

顕微授精

星 和 彦

山梨医科大学産婦人科学講座

はじめに

配偶子に人為的な操作を加えることで受精を行わせ、妊娠に導く一連の技術は assisted reproductive technology (ART) と呼ばれる。ART の歴史は古く 1799 年の人工授精に始まるが、ART が一躍脚光を浴びたのはやはり体外受精・胚移植 (*in vitro* fertilization and embryo transfer; IVF-ET) である。1978 年 IVF-ET による妊娠・分娩の最初の成功が Steptoe と Edwards によって報告¹⁾されて以来、この技術は瞬く間に世界中に広まり卵管性不妊症・男性不妊症の治療法として定着し、これで不妊症の問題は全て解決するのではないかとさえ考えられた。試験管内での受精は *in vivo* に比べ確かに相当少ない精子ですむ。しかし、精子の回収法を工夫しても、培養環境をいかに改善しても *in vitro* でさえ受精が起こらない症例がなお存在するのは事実である。そしてこの問題を解決するために考え出されてきたのが顕微授精法である。IVF-ET は配偶子同士の遭遇を手助けするが受精そのものは自然の進行にまかせられていた。受精をも人為的に進行させようとする方法が顕微授精である。これは IVF-ET 以来の衝撃的な ART の登場である。

顕微授精法の種類

糖蛋白質からなる透明帯は大切な卵の保護層で、物理的・化学的そして生物学的刺激から卵

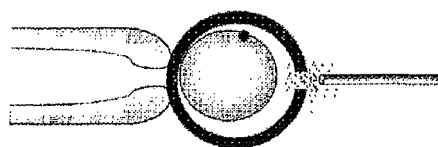
を守るばかりでなく、精子の先体反応を誘起したり多精子受精を阻止するなど、生殖過程において重要な役割を担っている。しかし精子にとっては受精過程での最大の barrier で、これを通してかどうか受精の成功を左右するといっても過言ではない。顕微授精法は主としてこの精子の透明帯通過を bypass させる手段がとられるため、①透明帯開口法、②囲卵腔内精子注入法、③卵細胞質内精子注入法、の 3 つの方法に大別される (図 1)。透明帯に小孔を開け精子の透明帯通過を容易にさせるのが透明帯開口法であり、顕微授精法の中では比較的手技が容易なため、妊娠・分娩の成功が早かった方法²⁾であるが、卵子表面を傷めたり、多精子受精の頻度が増加するなどの欠点が指摘されている。囲卵腔内精子注入法 (subzonal insertion of sperm; SUZI) は透明帯開口法よりも確実に精子を卵細胞表面に送り込むことができるので一時最も汎用されていた方法であるが、やはり多精子受精の問題は解決できなかった。卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) は最も古い歴史を持つ方法であるが、高度な技術を必要とし、卵細胞を直接操作することによる卵の損傷が心配されたためかヒトへの臨床応用は遅れていた。しかし、ベルギーからの驚異的な成功³⁾が伝えられて以来、一躍顕微授精法の主役に躍り出た感がある。

卵細胞質内精子注入法 (ICSI)

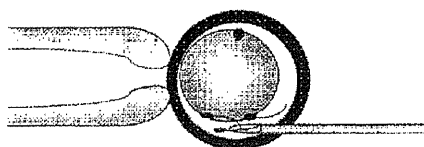
1 個の精子をマイクロニードルで卵細胞質内に直接送入して受精させる方法で、理論的には

受付 : 1996 年 10 月 23 日

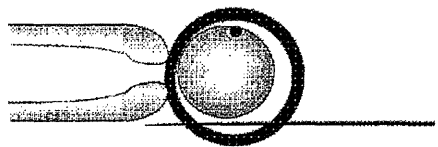
受理 : 1996 年 10 月 30 日



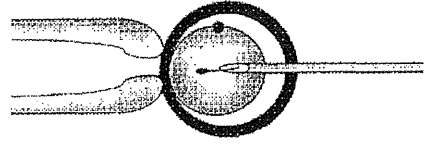
(1-1) 透明帯開口法
Zona drilling (ZD)



(2) 囲卵腔内精子注入法
Subzonal insertion of sperm (SUZI)



(1-2) 透明帯開口法
Partial zona dissection (PZD)



