

「哺乳動物の生殖における卵細胞質内精子注入法の利用」

Application of intracytoplasmic sperm injection in mammalian reproduction

東京農工大学大学院連合農学研究科

生物生産科学科

動物生産科学大講座

1 0 9 5 1 0 1 2

渡邊英明

# 目次

第1章	緒論	4
第2章	マウス卵子へのヨザル精子の卵細胞質内精子注入による卵活性化能の確認とヨザル精子染色体標本の作製	8
	2-1. 緒言	9
	2-2. 材料と方法	11
	2-3. 結果	29
	2-4. 考察	35
第3章	ヨザル卵子への卵細胞質内精子注入による胚作出	37
	3-1. 緒言	38
	3-2. 材料と方法	40
	3-3. 結果	46
	3-4. 考察	55
第4章	ヒトにおける卵細胞質内精子注入法の適用による胚作出とその改善	58
	4-1. 緒言	59

4 - 2 .	対象と方法 . . . . .	61
4 - 3 .	結果 . . . . .	79
4 - 4 .	考察 . . . . .	82
第5章	総合考察 . . . . .	84
第6章	総括 . . . . .	90
参考文献	. . . . .	95
要旨	. . . . .	104
謝辞	. . . . .	107

# 第 1 章

## 緒論

世界で初めて体外受精（conventional *in vitro* fertilization: c-IVF）による体外受精児の報告（Steptoe and Edwards, 1978）がされてから、ヒト生殖補助医療は日進月歩で発展し、1992年には、Palermo らが世界で初めて卵細胞質内精子注入法（Intracytoplasmic sperm injection: ICSI）を用いて、妊娠出産に成功している。この報告は、不妊治療におけるブレイクスルーとなり、それまで c-IVF では受精させることができなかった乏精子症などの男性不妊症でも、さらには無精子症などの重度男性不妊症においても精巣内精子などを用いることで受精卵を作出することが可能となった。

ヒト以外の哺乳動物では、Uehara ら（1976）がハムスターを用いて初めて受精卵の作出に成功している。1990年には Goto らがウシで、1995年には Kimura らがマウスにて産仔の獲得に成功に成功している。霊長類では 2003年に Hosoi らがニホンザルの受精卵の作製に成功している。

ICSI は、細いガラス管（インジェクションピペット）を用いて、卵細胞質内に精子を 1 個注入し受精させる方法であり、現在は用いるインジェクションピペットの形状などにより、実験動物などで用いられているピエゾ ICSI とヒト生殖医療に主に用いられている conventional ICSI（c-ICSI）とに大別される。ピエゾ ICSI は、先端が平らなインジェクションピペットを用いてピエゾパルスにより透明帯や卵細胞膜を穿破する方法である。それに対して c-ICSI は、先端が鋭利なインジェクションピペットを用いて、インジェクションピペットを押し進める推進力により透明

帯や卵細胞膜を穿破する方法である。

また、ICSIはc-IVFとは異なり精子の運動性は必須ではない。我々の研究室では、これまで貴重な実験用霊長類であるヨザルについての生殖細胞の形態学的な報告（Nakazato *et al.*, 2015; Matsumoto *et al.*, 2015）を行ってきたが、Nakazatoら（2015）によれば、ヨザル精巣上体尾部精子の性状は不良であった。ヨザルは、飼育管理下における繁殖には成功しているものの、その繁殖性は高いとは言えず、遺伝資源としてのヨザルの配偶子や胚の保存や個体の人為的な生産を効率的に行うために、IVFは有効な手段である。しかしながら、前述したとおり、ヨザル精子の性状は不良であるためc-IVFでは胚の作出が困難であり、ICSIが必要だと考えられた。また、ヨザル卵子は、形態的にヒト卵子に近いことも報告されていることから（Matsumoto *et al.*, 2015）、精子の性状が不良である点も合わせて考えると、ヒト生殖医療におけるICSIの適応（男性不妊）と合致する部分もあり、ヒト不妊症のモデルとして期待される。

そこで本研究では、ヨザル胚の作出を目的として第2章では、ヨザル精子の卵活性化能の有無を調べるため、マウス卵子へのピエゾICSIを行った。さらには、得られた前核期胚を用いて、ヨザル精子の染色体標本の作製を試みた。第3章では、ヨザルより採卵された未熟卵子を体外成熟により成熟させ、得られた成熟卵子と精子を用いてピエゾICSIを行い、胚の作出を試みた。あわせて得られたヨザル胚を継続培養し、胚発育を観察した。第4章では、ヒト生殖医療におけるピエゾマイクロマニピュレーターの

有用性を検討するため、同意の得られた ICSI 適応の患者の卵子へピエゾ ICSI を施行し、従来法である c-ICSI との成績を比較検討した。

## 第 2 章

マウス卵子へのヨザル精子の卵細胞質内  
精子注入による卵活性化能の確認と  
ヨザル精子染色体標本の作製



## 2 - 1 . 緒言

Palermo ら (1992) がヒトにおいて初めて ICSI を用いて妊娠出産に成功して以来、ICSI は数多くの男性不妊症患者に福音をもたらしてきた。ICSI では理論上、1 個の卵子に 1 個の精子を注入し受精させるので、卵子の数だけ生存精子があれば治療可能であり、今や男性不妊症や体外受精での受精障害症例などに対してなくてはならない治療法となった。しかし、確実に卵細胞質内へ精子を注入することができる ICSI においても、受精率が低値を示す症例や、全く受精しない症例が報告されている (Yoon *et al.*, 2008)。その原因の一つとして、精子の持つ卵活性化能が不十分であることが知られている (Sakkas *et al.*, 1996)。しかし、そのような卵子活性化能の低い精子を用いて ICSI を行う場合でも、ICSI 施行後に化学物質や電気刺激を用いて卵子の活性化を行うことで、受精率が改善することが報告されている (Zhang *et al.*, 1999; Nakagawa *et al.*, 2001)。

一方、ヨザルは、その生殖細胞、生殖能力や体外受精に関する報告がほとんどなく、わずかに本研究室による報告がみられるだけである (Nakazato *et al.*, 2015; Matsumoto *et al.*, 2015)。Nakazato ら (2015) によればヨザルの精子は、その性状が不良であり、体外受精が不成功であったことが報告されており、ヨザル胚の作出には体外受精では難しく ICSI が必要となるが、ヨザル精子に卵活性化能を有するか懸念される。ICSI でのヨザル胚の作出を試みる際には、貴重なヨザル卵子を使用するため、1 個の卵子も無駄にしないよう、事前にヨザル精子の卵活性化能の有

無を調べることは、重要だと考えられた。

本章の実験では、ヨザル精子が卵活性化能を有するか否かを明らかにすることを目的とし、異種精子の顕微注入でも前核の形成が確認されているマウス卵子へのヨザル精子の ICSI を施行し、前核の形成を観察、その成績を検討した。

また、前核を形成した卵を用いて染色体標本を作製し、ヨザル精子の染色体分析が可能か否か検討した。

## 2-2. 材料と方法

### ・ 供試動物

#### ヨザル

今回の実験は、東京大学動物実験実施規則に準じて行った。鹿児島県奄美大島にある東京大学医科学研究所動物研究施設で飼育されたヨザル雄 5 頭の精子を用いた。これらの雄ヨザルは、飼育室内の個別のケージ（長さ 630mm、高さ 900mm、幅 630mm）内にて、明暗サイクルは自然の日の出、日没に合わせて飼育されていた。また、不断給餌であり、毎日新鮮な果物やサツマイモと一緒に市販の飼育用飼料（CMS-1M、日本クリア）を与えていた。ケージには登ることのできるバーがあり、お互いを見る、また声を聴くことが可能であった。

#### マウス

実験には、卵子提供用として 3～5 ヶ月齢の BALB/c × C57BL/6J の雌マウスを供試した。すべてのマウスは明期 14 時間（5:00～19:00）、暗期 10 時間（19:00～5:00）の人工照明、室温 22～25℃、不断給餌・給水の条件下で飼育した。マウスの飼養および実験は、国立大学法人宇都宮大学動物実験等管理規程に基づき行った。

### ・ 採卵

過排卵処理を行うために、成熟雌マウスに 18:00 に equin chorionic gonadotropin (eCG, あすか製薬) 5IU を腹腔内投与

し、その 48 時間後に human chorionic gonadotropin (hCG, あすか製薬) 5IU を腹腔内投与した。hCG 投与 14 時間後に頸椎脱臼により雌マウスを安楽死させた。眼科用ハサミで傷つけないように注意しながら左右の卵管を採取し、ろ紙で血液をぬぐい、0.1%ヒアルロニダーゼを覆っている流動パラフィンの中に入れた。実体顕微鏡下で卵管膨大部を確認し、2本の解剖針を用いてシャーレの流動パラフィン内で卵管膨大部を切り裂き、卵子塊を引きずるようにして 0.1%ヒアルロニダーゼ (Sigma) を含む PBS に導入した。卵子の周りの卵丘細胞が剥がれたら、卵子を洗浄用培地に移した。

#### ・精子

ヨザル精子は、マウス精子凍結キットである FERTIUP (九動株式会社)を用いて凍結保存していたものを融解して使用した。

#### ・凍結精子の融解

37℃の恒温水槽に、37℃の温水を満たした精子融解用フロートを浮かべた。ピンセットを用いて液体窒素保管容器からストローを取り出し、空気中で 5 秒間保持した後、フロートに素早く映して 10 分間加温した。確実に加温するために、ストローの精子充填部を下方に向けてフロート内へ入れた。加温後、ストローを取り出し表面の水分をキムタオルで拭き取り、ストローの human tubal fluid (HTF)(表 2-1)側の綿栓部分をハサミで切り離した。切り離されたストロー端の HTF 側をストロー操作用シリンジに

差し込み、三方活栓のコックを一回転させ内圧を調整した後、懸濁液側のシール部分をハサミで切り離し、HTF 培地に懸濁液のみを静かに導入し、30 分間インキュベーター内で前培養を行った。その後、倒立顕微鏡下にて精子の運動性を確認した。

#### ・裸化处理と成熟の確認

採卵によって得られたマウス卵子の成熟を確認するため、また以後の ICSI 操作をスムーズに行うため裸化处理を行った。5 インチのパスツールピペットの先端から数 cm の部分をガスバーナーで炙り軟化させた直後に左右に引き、先端部分を切り離した。切り離した先端部分で本体部分の適当な内径を有した先端に軽く傷を付け、その傷より少し先端よりの部分に切り離した先端部分を押し当てパスツールピペット本体を折り、ピペッティングによりマウス卵子にダメージを与えないよう内径が約 150  $\mu$  m のパスツールピペットを作製した。作製したパスツールピペットを用いて卵丘卵子複合体を 0.1% ヒアルロニダーゼ溶液内でピペッティングすることで卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を除去した卵子の囲卵腔内に放出された第 1 極体が有る卵子を成熟卵と判定した。

#### ・ICSI

倒立顕微鏡 (IX-71、オリンパス) にマイクロマニピュレーター (ナリシゲ) を取り付け、ピエゾマイクロマニピュレーターシステム (PMM-150FU、プライムテック) を用いて ICSI を行っ

た。インジェクションのピペットホルダーには、ドライブユニット（MB-U、プライムテック）を接続し使用した。精子を注入するためのインジェクションピペット（PINU06-20FT、プライムテック）は外径  $6\text{-}7\ \mu\text{m}$ 、内径  $4\text{-}5\ \mu\text{m}$ 、卵子を保持するためのホールディングピペット（MT-HD30、北里バイオファルマ）は外径  $100\ \mu\text{m}$  のものを使用した。ピペットをピペットホルダーに装着する前にジョイスティックの全てのダイヤルを中央に合わせ、XYZ 軸全ての方法に対して駆動域を最大限に設定した。

ホールディングのピペットホルダーのホルダーキャップを外し、中にあるシリコンパッキンに破損等の異常がないかを確認した（図 2-1）。シリコンパッキンに異常があるとインジェクターからピペット内の密閉性が保てず、常に陰圧がかり適切な卵子の保持が困難になる場合があり、重要な確認事項である。ピペットホルダーのホルダーキャップを軽く締め、ホールディングピペットを根元からピペットホルダーに挿入していく。ホールディングピペットは、シリコンパッキンを超える部分まで挿入し、ホルダーキャップをしっかり締める（図 2-2）。

マイクロピペットにマイクロローダー（エッペンドルフ）を装着し、PMM オペレーションリキッド（プライムテック）を  $20\ \mu\text{l}$  吸引する。インジェクションピペットの根元のほうからマイクロローダーを挿入し、根元から 8 割程度まで挿入させたところで PMM オペレーションリキッドをマイクロローダーを抜去しながらインジェクションピペットの先端のほうへ流れないように気を付け  $20\ \mu\text{l}$  注入する（図 2-3）。注入した PMM オペレーション

リキッドに気泡が入っていないことも確認する。気泡が入った場合は、気泡をマイクロローダーにて取り除くか、無理であればPMMオペレーションリキッド全てを取り除き初めからやり直すようにする。PMMオペレーションリキッドの注入は、ピエゾパルスをインジェクションピペットにスムーズに伝えるために非常に重要な工程である。インジェクションのピペットホルダーのホルダーキャップを外し、中にあるシリコンパッキンに破損等の異常がないかを確認する(図 2-4)。シリコンパッキンに異常があるとインジェクターからピペット内の密閉性が保てず、常に陰圧がかかるため適切な精子の操作が困難になる場合があり、重要な確認事項である。ピペットホルダーのホルダーキャップを軽く締め、インジェクションピペットを根元からピペットホルダーに挿入していく。インジェクションピペットは、シリコンパッキンを超える部分まで挿入し、ホルダーキャップをしっかり締める(図 2-5)。ホールディングピペット、インジェクションピペットのそれぞれのピペットホルダーをマニピレーターに装着し、倒立顕微鏡の視野内にそれぞれのピペットが平行になるように固定する(図 2-6)。インジェクションピペットは、ピエゾパルスが効いていることを確認するためインジェクターを用いて陽圧をかけPMMオペレーションリキッドをインジェクションピペット先端に小滴ができるまで押し出す(図 2-7)。この際にインジェクションピペット内に気泡ができていないか再度確認しながら行う。PMMオペレーションリキッドの小滴がインジェクションピペットの先端にある状態でピエゾパルスをかけ、一定のリズムで小滴

が振動することを確認する。振動が確認できない、一定でない場合にはピエゾパルスが効いていない可能性があり、精子の不動化や透明帯をスムーズに貫通させることが難しくなるため、そのような場合は一度インジェクションピペットをピペットホルダーから抜去し、再度ピペットホルダーへの装着を行う。それでも改善しない場合は、インジェクションピペットを取り換え、新しいものを用いて設定し直す必要がある。

ICSI 用 dish への各培地の小滴の設定には、35mm dish(Nunc)を用いた。卵子用として  $20\mu\text{l}$  の 10%FBS (SIGMA, Lot No. 057K8414) 添加 HEPES-HTF (Irvine Scientific) ドロップ、精子用として同じく  $20\mu\text{l}$  の 10%FBS 添加 HEPES-HTF ドロップを配置、インジェクションピペットの準備用として  $5\mu\text{l}$  の 10% PVP 溶液のドロップを配置した。従来、精子用ドロップは精子の動きを緩慢にし、精子の不動化などをスムーズに行えるようにするため PVP を使用して作製するが、ヨザル精子は既報通り運動性が不良であったため (Nakazato *et al*, 2015)、今回の実験では精子用ドロップに PVP を添加しなかった。ドロップを作製したのち、 $37^{\circ}\text{C}$  に温められたミネラルオイルにてカバーした(図 2-8)。準備した ICSI 用 dish の精子不動化用ドロップに精子懸濁液を適当量加え、卵子は卵子洗浄用ドロップにて数回マウス卵子を洗浄し、ICSI 用ドロップへ移動し、dish への培地配置を完成とした。

ヨザル精子は、その運動性のみならず頭部の形態も不良であったため、顕微授精に用いる精子の選別は慎重に行った。精子用ドロップの際を泳ぎながら進んでいる精子の中から形態的に良好



なものを選別した。具体的には、ヨザル精子の形態はヒト精子と似ていることが報告されていることから (Nakazato *et al*, 2015)、ヒト精子と同様にきれいな卵型の頭部を有しており、できる限り運動性がより良い精子を選別した。見つけた良好運動精子をインジェクションピペットにて尾部から吸引し、2/3 程度吸引したところでインジェクションピペットを軽く前進させ精子をくの字にし、ピエゾパルス (speed: 2, intensity: 2) を尾部に当てることで不動化を行った。

不動化を行った精子をインジェクションピペット内へ吸引、保持しておき、卵子用ドロップへと移動した。卵子は、第 1 極体を 12 時方向になるように、なおかつできる限り囲卵腔が広い部分が 3 時方向になるようにホールディングピペットにて固定した。インジェクションピペットを 3 時方向から押し当て、透明帯をピエゾパルス (speed: 2, intensity: 2) にて貫通させた。精子をインジェクションピペットの先端へ移動し、卵細胞質内の 2/3~5/4 程度まで進入させ、1 回のピエゾパルス (speed: 1, intensity: 1) にて卵細胞膜を穿破した。その後、ゆっくりと精子を卵細胞質内へ注入し、インジェクションピペットを抜去した。

#### ・前核形成の確認とビンブラスチン処理

顕微授精 10 時間後、顕微鏡下で第 2 極体の放出確認と前核形成の観察を行った。得られた前核期胚については、100  $\mu$ l の 30ng/ml ビンブラスチン添加 KSOM 培地 (表 2-2) にて培養を継続した (37°C、5% CO<sub>2</sub>、95% air)。

#### ・染色体標本作製（ヨザル精子染色体の展開）

染色体標本の作製は、Yoshizawa ら(1992)の方法に従った。ICSI 10 時間後に、前核が確認できた胚をビンプラスチンが最終濃度 30ng/ml となるように調整された発生用培地に移して 8 時間処理した。ビンプラスチンの濃度および処理時間は Yoshizawa ら (1991)の結果に基づき決定した。ビンプラスチン処理後、前核が消失した胚を 1%クエン酸ナトリウム液で 5 分間低張処理し、メタノール：酢酸 = 3 : 1 の固定液 10~20  $\mu$ l を低張液に注入し弱固定を行った。70%アルコールで脱脂し、キムワイプでよく拭いたスライドガラスの上に弱固定された胚を 1 個おき、上から固定液を 1 滴ずつ 5~7 滴滴下した。固定液を滴下後、細胞質を除去するために 10 カウント間息を吹きかけ、約 40℃のホットプレート上で固定液を乾かした。固定液が蒸発するのを待ち、標本を無染色のまま顕微鏡で観察し、染色体の広がり具合をチェックした。細胞質が残り染色体の確認が困難な場合には、再び固定液を数滴滴下し、息を吹きかけて細胞質を除去した。染色体標本作製は、染色体の展開を良好なものにするために、十分に加湿した条件下で行われた。

