

令和 5 年 6 月 18 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11243

研究課題名(和文) 卵細胞質内精子注入法に特化した精子選別法・精子評価法の確立と治療前診断への応用

研究課題名(英文) Establishment of sperm selection and sperm evaluation methods specialized for intracytoplasmic sperm injection and application to pretreatment diagnosis

研究代表者

菅沼 亮太 (Suganuma, Ryota)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：30528211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はICSIにおける高精度良好精子選別法の確立および選択された精子機能評価法の確立である。精子調整法(A：密度勾配法、B：精液静置法、C：MACS法)、精子選別法(：IMSI法、：HA-coated slide-binding assay)を組み合わせ、新たな精子選別法の確立を試みた。精子調整法A・B・Cの順に行うことで精子運動率が上昇したが、調整法A・B・Cの単独実施と比較し有意差を認めなかった。また精子選別法の併用により精子の形態良好率、染色体正常率ともに上昇傾向を認めしたが、単独実施群と比較し有意差を認めなかった。今後、人工知能による画像診断法への応用に結び付けたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ICSIは2020年日本国内で151,732周期実施され、世界的にも年々増加傾向にあるが、受精率・生児獲得率とも改善傾向を認めていない。本研究では、現在実施されている精子調整法・精子選別法の5種類を組み合わせ、受精率・精子染色体正常率に改善傾向を認めたが、従来法の単独実施と比較し有意差を認めなかった。またICSI時に選択された精子機能評価として、マウス卵を用いた染色体分析法は1cell analysisとして有用であるが、高い専門技術と多くの労力が必要であり、より簡便な方法の開発が望まれる。世界的なICSIの治療成績向上のため、ICSI時に確実に正常精子を選択する方法の確立は喫緊の課題である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of our research is to establish a high-precision good sperm selection method in ICSI and a method to evaluate the selected sperm function. By combining sperm preparation methods (A: Centrifugation on density gradient, B: Swim-up, C: MACS) and sperm selection method (：IMSI,：HA-coated slide-binding assay), an attempt was made to establish a sperm selection method. Sperm motility increased by sequentially performing sperm preparation methods A・B・C, but there was no significant difference compared with the case of performing each methods A, B, and C alone. In addition, when sperm sorting methods and were used together, both the normal morphology rate and normal chromosome rate tended to increase, but there was no significant difference compared to when and were performed alone. In the future, we plan to conduct applied research on diagnostic imaging methods using artificial intelligence.

研究分野：生殖補助医療

キーワード：ICSI 顕微授精 sperm selection 受精障害

## 1. 研究開始当初の背景

卵細胞質内精子注入法 ( Intracytoplasmic sperm injection: ICSI ) は、1992 年に世界初の妊娠・出産の成功が報告され、現在においても最も強力な授精方法として全世界で実施されており、重症男性不妊症や体外受精の受精障害例の治療に不可欠な技術として定着している。日本国内のみならず世界的にも年々増加傾向にあるが、ICSI による受精率は平均 70 ~ 80% とされており、培養環境の改善やいくつかの ICSI 実施時の精子処理方法の開発によっても、当初から大きく改善していないことが知られている。

これまで申請者らの施設では、ICSI 後受精障害の原因として 63% が精子中卵活性化因子の異常によるものと推定されることを報告しており、また ICSI に用いられる精子形態とその後の臨床成績との関連に関する諸家の報告として、形態良好精子において治療成績が良いとする報告や、精子頭部の形態異常は着床率・流産率に悪影響を及ぼすとの報告もあり、ICSI 時の精子選択は治療成功の最重要課題である。

ICSI の際に正常と確認された精子を使用するのが理想であるが、ICSI に用いる精子を非侵襲的に検査する方法はないため、本研究で確立を目指している、ICSI の際により高い確率で正常精子を選択するための精子調整法および精子選別法や、ICSI に選択される個々の精子機能評価法の早期の確立が必要である。

## 2. 研究の目的

卵細胞質内精子注入法 ( ICSI ) は重症男性不妊症における最も効果的な授精技術であるが、ICSI 前の精子機能評価が行われずに治療が実施されている。これは通常と大きく異なる受精機序をもつ ICSI に適した精子機能評価法が確立されていないことに起因する。本研究では、複数の精子調整法と精子選別法を組み合わせることにより、ICSI における高精度良好精子選択法の確立と、選択された個々の精子に対する ICSI に特化した精子機能評価法の確立を目的とする。

治療前検査として、ICSI によって正常受精可能な精子の有無を確認し、症例毎に ICSI に用いるべき良好精子の機能的・形態的特徴の診断した後に、ICSI による実際の治療を実施するのが理想である。本研究は、新たな ICSI 治療前検査法の確立と一般化・標準化を目指ものであり、さらに多施設共同実施や精子凍結保存への応用を視野に、本法に対する精子凍結融解処理の影響を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

