

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10693

研究課題名(和文) DNA断片化陰性運動精子の選別と人工卵管用いる高精度媒精

研究課題名(英文) Separation of motile sperm without DNA fragmentation and high efficient in vitro fertilization in the artificial oviduct

研究代表者

兼子 智 (Kaneko, Satoru)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40214457

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は精子側技術の向上、媒精環境の効率化によりICSIに依存することなく受精胚を得ることを目的として、授精に供するDNA断片化陰性精子の高精度分画、2. DNA断片化初期像、頭部空胞、先体反応誘起能観察による精子品質管理、3. 卵管様微少流路内で運動精子分離、先体反応誘起、受精を同時に行う人工卵管法により、媒精に要する精子の質的向上と量的な下限値の低下を図ることに成功した。本法を顕微授精反復不成功例(250例、406周期)施行し57症例が妊娠し、49例が分娩に到った。ICSI反復不成功例が本研究で確立した高効率媒精システムにより妊娠に至る可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：ICSI is recognized as the last resort of severe male infertility, we developed following technologies to minimize ICSI; a novel centrifugal method to separate human motile sperm without DNA fragmentation, quality control by means of single cell pulsed field gel electrophoresis to observe the early stage of fragmentation, visualization of vacuoles with reactive blue2 and induction of the acrosome reaction with concanavalin A. Then high efficient in vitro fertilization in micro-channel, namely the artificial oviduct, perform separation of motile sperm, induction of the acrosome reaction and fertilization in micro-environment. The couple who have undergone repetitive ICSI without success (250 cases) have attended to the artificial oviduct trial (406 cycles), of these 70 pregnancies were successfully pregnant and 51 delivery were obtained. Our project revealed that combination of the advanced sperm technologies and high efficient fertilization technology are substituted for ICSI.

研究分野：生殖生理学

キーワード：精子 DNA断片化 不妊治療 生殖補助医療 顕微授精 人工卵管

1. 研究開始当初の背景

生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology : ART) の第一段階となる配偶子取得に関して、女性側の造卵機能障害には過排卵誘発法が確立されているのに対し、男性不妊の約 90% を占める特発性造精機能障害に対する有効な根治療法は確立されていない。重度精液所見不良症例の治療法として導入された Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) は、受精胚を容易に取得できる手技として適応拡大され、ART 施行例の 80% 以上を占める。本法はあくまで精子の量的不足を補う手技であり、質的異常を補償するものではないが、穿刺精子は明視野顕微鏡下に運動性とおおまかな頭部形態を指標として選択されているにすぎない。我々はこれまでヒト精子機能評価法、さらにはそれらを指標とした精子分画法を研究し、造精機能障害が産生精子量の減少のみならず多様な質的異常をもたらすことを明らかにしてきた。精子はその形成過程で DNA 修復能を失うため、一部の精子は double strand break (DSB) を蓄積している。そこで我々は単一精子の全 DNA から数本の長鎖 DNA 離脱を検出できる single cell pulsed-field gel electrophoresis (SCPFGE) 法を開発した。本法により分画した運動精子中にも DNA 切断の初期段階にあるものが含まれており、その頻度は個体差が大きいことが明らかになった。これらの知見は DNA 損傷精子の積極的な排除および多面的な機能形態検査が、穿刺精子の品質保証さらには治療の安全保証に不可欠であることを示唆している。これらの観点から ART の安全性向上を目指した研究、特に精子品質管理を検討することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、精子側技術の向上、媒精環境の効率化により顕微授精 (ICSI) に依存することなく受精胚を得る、ICSI をせざるを得ない

時は精子品質管理を徹底する、さらに精子が極端に不良な場合は治療不可を考慮する、という新しい治療モデルを提唱する。ICSI 回避の具体策として、1. 授精に供する精子の精子品質管理、すなわち選別による異常精子の排除と検査による確認、2. 卵管様微小流路内で運動精子分離、先体反応誘起、受精を同時に行い、媒精に要する精子の量的な下限値の低下を図る人工卵管を開発した。本研究は新規精子検査項目を開発した。DNA 断片化精子のように比較的簡単に排除できる異常もあるが、現段階の分離技術では排除困難な項目が多く、これらの出現率、選別後の改善率は個人差が大きい。さらに、原精液の状態が悪化すると多重異常を呈することが多く、選別を検討するレベルではなくなる。本研究は、重度精液所見不良例に対する ICSI 適応に関して、穿刺精子の安全基準、さらには ART の治療限界をどのように明確にするか、研究する。