#### ・統計処理

得られた結果の統計的評価は、カイ 2 乗検定により行い、有意水準 1%として判定した。

表 2-1. HTF 培地の組成

	(mM)
NaCl	101.60
KCl	4.69
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.37
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	2.02
NaHCO <sub>3</sub>	25.00
Glucose	2.78
Sodium Pyruvate	0.33
60% Sodium lactate	21.40
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0.050 mg/ml
Bovine Serum Albumin	5.0 mg/ml
1% Phenol red (liquid)	1 μl/ml

表 2-2. KSOM 培地の組成

	(mM)
NaCl	95.00
KCl	2.50
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.71
NaHCO <sub>3</sub>	25.00
Glucose	0.20
Na-Pyruvate	0.20
Glutamine	1.00
60% Sodium lactate	10.0
EDTA·2Na	0.01
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	0.030 mg/ml
Bovine Serum Albumin	1.0 mg/ml
1% Phenol red (liquid)	0.4 μl/ml

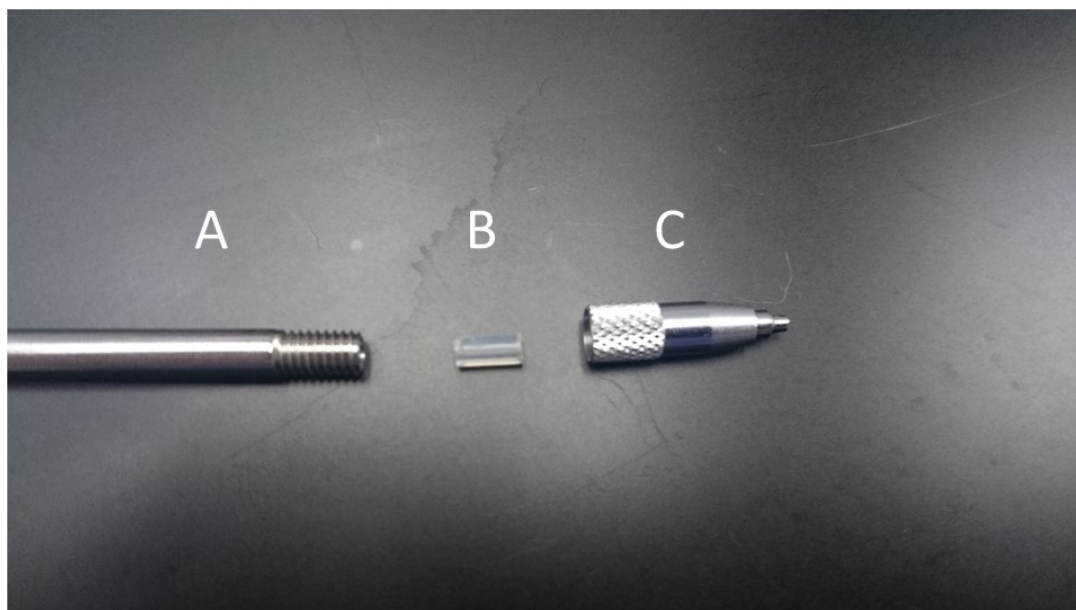


図 2-1. ホールディングピペットのピペットホルダーの確認

- A : ホルダー本体
- B : シリコンパッキン
- C : ホルダーキャップ

シリコンパッキンに異常があるとインジェクターからピペット内の密閉性が保てず、常に陰圧がかかり適切な卵子の保持が困難になる場合がある。

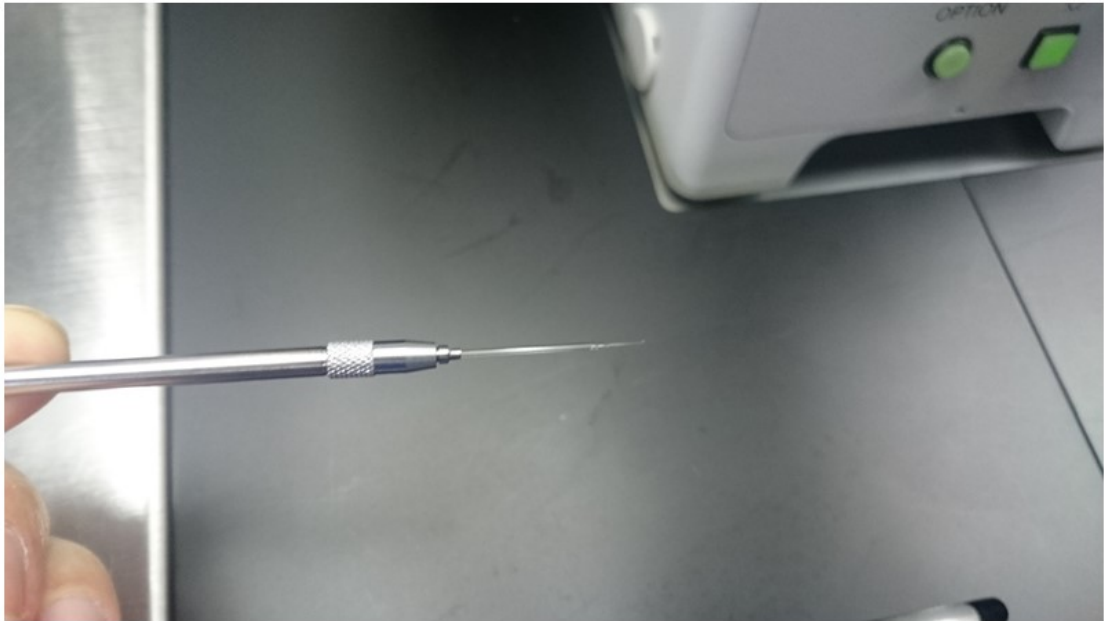


図 2-2. ピペツトホルダーにホールディングピペツトを挿入

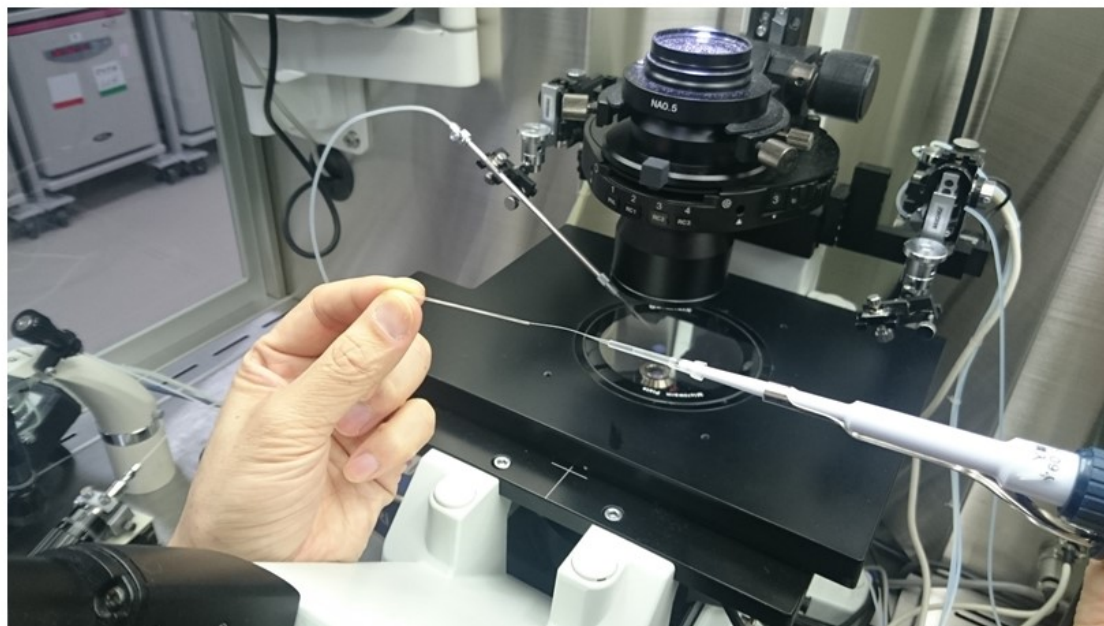


図 2-3.インジェクションピペットに PMM オペレーションリキッドを注入

インジェクションピペットにマイクロローダーを用いて PMM オペレーションリキッドを  $20\mu\text{l}$  注入する。注入した PMM オペレーションリキッドに気泡が入っていないことも確認する。

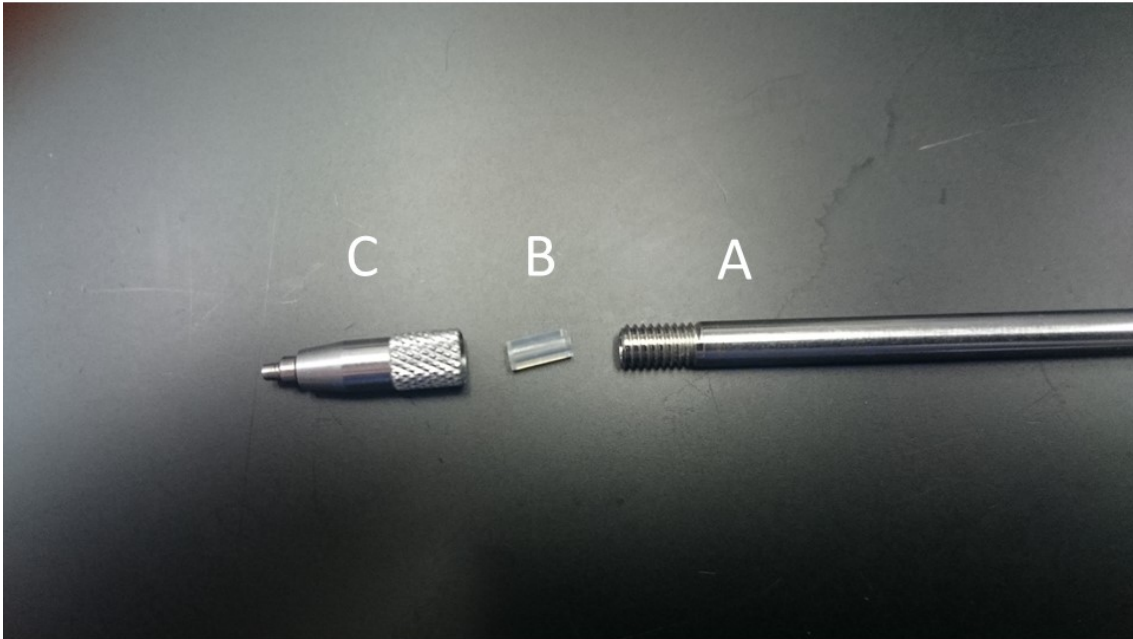


図 2-4. インジェクションピペットのピペットホルダーの確認

- A : ホルダー本体
- B : シリコンパッキン
- C : ホルダーキャップ

シリコンパッキンに異常があるとインジェクターからピペット内の密閉性が保てず、常に陰圧がかかるため適切な精子の操作が困難になる場合がある。





図 2-5. ピペットホルダーにインジェクションピペットを挿入

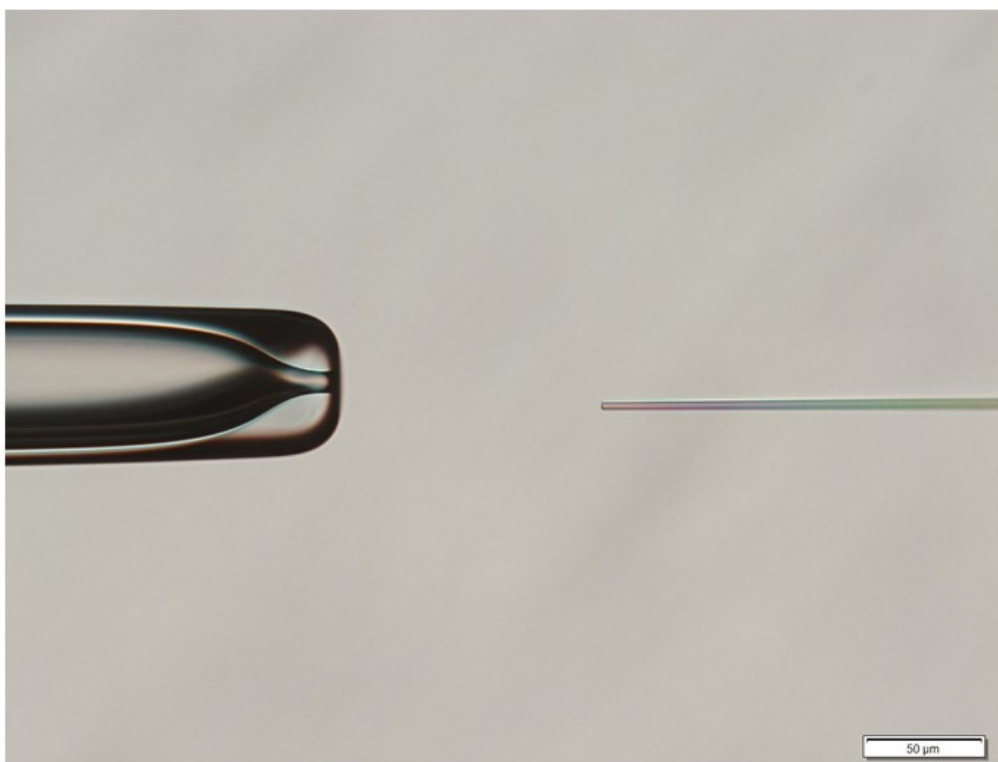


図 2-6. ホールディングピペットとインジェクションピペットのセッティング

ホールディングピペットとインジェクションピペットを倒立顕微鏡の視野内に平行になるようにセッティングする。

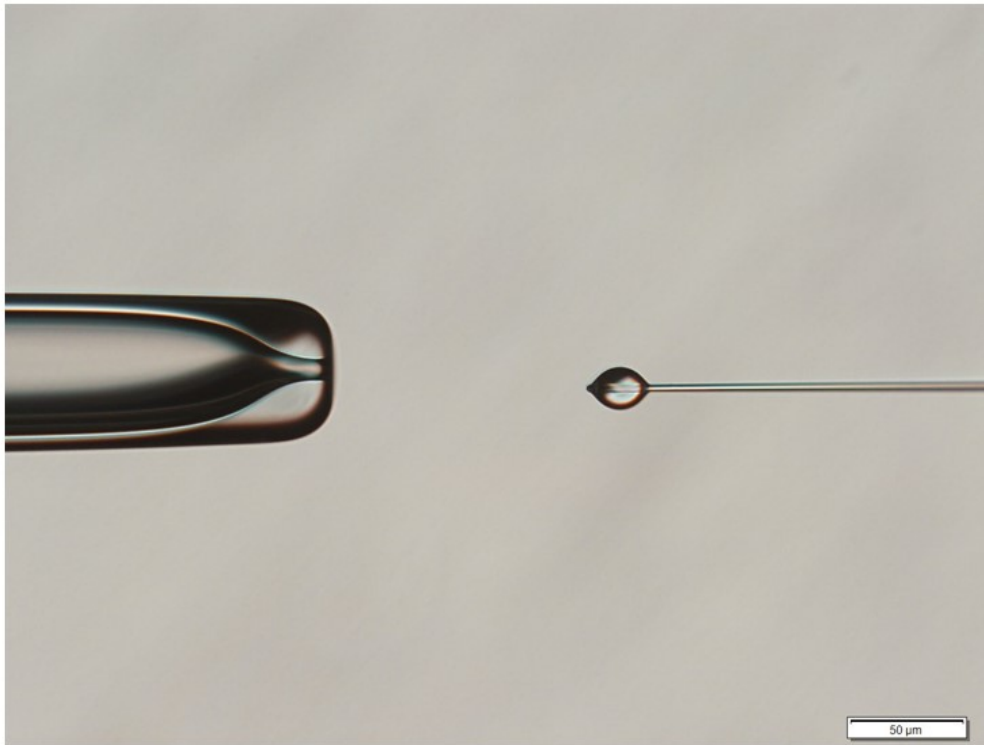


図 2-7.インジェクションピペットの先端に作製した PMM オペレーションリキッドの小滴

PMM オペレーションリキッドの小滴がインジェクションピペットの先端にある状態でピエゾパルスをかけ、一定のリズムで小滴が振動することを確認する。振動が確認できない、一定でない場合にはピエゾパルスが効いていない可能性があり、精子の不動化や透明帯をスムーズに貫通させることが難しくなるため、そのような場合は一度インジェクションピペットをピペットホルダーから抜去し、再度ピペットホルダーへの装着を行う。それでも改善しない場合は、インジェクションピペットを取り換え、新しいものを用いて設定し直す必要がある。

