

01157

# 単一割球の凍結保存及び染色体正常性 に関する基礎的研究

(研究課題番号：02670728)

平成4年度科学研究費補助金(一般研究C)  
研究成果報告書

平成5年3月

研究代表者 千石 一雄  
(旭川医科大学医学部助教授)

卵子，配偶子の凍結保存は体外受精時の余剰卵の有効的活用法として臨床応用が進められており，また初期胚より分離された各割球の発育に関しても基礎的研究が行なわれている。しかし，単一割球の凍結保存に関しては未解決な問題であり，割球の凍結保存の成功により遺伝子診断を含めさらなる卵子の有効的活用が可能となる。

本研究はその基礎的検討として，実験動物としてマウスを使用し，初期胚より分離した単一割球の凍結保存後の発育能の検討を第一の目的とした。さらに，凍結保存単一割球の正常性，totipotency 研究の第一段階として単一割球の細胞遺伝学的正常性検討の点から染色体分析を行なうことを第二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2年度：900千円

平成3年度：700千円

平成4年度：600千円

計：2200千円

## 研究発表

### 1. 学会誌等

- (1) IVF・ET スケジュール簡素化の試み，日本受精着床学会誌，8：225-228，1991，（玉手健一，千石一雄，高田久士，菊川美一，石川睦男，清水哲也）
- (2) 経膈超音波断層法による妊娠初期画像と血中 HCG との相関，日本産婦人科学会誌，43：535-540，1991，（千石一雄，玉手健一，石川睦男，菊川美一，清水哲也）
- (3) The Effect of Platelet Activating Factor on Ovulation, Prostaglandins, 42：95-104，1991，（Y. Kikukawa, M. Ishikawa, K. Sengoku, M. Kasamo, T. Shimizu）
- (4) ラット排卵周辺期における，活性酸素及び Superoxide Dismutase の意義，日本産婦人科学会誌，44：1-8，1992，（玉手健一，石川睦男，千石一雄，安部政彦，中田俊之，清水哲也，谷口直之）
- (5) Pulsatility indexes of the fetal middle cerebral, umbilical, internal iliac and femoral arteries as predictors of intrauterine growth retardation, J of Maternal - Fetal Investigation, 1：271-275，1992，（C. Hadjiev, M. Ishikawa, K. Sakai, K. Sengoku, T. Shimizu）
- (6) Polypronuclear Fertilization in Various Stimulation Protocols in in vitro fertilization, Int. J. of Infertility, (in press), K. Sengoku, M. Ishikawa, K. Tamate, T. Shimizu
- (7) 経膈カラードプラ法による卵管機能評価，産婦人科の世界，44：403-408，1992，（千石一雄，石川睦男，玉手健一，内潟芳之，高岡康男，清水哲也）
- (8) Effect of Platelet Activating Factor on mouse sperm function, J. of Assisted Re-

- production and Genetics, 9 : 447-453, 1992, (K. Sengoku, K. Tamate, M. Ishikawa, T. Shimizu)
- (9) OHSS 発症の予防と対策, 産科と婦人科, 50 : 1497-1503, 1992, (石川睦男, 内潟芳之, 玉手健一, 高岡康男, 千石一雄)
- (10) The role of Platelet Activating Factor in ovulation, RECENT ADVANCES IN OVARIAN FUNCTION : BASIC AND CLINICAL RESEARCHES, No.28, 221-228, 1992, (M.Ishikawa, Y. Kikukawa, K. Sengoku and T. Shimizu)
- (11) Superoxide dismutase / corpus luteum : Immunohistochemical Iocalization of Cn, Zn and Mn - SOD, ARTA, 4 : 251-259, 1993, (M. Ishikawa, K. Tamate, T. Nakata, K. Sengoku, K.Suzuki, N.Taniguchi)
- (12) Effects of platelet activating factor on human sperm function in vitro, Human Reproduction (submitted), (K. Sengoku, T. Takaoka, K. Tamate, M. Ishikawa)

