

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791715

研究課題名(和文) 卵細胞質内精子注入法における高倍率下精子選別法の有効性・安全性に関する基礎的検討

研究課題名(英文) Study for effects of intracytoplasmic morphologically selected sperm injection

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：高倍率(3000倍)でヒト精子を観察し、精子頭部・中間部・尾部によって形態良好精子を選別し、卵細胞質内精子注入法(ICSI)を行う手法(IMSI)を実施する際、運動精子が選択されていれば、精子頭部・中間部・尾部の形態異常の有無によって、ヒト精子受精能・ヒト精子染色体異常率に差のない可能性が示唆された。IMSIを行う場合、3時間までの観察環境・観察時間は、ヒト精子受精能・ヒト精子染色体異常率に悪影響を与えないことが確認された。IMSIによる精子形態分類が、生殖医療(人工授精・体外受精・顕微授精)の予後予測因子となるか、今後も検体および臨床データを蓄積し検討を行っていく。

研究成果の概要(英文)：Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI) is a one of the special technique of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) for severe infertile male. Spermatozoa are selected and use for micro injection which are observed high magnification of an inverted microscope. There is no significant difference when we select motile sperm for IMSI, whichever it has abnormal head, midpiece, and tail. If we complete IMSI within 3hr after preparation, there is no harmful effects on human sperm fertilization ability and chromosomal aberrations. We should accumulate more data to determine the morphological selection using high power microscope is useful for choice of ART for fertility treatment.

研究分野：医師薬学

キーワード：生殖医療 卵細胞質内精子注入法 体外受精

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、重症男性不妊症患者が受精卵を得るための最も効果的な治療方法として広く臨床応用されているが、未だその受精率は 70-80% に留まる。年々 ICSI による治療周期数は増加傾向にある現状から、相当数の未受精卵が生じ、貴重な生殖資源が失われていると推測される。また、胚移植後の妊娠率は治療周期あたり 20% 程度にとどまっており、成績の改善が期待されている。加えて、治療をうける女性の高齢化が進む傾向にあり、卵巣予備能の低下 (卵巣機能の低下) 及び卵子の質の低下が考えられており、より良好卵子が得難い状況となることが予想される。良好卵が多く得られる状況では、ICSI の際選択された精子が、良好精子である偶然性に期待する方法である程度の妊娠率が期待されるが、卵子数が少数の場合、より高率に遺伝的に正常な精子を選別する方法が求められる。

近年ヒト ICSI において高倍率 (3000 ~ 6000 倍) で精子を観察し、精子頭部に空胞のない形態良好な精子を選別し卵内に注入する (intracytoplasmic morphology selected sperm injection: **IMSI**) ことにより、ICSI 後の妊娠率が向上し、流産率が低下すると報告され、临床上の有効性が期待されている。IMSI は、既に国内外の多施設において臨床応用されているが、その評価は定まっておらず、その有効性・安全性に関する検討は不十分であり、特に安全性に関する検討は急務である。

2. 研究の目的

本研究において、IMSI による精子形態分類法の再評価を行い、精子形態分類と精子機能との関連を評価し IMSI の有効性について評価する (**実験 (1)**) 。

また、IMSI の安全性に関する検討として IMSI の際の観察・操作環境が配偶子に与える影響について調べ、顕微鏡観察時間および配偶子の顕微授精前操作時間の安全域の設定を目的とする (**実験 (2)**) 。

さらに、現在、生殖医療の予後 (タイミング療法、人工授精法、体外受精法、等による妊娠の可否、妊娠率等) を予測する客観的な精子機能評価法がないため、IMSI による精子分類方法が生殖医療における治療予後予測因子および治療方針決定のための客観的な精子機能評価因子となりえるかどうかの検討を行う (**実験 (3)**) 。

3. 研究の方法

実験 (1) (IMSI の有効性についての検討): 妊孕性の確認された提供精子を用い、高倍率で観察/形態分類したヒト精子をマウス卵に ICSI し、精子形態と卵活性化率・前核形成率の関連性を調べ、精子機能評価法としての有効性について検討を行った。精子形態評価については、頭部・中間部・尾部の形態 (頭部: 空胞形成 4% 以上 / 4% 未満・中間部: 異常あり / なし・尾部: 異常あり / なし) によって分類した (各群 20 個以上の精子に対し検討を行った) 。

実験 (2) (IMSI の安全性についての検討): IMSI を行うにあたり (十分に技術的に習熟したとしても) 通常の ICSI に比べ、精子選別時に比較的長時間の観察時間を要する。長時間の観察による紫外線の影響、体外培養環境下 (空气中) に長時間曝されることによる配偶子への影響 (高 O₂ 濃度環境の影響、HEPES 緩衝溶液の影響など) が懸念される。