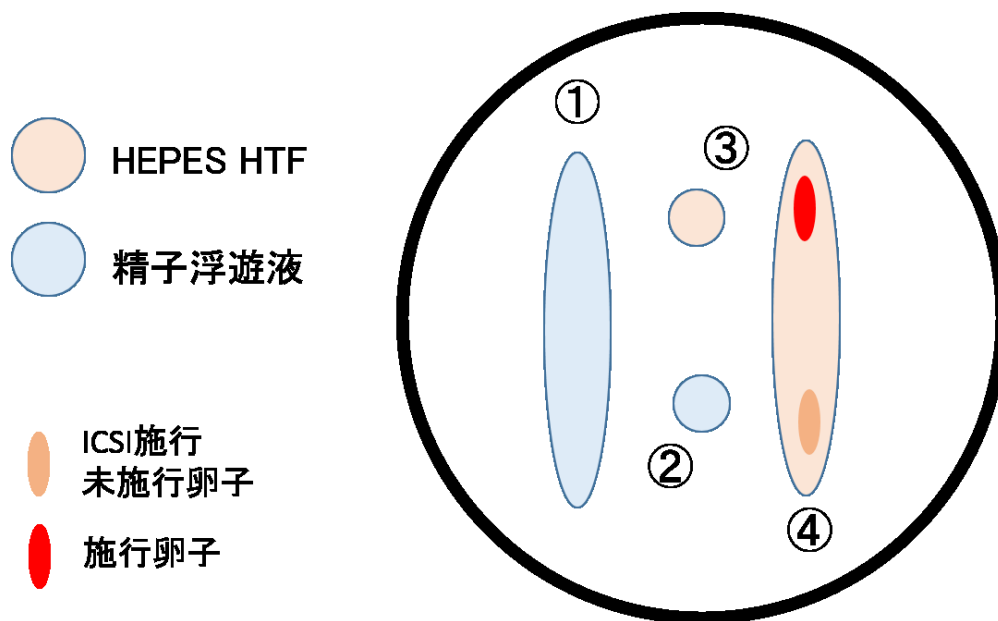


図 2-8. 用いた ICSI dish の模式図

- ① 精子不働化用培地の小滴
- ② インジェクションピペット準備用小滴
- ③ 卵子洗浄用小滴
- ④ ICSI 用小滴

## 2 - 3 . 結果

計 7 回の実験を行い、合わせて 22 匹のマウスから 342 個の卵子を回収し、その内訳は成熟卵子 215 個、未熟卵子 53 個、異常卵子 74 個であった (表 2-3)。成熟卵子 215 個に ICSI を行った結果、生存卵子率 60.5% (130/215)、ICSI 施行卵子あたりの前核形成率 55.3% (119/215) であった。また、生存卵子あたりの前核形成率は 91.5% (119/130) と高率であることから、ヨザル精子は卵活性化能を有すると考えられた (表 2-4)。

最初の 3 回の実験では、マウス卵子への ICSI のコツが掴めず低い生存卵子率であった。残りの 4 回では、ピエゾパルスにて細胞膜を破る際に、インジェクションピペットの卵細胞質内への進入を 2/3 程度だったものを 4/5 程度までとできるだけ奥まで進入させ破膜した結果、生存卵子率、前核形成率は有意に改善した (表 2-5)。また、今回の実験では未熟卵子が 53 個と数多く認められたので、Metaphase I (MI) 卵子 6 個に ICSI を行った結果、生存卵子率 83.3% (5/6)、前核形成率 50.0% (3/6) であった (表 2-6)。

前核が確認できた胚を用いて染色体標本を作製したところ、染色体の構造の違いによりマウス卵子由来の端部動原体型の染色体 20 本、ヨザル精子由来と推測される中部動原体型、次中部動原体型などの 20 数本の染色体を観察することが可能であった (図 2-2)。

表 2-3. 各実験における採卵数とその詳細

実験回数	供試 マウス (匹)	採卵数	成熟卵 子数	未熟卵 子数	異常卵 子数
1回目	3	48	11	0	37
2回目	3	38	12	23	3
3回目	3	65	35	24	6
4回目	3	22	15	4	3
5回目	3	22	20	2	0
6回目	4	80	70	0	10
7回目	3	67	52	0	15
合計	22	342	215	53	74

表 2-4. マウス成熟卵子へのヨザル精子を用いた ICSI の成績

実験回数	ICSI 施行数	生存卵子数 (%)	前核形成卵子数 (%)	生存卵子あたりの前核形成率
1 回目	11	4 (36.4)	4 (36.4)	100%
2 回目	12	3 (25.0)	3 (25.0)	100%
3 回目	35	9 (25.7)	9 (25.7)	100%
4 回目	15	13 (86.7)	10 (66.7)	76.9%
5 回目	20	16 (80.0)	14 (70.0)	87.5%
6 回目	70	49 (70.0)	45 (64.3)	91.8%
7 回目	52	36 (69.2)	34 (65.4)	94.4%
合計	215	130 (60.5)	119 (55.3)	91.5%

表 2-5. マウス成熟卵子へのヨザル精子を用いた ICSI の成績（手技変更前後での成績）

実験回数	ICSI 施行 卵子数	生存卵子数 (%)	前核形成卵子数 (%)
1～3回目*	58	16 (27.6) <sup>a</sup>	16 (27.6) <sup>a</sup>
4～7回目**	157	114 (72.6) <sup>b</sup>	103 (65.6) <sup>b</sup>

a,b : 異符号間に有意あり (P<0.01)

\* インジェクションピペットを 2/3 程度進入させたところでピエゾパルスにて破膜

\*\* インジェクションピペットを 4/5 程度進入させたところでピエゾパルスにて破膜



表 2-6. マウス未成熟卵子へのヨザル精子を用いた ICSI の成績

実験回数	ICSI 施行数	生存卵子数 (%)	前核形成卵子数 (%)	生存卵子あたりの前核形成率
1 回目	0			
2 回目	0			
3 回目	0			
4 回目	4	3 (75.0)	1 (25.0)	33.3%
5 回目	2	2 (100)	2 (100)	100%
6 回目	0			
7 回目	0			
合計	6	5 (83.3)	3 (50.0)	60.0%

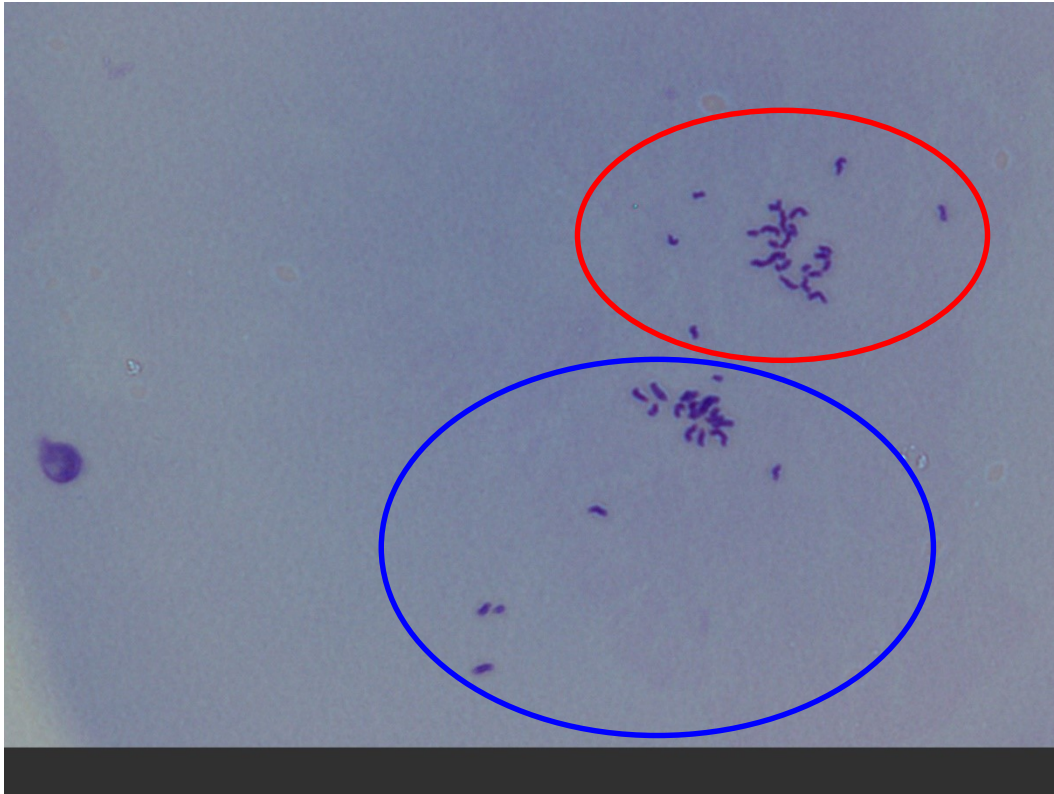


図 2-2. 得られたマウスおよびヨザルの卵子染色体標本の染色体中期像

この標本では、赤色枠内にヨザル精子の 20 数本の染色体、青色枠内マウス染色体 20 本が確認できる。

## 2-4. 考察

第2章では、ヨザル精子の卵活性化能の有無を調べるため、マウス卵子にヨザル精子を用いて ICSI を施行した。計7回の実験を行い、合計で生存卵子率 60.5% (130/215)、ICSI 施行卵子あたりの前核形成率 55.3% (119/215) であった。ICSI 施行卵子あたりでは、55.3%と低率であったが、生存卵あたりでは 91.5% (119/130) と高率であった。これは、ICSI 後の生存卵子では高率に卵子が活性化していることを意味しており、ヨザル精子はマウス卵子を活性化させる能力を有することが確認された。このことからヨザル胚作出の際にヨザル精子、ヨザル卵子を用いて ICSI を行う際は、ICSI 後の卵活性化は不要であると推察された。また、マウス卵子への ICSI の問題点として、初めの3回は ICSI 施行後の変性率が高い値を示していたが、インジェクションピペットをできるだけ奥へ（卵細胞質の 4/5 程度）進めてから細胞膜をピエゾパルスにて破くことで改善できた。これは、Yanagida ら (2001) の報告と一致している。彼らは、よりインジェクションピペットを卵細胞質内へ進入させ穿破し、細胞膜同士が広範囲にわたって接した方が細胞膜の修復がスムーズとなり ICSI 後の生存率が高いと報告している。

未熟卵子 (MI) 6 個への ICSI では、予想に反して前核形成卵を得ることに成功した。この要因については不明であるが、術者がマウス卵子を用いた実験経験が少なく、フラグメントのような小さな第1極体を見落としてしまっていた可能性は、否定できない。

術者のマウス卵子を用いた ICSI の経験不足から、ICSI 後の生存卵子率は 60.5%とやや低値であったが、異種精子であるヨザル精子を用いても生存卵子あたりの前核形成率は、91.5%と高い値を示した。マウス卵子への他の異種精子の顕微注入実験では、ハムスター (Kimura *et al*, 1998)、ウニ (Wakayama *et al*, 1997) などが行われており、前核を形成することが報告されている。また、ブタ卵子にウシ、マウス、ヒト精子を顕微注入し前核形成するという報告 (Kim *et al.*, 1999) もあり、卵活性化因子の種特異性は低いことが推測される。近年、卵活性化因子は、Phospholipase C zeta (PLC $\zeta$ ) ではないかとの報告が散見され (Saunders *et al.*, 2002; Yoon *et al.*, 2008)、卵活性化因子そのものについても、その種特異性についても更なる知見が明らかになるものと期待される。

また、マウス卵子へのヒト精子の顕微注入では前核形成のみならず、第 1 卵割中期に発生することが報告されている (Rybouchkin *et al*, 1995)。これによりヒト精子あるいはヒト精子細胞の染色体解析が可能であったとの報告がなされている (Rybouchkin *et al*, 1995; Lee *et al*, 1996; Araki *et al*, 1999; Ogawa *et al*, 2000)。ヨザルには、いくつかの亜種が存在しており、染色体数も数パターン報告されている (Defler *et al*, 2007)。本実験では、ヨザル精子の染色体分析可能な標本の作製に成功したが、その分析までには至らなかった。

## 第 3 章

# ヨザル卵子への卵細胞質内精子注入 による胚作出

### 3 - 1 . 緒言

サル類はヒトに最も近縁の種であり、感染症や病理研究など非ヒトモデル動物として様々な研究に用いられている (Hayton *et al.*, 2013; Collins *et al.*, 2010)。サルは、現在大きく原猿類と真猿類の 2 種類に分類される。原猿類は、アフリカ、アジアに生息する原始的なサルである。真猿類は、さらに新世界ザルと旧世界ザルに分類される。ヨザルは、オマキザル科の新世界ザルで、真猿類の中で唯一夜行性である。ヨザルは一夫一妻、周年繁殖動物で性周期は約 16 日間であり (Bonney *et al.*, 1980)、妊娠期間は 133 日間 (Hunter *et al.*, 1979) である。また、原虫性感染症であるマラリアの感受性がある数少ないサル的一种であり、貴重な実験用霊長類である。実験用動物として計画的な繁殖は不可欠であるが、ヨザルは飼育管理下においての繁殖には成功しているものの、その繁殖性は高いとは言えない。遺伝資源としてのヨザルの配偶子や胚の保存や個体の人為的な生産を効率的に行うために、体外受精は有効な手段と考えられるが、成功には至っていない。その原因として、ヨザル精子はその性状が非常に不良であり (Nakazato *et al.*, 2015)、通常の体外受精では受精卵を得ることが困難だということが考えられる。

そこで、本章の実験ではヨザル胚作出を目的とし、ヨザル精子、ヨザル卵子を用いて ICSI を試みた。ヨザルの ICSI による胚作出、そしてその後の胚移植の成功は、ヨザルの安定的な繁殖を可能にするものと思われる。さらには、ヨザルが実験用霊長類であること、人為的生殖法としては、体外受精は困難であり、ICSI

しなければ受精卵を作出しえない状況は、ヒト生殖医療における ICSI の適応（男性不妊症）と同様であることを合わせて考えれば、ヒト生殖医療の発展にも寄与することが期待される。

### 3-2. 材料と方法

#### ・ 供試動物

東京大学動物実験実施規則に準じて行った。鹿児島県奄美大島にある東京大学医科学研究所 病害動物研究施設で飼育されたヨザル 2 頭、メスのヨザル 1 頭（7 歳、体重 1,000 g 未経産）とオスのヨザル 1 頭（5 歳、体重 1,100 g）を使用した。これらのヨザルは、飼育室内の個別のケージ（長さ 630mm、高さ 900mm、幅 630mm）内にて、明暗サイクルは自然の日の出、日没に合わせて飼育されていた。また、市販の飼育用飼料（CMS-1M、日本クレア）の不断給餌であり、毎日新鮮な果物やサツマイモも一緒に与えられていた。ケージには登ることのできるバーがあり、お互いを見る、また声を聴くことが可能であった。

実験に使用した 2 頭のヨザルは、ケタミン（30mg/kg）とメデトミジン（0.05mg/kg）を筋肉注射で麻酔後、全採血によって安楽死させた。また、今回使用したメスのヨザルは発情周期の確認はできておらず、ホルモンなどを用いた過排卵処理も行っていない。

#### ・ 採卵

採卵は、雌のヨザルを安楽死させ卵巣摘出後、既報に従って行った（Matsumoto *et al*, 2015）。卵子は、10%FBS（SIGMA, Lot No. 057K8414）添加 HTF 内で 25G の注射針を用いて卵巣表面の下に観察される卵胞を裂き、そこから掬い取り法にて採取した。卵子は、周りを卵丘細胞に囲まれ卵丘卵子複合体（cumulus oocyte



complexes : COCs) と呼ばれる。得られた卵丘卵子複合体を卵丘細胞の状態により excellent(3層以上の卵丘細胞がみとめられるもの)、good (1もしくは2層の卵丘細胞がみとめられるもの)、poor (卵丘細胞が1層に満たないもしくは、部分的に認められもの) の3つのグレードに分類した。

#### ・採精

採精は、雄のヨザルを安楽死させ精巣を摘出後、既報に従い行った (Nakazato *et al*, 2015)。精巣より切除した両方の精巣上体尾部を凍結保存用培地に入れ、メスを用いて5~6ヶ所に切れ込みを入れ、さらに解剖針を用いてしごくことで精子を回収した。一部の精子懸濁液は、ICSIを行う際の10%FBS添加 HEPES-HTF ドロップに加えられた。

#### ・体外成熟 (*in vitro maturation*: IVM)

得られた卵子は、既報に従い IVM を行った (Matsumoto *et al*, 2015)。体外成熟培養に用いる培養液には、あらかじめ作製し平衡化したものを使用した。まず 35mm dish にマイクロピペットを用いて 50  $\mu$ l の 10%FBS 添加 HTF のドロップを作製し、ドロップを崩さないよう気を付けながら先端を短く加工したパストツールピペットを用いてミネラルオイルにてカバーした。ミネラルオイルにカバーされ形状が安定した 50  $\mu$ l のドロップに、さらに 50  $\mu$ l の 10%FBS 添加 HTF を加え 100  $\mu$ l のドロップを作製した。インキュベーター内 (37°C、5%CO<sub>2</sub> in air) で一晩平衡化し

体外成熟培養に使用した。得られた卵丘卵子複合体をグレードにより選別し、100  $\mu$  l の 10%FBS 添加 HTF ドロップへ移し、インキュベーター内（37°C、5%CO<sub>2</sub> in air）で 25 時間培養した。

#### ・成熟の確認

体外成熟培養後、卵子の成熟を確認するため裸化处理を行った。裸化处理をスムーズに行うため、あらかじめ内径の異なるパストツールピペットを何本か準備した。5 インチのパストツールピペットの先端から数 cm の部分をガスバーナーで炙り軟化させた直後に左右に引き、パストツールに本体部分と先端部分を切り離した。切り離した先端部分で本体部分の適当な内径を有した先端に軽く傷を付け、その傷より少し先端よりの部分に切り離した先端部分を押し当てパストツールピペット本体を適当な内径で折り、内径が 150  $\mu$  m 前後と 200  $\mu$  m 前後の 2 種類のパストツールピペットを作製した。200  $\mu$  m のパストツールピペットを用いて体外成熟用のドロップから卵丘卵子複合体を 0.1%ヒアルロニダーゼ溶液（Sigma）へ移し、ピペッティングすることで卵丘細胞を除去した。裸化がスムーズに行えない場合は 150  $\mu$  m のパストツールピペットを使用し、卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を除去した卵子の囲卵腔内に放出された第 1 極体が有るものを成熟卵と判定した。

#### ・ICSI

倒立顕微鏡（IX-71 オリンパス）にマイクロマニピュレーター（ナリシゲ）を取り付け、ピエゾマイクロマニピュレーターシス

テム (PMM-150FU: プライムテック) を用いて ICSI を行った。インジェクションのピペットホルダーには、ドライブユニット (MB-U: プライムテック) を接続し使用した。精子を注入するためのインジェクションピペット (PINU06-20FT、プライムテック) は外径  $6-7\mu\text{m}$ 、内径  $4-5\mu\text{m}$ 、卵子を保持するためのホールディングピペット (MT-HD30、北里バイオファルマ) は外径  $100\mu\text{m}$  のものを使用した。ピペットをピペットホルダーに装着する前にジョイスティックの全てのダイヤルを中央に合わせ、XYZ 軸全ての方法に対して駆動域を最大限に設定した。