ロ. 口頭発表

- (1) platelet activating factor のヒト精子受精能に及ぼす影響, 第43回日本産婦人科学会, 1991. 3. (京都), (千石一雄, 玉手健一, 石川睦男, 清水哲也)
- (2) 排卵周辺期における CU, Zn 及び Mn - superoxide dismutase の意義, 第43回日本産婦人科学会, 1991. 3. (京都), (玉手健一, 石川睦男, 千石一雄, 齋藤聰史, 清水哲也)
- (3) Investigation of the relations between the fetal central and peripheral blood flow with pulsed doppler, 第58回日本超音波医学会, 1991. 4. (京都), (M.Ishikawa, C. Hajiev, K. Sasaki, K.Sengoku, T. Shimizu)
- (4) 体外受精, 胚移植における子宮外妊娠例の検討第9回日本受精着床学会, 1991. 7. (四日市), (玉手健一, 千石一雄, 内潟芳之, 高岡康男, 石川睦男, 清水哲也)
- (5) Fetal central and peripheral blood flow in normal and IUGR fetuses, 第59回日本超音波医学会, 1991.11. (千葉), (C. Hajiev, M. Ishikawa, K. Sasaki, K. Sengoku, T. Shimizu)
- (6) Effect on ovulation and localization of superoxide dismutase in rat ovary, 5th International Congress on Oxygen Radicals, 1991.11(Kyoto), (K. Tamate, M. Ishikawa, K. Sengoku, T. Shimizu, T. Kawaguchi, K. Suzuki, N. Taniguchi)
- (7) ラット卵巣における superoxide dismutase の意義, 第36回日本不妊学会, 1991.11. (名古屋), (玉手健一, 石川睦男, 千石一雄, 内潟芳之, 高岡康男, 清水哲也)
- (8) 体外受精, 胚移植におけるヒト卵子の細胞遺伝学的検討, 第44回日本産婦人科学会, 1992. 4. (千葉), (千石一雄, 玉手健一, 高岡康男, 内潟芳之, 西野共子, 石川睦男, 清水哲也)
- (9) ヒト卵巣及び卵胞液における superoxide dismutase の局在とその意義第44回日本産婦人科学会, 1992. 4. (千葉), (玉手健一, 石川睦男, 千石一雄, 内潟芳之, 高岡康男, 中川俊之, 清水哲也, 谷口直之)
- (10) ヒト唾液中プロゲステロン測定に関する有用性, 第44回日本産婦人科学会, 1992. 4. (千葉), (高岡康男, 内潟芳之, 玉手健一, 千石一雄, 石川睦男, 清水哲也)

- (11) 各種 GnRHa 投与方法による IVF - ET 成績の比較, 第10回日本受精着床学会, 1992. 7. (徳島), (内潟芳之, 高岡康男, 玉手健一, 千石一雄, 石川睦男, 清水哲也)
- (12) A chromosomal study of unferilized human oocytes prepared by the gradual fixation - air drying method, 中日遺伝学会, 1992.10. (北京), (N. Nishino, Y. Kamiguchi, H. Tateno, M. Mikamo, K. Sengoku, M. Ishikawa)
- (13) IVF 症例における未受精卵の染色体分析, 第37回日本不妊学会, 1992.11 (東京), (西野共子, 高岡康男, 内潟芳之, 玉手健一, 千石一雄, 石川睦男)
- (14) ヒト精子中の Mn - SOD 濃度とその受精率, 分割率の検討, 第37回日本不妊学会, 1992. 1. 1, (西脇邦彦, 玉手健一, 高岡康男, 内潟芳之, 千石一雄, 石川睦男)

## 研究 成 果

### 1. 研究目的

卵子, 配偶子の凍結保存は体外受精時の余剰卵の有効的活用法として臨床応用が進められており, また, 初期胚より分離された各割球の発育に関しても基礎的研究が行なわれている。しかし, 単一割球の凍結保存に関しては未解決であり割球の凍結保存の成功により, さらなる卵子の有効的活用が可能となる。本研究はその基礎的検討として, 実験動物としてマウスを使用し, 初期胚より分離した単一割球の凍結保存後の発育能の検討を第一の目的とした。さらに凍結保存単一割球の正常性, totipotency 研究の第一段階として単一割球の細胞遺伝学的正常性に関する観点から染色体分析を行なうことを第二の目的とした。

