

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591914
 研究課題名（和文） 生殖補助医療における精子の品質管理-酸化的 DNA 損傷の回避とテロメア保護
 研究課題名（英文） Quality assurance of human sperm in assisted reproductive technology
 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

研究成果の概要：

1. 従来の直交電極をswitchしてDNA超伸展を図る方法に代え、ターンテーブルを装備した電気泳動装置を開発した。サーボ制御により、ターンテーブルが首振り運動することにより、効率よくDNA fiberの伸張が行えるようになった。
2. 細胞操作過程における酸素傷害を防止するため、低酸素で細胞操作、細胞培養装置を開発し、酸素濃度2.0%環境下で高精度細胞培養が行えるようになった。
3. フローサイトメトリ (FCM) を用いて精子DNA量を評価した。射精精子のDNA量は大きくばらついていたが、精製によりDNA量がそろった精子が得られることが示された。
4. ペプチド核酸プローブを用いるFISH法により、染色体末端、すなわちテロメア部位の高精度観察を行った。半数体である精子は理論上46のシグナルが得られる。射精精子のシグナル数はばらついており、FCMにおけるDNA量のバラツキは項目3の結果を支持した。
5. 分離、調製した精子は一部を用いて機能評価(品質管理)を行うことが不可欠である。検査時間確保のためにも凍結保存が必要であり、受精能維持可能な凍結保存法を開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産科婦人科学

キーワード：精子、DNA、2重鎖切断、低酸素培養、テロメア、ICSI

1. 研究開始当初の背景

精子を人為的に卵に穿刺して受精を図る顕微授精(ICSI)は、男性不妊、特に精液所見が不良な症例における唯一の授精手段として汎用されてきた。これまで穿刺主義に関して詳細な検討がなされてきたが、穿刺精子の

選別は顕微鏡下に大まかな精子頭部形態と運動性を指標としてきた。すなわち、運動精子=良好精子の想定に基づき治療体系が組み立てられてきた。一方、造精機能傷害は産生精子の減少とともに様々な質的異常をもたらす。その項目、頻度は症例ごとに大きく異なる。この知見は、ICSIの施行に際しては治

療の安全性確保の観点から、穿刺する精子の品質評価並びに保証が不可欠であることを示唆している。

本研究は多面的に精子品質管理を行うために、検査法の開発並びに培養法の改良を行った。

2. 研究の目的

生殖補助医療、特に顕微授精に供する精子の品質管理を目的として、精子 DNA 損傷の電気泳動的観察法の確立、減数分裂時における染色体分配精度の観察を目的としたテロメア数測定法の確立を行う。精子、卵、胚の DNA 損傷の一原因として、活性酸素が挙げられる。その防止を目的とした低酸素配偶子取り扱い、培養装置を開発した。

3. 研究の方法

DNA fiberの伸展には、ターンテーブルを装備した電気泳動装置を用いた。泳動時間を変化させ、鎖長の異なるfiberを展開した。細胞操作過程における酸素傷害を防止するため、低酸素で細胞操作、細胞培養を行った。

フローサイトメトリ (FCM) は、常法に従った。精子はサイバーゴールドによりDNA染色した。FISH法によるテロメア領域の可視化にはペプチド核酸プローブ(単鎖TTAGGGX3)を用いた。

4. 研究成果

1. 従来の直交電極をswitchしてDNA超伸展を図る方法に代え、ターンテーブルを装備した電気泳動装置を開発した(図1)。サーボ制御により、ターンテーブルが首振り運動することにより、効率よくDNA fiberを伸張させることができた(図2)。

単一細胞におけるDNA切断は、長鎖、単鎖、顕微鏡で認識できないキロベースレベルの断片を分別観察し、全ての項目で陰性であることを確認することが不可欠であることを認めた。

2. 細胞操作過程における酸素傷害を防止するため、低酸素で細胞操作、細胞培養装置を開発し、酸素濃度2.0%環境下で高精度細胞培養が行えるようになった。図3にガス循環型クリーンベンチを示した。図4はクラスター型細胞培養装置および使用する培養カプセルを示している。

