた。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。

K. Sengoku, M. Ishikawa, K. Tamate, T. Shimizu polynuclear Fertilization in Various Stimulation Protocols In Vitro Fertilization International Journal of Infertility:31, 45-1994

（資料2）

(4) 顕微授精時の受精成立予知における透明帯除去ヒト卵精子貫通試験の有用性に関する検討

精子受精能評価法としてハムスターテストが汎用されているが、体外受精時の受精率と必ずしも相関を示さないことが報告されている。そこで、精子受精能評価法、特に顕微授精時の受精成立予知法の確立を目的として透明帯除去ヒト卵精子貫通試験の有用性を検討した。

研究方法

通常の体外受精における受精率0%症例,及び受精率70%以上の症例よりえられた253個の未受精卵を使用し透明帯除去後donor精子を媒精し,2群間の受精率を比較検討した。また,体外受精において受精率0%,<30%,>30%を示した症例よりえられた未受精卵272卵を使用し,透明帯除去後配偶者精子と媒精し3群間の受精率を比較検討した。さらに囲卵腔内精子注入法を施行した29例を対象として,透明帯除去ヒト卵精子貫通試験とSUZIの受精率との相関を検討した。

結果

受精率0%群と,70%以上の群ではdonor精子媒精後の精子侵入率に差が認められなかった。また,受精率0%,<30%,>30%群間の比較では,各々精子侵入率は45.3%,72.7%,90.0%を示し,通常の体外受精率と透明帯除去卵の精子侵入率との間に相関が認められた。SUZIで受精が成立しなかった症例の透明帯除去卵の精子侵入率は7.5%で,受精が成立した症例の37.8%に比し有意な低値を示した。

考察

透明帯除去ヒト卵精子貫通試験は卵子の質による影響が少なく,体外受精における受精率と良く相関することを明らかにした。さらに顕微授精時の受精成立予知法としても有用性が高く,精子受精能を正確に反映する検査法であることが示唆された。この成績は,透明帯除去ヒト卵精子貫通試験が,電気的細胞融合法を用いた受精法施行時の精子選択に応用可能であると考えられる。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。

K. Sengoku, K. Tamate, Y. Takaoka, M. Horikawa, M. Ishikawa The use of zona-free aged unfertilized oocytes as a predictor for successful subzonal insemination Fertility and Sterility (in press) (資料3)

(5) ヒト卵子及び初期胚の卵細胞膜多精子受精防御機構に関する検討

卵子の多精子受精防御機構に透明帯及び卵細胞膜が重要な役割をはたしていることは種々の動物で報告されている。ヒトにおいても透明帯が多精子受精防御に関与していることが示されているが,卵細胞膜における防御機構の存在に関しては十分に解明されていない。そこで,ヒト卵細胞膜の多精子受精防御機構に関する基礎的検討を行った。

研究方法

体外受精時にえられた未受精卵及び多精子受精で卵割を認めた2-6細胞胚を用い,透明帯除去後媒精し,精子侵入率の経時的变化を検討した。また媒精後2時間後に再媒精した群と対象群の侵入精子数を比較検討した。同様に受精卵の侵入精子数,接着精子数を検討した。

結果

侵入精子数の経時的变化の検討では,精子侵入数は媒精後2時間で最大値に達し媒精30分後,60分後では各々最大侵入精子数の23.1%,52.6%を示した。再媒精実験においても再媒精群と対象群の侵入精子数,接着精子数に有意差は認められなかった。さらに,2細胞期以降の分割卵では侵入精子が認められず,接着精子数も受精後卵割の進行にともない減少を示した。

考察

これらの結果より,ヒト卵細胞膜にも多精子受精防御機構が存在し,媒精後約2時間で確立することが明らかとなった。また,卵細胞膜の多精子受精防御は受精後の卵細胞膜の質的变化が関与しており,その作用は永続性を有していることが示唆された。以上の成績は,電気的細胞融合法によ

る受精法の確立に関し、卵細胞膜の質的变化を十分考慮する必要性を示唆するものである。

以上の成績の詳細は添付した以下の別冊を参照されたい。

K. Sengoku, M. Horikawa, Y. Takaoka, M. Ishikawa, W. R. Dukelow The plasma membrane block to polyspermy in human oocytes and preimplantation embryos *Journal of Reproduction and Fertility*(submitted)
(資料4)

まとめ

単一精子を卵細胞腔内に注入し電気的細胞融合法を応用した受精法の確立、及びこの方法によりえられた受精卵の形態学的、細胞遺伝学的正常性の検討を目的として、基礎的研究を行った。

1. 単一精子卵細胞腔内注入後電気的細胞融合法を応用しマウス卵で受精に成功した。また同様に、ヒト精子とハムスター卵の受精に成功したが、受精後の胚発育率は低率であった。この結果は、電気的細胞融合法を応用することにより卵細胞質障害の少ない、安全かつ簡易な受精法の確立が可能であることを示唆するものである。

2. 体外受精胚の着床率が低率である要因として卵子、初期胚の染色体異常の関与が指摘されている。ヒト未受精卵の染色体分析の結果より、数的ならびに構造異常が比較的高率に認められることを明らかにした。また、母体年齢の増加とsplitting出現率に相関が認められ、この異常が、ヒト初期胚の異数性異常生成の原因になりうるか否か今後の検討の必要性が示された。さらに、この成績は、体外受精、顕微授精などの胚操作による受精卵の細胞遺伝学的正常性に関し、今後も厳密な検討を加えていく必要性を明らかにしたものである。

3. 受精の異常として比較的高率に認められる多精子受精発生機序に関与する諸因子を解析した。多精子受精発現頻度は、媒精精子数、卵成熟度ならびに媒精精子の受精能自体と相関することが示された。これらの成績は、体外受精時の正常な受精の成立のために、正確な精子受精能評価法を確立する必要性を示唆するものである。

4. 正確な精子受精能評価法の確立を目的として、透明帯除去ヒト卵精子貫通試験の有用性を検討した。ヒト透明帯除去卵精子貫通試験は体外受精の受精率と高い相関を示し、また、卵のqualityによる影響が少ないことを明らかにした。さらに、卵細胞腔内精子注入法の受精率とも高い相関が認められ、顕微授精法の選択にも有用性が高いことを示した。この成績は、電気的細胞融合による受精法施行時の精子の選択に、ヒト透明帯除去卵による精子受精能評価法が応用可能であることを示唆するものである。

5. ヒト卵の多精子受精防御機構の解明を目的として、ヒト卵細胞膜における多精子受精防御メカニズムの存在の有無に関し検討した。その結果、ヒト卵細胞膜の多精子受精防御機構は媒精後約2時間で確立されることを明らかにした。また卵割の進行にともない侵入精子数、接着精子数は減少を示し、多精子受精block機構には卵細胞膜の質的变化が関与しており、その作用は永続的であることを示した。この成績は、卵細胞腔内に注入した精子の卵への接着、融合機序に関するさらなる基礎的検討が必要であり、これらの解明は、電気的細胞融合法による受精率の向上に寄与するものと考えられる。

以上に記した研究結果から、初期の目的の基礎的部分は達成されたものと思われる。しかし、電気的細胞融合法による受精率は低率であり、また、前核期以降の胚発育は認められておらず、受精卵の形態学的、細胞遺伝学的検討に関しては端緒にあるといえる。今後、これらの成績を踏まえ、細胞融合条件、卵のactivationなどに関してさらなる基礎的検討を加えていく必要がある。