### 2. 研究成績

#### (1) 割球分離及び単一割球の凍結保存, 染色体正常性の検討

初期胚の割球分離は prenatal diagnosis を初め, 卵子のさらなる活用, 初期胚研究手段として優れた手法と言える。現在まで4細胞期, 8細胞期より分離した胚の発育に関しては種々の成果が報告されている。しかし採取した割球の発育能を検討した報告は少なく, さらに凍結保存に成功した報告は認められない。今回マウスを使用し embryo biopsy に関する基礎的検討を行った。

#### 研究方法

(C57BLx CBA) F1 マウスを使用し, PMSG 5IU, HCG 5IU により過排卵処置施行後交配し4細胞及び8細胞期胚を採取した。割球分離は胚を Ca, Mg - free PBS 中でマイクロマニピュレータ下で行った。内径30 $\mu$ m の holding pipete で胚を保持し内径約15 $\mu$ m の biopsy 用ガラス管で透明帯に slit を作製した後, もう一方よりガラス管を挿入し割球を slit より押し出す extrusion 法を採用した。biopsy 以外は同様に処置した胚を対象とした。割球分離後の親胚の胞胚への発育率, recipient への移植8日後の着床率を検討した。また分離した単一割球を Whitten medium で培養し, その後の発育能及び染色体の検討を行った。染色体標本作製は gradual fixation method (上田, 美甘) を応用し, hypotonic solution として0.9% sodium citrate を用い60秒処理した。さらに耐凍剤として1.5 M DMSO + 0.25 M Sucrose を用い5 step 希釈法により単一割球の凍結保存に関し検討した。

#### 結果

1 biopsy 施行時胚の約10%に細胞の破壊を認めたが胞胚への発育率は4 cell で75%, 8 cell で78.3%に及び対象の82.4%, 83.7%と差は認められず, 4 cell, 8 cell 間にも有意差は認められ

ない。着床率は4 cell 25%, 8 cell 35%で8 cell でやや高値を示したが対象の50%と比較するといずれも低値であった。(Table 1, 2)

2 割球の発育に関しては約60%の割球が少なくとも1回以上の分割を認めた。0.04 $\mu$ g colcemid 添加16時間後の染色体分析では4 cell はMetaphase27%, interphase40%, 変性32%をしめし, 8 cell はMetaphase52%, interphase26%, 変性及び染色体分析不能率は22%であった。(Table 3)

3 単一割球の凍結保存は検討した1.5 M DMSO, 0.25 M Sucrose, 5 step 希釈法では融解後すべての細胞が変性をしめし, 従って染色体分析は不能であった。

#### 考察

(1) 4 cell, 8 cell とも割球分離後の *in vivo*, *in vitro* での発育能を認め両ステージの胚が embryo biopsy に適当と考えられた。(2) 4 cell, 8 cell とも分離した単一割球のその後の発育能を認め, また染色体分析が可能であることから種々の prenatal diagnosis の検体となりうることを示され, さらに単一割球より複数の遺伝子解析の可能性が示唆された。(3) 単一割球の凍結保存に関しては, 今後 artificial zona の開発, 耐凍剤, 凍結法の改良, また細胞保護物質の添加などのさらなる検討の必要性を認めた。

**Table 1 Development to Blastocyst stage of Biopsied embryo in vitro**

Cleavage	Group	No. of pre - embryos	No. of blastocyst (%)
Four - cell	Control	51	42 (32.4)
	Biopsied	48	36 (75.0)
Eight - cell	Control	43	36 (83.7)
	Biopsied	46	36 (78.3)

**Table 2 Implantation Rates of Biopsied Embryos**

Cleavage	Group	No. embryos transferred	Implantation rate
Four - cell	Control	30	16 (53.3)
	Biopsied	25	6 (24.0)
Eight - cell	Control	31	15 (48.4)
	Biopsied	23	8 (34.8)

**Table 3 Preparation of Biopsies for cytogeretic analysis**

Cleavage	No. of blastomeres	Metaphase (%)	Interphase (%)	Loss (%)
Four - cell	22	6 (27.3)	9 (40.9)	7 (31.8)
Eight - cell	23	12 (52.2)	6 (26.1)	5 (21.7)