従来型のCO₂インキュベーターが複数の培養ディッシュを同一庫内で培養するのに対し、本装置では症例ごとに培養カプ

図1 首振り型電気泳動装置

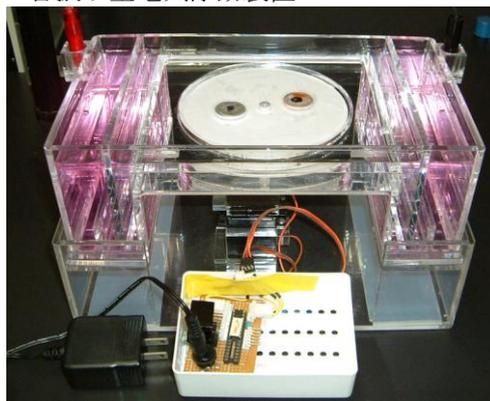
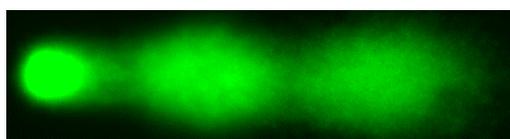
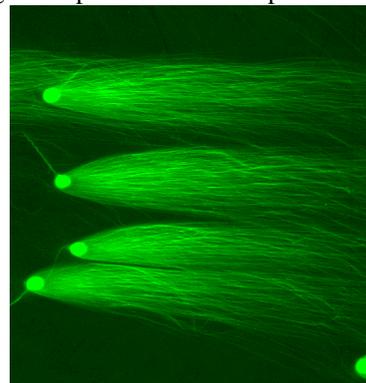


図2 single cell pulse field electrophoresis



画像は上から、精子DNA fiber展開像、単鎖断片を示している。

セルを使用した個別培養を行う。これはセキュリティの向上とともにガス環境の安定に向上する。図5はカプセルのフタを開閉することにより流入した空気、特に酸素のパーセントにより、短時間でガス環境の回復が可能であることを指名している。容量500mlのカプセルにはガス緩衝液200mlを入れてある。残存する空間300mlに侵入した空気を培養ガスに置換するのに要する時間を示している。培養ガスを少量注入してもガス平衡まで150分間を要している。この知見は容量が50リットル程度のCO₂インキュベーターにおいてガス平衡の回復は容易ではないことを示している。一方、無酸素ガス注入によるパーセントにより、ガス環境は数分間で回復することができた。

図3 ガス循環型クリーンベンチ

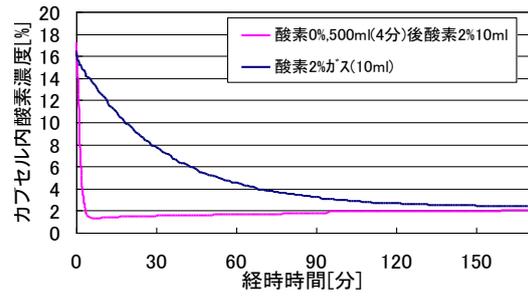


本装置は、1. 循環濾過によりほぼ無塵(チャンバー内ガスは150回濾過/hr)、2. 感染防止フィルムの使用、3. 追跡性の保証、4. チャンバ所的に無酸素、2.0% O₂濃度環境、などの特徴を有する。

図4 クラスター型細胞培養装置および培養カプセル

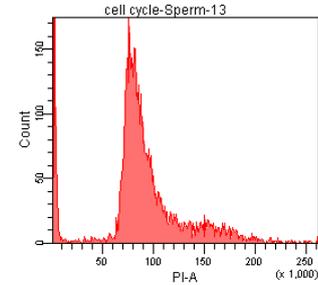


図5 酸素パージによる培養ガス環境の回復

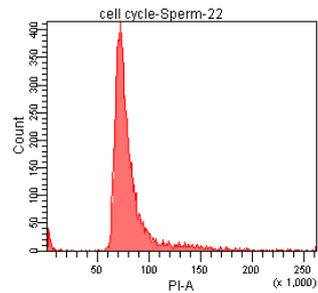


- フローサイトメトリ (FCM) を用いて精子DNA量を評価した。射精精子のDNA量は大きくばらついていたが、Nycodenz沈降平衡、Percoll沈降速度差遠心、swim upにより精製した精子ではFCMにおけるピーク幅は狭小化し、精製によりDNA量がそろった精子が得られることが示された。