ホールディングピペットとインジェクションピペットのセッティングは、第 2 章、第 2 項「ICSI」と同様に行った。

ICSI 用 dish は、35mm dish を用いて作製した。卵子用として  $20\mu\text{l}$  の 10% FBS 添加 HEPES-HTF ドロップを作製、精子用として同じく  $20\mu\text{l}$  の 10% FBS 添加 HEPES-HTF ドロップを作製した。従来、精子用ドロップは精子の動きを緩慢にし、精子の不動化などをスムーズに行えるようにするため PVP を使用して作製するが、ヨザル精子は既報通り運動性が不良であったため (Nakazato *et al*, 2015)、今回の実験では PVP は使用しなかった。ドロップを作製したのち、 $37^{\circ}\text{C}$  に温められたミネラルオイルにてカバーした (図 3-1)。準備した ICSI 用 dish の精子用ドロップに精子懸濁液を適量加え、卵子洗浄用ドロップで卵子を洗浄し ICSI 用ドロップに移し、ICSI 用 dish の完成とした。

ヨザル精子は、その運動性のみならず頭部の形態も不良であることが報告されており (Nakazato *et al*, 2015)、顕微授精に用い

る精子の選別は慎重に行った。精子用ドロップの際を泳ぎながら進んでいる精子の中から形態的に良好なものを選別した。具体的には、ヨザル精子の形態はヒト精子と似てことが報告されていることから (Nakazato *et al*, 2015)、ヒト精子と同様にきれいな卵型の頭部を有しており、運動性がより良い精子を選別した。見つけた良好運動精子をインジェクションピペットにて尾部から吸引し、2/3 程度吸引したところでインジェクションピペットを少し進めて精子をくの字にし、ピエゾパルス (speed: 2, intensity: 2) にて不動化を行った。

不動化を行った精子をインジェクションピペット内へ吸引、保持しておき、卵子用ドロップへと移動した。卵子は、第 1 極体を 12 時方向になるように、なおかつできる限り囲卵腔が広い部分が 3 時方向になるようにホールディングピペットにて固定した。インジェクションピペットを 3 時方向から押し当て、透明帯をピエゾパルス (speed: 2, intensity: 2) にて貫通させた。精子をインジェクションピペットの先端へ移動し、卵細胞質内の 3/2~5/4 程度まで進入させ、1 回のピエゾパルス (speed: 1, intensity: 1) にて卵細胞膜を穿破した。その後、ゆっくりと精子を卵細胞質内へ注入し、インジェクションピペットを抜去した (図 3-2)。

#### ・受精の確認と胚培養

顕微授精 17.5 時間後、顕微鏡下で囲卵腔への第 2 極体の放出と卵細胞質内への前核の形成を観察し、受精の確認を行った。得られた受精卵は、100  $\mu$ l の 0.1% BSA 添加 KSOM にて培養を継

続し（37℃、5% CO<sub>2</sub>、in air）、そののち宇都宮大学の研究室へ  
輸送して培養を継続し、毎日形態観察を行った。

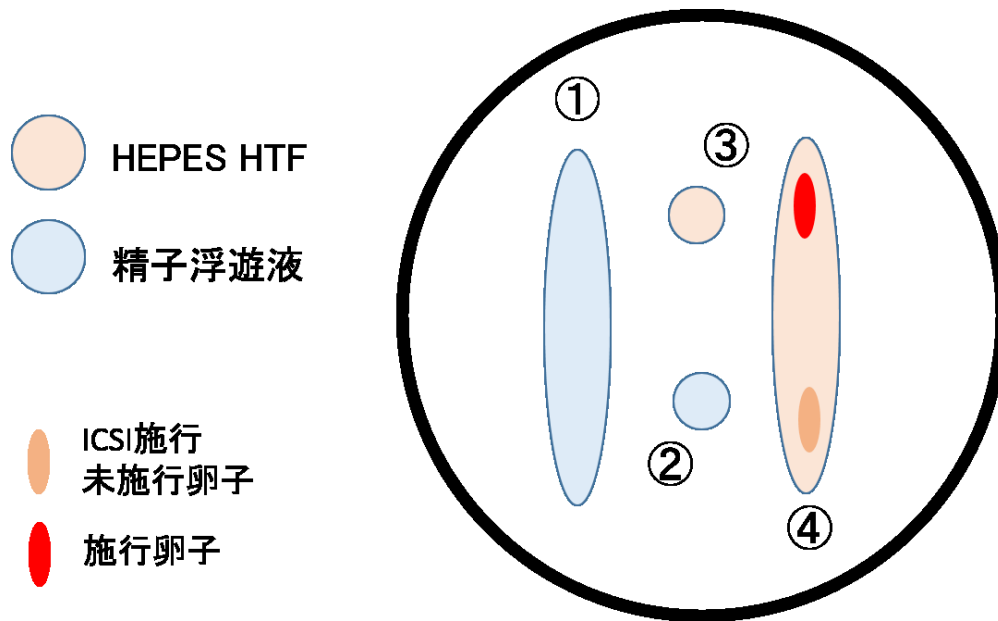


図 3-1. 用いた ICSI dish の模式図

- ① 精子不動化用培地の小滴
- ② インジェクションピペット準備用培地小滴
- ③ 卵子洗浄用培地
- ④ ICSI 用培地

### 3-3. 結果

摘出した両卵巢から合計で 14 個の COC が回収され(表 3-1)、卵丘細胞の状態により excellent 3 個、good 4 個、poor 7 個に分類された。

卵子を 25 時間の IVM の後、0.1%ヒアルロニダーゼ処理にて裸化をおこない成熟の確認を行った。excellent COC 3 個は、3 個(100%) 全てに卵丘細胞の膨化が認められたものの、第 1 極体の放出がみられた成熟卵は 1 個であり、体外成熟率は 33.3% (1/3) であり、第 1 極体が認められなかった他の 2 個は、1 個が M I 期、もう 1 個は変性卵であった。Good COC 4 個は、4 個(100%) 全てに卵丘細胞の膨化が認められたものの、第 1 極体の放出がみられた成熟卵は 1 個で体外成熟率は 25.0% (1/4) であり、第 1 極体が認められなかった他の 3 個は、全て M I 期であった。Poor COC 7 個は、1 個(14.3%) に卵丘細胞の膨化を認めたものの、体外成熟率は 0%(0/7) であり、M I 期が 1 個、Germinal vesicle (GV) 期が 2 個、変性卵が 4 個であった(表 3-1)。また、得られた 2 個の成熟卵子は、色調、透明帯の厚さや卵細胞質の大きさなど形態的にはヒト成熟卵子と類似していた。

ヨザル卵子を用いた ICSI は、今回が初めてであり練習の意味も含めて念のため M II 卵子 2 個の他に M I 卵子 5 個、GV 卵子 2 個にも ICSI を行った。受精は、倒立顕微鏡下にて第 2 極体の放出と分割により判定した。M II 卵 2 個に ICSI を施行した結果、2 個とも生存(100%) し、2 個とも第 2 極体の放出がみられた(100%)。M I 卵 5 個に ICSI した結果、4 個が生存(80.0%)

したものの、第 2 極体の放出には至らなかった (0%)。GV 卵 2 個に ICSI した結果、1 個が生存 (50.0%) したものの、第 2 極体の放出には至らなかった (0%, 表 3-2)。また、ICSI を行った際、インジェクションピペットを卵子内 2/3 程度まで進入させても卵細胞膜は、破けることなく伸展し、その伸展性はヒト卵子やマウス卵子と同等であった。また、ピエゾパルスによって卵細胞膜の破れる様子も、ヒト卵子やマウス卵子と似ており、それらの卵子と同様の感覚で ICSI を行う事が可能であった (図 3-2)。

顕微授精の後、17.5 時間に第 2 極体の放出により受精の確認を行った結果、excellent COC 由来の 1 個では 2 細胞期に達しており、good COC 由来 1 個は、前核は確認できなかったが第 2 極体の放出が確認された (図 3-3)。ICSI 後 30.5 時間には、1 個は 3 細胞期 (不等分割) へ、もう 1 個は 2 細胞期への分裂が確認された (図 3-4)。2 個とも前核の確認はできなかったものの、そのまま培養を継続した。継続培養の結果、ICSI 後 48 時間には各々 4 細胞期と 5 細胞期、66 時間では 6 細胞期と 8 細胞期、98 時間では 2 個とも 10 細胞期 (図 3-5)、114 時間では両方とも部分的に細胞の融合を認めたものの、それ以降の発育は停止し ICSI 後 138 時間で培養を終了した (表 3-3)。

表 3-1. ヨザル卵子の IVM の成績

COC の 評価	採卵数	CC 膨化卵 子数 (%)	M II 期卵 子数 (%)	M I 期卵 子数 (%)	GV 期卵子 数 (%)	変性卵子 数 (%)
excellent	3	3 (100)	1 (33.3)	1 (33.3)	0	1 (33.3)
good	4	4 (100)	1 (25.0)	3 (75.0)	0	0
poor	7	1 (14.3)	0	1 (14.3)	2 (28.6)	4 (57.1)



表 3-2. ヨザル卵子および精子を用いた ICSI の成績

卵子の成熟性	ICSI 施行卵 子数	生存卵子数 (%)	受精卵子数 (%)
M II	2	2 (100)	2 (100) *
M I	5	4 (80.0)	0 (0)
GV	2	1 (50.0)	0 (0)

\* ICSI 17.5 時間後に倒立顕微鏡にて第 2 極体の放出と分割により受精と判断した。

表 3-3. ICSI 後経過時間によるヨザル胚の胚発育

ICSI 後経過 時間(時間)	17.5	30.5	41.0	48.0	66.0	72.5	90.2	98.0	122.	138.
							5		5	0
excellent COC 由来卵子	2	3	4	4	6	6	8	10	8*	10*
good COC 由来卵子	1cell (2nd PB)	2	3-4	5	8	8	8	10	10*	10

\* 幾つかの割球がコンパクションしている様子が確認された

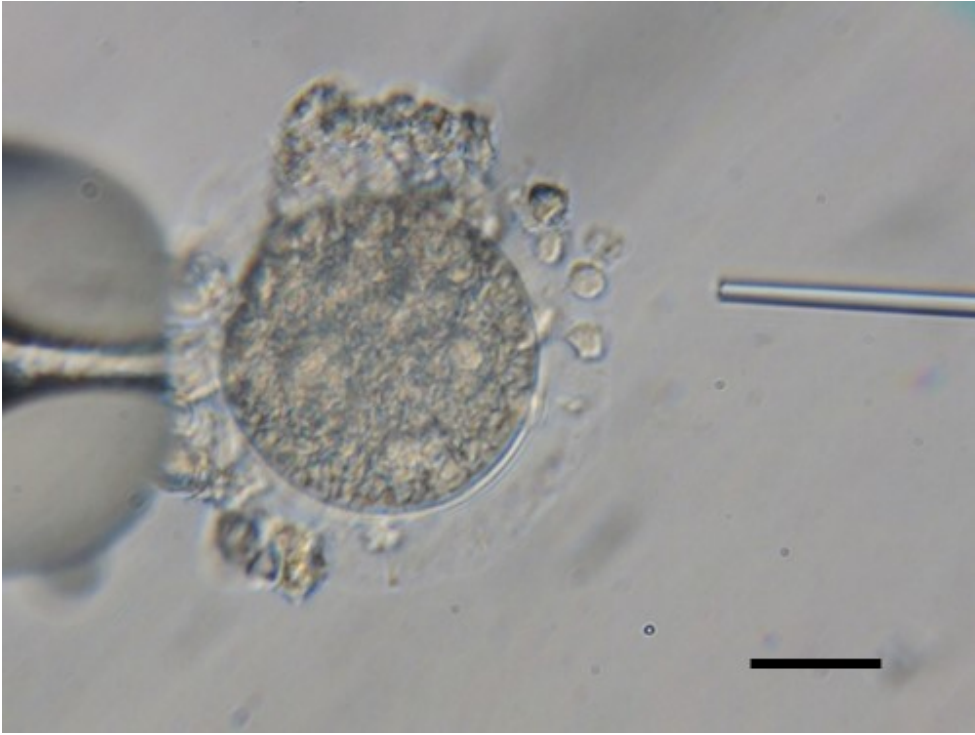


図 3-2. ヨザル卵子への ICSI

Bar は  $50 \mu\text{m}$

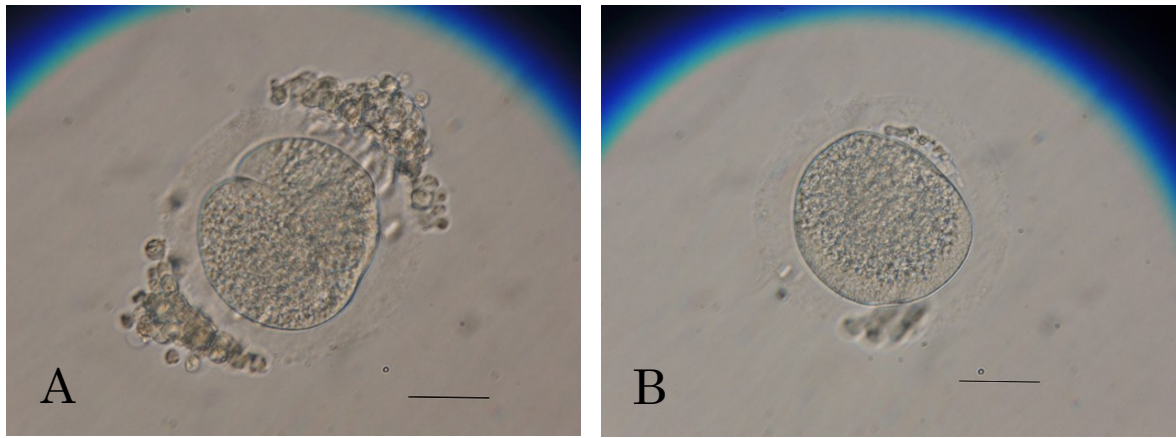


図 3-3. ICSI 17.5 時間後のヨザル受精卵

A) excellent COC 卵子の ICSI により得られた 2 細胞期胚。

B) good COC 卵子の ICSI により得られた胚。第 2 極体の放出が確認できる。

Bar は、50µm

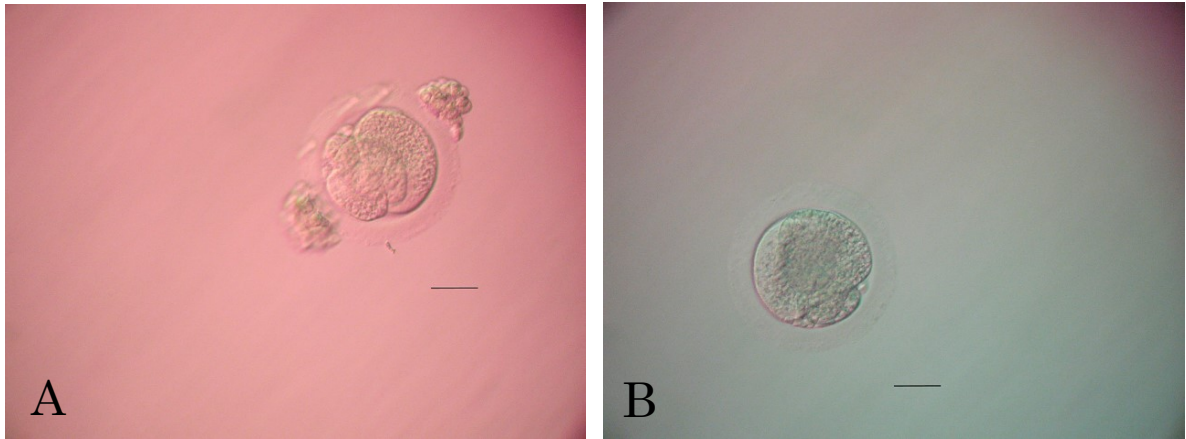


図 3-4. ICSI 30.5 時間後のヨザル胚

A) excellent COC 卵子の ICSI から発生した 3 細胞期胚。

B) good COC 卵子の ICSI により得られた 2 細胞期胚。

Bar は、50µm

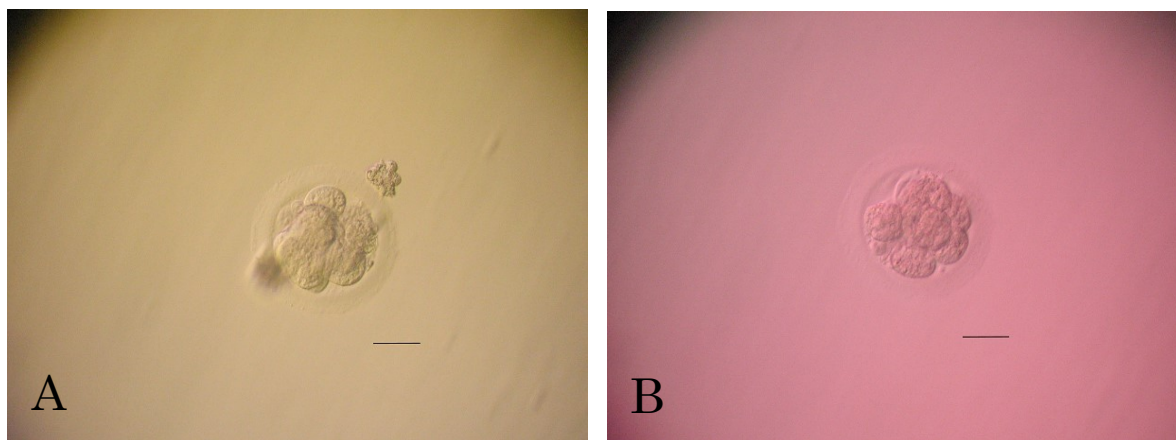


図 3-5. ICSI 98.0 時間後のヨザル胚

A) excellent COC 卵子の ICSI から発生した 10 細胞期胚。

B) good COC 卵子の ICSI により得られた 10 細胞期胚。

Bar は、50µm

### 3-4. 考察

第3章の実験では、過排卵処理を行っていないメスのヨザル(6歳8か月)の両卵巢を摘出し、そこから採卵を行い合計14個のCOCが回収された。卵丘細胞の状態により excellent 3個、good 4個、poor 7個に分類した。25時間のIVMの結果、excellent COCは、MII 1個、MI 1個、変性1個であり、体外成熟率は33.3%であった。good COCは、MII 1個、MI 3個であり、体外成熟率は25.0%であった。Poor COCからは成熟した卵子は認められず、MI 1個、GV2 2個、変性4個であった。このことから、卵丘細胞がより層を成しているCOCがIVMにおいて成熟しやすい可能性が示唆され、この結果ヨザルおよびリスザルを用いたMastumotoら(2015)の報告と同様であった。