実験 (2) : IMSI 施行時における高倍率下観察時間の影響を確かめるべく、ヒト精子の顕微鏡下曝露時間を 15 分以内 ~ 180 分に設定し、それぞれ実験 (1) に従い形態分類したヒト精子を用いてマウス

卵に ICSI 後、前核形成率の評価・染色体分析を行い、顕微鏡下観察時間が精子核に及ぼす影響を調べることにより、IMSI 施行時の顕微鏡観察時間の安全域の設定を行った。

実験(2) : 体外培養環境による影響を確かめるべく、ICSI に用いる精子を空气中で前培養した場合と、CO₂ 5%・O₂ 5%・N₂ 90%環境下で前培養した場合で、培養時間の違い(30~180分で検討)がヒト精子染色体に及ぼす影響を調べることにより、IMSI 施行時におけるヒト精子の顕微授精前操作時間の安全域の設定を行った。

実験(3)(新たな精子機能評価法としての高倍率下精子形態分類の有用性を検討): 現在、生殖医療の予後(タイミング療法、人工授精法、体外受精法、等による妊娠の可否、妊娠率等)を予測する客観的な精子機能評価法がない。今回、研究期間中に当施設で生殖医療を受ける患者を対象とし、同意の得られた症例から精子の提供を受け、IMSI による精子形態評価の結果が生殖医療の予後予測因子となりえるかどうかの検討を行うため、検体の保存と臨床データの蓄積を行った。

4. 研究成果

実験(1)結果(IMSIの有効性についての検討): 運動性の確認された(生存精子と判定)ヒト精子を用いた ICSI の結果からは、頭部空胞形成の有無、中間部・尾部形態異常の有無によって前核形成率(各群 95 - 98%)・ヒト精子核由来染色体異常率(各群 8-10%)に有意差を認めなかった。非運動精子において、運動精子と比較し、前核形成率の低下(95% 38%)、染色体異常率の上昇(8% 75%)を認めたが、各精子形態分類による差を認めなかった。上述の精子形態分類による明らかな精子機能の

差異を認めなかったが、空胞の数や大きさの違いによる検討は行っておらず、頭部形態評価については検討の余地があると考え

実験(2)(IMSIの安全性についての検討):

実験(2) IMSI 用の観察環境下に精子をそれぞれ 15 分、30 分、60 分、120 分、180 分暴露した後、運動性の確認されたヒト精子をマウス卵に ICSI した際の前核形成率は各々 98%、100%、98%、98%、98% であり、有意差を認めなかったが、ヒト精子核由来の染色体異常率は、8%、10%、8%、12%、15% であり、有意差を認めなかったが時間経過に伴う異常率増加傾向が疑われた。

実験(2) : IMSI 観察環境下(空气中)と CO₂ 5%・O₂ 5%・N₂ 90%環境下でヒト精子を前培養した場合とで、30 分から 180 分の間では、ICSI 後の前核形成率(98-100%)および精子核由来染色体異常率(6-10%)に有意差を認めなかった。

既報においては観察時間に 6 時間以上を要した報告もあるが、臨床上ヒト ICSI を行う場合、卵に対する前培養時間の長期化による悪影響が懸念されるため、より短時間が理想であり、本研究における 3 時間以内での検討は妥当性があると考え。本研究結果からは、3 時間以内であれば IMSI による精子観察環境・観察時間はヒト精子機能(受精能・染色体異常率)に影響を与えない可能性が示唆された。ただし長時間観察による染色体異常率上昇の危険性が懸念されるため、より短時間であることが望ましいと考えられた。

実験(3)(新たな精子機能評価法としての高倍率下精子形態分類の有用性を検討): 本研究期間に、250 検体(198 症例)(うち人工授精: 132 検体(100 症例)) 体

外受精：80 検体（63 症例）、ICSI：38 検体（35 症例）の保存を行った。現時点において臨床成績の判明している（生児獲得あるいは治療を終了）症例は、15 症例（7.5%）である。今後も検体の追加を行うとともに、臨床成績データの蓄積を継続し、生殖医療による治療予後との相関関係についての検討を行う予定である。

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 2 件)

生殖補助医療（ART）の最前線 受精と受精障害 医学のあゆみ 249 巻 83 - 88 (2014)

日本アンドロロジー学会総会記事 33 巻 147 - 148 (2014)

〔学会発表〕(計 4 件)

第 66 回 日本産科婦人科学会総会学術講演会 2014 東京国際フォーラム 他

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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：00457764

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：