

## 学 位 論 文 要 旨

### 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

渡 邊 英 明

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巢から 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。