また、得られた成熟卵子より2個受精卵を得ることに成功したが、ICSI後17.5時間の受精の確認では2前核を確認することができず、1個はすでに2細胞期へ進んでおり、もう1個は第2極体のみの確認であった。この第2極体のみの確認された受精卵は、その後前核を形成させることなく2細胞期へ分割した。このことと、もう一方の受精卵もすでに2細胞期になっていたことを合わせて考えると、両方の受精卵は受精確認時のICSI後17.5時間ではすでに前核が消失していたことを示唆している。ヨザルと同じ新世界ザルであるアカゲザルを用いた検討では、受精確認はICSI後10-12時間で行うと報告しており(Hewitson *et al.*, 1998)、ヨザルにおいても2前核を観察するにはもう少し早い時間での受精確認が望ましいと考えられる。

また、今回得られた 2 個の受精卵は胚盤胞まで発育しなかったが、これには幾つかの原因が考えられる。1 つ目は、得られた受精卵が 2 個と少なかったことである。今回の検討では、IVM により 14 個の COC より 2 個の成熟卵子を得ることに成功した。2 個の成熟卵子からは、受精卵が得られ、その後の発育も認められた。しかし、MI、GV への ICSI では受精も、その後の発育も認められなかった。このことから、やはり成熟卵子を数多く得ることは重要なポイントであると考えられた。アカゲザルではすでに有効な過排卵処理が確立されており、一度に複数個の成熟卵を採卵できることを報告しているが (Hewitson *et al.*, 1998; Nusser *et al.*, 2001)、ヨザルでは未だ有効な過排卵処理についての報告はなされていない。過排卵処理が確立すれば得られる受精卵数が増えることで胚盤胞への発育の可能性が高くなると考えられる。また、今回採卵時に卵丘細胞の状態により COC を 3 つのグレードに分類したが、excellent、good のより良いグレードの COC より成熟卵子、受精卵が得られていることから、性周期に合わせた採卵やより効果的な IVM を行うことで数多くの受精卵を作出できる可能性が示唆された。2 つ目は、培養液の問題である。アカゲザルでは BRL 細胞との共培養によって CMRL 培地 (10%FBS 添加) のみの成績と比して培養成績が向上したと報告している (Zhang *et al.*, 1994)。今回の検討では、0.1% BSA 添加 KSOM にて受精卵を培養したが、培地選択が適切であったかは検討すべきであり、今後は種々の細胞との共培養を含め改良の余地があると思われる。3 つ目は、精子の問題である。ヨザルの精子の形態



や運動性は、Nakazato *et al.*(2015)が報告しているように不良であり、今回の実験に使用したヨザル精子も同様であった。ヒト生殖補助医療では精子所見の低下は、精子 DNA の fragmentation を増加させ (Benchaib *et al.*, 2003)、そのような精子を ICSI に使用することで受精率の低下 (Lopes *et al.*, 1998)、着床率の低下が起こることが報告されている (Muriel *et al.*, 2006) ことから、精子の選別も課題と言える。

本実験により、我々は ICSI によってヨザルの受精卵さらには分割胚の作出には成功したものの、得られた受精卵は胚盤胞までには至らなかった。ヨザルの IVF-ET の成功には、過排卵処理の確立、培養液・培養環境の改善、また良好精子の選別などの更なる検討が必要であろうと考えられる。

## 第 4 章

# ヒトにおける卵細胞質内精子注入法の 適用による胚作出とその改善

#### 4-1. 緒言

ヒトにおいて初めて ICSI を用いて受精卵の作出に成功したのは、1991年であるが (Ng *et al.*, 1991)、その受精卵は移植に用いるも妊娠には至らなかった。しかし、その翌年には Palermo ら (1992) が妊娠出産に成功している。それ以来、ICSI は男性不妊症を中心に用いられるようになり、今ではヒト生殖補助医療において必須の治療法となっている。ヒト生殖補助医療によく用いられている ICSI は、先端が尖ったインジェクションピペットを用いて、卵子に突き刺し物理的に透明帯を貫通させ、インジェクターで吸引圧をかけ、細胞膜を穿破する c-ICSI である。実験動物でも、Uehara ら (1976) が初めて、ハムスターを用いて哺乳類の受精に成功してから、しばらくは c-ICSI が用いられていた。しかし、Kimura と Yanagimachi (1995) がピエゾマイクロマニピュレーターを用いてマウスの産仔獲得に成功したことを報告すると、実験動物では瞬く間にピエゾ ICSI が用いられるようになったものの、ヒトでは初めて妊娠出産に成功した Palermo ら (1992) が c-ICSI であったことや翌年に Van Stirteghem ら (1993) が続けて c-ICSI を用いて高い受精率、着床率を報告したことで、長い間ヒトではピエゾ ICSI は用いられなかった。

しかし、近年ヒトにおいてもピエゾ ICSI の有用性が報告されている (Hiraoka *et al.*, 2013)。ヒトで初めてピエゾ ICSI の有用性を報告したのは Yanagida ら (1999) であるが、ピエゾ ICSI は c-ICSI に比べて ICSI 後の生存卵子率、受精率が改善したと報

告している（生存卵子率 81 vs 89%、受精率 54 vs 70%）。この時の報告では、ピエゾ ICSI を用いることで c-ICSI より高い生存卵子率、受精率ではあったが、値自体が満足できるものではなかった。近年、Hiraoka ら（2013）は、ピエゾ ICSI のインジェクションピペットのガラスの厚さを薄くすることで生存卵子率 99%、受精率 89%という高い値を報告している。

そこで、本章ではクリニックの ICSI の成績の改善を目的にピエゾ ICSI の導入を試み、その成績を検討した。

## 4-2. 対象と方法

### ・対象

2012～2014年に神奈川レディースクリニックを挙児希望にて受診し、生殖補助医療（ART）を受け ICSI を行い、インフォームドコンセントの得られた 1551 周期を対象とし、後方視的に検討を行った。なお、ICSI は 12 名の培養士によって施行された。

### ・採卵

以下の処理は全て医師により行われた。GnRH アゴニスト法、もしくは GnRH アンタゴニスト法を用いて卵巣刺激を行い、主席卵胞径が 18mm を超えた時点で trigger として hCG5,000～10,000IU、もしくは GnRH アゴニスト 150～300 $\mu$ g を投与し、35～36 時間後に採卵を行った。採卵は、プロポフォールによる静脈麻酔もしくは、膣壁へのキシロカインスプレーの塗布による局所麻酔を行い、患者の疼痛を軽減した。19G 採卵針を用い、卵胞を穿刺し、卵胞液ごと吸引回収した。胚培養士が、回収された卵胞液を 100mm dish に薄く広げ実体顕微鏡下で COC を探し、Gamete buffer（COOK）内にパスツールを用いて回収した（図 3-1）。

### ・採精

夫に院内、もしくは自宅にて用手的に採精を依頼した。

### ・運動良好精子の回収（Swim up 法）

採精された精液は、30分以上液状化させのち精液検査を行い、3~5mlのGamete bufferを加えて希釈し、洗浄濃縮（1800rpm、10分）。上清を除去し、攪拌後、2mlのGamete bufferを重層し、インキュベーター内（37℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>）で静置した。30~40分間後、運動良好精子が移動した培養液を回収し、洗浄濃縮し、調整精子浮遊液とした。

#### ・ 裸化处理

裸化处理をスムーズに行うため、あらかじめ内径の異なるパストールピペットを準備した。5インチの滅菌済みパストールピペットの先端から数cmの部分をガスバーナーで炙り軟化させた直後に左右に引き、パストールに本体部分と先端部分を切り離した。切り離した先端部分で本体部分の適当な内径を有した先端に軽く傷を付け、その傷より少し先端よりの部分に切り離した先端部分を押し当てパストールピペット本体を適当な内径で折り作製した。内径が130μm、150μm、200μm、300μm前後の4種類と先端をファイヤーポリッシュしただけの合計5本のパストールピペットを準備した（図3-2）。

Center well dish（353037, FALCON）2枚を準備し、1枚には中心に0.5mlの80IUのリコンビナントヒアルロニダーゼ（ICSI Cumulase、オリジオ）に0.5mlのGamete bufferを加えて40IUとし、周りには3mlのGamete bufferを入れ洗浄用とした。他方には、中心に1mlのGamete bufferを入れ、最終的な裸化处理用とした（図3-3）。卵丘細胞が絡まないようにファイヤ

ーポリッシュしたパスツールピペットを用いて 40IU リコンビナントヒアルロニダーゼ中で 30 秒程度ピペッティングを繰り返し、卵丘細胞を除去した。300  $\mu$  m のパスツールピペットに替えて、リコンビナントヒアルロニダーゼから卵子を取り出し、周りの Gamete buffer で数回ピペッティングすることで洗浄し、裸化処理用の dish に移した。200  $\mu$  m もしくは 150  $\mu$  m のパスツールピペットに替えてピペッティングすることで、卵子の周囲にタイトに付着している卵丘細胞（放射冠細胞）を除去した。どうしても裸化がスムーズに行えない場合は 130  $\mu$  m のパスツールピペットを使用し、慎重に卵丘細胞を除去した。卵丘細胞を除去した卵子の囲卵腔内に放出された第 1 極体が有るものを成熟卵と判定した。

#### ・卵細胞質内精子注入法

##### **c-ICSI**

倒立顕微鏡（IX-71 オリンパス）にマイクロマニピュレーター（ナリシゲ）を取り付け、使用した。精子を注入するためのインジェクションピペット（TIP-30-6、TPC）は外径 6-7  $\mu$  m、内径 4-5  $\mu$  m、卵子を保持するためのホールディングピペット（MT-HD30、北里バイオファルマ）は外径 100  $\mu$  m のものを使用した。ピペットをピペットホルダーに装着する前にジョイスティックの全てのダイヤルを中央に合わせ、XYZ 軸全ての方法に対して駆動域を最大限に設定した（図 3-4）。

ホールディングピペットのセッティングは、第 2 章、第 2 項

「ICSI」と同様に行った。

インジェクションのピペットホルダーのホルダーキャップを外し、中にあるシリコンパッキンに破損等の異常がないかを確認した。シリコンパッキンに異常があるとインジェクターからピペット内の密閉性が保てず、常に陰圧がることから適切な精子の操作が困難になる場合があり、重要な確認事項である。ピペットホルダーのホルダーキャップを軽く締め、インジェクションピペットを根元からピペットホルダーに挿入していく。インジェクションピペットは、シリコンパッキンを超える部分まで挿入し、ホルダーキャップをしっかりと締める。ホールディングピペット、インジェクションピペットのそれぞれのピペットホルダーをマニピュレーターに装着し、倒立顕微鏡の視野内にそれぞれのピペットが平行になるように固定した。

ICSI用 dish は、50mm dish (351006、FALCON) を用いて作製した。Gamete buffer を用いて卵子用として  $20\mu\text{l}$ 、卵子洗浄用として  $10\mu\text{l}$  のドロップを作製、3.5% PVP 溶液を用いて精子用として  $20\mu\text{l}$ 、ピペット準備用として  $10\mu\text{l}$  のドロップを作製した。ドロップを作製したのち、 $37^\circ\text{C}$  に温められたミネラルオイル (Vitrolife) にてカバーした (図 3-5)。準備した ICSI 用 dish の精子用ドロップに精子懸濁液を適量加え、卵子用ドロップにヒト卵子を移し ICSI 用 dish の完成とした。

顕微授精に用いる精子の選別は慎重に行った。精子用ドロップの際を泳ぎながら進んでいる精子の中から形態的に良好なものを選別した。きれいな卵型の頭部を有しており、運動性がより良



い精子を選別した。見つけた良好運動精子をインジェクションピペットにて上から押さえ、ピペットを左右に動かすことで不動化を行った。不動化を行った精子をインジェクションピペット内へ吸引、保持しておき、卵子用ドロップへと移動した。

卵子は、第1極体を12時方向になるように、もしくは6時方向になおかつできる限り囲卵腔が広い部分が3時方向になるようにホールディングピペットにて固定した(図3-6)。精子をインジェクションピペットの先端へ移動し、インジェクションピペットを3時方向から侵入させ、透明帯を貫通させた。透明帯を貫通させた際に卵細胞膜が破れた場合は、そのまま精子を注入し、インジェクションピペットを抜去した。卵細胞膜が破れなかった場合は、卵細胞質内の3/2~5/4程度まで進入させ、インジェクターを用いて卵細胞質を吸引し卵細胞膜を穿破した。その後、吸引した細胞質とともにゆっくりと精子を卵細胞質内へ注入し、インジェクションピペットを抜去した(図3-7)。ICSI施行後、750 $\mu$ lのGlobal total medium (Life Global)にて培養した(37 $^{\circ}$ C、6% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、89% N<sub>2</sub>)。

### ピエゾ ICSI

倒立顕微鏡 (IX-71 オリンパス) にマイクロマニピュレーター (ナリシゲ) を取り付け、ピエゾマイクロマニピュレーターシステム (PMM4G、プライムテック) を用いて ICSI を行った。インジェクションのピペットホルダーには、ドライブユニット (MB-D、プライムテック) を接続し使用した。精子を注入する

ためのインジェクションピペット（PINU06-20FT、プライムテック）は外径  $6-7\mu\text{m}$ 、内径  $4-5\mu\text{m}$ 、先端部が平らであり、卵子を保持するためのホールディングピペット（MT-HD30、北里バイオファルマ）は外径  $100\mu\text{m}$  のものを使用した。ピペットをピペットホルダーに装着する前にジョイスティックの全てのダイヤルを中央に合わせ、XYZ 軸全ての方法に対して駆動域を最大限に設定した。

ホールディングピペット、インジェクションピペットのセッティングは、第 2 章、第 2 項「ICSI」と同様に行った。

ICSI 用 dish は、50mm dish（351006、FALCON）、もしくは ICSI dish（Vitrolife）を用いて作製した。卵子用として  $20\mu\text{l}$  の Gamete buffer ドロップを作製、精子用として 3.5% PVP 溶液を用いてドロップを作製した。ドロップを作製したのち、 $37^{\circ}\text{C}$  に温められたミネラルオイルにてカバーした（図 3-5）。準備した ICSI 用 dish の精子用ドロップに精子懸濁液を適量加え、卵子用ドロップにヒト卵子を移し ICSI 用 dish の完成とした。

顕微授精に用いる精子の選別は慎重に行った。精子用ドロップの際を泳ぎながら進んでいる精子の中から形態的に良好なものを選別した。きれいな卵型の頭部を有しており、運動性がより良い精子を選別した。見つけた良好運動精子をインジェクションピペットにて尾部から吸引し、 $2/3$  程度吸引したところでインジェクションピペットを少し進めて精子をくの字にし、ピエゾパルス（speed: 2, intensity: 2）にて不動化を行った。不動化を行った精子をインジェクションピペット内へ吸引、保持しておき、卵子

用ドロップへと移動した。

卵子は、第1極体を12時方向になるように、もしくは6時方向になおかつできる限り囲卵腔が広い部分が3時方向になるようにホールディングピペットにて固定した。インジェクションピペットを3時方向から押し当て、透明帯をピエゾパルス (speed: 2, intensity: 2) にて貫通させた。精子をインジェクションピペットの先端へ移動し、卵細胞質内の  $3/2 \sim 5/4$  程度まで進入させ、1回のピエゾパルス (speed: 1, intensity: 1) にて卵細胞膜を穿破した。その後、ゆっくりと精子を卵細胞質内へ注入し、インジェクションピペットを抜去した (図 3-8)。ICSI 施行後、前日から作製し予め平衡化していた  $750 \mu\text{l}$  の Global total (Life Global) に  $250 \mu\text{l}$  のオイルカバーをして受精確認用の 5 well dish (MTG) にて培養した ( $37^\circ\text{C}$ 、 $6\% \text{CO}_2$ 、 $5\% \text{O}_2$ 、 $89\% \text{N}_2$ )。

#### ・受精の確認と胚培養

ICSI 17~19 時間後、実体顕微鏡下で囲卵腔への第2極体の放出と卵細胞質内への前核の形成を観察し、受精の確認を行った。

得られた受精卵は、新たな  $700 \mu\text{l}$  の Global total medium (Life Global) にて培養を継続し ( $37^\circ\text{C}$ 、 $6\% \text{CO}_2$ 、 $5\% \text{O}_2$ 、 $89\% \text{N}_2$ )、受精後3日目 (Day3)、5日目 (Day5) の分割、胚発育の状況を顕微鏡下で確認した。Day3 胚は Veeck の分類 (図 3-9) を用いて (Veeck, 1991)、Day5 の胚盤胞は Gardner 分類 (図 3-10) を用いてグレーディングを行った (Trounson *et al.*, 1999)。Day3 胚は Veeck 分類 8 細胞期グレード 2 以上を、Day5 胚盤胞は

Gardner 分類 3BB 以上を良好胚盤胞と判定した。c-ICSI とピエゾ ICSI、ICSI 施行後のそれぞれの生存卵子率、受精率、Day3 良好胚率、Day5 胚盤胞率、Day5 良好胚盤胞率を算出し、その成績を比較検討した。

・統計処理

得られた結果の統計的評価は、カイ 2 乗検定により行い、有意水準 1%として判定した。



図 3-1. 回収されたヒト COC

Bar は、5mm

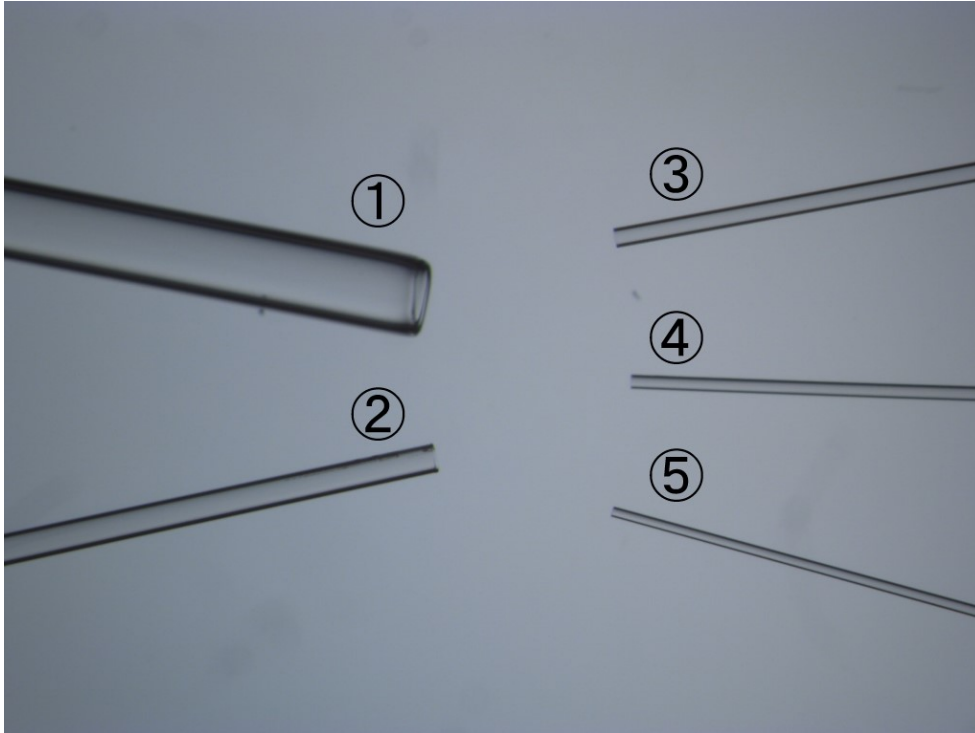


図 3-2. 準備した 5 本のピペット

- ① ファイヤーポリッシュのみのパスツールピペット
- ②  $300 \mu\text{m}$
- ③  $200 \mu\text{m}$
- ④  $150 \mu\text{m}$
- ⑤  $130 \mu\text{m}$