## (2) ヒト未受精卵の細胞遺伝学的検討

体外受精胚の着床率は未だ低率であり、その主要原因の一つに卵子及び胚の染色体異常が挙げられる。卵の細胞遺伝学的正常性に関する基礎的検討として体外受精時に得られた未受精卵の染色体分析を行い、排卵誘発剤、母体年齢などの環境要因が卵子染色体異常と関連するかなにかに関し検討した。

### 材料及び方法

65周期の体外受精施行時に得られた未受精卵126卵を対象として gradual fixation method (上11, 美甘) による染色体標本を作製した。排卵誘発法の内訳は clomiphene / hMG 法59卵, GnRHa / hMG 法67卵である。

### 結果

1) 126卵中101卵が Metaphase II を示し、その内の67卵 (66.3%) が染色体分析可能で正常核型51卵 (76.1%) , hyperhaploid 4 卵 (5.9%) , hypohaploid 6 卵 (9%) , diploid 6 卵 (9%) であった。2) 排卵誘発法別では, CC/hMG では28卵中正常核型16 (72.7%) aneuploid 4 (14.3%) , diploid 2 (7.1%) , GnRHa / hMG では39卵中正常核型29卵 (74.3%) aneuploid 6 (15.4%) , diploid 4 (10.3%) を示し両群間に差は認められなかった。3) hMG 投与量と染色体異常発現に関連性は認められなかったが、母体年齢が36歳以上の群に aneuploid が 28.6%と増加傾向が認められた。

### 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、特に diploid が高率に認められた。この結果は、体外受精によりえられた胚の正常性に関しさらなる検討の必要性を示唆するものである。また排卵誘発法の相違による染色体異常発現率には差は認められなかったが、母体年齢の増加が aneuploid 発現に関与する可能性が示唆された。

(参考資料1)

## (3) 卵の生存性に関与する活性酸素及び消去系の検討

凍結融解後の細胞障害にスーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ ) , ハイドロキシパーオキシサイド ( $H_2O_2$ ) などの活性酸素が関与している。この活性酸素の卵巣内卵に対する影響を検討するため、スーパーオキシドを分解する Superoxide Dismutase (SOD) に着目し基礎的検討を行った。過排卵処置ラットに Cu, Zn - SOD として Purified recombinant human SOD, Mn - SOD として Polyethylene glycol SOD を投与したところ排卵は有意に抑制された。ラット卵巣内の SOD 活性は NBT 法の検討により顆粒膜細胞、外莖膜細胞に強い活性を認めることが判明した。SOD のポリクローナル抗体を用いた局在の検討では Cu, Zn - SOD は顆粒膜細胞に Mn - SOD は外莖膜細胞に局在することが明かとなった。一方、ヒト卵巣組織における Mn - SOD の局在に関する検討では顆粒膜細胞に主な局在をしめしラットの成績と相違を認めた。

以上の成績より排卵及び卵の生存性に活性酸素—抗酸化酵素が深く関与していることが明かとなり、卵子、単一割球の凍結保存に際しては、この系を破壊することのない凍結法の確立、及び卵膜保護作用を有する抗酸化酵素の応用により凍結融解後の胚の生存性を向上させる可能性が示唆された。

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

# M. Ishikawa, K. Tamate, T. Nakata, K. Sengoku, K. Suzuki, N. Taniguchi  
Superoxide Dismutase / Corpus luteum : Immunohistochemical localization of Cu, Zn - and  
Mn - SOD ARTA, 4, 251 - 259, 1993 (資料 2)

#玉手健一, 石川睦男, 千石一雄, 安部政彦, 中田俊之, 清水哲也 ラット排卵周辺期における  
活性酸素及び Superoxide Dismutase の意義 日産婦誌 44 : 1 - 8, 1992  
(資料 3)