3. 研究の方法

DNA 断片化陰性精子の調製： Optiprep 沈降平衡法、Percoll 沈降速度差遠心分離法を用いた。

精子頭部空胞の観察： reactive blue2 (RB2) を用いる希薄染色法を用いた。

精子先体反応誘起の観察： コンカナバリン A 蛍光染色により露出先体内膜を観察した。

4. 研究成果

(1) DSB 陰性運動精子の調製

運動精子分離に汎用される Percoll 密度勾配遠心法は、約 35 年前に筆者らが開発した。しかし、DSB 陽性精子は陰性精子に比して高密度であり、本法は原理的に DSB 陰性精子分離には不向きである。また swim up 法による運動精子の分離は、回収率が極端に低く (一般的に数%程度)、運動精子を捨てているようなものである。さらに高酸素環境下における

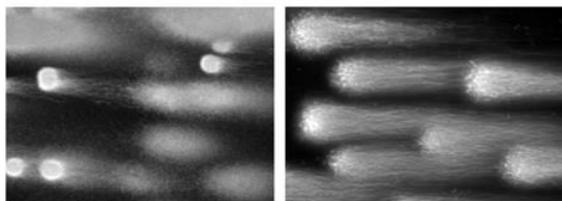
精子運動はミトコンドリア呼吸による活性酸素レベル上昇を招き、DNA 保護の観点から回避すべきである。一方、沈降平衡法、沈降速度差遠心分離法の組み合わせにより DSB 陰性運動精子を高い回収率で調製が可能であり、最終的に人工卵管の細流路における酸素遮断 swim side により運動精子を分離する。

(2) 機能形態検査による精子品質管理

① DNA 断片化

精子は成熟の過程で DNA 修復系を失い、DNA 損傷が蓄積する。精液中の非運動精子はほとんどが DNA 高度断片化像を示し、運動精子中にも DNA 断片化初期段階ものが混在し、その修復は受精後に卵側修復系に依存する。DNA 損傷の中でも DSB は細胞致死性が高く、その許容限度は一精子あたり数カ所とされる。ART における DNA 断片化検査の意義は、運動精子における DNA 切断の初期段階を検出し、断片化の少ない精子を提供することである。

SCPFGE 法は、DSB 陽性、陰性標準品 (図 1) を対照として定量性を確認する。現段階における陰性の定義は、電気泳動により伸長した全 DNA fiber の先に離脱した長鎖断片を認めないことである。検出感度設定用の標準品は、DSB 陰性標準品を弱アルカリで数分間処理して 10 ヶ所程度の切断を作成したものを使用する。標準品を用いた本法での検討から、これまで汎用されてきた COMET 法、TUNEL 法、dispersion test 等は検出感度不足であり、精液を対象とした検査では非運動精子に由来する高度断片化像を検出していることが示されている。



DNA断片化陽性標準品

DNA断片化陰性標準品

図 1 SCPFGE 法で解析した DNA 2 重鎖断片化陰性、陽性標準品

② 精子頭部空胞

我々は、reactive blue2 (RB2)を用いる希薄染色法による頭部空胞の negative 染色法を開発した。本色素はアルカリ条件下でプロタミン特異染色が可能であり、多様な細胞が混在する精液中の精子頭部を選択的に青染し、頭部空胞は非染部 (白抜け) として観察できた (図 2)。ヒト精液における精子頭部形態と空胞は個人差が大きく、また同一精液内においても精子間差が大きいことが明らかになった (図 3)。

③ 先体

ゴルジ装置に由来する先体は、Ca チャンネルを介した Ca 流入により先体反応誘起する。培養液中における先体内膜の経時的露出 (先体反応誘起能) は、先体内膜に局在するハイマンノース糖鎖をコンカナバリン A 蛍光染色により観察する (図 4)。体外受精における受精障害は先体の機能形態異常が関与する 경우가多く、先体の形成不全、先体反応誘起障害がある。先体局在には個人差が大きいことが示され、体外受精における必須検査であることが示された。