- ① リコンビナントヒアルロニダーゼ 40IU  
(ICSI Cumulase : MediCult社)
- ② Gamate buffer  
(Cook社)

- ① ヒアルロニダーゼ処理
- ② 洗浄
- ③ 裸化

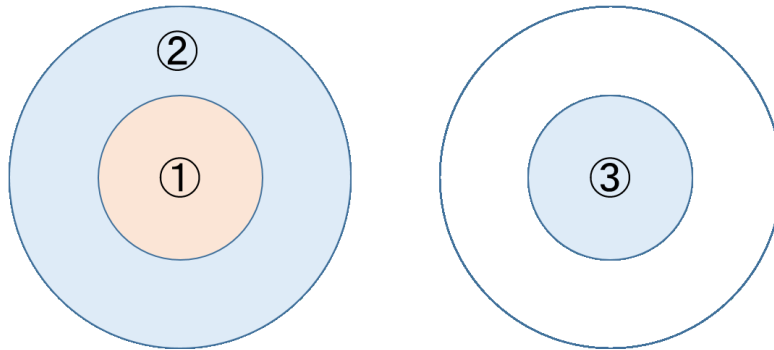


図 3-3. ヒアルロニダーゼ処理の dish の準備と手順

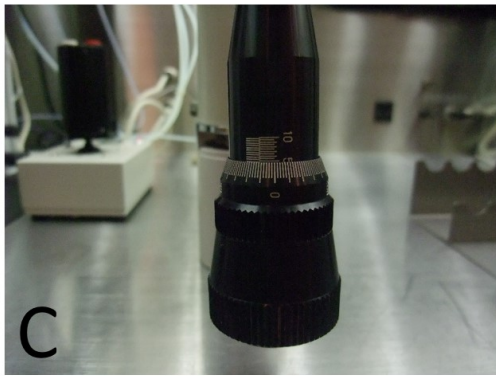
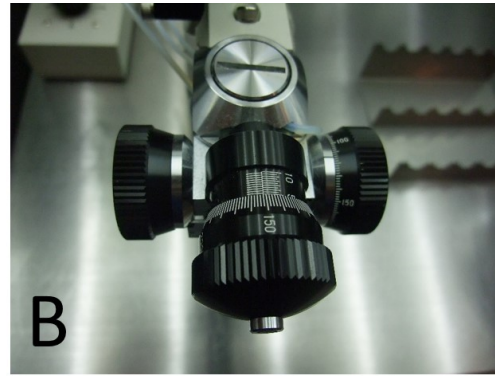
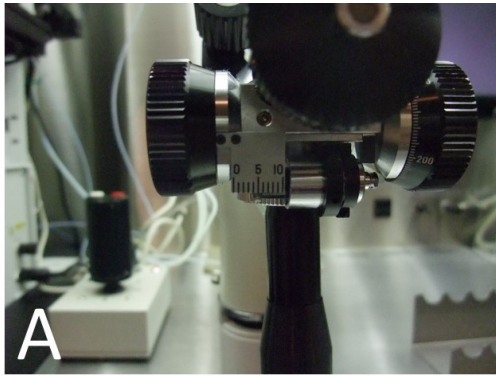


図 3-4. マイクロマニピュレーターの各軸のダイヤル

- A. X 軸ダイヤル
- B. Y 軸ダイヤル
- C. Z 軸ダイヤル



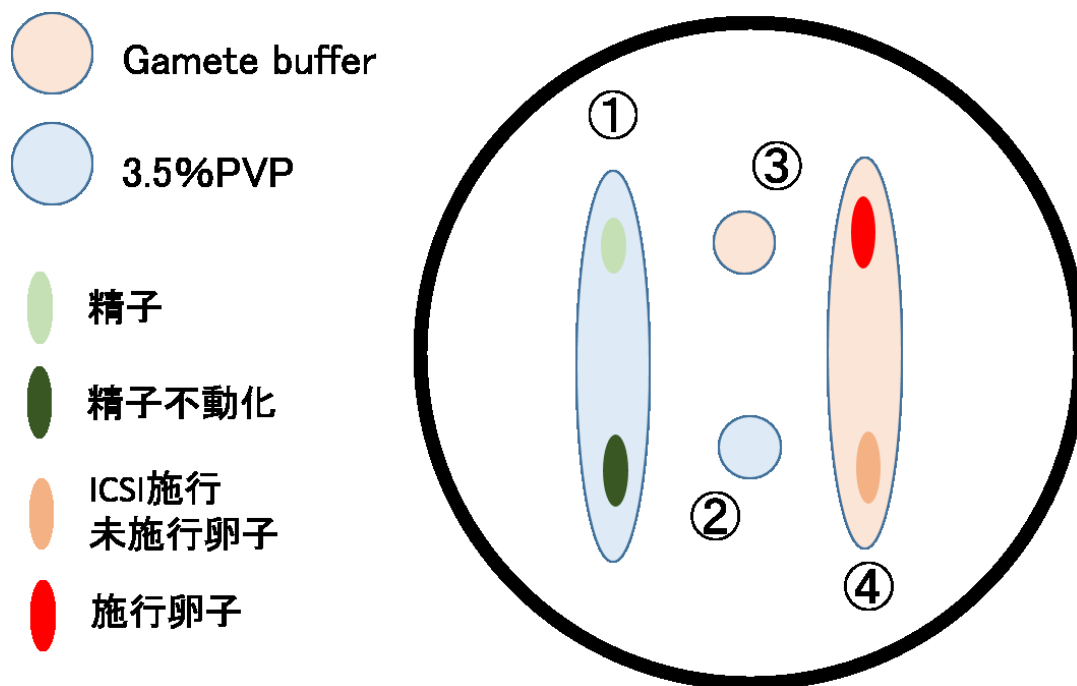


図 3-5 作製した ICSI dish

- ① 精子用ドロップ
- ② ピペット準備用ドロップ
- ③ 卵子洗浄用ドロップ
- ④ 卵子用ドロップ

各ドロップを作製した後、37℃に温められたミネラルオイルにてカバーした。

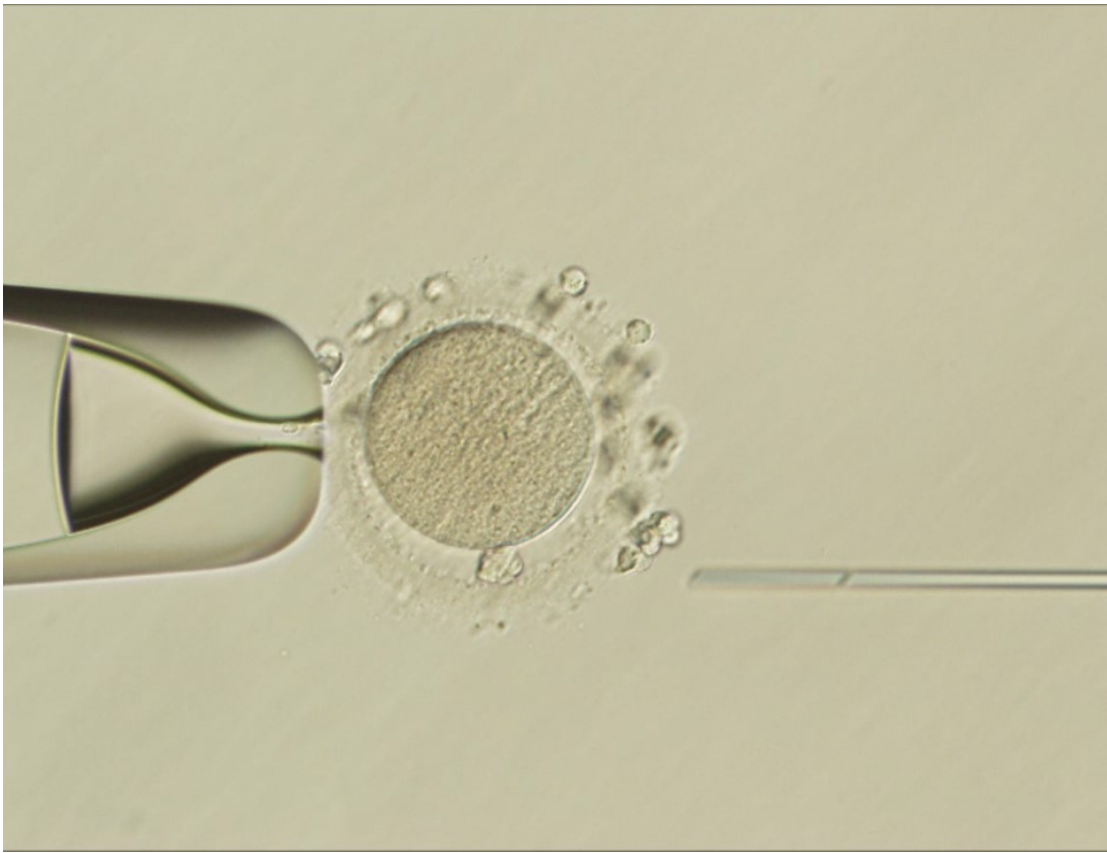


図 3-6. 卵子の固定

極体を 6 時もしくは 12 時方向に、なおかつ 3 時方向にできるだけ囲卵腔が広い部分に来るようにホールディングピペットに固定した。

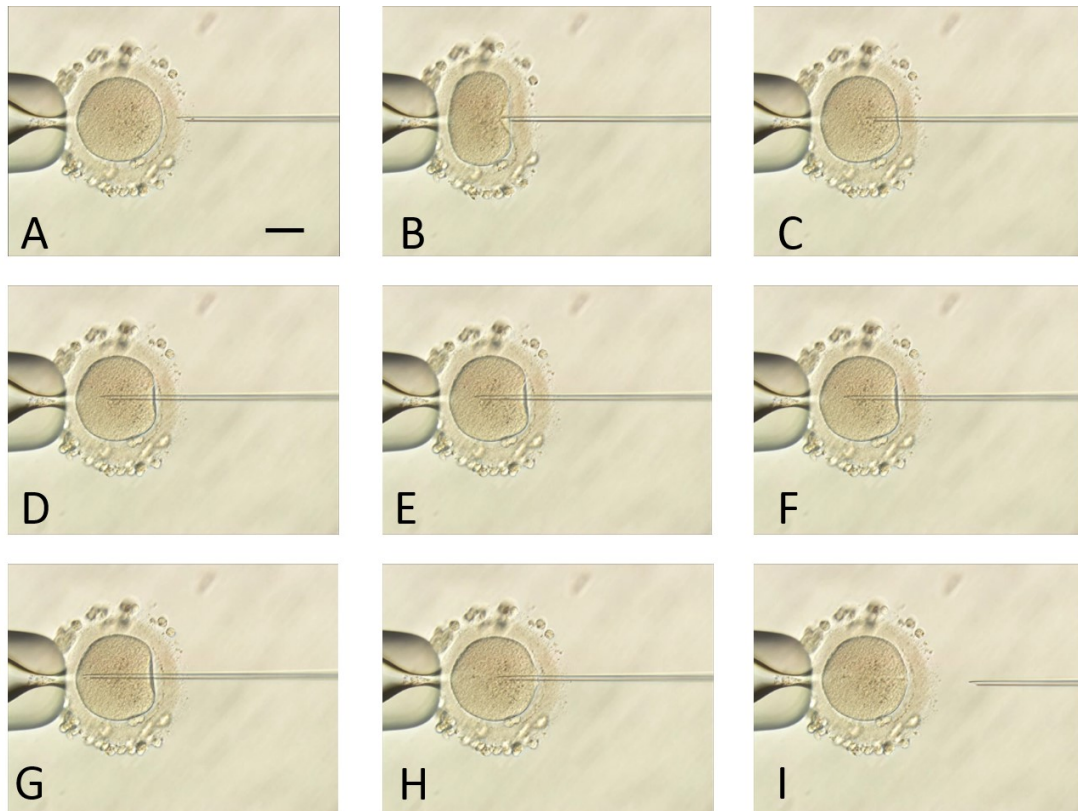


図 3-7. c-ICSI の連続写真

- (A) 卵子を固定し、精子をピペットの先端へ移動させる
- (B) 3時方向からピペットを押し進める
- (C) 透明帯が破ける
- (D) さらに奥に押し進める
- (E) 吸引圧をかけ、細胞膜を細胞質ごと吸引する
- (F) 細胞膜が破れる
- (G) ピペットをわずかに奥に進め、精子を注入する
- (H) ピペットをゆっくりと抜去する
- (I) 終了

Bar は、50  $\mu$  m

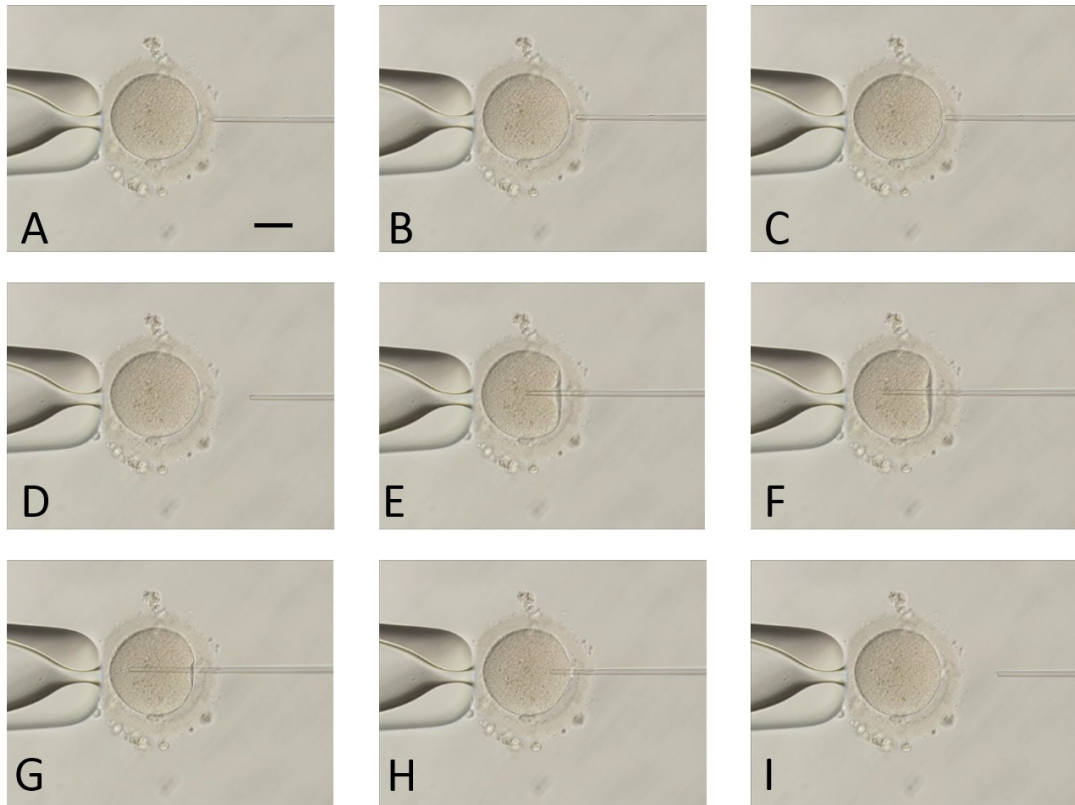


図 3-8. ピエゾ ICSI の連続写真

- (A) 卵子を固定し、3時方向からピペットを押し当てる
- (B) ピエゾパルスにて透明帯に穴を開ける
- (C) 透明帯を貫通
- (D) 精子をピペットの先端へ移動させる
- (E) ピペットを細胞質内へ押し進める
- (F) ピエゾパルスにて破膜させる
- (G) 精子を注入する
- (H) ピペットをゆっくりと抜去する
- (I) 終了

Bar は、50  $\mu$  m

- G1 : 割球が等分割で、フラグメントがなし  
 G2 : 割球が等分割で、フラグメントが 20% 以内  
 G3 : 割球が不等分割で、フラグメントがなし  
 G4 : フラグメントが20 - 50% 以内 (割球の分割状態が判別できる程度)  
 G5 : フラグメントが50% 以上 (フラグメントで割球の分割状態が判別出来ない)

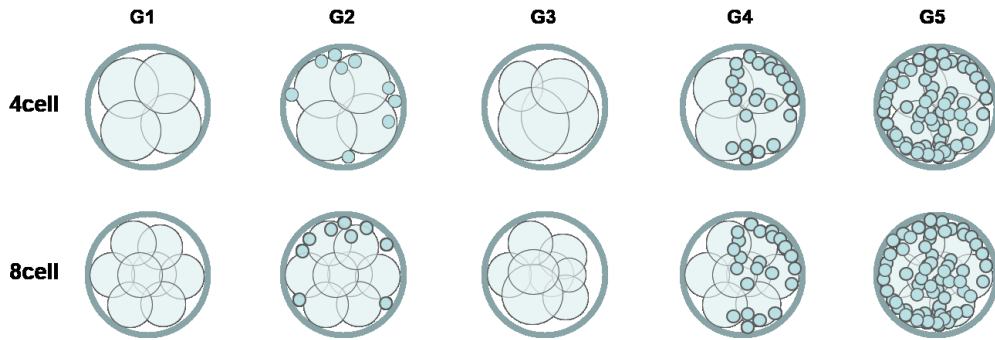


図 3-9. 4細胞期と8細胞における Veeck 分類の模式図

胚盤胞の評価 (Gardner分類による)