複数の精子調整法と精子選別法を組み合わせることによる ICSI における高精度良好精子選択法および選択された個々の精子に対する ICSI 時の精子機能評価法の確立を目的とし、新たな ICSI 治療前検査法として標準化を目指す。

研究開始当初、下記実験 ~ を計画

**実験** : 下記 3 種の精子調整法、2 種の精子選別法の組み合わせによる高精度良好精子選択法の有効性に関する検討と新たな精子選択基準の設定 ( 同法により遺伝的・機能的に優れた精子を ICSI 時に高率に選択可能であるかを検討し精子のスコアリング方法を設定する )

精子調整法 A : 密度勾配法 ( 射出成熟精子の密度を利用し良好精子の遠心分離を行う )

精子調整法 B：精液静置法（スイムアップ法：精子運動性を利用し、運動性良好精子を回収する）

精子調整法 C：MACS 法（磁場下にアポトーシスしない精子を回収する）

精子選別法：IMSI 法（高倍率で精子を観察し、形態良好精子を選別する）

精子選別法：HA-coated slide-binding assay（ICSI 用ディッシュ上に塗布したヒアルロン酸に結合する成熟精子を選別する）

まず妊孕性の確認された正常一般精液所見を満たす提供精子を用いて、上記精子調整法・精子選別法を併用することにより精子を選択する。除核マウス卵に ICSI 後、受精機能評価および精子染色体分析を実施する。各精子調整法実施の有無、IMSI で選択される精子形態異常の有無、HA-coated slide-binding assay の結果を加えてスコアリングを行い、精子染色体正常率との相関を明らかにすることにより、良好精子の判定基準の設定を行う。

**実験**：高精度良好精子選択法の安全性についての検討（上記精子調整法・精子選別法に伴う処理時間と精子観察時間が機能的・遺伝的に悪影響を与えるかどうか検討する）  
実験で実施した各処理方法による悪影響および ICSI 時の精子観察時間の延長に伴う悪影響について検討し、処理時間や観察時間に関する安全域の設定を行う。また各々の精子スコアの違によって環境から受ける悪影響に差が生じるのかも併せて検討する。

**実験**：臨床不妊症例からの提供精子を用いた実験の結果の再評価および実験で得られた安全域に対する再検討

平成 29 年の実験結果から得られた精子スコアリング方法および安全域の設定（精子観察時間および ICSI 前培養時間など）に従い、当院にて治療中の不妊症例からの提供精子を用いて本方法の有効性・安全性の検討を行う（結果を踏まえ、形態分類の集約化あるいは細分化、スコアリング方法の再評価を行う）。また精子スコアリングの個体差および症例における安全域違いの有無などの再評価もあわせて行う（顕微鏡観察時間・体外培養時間の影響に個人差、あるいは精子スコアの個体差がある可能性を考慮し、安全域の再設定や評価方法の汎用性について再検討する）。

**実験**：凍結融解処理の影響に関する追加検討 本研究で確立した良好精子選択法により、良好精子と判定された精子を悪影響なく凍結保存可能であれば、調整後（診断後）の精子群を凍結保存しておき、実際の治療時に融解し ICSI に用いるといった臨床応用が可能となる。また将来的に他施設からの凍結移送精液を用いて ICSI に適した精子の診断・調整を行い、凍結処理後にそれを返送し他施設にて融解後に治療的 ICSI を実施する、といった多施設共同での臨床応用の可能性も考慮される。本研究における良好精子選択法と選択された精子の凍結融解処理の影響について明らかにすることは非常に重要である。凍結融解精子を用いて実験と同様に精子受精能評価・染色体分析を実施し、凍結融解処理の影響について明らかにする。上記他施設との連携の場合を想定し、調整前 調整後の 2 度の凍結融解の影響も検討する。

#### 4. 研究成果

##### **実験 - 結果**

実験：下記 3 種の精子調整法、2 種の精子選別法の組み合わせによる高精度良好精子選択法の有効性に関する検討を行った。

精子調整法 A：密度勾配法、精子調整法 B：精液静置法、精子調整法 C：MACS 法  
 精子選別法：IMSI 法、精子選別法：HA-coated slide-binding assay