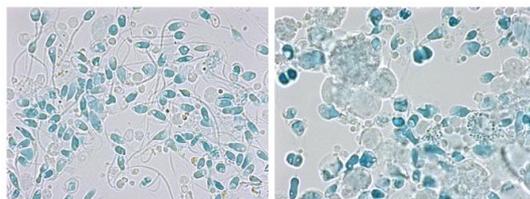


図 2 Reactive Blue2 用いる希薄染色法により可視化したヒト精子頭部空胞



図 3 ヒト精液における精子頭部形態と空胞 (形状と数) の精子間差

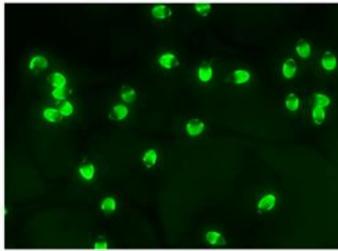


図 4 沈降平衡法、沈降速度差遠心分離法により選別した精子の先体局在

(3) 人工卵管による高効率媒精

ICSI は精子の量的不足を補う手技であり、質的異常を補償できない。そこで、まず精子選別精度の向上および精子品質管理の徹底により受精に寄与する有効精子量の増加を図った。具体的には、沈降平衡法、沈降速度差遠心法を組み合わせ、DNA 断片化陰性運動精子を調製した。重度精子減少症例には separable fine neck tube を用い、精子回収率の向上を図った。これら精子側の努力に対応して、人工卵管 (図 5) は卵管様微少流路内で最終的な運動精子分離、先体反応誘起、受精を同時に行い、媒精に要する精子量の大幅な低減を目的とする。複数の well を培養液の細流路で接続し、ミネラルオイル等で被覆したシンプルな構造であり、一方の well に DSB 陰性精子を入れ、他方に卵を収納する。容量 $50\mu\text{l}$ 程度の細流路を運動精子が swim side し、卵周囲の精子濃度が徐々に増加する。

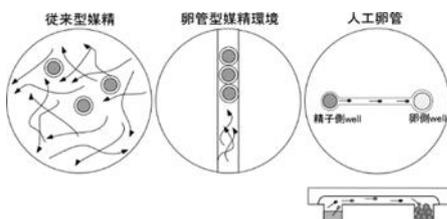


図 5 人工卵管模式図

(4) 人工卵管の小規模臨床

本稿で解説した高効率媒精システムが、ICSI 代替法として有用であるか検討するため、ICSI 不成功例 250 例に 406 周期施行し、2015 年 7 月までに妊娠転帰が確定した 57 症

例 (計 70 例 : 2 回妊娠 11 例、3 回妊娠 1 例を含む) の成績を解析した。57 症例中 55 症例は前医にて 1-40 (9.3 ± 8.6) 回 ICSI を施行せるも妊娠しなかったが、このシステムでは 70 例の妊娠が得られ、49 例が正常経膈分娩、2 例が帝王切開術にて出産した。一方、19 例では胎嚢確認後、流産 (27%) となった。分娩群、流産群の調製後精子濃度、運動率は両群間で差異はなかったが、年齢は 40.1 ± 2.09 、 42.7 ± 3.37 歳、ICSI 施行回数 6.7 ± 3.5 、 15.8 ± 13.6 回、人工卵管周期における妊娠までの施行回数 1.9 ± 1.1 、 1.9 ± 1.0 回、採卵数/分割胚数はそれぞれ $3.8 \pm 1.6/2.9 \pm 1.3$ 、 $2.7 \pm 1.4/1.9 \pm 1.0$ と流産群は分娩群に比して、年齢、ICSI 施行回数が有意に高く、分割卵数は有意に少なかった。受精率は約 77% と両群間でほぼ同じであった。ICSI 反復不成功例においても、本稿で述べた高効率媒精システムにより、妊娠に至る可能性があると考えられた。しかし、流産群で示された通り、長期間の ICSI 施行による加齢の影響が推測された。今後の研究は、多様な症例に人工卵管の運用をどのように最適化していくかが主眼となる。

(5) 結論

「精子の状態が悪いから ICSI」という従前の患者説明は、本研究の成果を考慮すると「精液段階では状態が悪かったが、高度に精子を選別し、詳細に検査した結果、穿刺可能であると判定されたが、ほんの僅かしか得られなかったから ICSI とした」になる。前項で述べた小規模臨床試験においても、ICSI 反復不成功例の約 2 割が人工卵管により妊娠可能であったが、残りの 8 割は ICSI、人工卵管共に不成功であった。現在、このグループの夫精子をさらに詳細に検討しているが、従来の精液検査 (精子濃度、運動率、頭部形態正常率等) では検知できない様々な機能形態異常を認める場合が多い。ICSI のみならず全て