#### (4) 排卵機構および卵, 精子に対する血小板活性化因子の検討

生体活性を有するリン脂質の一つである血小板活性化因子 (PAF) は近年受精卵からの分泌が報告され生殖機構への関与が示唆されている。そこで PAF の排卵機構ならびに卵成熟, 胚発育能さらには精子受精能に対する影響に関する基礎的検討を行った。過排卵処置マウスへの PAF 受容体拮抗剤, CV - 3988 の投与により排卵が抑制され, PAF の同時投与による抑制の解除が示され, PAF が排卵機構に促進的に関与していることを明かにした。また CV - 3988 による排卵が抑制された卵胞卵の体外受精率は control 群と差を認めず PAF の卵成熟機構への関与は否定的である。精子に関してはマウス及びヒトの検討から, PAF は in vitro で capacitation, acrosome reaction を促進し, 受精率を向上させることを明かにした。さらに CV - 3988 の添加により抑制された先体反応出現率, 受精率の低下が PAF により回復することより PAF が精子受精能に直接関与している可能性を示した。これらの実験成績は割球分離した胚および単一割球の発育率向上に PAF が促進的に関与する可能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

# Y. Kikukawa, M. Ishikawa, K. Sengoku, M. Kasamo, T. Shimizu. The effect of platelet activating factor on ovulation Prostaglandins : 42, 95 - 104, 1991

(資料 4)

# K. Sengoku, M. Ishikawa, K. Tamate, T. Shimizu Effects of platelet activating factor on mouse sperm function J. Assisted Reprod. Genetics : 9, 447 - 453, 1992

(資料 5)

# Effects of platelet activating factor on human sperm function in vitro : Human Reproduction (Submitted)

(資料 6)

## ま と め

初期胚の割球分離後の発育能, 分離した単一割球の生存性及び染色体正常性, さらに単一割球の

凍結保存の確立を目指し基礎的研究を行った。

1 4細胞, 8細胞期胚における割球分離後の生存性を *in vitro*, *in vivo* で明らかにしたがその生存率は対象群に比し低率であった。また単一割球の染色体分析が可能であることを明らかにした。これらの結果は分離した割球の遺伝子レベルでの解析を含め、さらなる卵子の活用を可能にするものである。

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が挙げられている。ヒト未受精卵の染色体分析の結果より *aneuploid*, *diploid* といった染色体の数的異常が比較的高率に認められることを明らかにした。また排卵誘発剤の投与量による染色体異常発現率に差は認められなかったが母体の年齢の増加が卵の染色体異常発現に関与している可能性を示唆した。この成績は受精卵の正常性に関して割球などを利用し、さらに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 凍結融解時の細胞障害に関与する因子として、スーパーオキシドアニオン ( $O_2^-$ )、ヒドロキシパーオキシド ( $H_2O_2$ ) などの活性酸素の関与が報告されている。この活性酸素の排卵機構及び卵にたいする影響を検討するため活性酸素の消去酵素である Superoxide Dismutase (SOD) に着目し検討した。その結果 Cu, Zn - SOD, Mn - SOD の投与により排卵は有為に抑制される成績を得た。免疫組織学的検討によりラット卵巢では Cu, Zn - SOD は顆粒膜細胞特に卵丘細胞に局在が認められ, Mn - SOD は外莢膜細胞に局在を認めた。一方ヒトではラットの成績と相違し Mn - SOD が顆粒膜細胞に強い局在を示す結果を得た。これらの成績は卵子の生存性に, SOD などの抗酸化酵素が重要な関連を有し, このような系を破壊することのない凍結法の確立の必要性を示唆するものである。

4 生理活性リン脂質である血小板活性化因子 (PAF) が受精卵より分泌され胚の着床に関与していることが示唆されている。この PAF の排卵機構, 胚の生存性及び精子受精能に与える影響に関し検討した。PAF 受容体拮抗剤 CV - 3988 投与によりマウスで排卵が抑制され PAF 投与により排卵が回復することを認めた。また, マウス及びヒト精子に対し PAF が *capacitation*, *asrosome reaction* を促進し受精能を向上させることを明らかにした。この成績は PAF などの生理活性物質の添加により割球分離した胚の発育, 単一割球の発育能が促進される可能性を示唆するものである。

以上に記した研究成果から, 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, 単一割球の凍結保存に関する方法の確立は端緒にあるといえ, 今後さらにこれらの成績を踏まえ検討を加えていく必要がある。