妊孕性の確認された正常一般精液所見を満たす提供精子（紙面での説明・同意を得ている）を用いて、上記精子調整法・精子選別法を併用し精子の選択を行った。精子調整法 A B の順に行うことにより、精子運動率（前進運動精子率）の上昇（実施前 42～65% 92～98%）が認められた。ただし精子調整法 A・B を単独で行った場合（A 群：88～95%、B 群：90～98%）と比較し有意差を認めなかった。また C の単独実施では精子運動率の低下を認めた（32～60%）。C の追加時期に関して、A B の前に実施した場合と後に実施した場合、DNA 損傷の割合が、前に実施した場合に有意に改善するとの先行研究があり、また後に C を追加した場合、運動率の低下を認めたことから、C A B の順で実施した後に精子選別法の順で実施する（ヒアルロン接着精子を回収し、高倍率観察下に正常形態精子を選別）こととし、データの集積を行った。精子選別法を実施することにより非実施群と比較し、ICSI に選択された精子の形態良好率（実施群：85～97%、非実施群：55～70%）の向上を認めた。また精子選別法を実施することにより染色体正常率の上昇傾向（実施群：92%、非実施群：85%）を認めたが、有意差を認めなかった。妊孕性の確認された正常一般精液所見を満たす提供精子を用いて検討を行ったため、無処理の状態でも精子染色体異常率が低く、有意差を認めるに至らなかった可能性が考えられた。なお、無処理の場合を含め各処理における染色体異常率に有意差を認めなかったため、本検討時点においては精子スコアリングを行う妥当性が認められなかった。

## 実験 - 結果

実験：高精度良好精子選択法の安全性についての検討（上記精子調整法・精子選別法に伴う処理・観察時間の影響に関する検討）

実験の各処理及び精子観察による大気下操作時間の延長に伴う悪影響について検討を行った。0 群：無処理、精子調整法 A B 実施（AB 群）A のみ実施（A 群）B のみ実施（B 群）C のみ実施（C 群）において、処理直後、4 時間後、8 時間後において、室内保存（室温・大気下）および CO<sub>2</sub> インキュベーター内保存（37 設定 5%O<sub>2</sub> 5%CO<sub>2</sub> 環境）での精子運動率について検討を行った。

	精子運動率（直後）	4 時間後（室内/培養器内）	8 時間後（室内/培養器内）
0 群	42～65	30～45 / 38～55	25～37 / 30～42
AB 群	92～98	72～90 / 80～92	32～65 / 70～88
A 群	88～95	68～87 / 82～90	35～67 / 72～90
B 群	90～98	70～92 / 85～94	45～65 / 75～85
C 群	32～60	21～47 / 30～55	15～32 / 25～40

(%)

精子処理後、室温・大気下での管理時間が延長することにより（37 設定・CO<sub>2</sub> インキュベーター内で管理した場合と比較し）運動率は低下するが、各処理の有無による差は認められなかった。ただし 8 時間後においても、形態良好運動精子を選択し、ICSI を実施した場合の精子染色体異常率は室内、CO<sub>2</sub> インキュベーター内とも 8%であったため、大気下での操作時間が 8 時間までであれば、ICSI における精子染色体に対する悪影響は否定的であることが示された。今後、さらに長時間における経時的な影響についても検討を行う必要があると考える。

## 実験 - 結果

新型コロナウイルス感染拡大に伴う実験遂行環境の悪化(実験動物の確保や消耗品の確保の困難性)より、研究の延期を余儀なくされ、さらに 2022 年 2 月 21 日および 2022 年 3 月 16 日の東日本大震災の余震による影響で実験動物舎の設備故障等により、実験の遂行は不可能の判断し、実験動物を用いない精子処理後の精子画像による良好精子選別法の可能性につき、画像データ収集および機械学習への応用の可能性につき検討を行った。精子調整 A および B 処理前後の精子画像セットを作成し、ヒトの目による診断の可否につき検討を行った。形態良好精子に対する画像の判断に関して学習効果を認めしたが、精子調整の有無および比重の判断に関しては学習効果を認めなかった(ヒトの目では判別不可能と考えられた)。今後、人工知能(ディープラーニング)による正常精子判定への応用の可能性について検討を行っていきたい。

## 実験 - 結果

妊孕性の確認された正常一般精液所見を満たす提供精子を用いて、精子調整法 C A B の順で行った後、運動精子を回収し、sperm freeze<sup>®</sup>(北里コーポレーション)を用いて 1~3 回の反復凍結融解を実施し、融解後精子選別法にて形態良好精子を選択し速やかにマウス卵に ICSI を実施した後、既報に従い精子染色体分析を実施した。正常染色体率は、無処理:92%、1 回凍結融解:92%、2 回凍結融解:92%、3 回凍結融解:90%であり、有意差を認めなかった。本検討結果から、少なくとも精子調整・選別後の精子に関して、繰り返し実施される凍結融解処理は精子染色体に悪影響を及ぼさない(あるいは悪影響のない精子を ICSI に選択できる)可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅沼亮太
2. 発表標題 受精障害への対応と治療前診断法の確立にむけて
3. 学会等名 第65回北日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 菅沼亮太 他 柴原浩章編集	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 153
3. 書名 生殖医療フロントライン 受精とその障害	

1. 著者名 菅沼亮太 他 柴原浩章編集	4. 発行年 2022年
2. 出版社 中外医学社	5. 総ページ数 209
3. 書名 生殖医療フロントライン EBMから考える生殖医療	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 俊文  (Takahashi Toshifumi)  (20302292)	福島県立医科大学・公私立大学の部局等・教授    (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------