BL-1: 胞胚腔が50%未満の初期胚盤胞

BL-2: 胞胚腔が50%以上の胚盤胞

BL-3: 胞胚腔が全体に広がった胚盤胞

BL-4: 胞胚腔が拡大し透明帯が薄くなった拡張期胚盤胞

BL-5: 透明帯より栄養外胚葉が脱出している胚盤胞

BL-6: 透明帯より栄養外胚葉が完全に脱出した胚盤胞

内細胞塊(ICM; 胎児になる細胞塊)の評価

A: 細胞数が多く密である

B: 細胞数が数個で疎である

C: 細胞数が非常に少ない

栄養外胚葉(TE; 胎盤になる細胞塊)の評価

A: 細胞数が多く密である

B: 細胞数が数個で疎である

C: 細胞数が非常に少ない

BL-●●●●  
 ● 胚盤胞ステージ  
 ● 内細胞塊の評価  
 ● 栄養外胚葉の評価



図 3-10 Gardner 分類と拡張胚盤胞 (BL-3) における模式図

#### 4 - 3 . 結果

c-ICSI、ピエゾ ICSI いずれの方法においても、受精卵を得ることは可能であり、得られた受精卵については形態的な差異は認められなかった（図 3-11）。c-ICSI は、735 周期 3497 個の成熟卵子に対して行い、生存卵子率は 91.7% (3209/3497)、ICSI 施行卵子あたりの受精率は 66.2% (2315/3497)、生存卵子あたりの受精率は 72.1% (2315/3209) であった。ピエゾ ICSI は、816 周期 3556 個の成熟卵子に対して行い、生存卵子率は 96.3% (3355/3556)、ICSI 施行卵子あたりの受精率は 72.6% (2582/3556)、生存卵子あたりの受精率は 77.0% (2582/3355) であった。生存卵子率、ICSI 施行卵子あたりの受精率、生存卵子あたりの受精率においてピエゾ ICSI は、c-ICSI に比して有意に高い値を示した（表 3-1）。

受精後の胚発育では c-ICSI は、Day3 良好胚率 44.4% (1028/2315)、Day5 胚盤胞率 45.2% (917/2030)、Day5 良好胚盤胞率 29.2% (593/2030) であった。ピエゾ ICSI は、Day3 良好胚率 50.7% (1290/2542)、Day5 胚盤胞率 45.5% (1034/2272)、Day5 良好胚盤胞率 29.3% (666/2272) であった。Day3 以降の胚発育については、有意な差は認められなかった（表 3-1）。

表 3-1. c-ICSI とピエゾ ICSI の受精確認時の成績

	c-ICSI	ピエゾ ICSI
治療周期数	735	816
ICSI 施行卵子数	3497	3556
生存卵子率 (%)	91.7 <sup>a</sup> (3209/3497)	96.3 <sup>b</sup> (3355/3556)
受精率 (%、施行卵子 あたり)	66.2 <sup>a</sup> (2315/3497)	72.6 <sup>b</sup> (2582/3556)
受精率 (%、生存卵子 あたり)	72.1 <sup>a</sup> (2315/3209)	77.0 <sup>b</sup> (2582/3355)
Day 3 良好胚率	44.4 (1028/2315)	50.7 (1290/2542)
Day 5 胚盤胞率	45.2 (917/2030)	45.5 (1034/2272)
Day 5 良好胚盤胞率	29.2 (593/2030)	29.3 (666/2272)

a,b : 同行異符号間に有意差あり ( $P < 0.01$ )



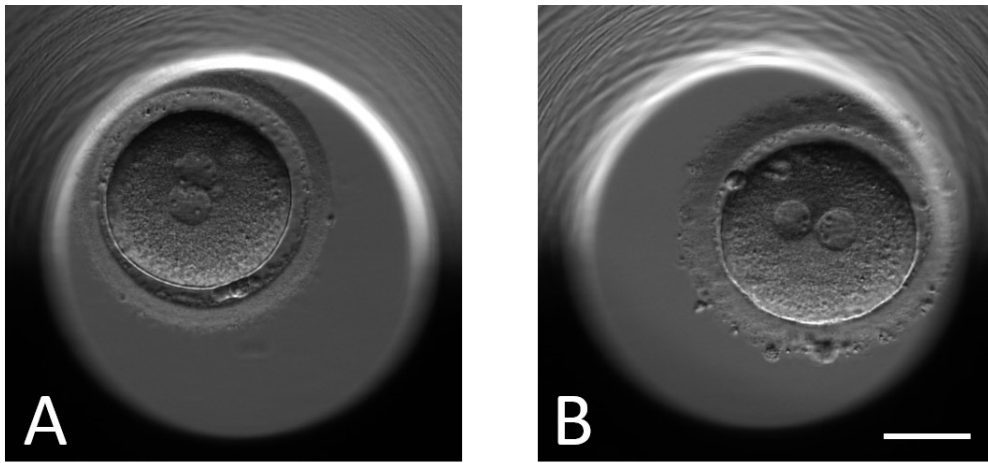


図 3-11. C-ICSI とピエゾ ICSI によって得られた受精卵

c-ICSI によって得られた受精卵 (A) とピエゾ ICSI によって得られた受精卵 (B)。c-ICSI とピエゾ ICSI によって形態的な違いは、認められなかった。

Bar は、50  $\mu$  m

#### 4-4. 考察

本検討によりヒト卵子においても c-ICSI に比べてピエゾ ICSI は有意に成績が改善した（生存卵子率 91.7 vs 96.3、受精率 66.2 vs 72.6）。これは、Hiraoka ら（2013）と同様の結果であり、彼らは c-ICSI は膜穿破時にピペット内へ細胞質を吸引するため細胞膜穿破面積が大きくなり、卵子への物理的なダメージが増大し、結果変性率が高くなったと推測している。また、ピエゾ ICSI ではインジェクションピペット先端の透明帯貫通時に卵子が変形しないことも卵子へのダメージを減少させた要因と述べている。卵子へのより非侵襲的な ICSI を実現できたことが ICSI 後の変性率を低下させ、ICSI 施行卵子あたりの受精率の改善につながったと考えられる。しかし、合わせて生存卵子あたりの受精率も改善しており（72.1% vs 77.0%）、これは単純に生存性を向上させただけでなく、何か別の要因も含まれることを示唆している。c-ICSI では、しばしば精子の注入の際に吸引した細胞膜と精子が纏わりつき、細胞質内へ注入しにくいことがあり、c-ICSI の不受精の原因の一つに精子を注入したつもりでも、実際には精子が注入できておらず精子が囲卵腔へ排出されているケースが知られている。このことを合わせて考えると、ピエゾ ICSI は細胞膜の穿破時にピエゾパルスによりきれいな円形の穴が開くことで、より確実な精子の注入が可能になっているのではないかと考えられた。

受精後の胚発育については良好胚発育には差を認めておらず（Yanagida *et al.*, 1999; Hiraoka *et al.*, 2013）、これも本検討

と同様の結果であった。このことからピエゾ ICSI は、ICSI 施行後の変性率を下げ、同時に受精率を向上させ、胚発育は c-ICSI と同等の成績が得られる有用な方法であることが示された。

# 第 5 章

## 総合考察

ICSI は、雄性生殖細胞を顕微操作により人為的に卵子内へ注入し、受精させる方法である。体外受精と異なり、精子の運動性は必須ではないことから、不動精子や未熟な精子、変態前の精子細胞でも受精が可能である。今回使用したヨザルは、精子性状が不良であることが報告されており (Nakazato *et al.*, 2015)、体外受精での胚の作出は困難であると考えられ、ICSI を用いることとした。しかし、ヨザルはアカゲザルなどのように有効な卵巣刺激法 (Hewitson *et al.*, 1998; Nusser *et al.*, 2001) が確立されておらず、ICSI を行う成熟卵子を数多く得ることは難しく、精子の性状がかなり不良であることを考慮すると、ヨザル精子の卵子活性化能が低いことも考えられ、ヨザル卵子とヨザル精子を用いた ICSI はかなり不確実な実験であることが懸念された。そこで、少しでも事前に情報を得るために、マウス卵子へヨザル精子を用いて ICSI を行うことでヨザル精子の卵活性化能を調べることにした。マウス卵子は、異種精子を注入しても活性化し前核を形成することが知られている (Kimura *et al.*, 1995; Yazawa *et al.*, 2000)。また、Kimura ら (1995) の報告では、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いたピエゾ ICSI では、精子を注入しない疑似注入での活性化率は 4.6% (62/63) であり、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いない c-ICSI では 20.0% (4/20)

(Rybouchkin *et al.*, 1995) であり、これらのことから精子の卵活性化能を調べるには、ピエゾ ICSI 用いることが適していると考えられた。ヨザル精子とマウス卵子を用いた ICSI を合計 7 回、計 215 個に対して行い、生存卵子率 60.5% (130/215) とやや低

い値であった。これは、マウス卵子への顕微注入の難しさに不慣れな点が、1番の要因であった。しかし、生存卵子あたりの前核形成率は91.5% (119/130) と高率であったことから、ヨザル精子は十分な卵活性化能を有していることが示された。

また、異種精子を用いたマウス卵子へのICSIは、精子の染色体分析にも用いられている (Rybouchkin *et al*, 1995; Lee *et al*, 1996; Araki *et al*, 1999; Ogawa *et al*, 2000)。今回得られた前核期胚からヨザル精子染色体が分析可能な染色体標本の作製に成功した。

ヨザル精子に卵活性化能があることが確かめられたことにより、ヨザル胚の作出を目的としてヨザル卵子、精子を用いてICSIを行った。採卵の結果、14個のCOCを回収でき、IVMを行うことで2個の成熟卵子を得た。ヨザル卵子を用いたICSIは初めてであり、念のため未熟卵子も含め9個にICSIを行ったが、ICSI後17.5時間の観察より、成熟卵の2個のみが受精していた。1個は、すでに2細胞期へ分割しており、もう一つは第2極体のみの確認であったが、その後前核を形成することなく2細胞期へ分割したことから、2個ともすでに前核が消失していたものと考えられた。その後、ICSI後48時間で4細胞と5細胞、66時間で6細胞と8細胞、98時間では両方とも10細胞、114時間では幾つかの割球にコンパクションが認められたが、その後の発育は停止し138時間で培養を終了した。今回の検討では、胚盤胞には発育しなかったが、得られた2個の成熟卵から2個(100%)の受精卵を得ることができ、その後胚発育も認められた。

胚盤胞への発育が認められなかった原因として、いくつか考えられる。まず、ヨザルでは卵巢刺激が確立されておらず、成熟卵子を数多く得ることが難しいことである。これは、適切な卵巢刺激の確立、もしくは効率のよい体外成熟培養の確立が望まれる。2つ目には、培養液の問題である。Zhangら（1994）は、アカゲザルでは、CMRL培地（10%FBS添加）と比較してBRL細胞との共培養によって培養成績が向上したと報告している。共培養も含めて適切な培養液の開発が必要であろう。最後は、精子の質の問題である。ヒト生殖医療では、精子所見低下は精子DNAのfragmentationの増加（Benchaib *et al.*, 2003）、引いては受精率の低下（Lopes *et al.*, 1998）、着床率の低下（Muriel *et al.*, 2006）を引き起こすことが報告されている。

このようにヨザルのIVF-ETの成功には、いまだ幾つかの課題は残されてはいるものの、ICSIによってヨザルの受精卵の作出に成功した。ヨザル卵子を用いたICSIは、初めてであったにも関わらず、受精卵を得ることに成功したのは、ヨザル卵子がMatsumotoら（2015）の報告と同様にヒト卵子と形態的に類似したこと、さらにはICSI時にインジェクションピペットを細胞質へ刺した際の細胞膜の伸展性なども非常によく似ており、術者が不妊治療におけるヒトICSIを3,000件以上行っている熟練者であったことも一因であったと考えられる。ヨザル卵子のヒト卵子との類似性、ヨザル精子が性状不良であり、まさにヒトにおけるICSIの適応（男性不妊症）と同じであることから、ヨザルのヒト不妊モデル動物としての、可能性を見出せた検討であった。

ヒト生殖医療の様々な手法は、実験動物や前述したサルなどのヒトモデル動物からの知見によるところが大いに存在する。特に ICSI などの発生工学の技術的手法を取り入れたものはなおさらである。ICSI によって初めて受精卵の作出に成功したのは 1976 年にハムスター卵子を用いた Uehara らの報告であったが、この時に用いられた ICSI は、先端が鋭利なインジェクションピペットを用いた c-ICSI であった。その後は、c-ICSI によってウサギやウシなどで産仔の獲得に成功している。しかし、実験動物の中心でもあったマウスにおいては、c-ICSI は施行後の生存性が低値であり、良好な結果は得られなかった。しかし、Kimura ら (1995) は、ピエゾマイクロマニピュレーターを用いたピエゾ ICSI によりマウスにおいて産仔が得られたことを報告し、大きなインパクトを与えた。この報告をきっかけに、実験動物ではピエゾ ICSI が、急速に広がった。しかし、ヒトにおいては初めて妊娠出産に成功した Palermo ら (1992) が c-ICSI であったことで、ピエゾ ICSI 導入は時間を要した。しかし、近年ヒトにおけるピエゾ ICSI の有用性も報告されている (Hiraoka *et al.*, 2013)。そこで ICSI の成績の向上を図るため、ピエゾ ICSI を導入し、c-ICSI と比較検討を行った。その結果、c-ICSI に比べてピエゾ ICSI は有意に成績が改善することが認められた (生存卵子率 91.7 vs 96.3、受精率 66.2 vs 72.6)。また、生存卵子あたりの受精率も向上していることから (72.1% vs 77.0%)、ピエゾ ICSI は、c-ICSI に比べて非侵襲的で、より精子の確実な注入が可能な ICSI であることが示唆された。また、D3 良好胚率などの胚発育



に関して差は認められなかったことから、胚発育は同等であり、なおかつ生存卵子率、受精率は改善させることができる、有用な方法であることが示された。

## 第 6 章

### 総括

哺乳動物における生殖工学の発展は著しく、体外受精、顕微授精、胚移植などの技術はヒト生殖補助医療へも応用されている。その結果、子孫を残すことが困難とされてきた男性不妊患者においても顕微授精の適用で挙児が可能となった。しかし、顕微授精についてはまだ技術的な改善の必要性がある。

そこで本研究では、哺乳類とくに新世界ザルの 1 種であるヨザルにおける卵細胞質内精子注入法 (ICSI) を用いた胚の作出、またヒトにおいてはピエゾマイクロマニピュレーターを用いたピエゾ ICSI の有用性について検討した。

第 1 章では、「緒論」として本研究の背景と意義について論じた。

第 2 章では、「マウス卵子へのヨザル精子の卵細胞質内精子注入による卵活性化能の確認とヨザル精子染色体標本の作製」として、ヨザル胚作出のためヨザル精子の卵活性化能の有無を調べるとともにヨザル精子染色体の染色体標本の作製を試みた。

ヨザルという貴重な実験動物を使用するという事、成熟卵子が数多く取れない可能性が高いこと、ヨザル精子はその性状から卵子活性化能がない、もしくは不十分である可能性が考えられることから、できうる限り確実に受精卵を得ることができるよう、異種精子でも前核形成が確認されているマウス卵子へのヨザル精子の ICSI を行った。合計 7 回の実験を行い、マウス 22 匹から採卵を行い 342 個の卵子を回収した。そのうち第 1 極体の放出を

確認できた 215 個の成熟卵に ICSI を行った。その結果、130 個 (60.5%) が生存し、119 個 (55.3%) に前核の形成を認めた。ICSI 後の生存卵子率が 60.5% であり、約 4 割が ICSI 後に変性をしており、その結果前核形成率は 55.3% と低い値であったが、生存卵子あたりでの前核形成率は 91.5% (119/130) であった。また、ICSI 時に細胞膜を穿破する際、はじめはインジェクションピペットを卵子の 2/3 程度まで進入させたところでピエゾパルスにて破膜を行っていたが、4 回目以降からは 4/5 程度進入させて破膜を行うように変更した結果、生存卵子率が有意に上昇した (27.6% vs 72.6%)。生存卵子あたりの前核形成率が 91.5% と高率であったことから、ヨザル精子は卵活性化能を有することが確認できた。また、得られた前核期胚を用いて、染色体標本作製した。その結果、ヨザル精子染色体が分析可能な染色体標本作製に成功した。

第 3 章では、「ヨザル卵子への卵細胞質内精子注入による胚作出」として、ヨザル卵子とヨザル精子を用いて ICSI を行い、ヨザル胚の作出を試みた。

ヨザルは卵巣刺激が確立されていないことから、性周期を何もコントロールすることなく採卵を行った。両卵巣から 14 個の COC を回収した。卵丘細胞の付着状態が良好なものから 3 段階に分類し、excellent 3 個、good 4 個、poor 7 個を得て、25 時間の体外成熟培養を行った。卵子の成熟確認のため 0.1% ヒアルロニダーゼ処理にて卵丘細胞の除去をおこなった結果、excellent COC 3

個からは 1 個 (33.3%)、Good COC 4 個からは 1 個 (25.0%) の成熟卵子が得られた。Poor COC からは、成熟卵子が得られなかった。得られた 2 個の成熟卵子は、形態的にはヒト成熟卵子と類似していた。ヨザル卵子を用いた ICSI は、今回が初めてであり練習の意味も含めて念のため成熟卵子 2 個の他に未熟卵子 7 個にも ICSI を行った。成熟卵子 2 個に ICSI を施行した結果、2 個とも生存 (100%) し、未熟卵子 7 個に ICSI した結果、5 個が生存 (71.4%) した。また、ICSI を行った際、インジェクションピペットを卵子内 2/3 程度まで進入させても卵細胞膜は、破けることなく伸展し、その伸展性はヒト卵子やマウス卵子と同等であり、卵細胞膜の破れる様子も似ていた。ヨザル卵子は、形態のみならず ICSI 時の卵子の変化もヒト卵子やマウス卵と類似していた。顕微授精の後、17.5 時間に第 2 極体の放出により受精の確認を行った。excellent COC 由来の 1 個では 2 細胞期に達しており、good COC 由来 1 個は、前核は確認できなかったが第 2 極体の放出が確認され、2 個 (100%) とも受精していた。未熟卵子からは、受精卵は得られなかった。ICSI 後 30.5 時間には、1 個は 3 細胞期 (不等分割) へ、もう 1 個は 2 細胞期への分裂が確認された。継続培養の結果、ICSI 後 48 時間には各々 4 細胞期と 5 細胞期、66 時間では 6 細胞期と 8 細胞期、98 時間では 2 個とも 10 細胞期、114 時間では両方とも部分的に細胞の融合を認めたものの、それ以降の発育は停止し ICSI 後 138 時間で培養を終了した。

第4章では、「ヒトにおける卵細胞質内精子注入法の適用による胚作出とその改善」として、ヒト不妊治療における ICSI の成績向上のためピエゾ ICSI を試み、従来から行われている通常の ICSI との比較検討を行うことで、その有用性を検討した。

インフォームドコンセントの得られた ICSI 適応の患者に対してピエゾ ICSI を施行し、c-ICSI と生存卵子率、受精率、胚発育を比較することでその有用性を検討した。受精の結果は、通常の ICSI を 735 周期 3497 個の卵子に対して行い、生存卵子率は 91.7% (3209/3497)、ICSI 施行卵子あたりの受精率は 66.2% (2315/3497)、生存卵子あたりの受精率は 72.1% (2315/3209) であった。ピエゾ ICSI は、816 周期 3556 個の成熟卵子に対して行い、生存卵子率は 96.3% (3355/3556)、ICSI 施行卵子あたりの受精率は 72.6% (2582/3556)、生存卵あたりの受精率は 77.0% (2582/3355) であった。生存卵子率、ICSI 施行卵子あたりの受精率、生存卵子あたりの受精率、全ての項目で有意にピエゾ ICSI が高い値を示した。しかし、その後の Day3 良好胚率や Day5 胚盤胞率など胚発育には差を認めなかった。これらの結果より、ピエゾ ICSI は通常の ICSI と比較して、胚発育には差は認めないものの、生存卵子率、受精率を有意に改善することが明らかとなり、その有用性が認められた。1 個でも多くの受精卵を得ることは、不妊治療の成績向上のためには大変重要であり、この結果は今後の治療成績向上の一助になるものと考えられる。

参考文献

Araki, Y., Ogawa, S., Ohno, M., Yoshizawa, M., Motoyama, M., Araki, S., Aslam, I. and Fishel, S. (1999): Successful metaphase chromosome analysis of human elongated spermatids using Mouse oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 5, 784-787.