の ART は、重度精子機能形態異常に対応できないという結論に帰結する可能性も否定できない。

現状では、ICSI 中に培養士が明視野顕微鏡下に運動性とおおまかな頭部形態を指標として穿刺精子を選択している。今後は、高精度な精子分画および品質管理技術を普遍化し、事前に精子詳細情報を取得して採卵可能かを評価することが重要であると考えられる。その際、冒頭に述べた ICSI 回避戦略が安全性の観点から重要となると考えられ、特にこれまでまったく触れられてこなかった”精子が極端に不良（重度精子機能形態異常）であり、媒精もしくは穿刺可能な精子を得ることができない場合は治療不能（in-ART）を考慮する”、という新しいモデルが不可欠である。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Katayama, M., Kaneko, S., Tsukimura, T., Takamatsu, K., Togawa, T., Multivariate analysis of D- and L-amino acid composition in human seminal plasma reveals correlations with sperm concentration, motility and morphology. Paripex-Indian J Res, 5: 458-461, 2016 査読有り
2. Ahmed, NE., Murakami, M., Kaneko, S., Nakashima, M. The effects of hypoxia on the stemness properties of human dental pulp stem cells (DPSCs). Sci Rep 14:35476. doi: 10.1038/srep35476, 2016 査読有り
3. Katayama, M., Kaneko, S., Tukumura, T., Takamatsu, K., Togawa, T., Determination of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethyl-cytosine, and

5-formylcytosine expression in mobile and immobile sperm from ejaculation: analyses of relationships with sperm properties using partial least square regression. Paripex-Indian J Res, 7(4): 102-104, 2018, ISSN-2250-1991 査読有り

4. 兼子智、黒田優佳子、高松潔、人工卵管（卵管型微小環境媒精法）を用いる高効率媒精、産科と婦人科 85:322-327, 2018 査読なし

〔学会発表〕（計 7 件）

1. 兼子智、内田明花、杉山重里、橋本志歩、小川誠司、片野坂潤子、岡崎雅子、川口真帆、小川真里子、吉田丈児、高松潔、DNA断片陰性、陽性標準精子を用いたアクリジンオレンジDNA断片化解析の再評価、第33回日本受精着床学会学術講演会、平成27年11月26日
2. 兼子智、内田明花、杉山重里、橋本志歩、小川誠司、片野坂潤子、岡崎雅子、川口真帆、小川真里子、吉田丈児、高松 潔、頭部外周形状、先体局在、頭部空胞、中片部、尾部の分別染色による精子形態詳細情報の取得、第33回日本受精着床学会学術講演会、平成27年11月26日
3. 黒田優佳子、兼子智、吉田丈児、高松潔、ICSI不成功例を対象とした人工卵管（卵管型微小環境媒精法）を用いる高効率媒精法と本法による妊娠・出産・流産例の検討、第33回日本受精着床学会学術講演会、平成27年11月26日
4. 萩生田純、石川博通、中川健、川口真帆、岡崎雅子、井上治、小川誠司、兼子 智、高松潔、吉田丈児、精索静脈瘤に対する顕微鏡下手術の臨床的検討、第61回日本生殖医学会学術講演会、平成28年11月3、4日
5. 吉田丈児、兼子智、飯野孝太郎、井上治、

吉丸真澄、橋本志歩、小川真里子、岡崎雅子、片野坂潤子、萩生田純、中川 健、高松潔：抗精子抗体検査における精度管理の必要性、第 62 回日本生殖医学会学術講演会、平成 29 年 11 月 15, 16 日

6. 兼子智、飯野孝太郎、井上治、吉丸真澄、橋本志歩、小川真里子、岡崎雅子、片野坂潤子、吉田丈児、萩生田純、中川 健、高松潔、重度精液所見不良例における精子多重形態異常と in-ICSI、第 62 回日本生殖医学会学術講演会、平成 29 年 11 月 15, 16 日
7. 兼子智、黒田優佳子、吉丸真澄、橋本志歩、小川誠司、山口緑、杉山重里、小川真里子、吉田丈児、高松潔、人工卵管を用いる高効率媒精における少数精子取扱法の検討、第68回日本産科婦人科学会学術講演会、平成28年4月21-24日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兼子 智 (KANEKO, Satoru)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：40214457

(2) 研究分担者

高松 潔 (TAKAMATSU, Kiyoshi)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：30206875

吉田 丈児 (YOSHIDA, Joji)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：70191591

小川 真里子 (OGAWA, Mariko)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：40296653