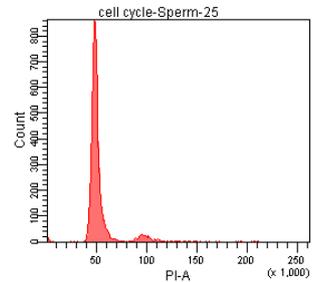
図6 精製によるDNA量分布の変化



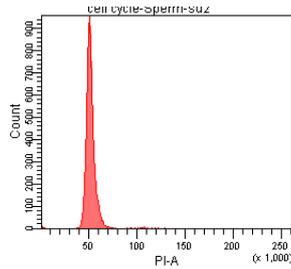
射精精液



沈降平衡



沈降速度差遠心分離

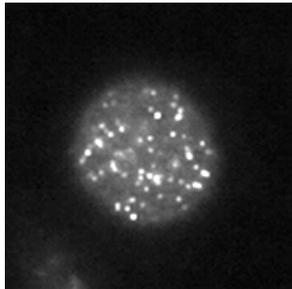


Swim up

4. ペプチド核酸プローブを用いるFISH法により、染色体末端、すなわちテロメア部位の高精度観察を行った。半数体である精子は、理論上46のシグナルが得られる。FISHのラベル効率が100%には達しないため、シグナルが46以下であることは必ずしも染色体数の過少であることを示さないが、46以上である場合は過多であるといえる。射精精子のシグナル数はばらついており、染色体過多の精子を認めた。この結果は、精子減数分裂過程における染色体分配精度が必ずしも高くないことを示唆している。今後、症例数を増やし、造精機能傷害との関連性を検討する必要がある。

前項に示した、FCMにおけるDNA量のバラツキは本項の結果を支持しており、不妊治療の安全性確保の観点からも詳細な研究が求められる。

図7 精子テロメア像

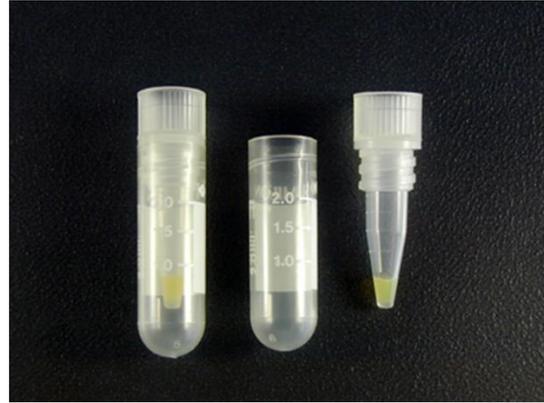


5. 分離、調製した精子は一部を用いて機能評価(品質管理)を行うことが不可欠である。検査時間確保のためにも、凍結保存が必要である。凍結、融解過程における精子生存性維持を目的とした可変型2重腔チューブを開発した。

一般に凍結時の最適速度は-30℃/分程度であるが、融解時にはできるだけ高速であることが要求される。変型2重腔チューブは凍結時と融解時に容器形状が変化し、両者において最適な温度変化率が得られる。これにより蘇生率の向上が図ら

れた。

図7 ヒト精子凍結用可変型2重腔容器



操作手順：項目3にまとめた精子調製法で射精精液から精子を分離し、凍結保護剤と等量混合して内筒に入れ、外部容器に装着して液体窒素に直接浸漬した。融解時は、液体窒素タンクから取り出した容器のフタを開け、内筒のみを微温湯に浸漬して融解する。

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 5 件)

1. Kaneko S, Takamatsu K, Yoshida J, Miyaji K, Ishikawa H, Kawamata T, Shinozaki N, Individual tissue culture system in a disposable capsule with hypoxic atmosphere, *Ann. Cancer Res. Therap.*, 16: 8-11 2008 査読あり

2. Katayama M, Takamatsu K, Kaneko S, Miyaji K, Ishikawa H, Matsuda Y, HPLC for no stress screening of potential prostate cancer marker catechol estrogens in urine using a diamond electrode - electrochemical and fluorescence detector. *J. Se. Sci.*, 30: 2279 - 2285, 2007 査読あり

3. Ishikawa H, Kaneko S, Human sperm cryo- preservation – theory and clinical application. *J. Mamm. Ova Res.*, 24: 14-17, 2007 査読あり

4. Ishikawa H, Kaneko S, Miyaji K, Takamatsu K, Cryopreservation of human sperm in patients with malignancy; 2 years' experience. *Reprod. Med. Biol.* 6 : 127-132, 2007 査読あり

5. 兼子智、高松潔精子から始める配偶子、胚の品質管理、製造管理、産婦人科治療、57:1523-1527、2008 査読なし

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 兼子智、郡山純子、谷垣伸治、中川博之、石川光也、小林佑介、斎藤優、吉田丈児、高松潔、ICSIにおける穿刺精子の品質管理、日本産科婦人科学会雑誌、59：447, 2007

2. 兼子智、宮地系典、中川博之、佐藤健二、小川真里子、石川光也、吉田丈児、黒田優佳子、小埜清、岡崎雅子、丸茂健、石川博通、高松潔、ヒトへの組織移植を前提とした臨床培養に用いる使い捨て低酸素培養システムの構築、日本受精着床学会総会・学術講演会抄録、224、2007

5. 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