Benchaib, M., Braun, V., Lornage, J., Hadj, S., Salle, B., Lejeune, H. and Guerin, J.F. (2003): Sperm DNA fragmentation decreases the pregnancy rate in an assisted reproductive technique. *Hum. Reprod.*, 18, 1023-1028.

Bonney, RC., Dixson, AF. and Fleming, D. (1980): Plasma concentrations of oestradiol-17 $\beta$ , oestrone, progesterone and testosterone during the ovarian cycle of the owl monkey (*Aotus trivirgatus*). *J. Reprod. Fertil.*, 60, 101-107.

Collins, CE., Airey, DC., Young, NA., Leitch, DB. and Kaas, J H. (2010): Neuron densities vary across and within cortical areas in primates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(36), 15927-15932.

Defler, TR. and Bueno, ML. (2007): *Aotus* Diversity and the Species Problem. *Primate Conservation.*, 22, 55-70.

Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y. and Ogawa, K. (1990): Fertilisation of bovine oocytes by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet. Rec.*, 127(21), 517-520.

Hayton, K., Dumoulin, P., Henschen, B., Liu, A., Papakrivos, J. and Wellems, TE. (2013): Various PfrRH5 polymorphisms can support *Plasmodium falciparum* invasion into the erythrocytes of owl monkeys and rats. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 187(2), 103-110.

Hewitson, L., Takahashi, D., Dominko, C., Simeriy, C. and Shatten, G. (1998): Fertilization and embryo development to blastocysts after intracytoplasmic sperm injection in the rhesus monkey. *Hum. Reprod.*, 13, 3449-3455.

Hiraoka, K., Hiraoka, K., Tamaki, T., Nada, Y., Kiriake, C., Yoshie, M., Uto, H., Yoshida, H., Kitamura, S. and Kuwayama, M. (2013): Clinical Efficacy of an improved Piezo-ICSI Method using an Ultra-thin Micropipette *J. Mamm. Ova Res.*, 30(2), 53-58.

Hosoi, Y., Torii, R., Fujinami, N., Matsumoto, K., Saeki, K. and Iritani, A. (2003): Fertilization by intracytoplasmic sperm



injection and subsequent embryo development in vitro blastocysts in japanese monkey (*Macaca fuscata*). *J. Mamm. Ova Res.*, 20(1), 34-40.

Hunter, J., Martin, R.D., Dixson, A.F., Rudder, B.C. (1979): Gestation and Inter-Birth Intervals in the Owl Monkey (*Aotus trivirgatus griseimembra*). *Folia Primatol (Basel)*., 31(3), 165-175.

Kim, N.H., Jun, S.H., Do, J.T., Uhm, S.J., Lee, H.T. and Chung, K.S. (1999): Intracytoplasmic injection of porcine, bovine, mouse, or human spermatozoon into porcine oocyte. *Mol Reprod. Dev.*, 53 (1), 84-91.

Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995): Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52(4), 709-72.

Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Bortkiewicz, H., Rerry, A.C.F. and Yanagimachi, H. (1998): Analysis of mouse oocyte activation suggests the involvement of sperm perinuclear material. *Biol. Reprod.*, 58, 1407-1415.

Lee, J.D., Kamiguchi, Y. and Yanagimachi, R. (1996): Analysis of chromosome constitution of human spermatozoa with

normal and aberrant head morphologies after injection into mouse oocytes. *Hum. Reprod.*, 11, 1942-1946.

Lopes S., Sun, JG., Jurisicova, A., Meriano, J. and Casper, RF. (1998): Sperm Deoxyribonucleic Acid Fragmentation is Increased in Poor-Quality Semen Samples and Correlates with Failed Fertilization in Intracytoplasmic Sperm Injection. *Fertil. Steril.*, 69, 528-532.

Matsumoto, T., Isobe, K., Kusakabe, KT., Kuraishi, T., Hattori, S., Nakazato, C., Matsumoto, H., Fukui, E., Kuwahata, A., Ochi, M., Kiso, Y., Kai, C. and Yoshizawa, M. (2015): Morphological characterization and in vitro maturation of follicular oocytes from the owl monkey (*Aotus Lemurinus*) *J. Mamm. Ova Res.*, 32(3), 103-108.

Muriel, L., Garrido, N., Fernández, JL., Remohí, J., Pellicer, A., de los Santos MJ. and Meseguer, Ma. (2006): Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level, as measured by the sperm chromatin dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 85, 371-383.

Nakagawa, K., Yamano, S., Moride, N., Yamashita, M.,

Yoshizawa, M. and Aono, T. (2001): Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 76, 148-152.

Nakazato, C., Yoshizawa, M., Isobe, K., Kusakabe, KT., Kuraishi, T., Hattori, S., Matsumoto, H., Fukui, E., Kuwahata, A., Ochi, M., Kiso, Y. and Kai, C. (2015): Morphological characterization of spermatozoa of the night mokey. *J. Mamm. Ova Res.*, 32(1), 37-40.

Ng, SC., Bongso, A. and Ratnam, SS. (1991): Microinjection of human oocytes: a technique for severe oligosthenoteratozoospermia. *Fertil. Steril.*, 56(6), 1117-1123.

Nusser, KD., Mitalipov, S., Widmann, A., Gerami-Naini, B., Yeoman, RR. and Wolf, DP. (2001): Developmental competence of oocytes after ICSI in the rhesus monkey. *Hum. Reprod.*, 16, 130-137.

Ogawa, S., Araki, S., Araki, Y., Ohno, M. and Sato, I. (2000): Chromosome analysis of human spermatozoa from an oligasthenozoospermic carrier for a 13:14 Robertsonian translocation by their injection into mouse oocyte. *Hum.*

Reprod., 15, 1136-1139.

Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, AC. (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340(8810), 17-18.

Rybouchkin, A., Dozortsev, D., Sutter, P., Qian, C. and Dhont, M. (1995): Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activation capacity and the karyotype of human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 10, 1130-1135.

Sakkas, D., Uener, F., Bianchi, PG., Bizzaro, D., Wagrner, I., Jaquenoud, N., Manicardi, G. and Campana, A. (1996): Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 11, 837-843.

Saunders, CM., Larman, MG., Parrington, J., Cox, LJ, Royse, J., Blayney, LM., Swann, K. and Lai, FA. (2002): PLC zeta: a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*, 129, 3533-3544.

Stephens, PC. and Edwards, RG. (1978): Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 12, 366.

Trounson, AO. and Gardner, DK. (1999): Handbook of in vitro fertilization. 2<sup>nd</sup> ed. Boca Raton: CRC Press., p.248.

Uehara, T. and Yanagimachi, R. (1976): Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. Biol. Reprod., 15(4), 467-470.

Van steirteghem, AC., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Jassenswillen, C., Tournaya. H., Derde, M.P., Van Assche, E. and Devroey, P. (1993a): Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. Hum. Reprod., 8, 1055-1060.

Van steirteghem, AC., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smitz, J., Wisanto, A. and Devroey, P. (1993b): High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 8, 1061-1066.

Veeck, LL. (1991): Typical morphology of the human oocyte and conceptus. In Atlas of Human Oocyte and Early Conceptus, Vol. 2. Williams and Wilkins, Maryland, pp.1-13.

Wakayama, T., Uehara, T., Hayashi, Y. and Yanagimachi, R. (1997): The response of mouse oocytes injection with sea urchin spermatozoa. *Zygote*, 5(3), 229-234.

Yanagida, K., Katayose, H., Yazawa, H., Kimura, Y., Konnai, K. and Sato, A. (1999): The usefulness of a piezo-micromanipulator in intraplasmic sperm injection in humans. *Hum. Reprod.*, 14, 448-453.

Yanagida, K., Katayose, H., Suzuki, K., Suganuma, A. and Sato, A. (2001): Flexibility of oolemma is an important factor for oocyte survival after ICSI. *J. Mamm. Ova Res.*, 18, 93-98.

Yazawa, H., Yanagida, K., Katayose, H., Hayashi, S. and Sato, A. (2000): Comparison of oocyte activation and Ca<sup>2+</sup> oscillation-inducing abilities of round/elongated spermatids of mouse, hamster, rat, rabbit and human assessed by mouse oocyte activation assay. *Hum. Reprod.*, 15(12), 2582-2590.

Yoon, SY., Jellerette, T., Salicioni, AM., Lee, HC., Yoo, MS., Coward, K., Parrington, J., Grow, D., Cibelli, JB., Visconti, PE., Mager, J. and Fissore, RA. (2008): Human sperm devoid of PLC, zeta 1 fail to induce Ca<sup>2+</sup> release and are unable to

initiate the first step of embryo development. *J. Clin. Invest.*, 118, 3672-3681.

Yoshizawa, M., Takada, M., Nakamoto, S., Muramatsu, T. and Okamoto, A. (1991): Adequate Concentration and Duration of Vinblastine Treatment for Chromosome Preparation in Mouse Embryos. *Animal Science and Technology*, 62: 511-518.

Yoshizawa, M., Nakamoto, S., Fukui, E., Muramatsu, S. and Okamoto, A. (1992): Chromosomal analysis of first-cleavage mouse eggs fertilized in caffeine-containing medium. *J. Reprod. Dev.*, 38: 107-113.

Zhang, L., Weston, AM., Denniston, RS., Goodesux, LL., Gogke, RA. and Wolf, DP. (1994): Developmental potential of rhesus monkey embryos produced by in vitro fertilization, *Biol. Reprod.*, 51, 433-440.

Zhang, J., Wang, CW., Blaszyk, BA., Grifo, JM., Ozil, J., Haberman, E., Adler, A. and Krey, LC. (1999): Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 72, 509-512.

## 要旨

哺乳動物における生殖工学の発展は著しく、マウスや家畜において開発された体外受精、顕微授精、胚移植などの技術は、ヒト生殖補助医療へも応用され、難治性男性不妊患者においても顕微授精の適用で子孫を残すことができるようになった。しかし、顕微授精についてはまだ技術的な改善の必要性がある。

本研究では、新世界ザルの1種であるヨザルの卵子と精子を用いてピエゾマイクロマニピュレーターによる卵細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic sperm injection: ICSI) を試み、初めて胚作出に成功した。またヒト卵子においてもピエゾマイクロマニピュレーターによる ICSI が有用であることを明らかにした。

初めに、ヨザルという貴重な実験動物を使用すること、成熟卵子が数多く採取できない可能性が高いこと、ヨザル精子はその性状から卵子活性化能がない、もしくは不十分である可能性が考えられたことから、異種精子の ICSI でも前核形成が確認されているマウス卵子へヨザル精子の ICSI を行った。卵子が小さく脆いマウス卵子への ICSI は技術的な難度が高いとされるが、ピエゾマイクロマニピュレーターを使用し、卵細胞膜の穿破を工夫した結果、生存卵子率を有意に上昇できた (27.6% vs 72.6%)。ヨザル精子を ICSI し得られた生存卵子あたりの前核形成率は 91.5% と高率であったことから、ヨザル精子は卵活性化能を有すると判定された。また、得られた前核期胚を用いて染色体標本作製し、ヨザル精子染色体が分析可能な標本作製に成功した。



次に、ヨザル雌個体から採卵を行った。安楽死後に摘出した両卵巣から 14 個の卵丘卵子複合体 (COC) を回収し、卵丘細胞の状態が良好なものから 3 段階に分類し、Excellent COC 3 個、Good COC 4 個、Poor COC 7 個を得て、25 時間の体外成熟培養を行った。卵子の成熟確認のために 0.1% ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞の除去を行った結果、Excellent COC 3 個からは 1 個 (33.3%)、Good COC 4 個からは 1 個 (25.0%) の成熟卵子が得られた。Poor COC からは、成熟卵子は得られなかった。得られた 2 個の成熟卵子は、形態的にはヒト成熟卵子と類似していた。なお、ヨザル卵子を用いた ICSI は今回が初めてのため、成熟卵子への ICSI の前に、未熟卵子 7 個にも ICSI を試行し方法を検討したところ、5 個が生存 (71.4%) していた。ICSI を行った際インジェクションピペットを卵子内 2/3 程度まで進入させても卵細胞膜は破けることなく伸展し、その伸展性はヒト卵子やマウス卵子と同等であり、卵細胞膜の破れる様子も類似していた。成熟卵子 2 個に ICSI を施行した結果 2 個とも生存 (100%) した。顕微授精の 17.5 時間後に第 2 極体の放出により受精の確認を行った。Excellent COC 由来の 1 個は 2 細胞期に達しており、Good COC 由来の 1 個では前核を確認できなかったが第 2 極体の放出が確認され、2 個 (100%) とも受精と判定した。受精したものは ICSI 後 30.5 時間には、1 個は 3 細胞期へ、もう 1 個は 2 細胞期へと発生した。継続培養の結果、ICSI 後 48 時間には各々 4 細胞期と 5 細胞期、66 時間では各々 6 細胞期と 8 細胞期、98 時間では 2 個とも 10 細胞期へと発生し、114 時間では両方とも部分的に細胞の融合を認めたものの、それ

以降の分割は見られなかったため、発生停止と判断し、ICSI 後 138 時間で培養を終了した。胚盤胞までの発生は見られなかったものの、これまで報告されていないヨザルの体外胚作出にピエゾマイクロマニピュレーターによる ICSI で初めて成功した。

マウスやヨザルで高い生存卵子率であったピエゾマイクロマニピュレーターを用いた ICSI をインフォームドコンセントの得られた ICSI 適応の患者の卵子の卵子に対して施行し、通常の ICSI と生存卵子率、受精率、胚発育率を比較検討した。通常の ICSI では、生存卵子率は 91.7%、ICSI 施行卵子あたりの受精率は 66.2%、生存卵子あたりの受精率は 72.1%であった。ピエゾ ICSI では、生存卵子率は 96.3%、ICSI 施行卵子あたりの受精率は 72.6%、生存卵子あたりの受精率は 77.0%であった。生存卵子率、ICSI 施行卵子あたりの受精率、生存卵子あたりの受精率の全てにおいて有意にピエゾ ICSI が高い値を示した。その後の Day3 良好胚率や Day5 胚盤胞率などの胚発育には差を認めなかった。これらの結果から、ピエゾ ICSI は通常の ICSI と比較して、生存卵子率、受精率を有意に改善することが示され、その有用性を明らかにすることができた。

ピエゾマイクロマニピュレーターによる ICSI 法を検討した本研究は、ヨザル体外胚作出に初めて成功し、さらにヒト卵子に適用することでその有用性を明示した。本研究結果は、種々の哺乳動物へのピエゾ ICSI の適用のみならず、今後のヒト不妊症の治療成績向上の一助になるものと考えられる。

## 謝辞

本研究の実験遂行および本論文を作成するにあたり、ご指導、ご助言を賜りました吉澤緑教授に深謝致しますとともに、心から御礼申し上げます。ありがとうございました。吉澤緑教授には、本研究に対するご指導だけではなく、研究者としての研究に対する姿勢、あるべき姿を丁寧にご教授頂きました。先生にご指導頂いた時間を糧として、今後は社会人として、また研究者として更に研鑽して参りたいと思います。

また、本研究についてのご助言、本論文作製にあたりご指導を頂きました松本浩道准教授、福井えみ子准教授に心よりお礼申し上げます。

忙しい中、実験をともに行いサポート頂きました修士1年西萌香様、卒業生の松本拓也様に感謝申し上げます。

また、ヨザルの研究においては、貴重な実験動物を提供して頂きました東京大学医科学研究所の甲斐知恵子教授、東京大学医科学研究所・奄美病害動物研究施設の服部正策准教授、倉石武特任助教授、山口大学共同獣医学部の木曾康郎教授、日下部健准教授に感謝申し上げます。

本研究を遂行するあたり、様々なご支援を賜りましたおち夢クリニック名古屋の越知正憲先生、桑波田暁子先生に感謝申し上げます。

最後に様々な形でサポートをして頂きました宇都宮大学 農学

部 生物生産科学科 動物生産学講座 動物育種繁殖学研究室の皆  
さまに心より感謝します。