(3) 卵細胞質内精子注入法
Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

図 1. 顕微授精法

ZD : 酸性溶液を吹きつけることにより透明帯の一部を溶かして小孔を作る。

PZD : 細いガラス針で透明帯を串刺しにして切開創を作る。

SUZI : 囲卵腔に精子を注入する。

ICSI : 1 個の精子をマイクロニードルを用いて卵細胞質内に注入する。

表 1 . 卵細胞質内精子注入法の報告例

年	動物	注入精子	発生状況	報告者
1962	ウニ	生存精子	精子頭部の膨化	Hiramoto
1966	カエル	生存精子	前核	Graham
1976, 1977	ハムスター	死滅精巢上体精子	前核	Uehara & Yanagimachi
1983	マウス		胚盤胞	Market
1988	ウサギ	生存精子	産仔	Hosoi, et al
1988	ヒト	死滅精子	前核	Lanzendorf, et al
1990	ウシ	死滅精子	産仔	Goto, et al
1991	ウサギ	死滅精巢精子	2 ~ 3 細胞期	Yanagida, et al
1991	ヒト	生存精子	2 ~ 4 細胞期	淡路ら
1991	ハムスター, 他	凍結乾燥精子	前核	Yanagida, et al
1992	ヒト	生存精子	産子	Palermo, et al
1992	ハムスター, ヒト	脱水処理精子	前核	Katayose et al
1992	ハムスター	死滅精子	前核	Hoshi, et al
1992	ウサギ	熱処理精子	6 ~ 8 細胞期	Hoshi, et al
1993	ハムスター	精子細胞	前核 ~ 2 細胞期	Ogura, et al
1993	ヒト	生存精子	産子	Palermo, et al
1993	ヒト	生存精子	産子	Van Steirteghem, et al
1993	ヒト	生存・死滅精子	妊娠	Tanaka, et al
1993	ヒト	生存精子	4 細胞期 (妊娠)	Tucker, et al
1994	ヒト	生存精子	産子	Van Steireteghem, et al
1994	ウサギ	凍結乾燥精子	6 ~ 8 細胞期	Hoshi, et al
1994	ヒト	死滅精子	産子	Hoshi, et al
1995	ヒト	生存精子	産子	Hoshi, et al
1995	マウス	生存精子	産子	Kimura & Yanagimachi
1995	マウス	精子細胞	産子	Kimura & Yanagimachi
1995	マウス	第二精子母細胞	産子	Kimura & Yanagimachi
1996	ヒト	精子細胞	産子	Tesarick, et al

1個の精子さえあれば受精が可能になる。透明帯開口法や囲卵腔内精子注入法は、透明帯の通過はbypassするものの精子と卵(oocyte)との接着・融合すなわち「受精」は自然の進行にまかされている。ICSIは受精のprocessを全てbypassし、精子の卵への侵入そのものも人為的に行わせるもので前二者とはこの点が全く異なり、顕微授精本来の目的に最も合致した方法といえる。多精子受精の心配はなく、受精率も40～60%が期待でき、現在最も有望視されている方法といえる。

主な報告例を表1に示したが、哺乳動物のICSIはハムスターの精子核をハムスター卵に顕微注入(microinjection)して雄性前核形成を観察したUeharaとYanagimachiの研究に始まる⁴⁾。同種の配偶子を用いたICSIの報告は多数あるが、現在まで新生仔(児)が得られているのはウサギ、ウシ、ヒトそしてマウスだけである。Hosoiらは運動性のあるウサギ精子をウサギ卵に顕微注入して生存率62.6%、受精率46.2%、卵分割率29.7%、11個の胚を2羽の偽妊娠ウサギに移植して2羽の産仔を獲得している⁵⁾。ウシではGotoらが凍結後融解した精巢上体精子(immobilized and killed sperm)を顕微注入し、卵分割率12.0%、得られた胚を移植して産仔を得ている⁶⁾。細胞膜の物理的性状が他の動物種と異なるためか顕微注入後の生存率が不良でマウス卵のICSIはなかなかうまくいかなかったが、マウス卵用に改良された方法で産仔の獲得に成功したことが最近KimuraとYanagimachiから報告された⁷⁾。実験動物での成功はICSIの研究ひいては受精現象そのものの機序解明に寄与するところが大きく、今後の研究進展が期待されている。

ヒトではPalermoらが1992年に生存率81%、受精率82%、卵分割率47%の成績を報告し³⁾、得られた胚を7周期に移植して4例の妊娠、3例の分娩に成功している。1993年の彼らの論文によると、716個の卵にICSIを行い、77%の生存率、受精率44%、17%94個の胚が得られ、59個を移植して8例の妊娠、4生児を得たと報告

されている⁸⁾。同施設から出されたVan Steirteghemらの報告^{9,10)}はさらに驚異的である。150周期1,409個の卵にICSIを行い1,292個91.7%が生存、830個64.2%が受精し、641個49.6%が良好胚に発育し、596個の胚を135周期で移植して67例の妊娠例を得ている。妊娠率是对移植周期あたり49.6%、臨床的妊娠率も39.2%に上っている。さらにVan Steirteghemらは1994年に350症例の3,944個の成熟卵にICSIを行い、生存率86.2%(3,401/3,944)、受精率51.5%(2,033/3,944)、分割率35.8%(1,412/3,944)、妊娠率37.5%(130/347 ET)の成績を報告している¹¹⁾。著者らも1992年からICSIを臨床応用し、本邦第1例をはじめ多くの妊娠例を得て報告してきた¹²⁾(福島県立医科大学)。

ICSIは高度な技術を要する方法であるが、他の顕微授精法と異なり精子の運動性や先体反応とは無関係に適用できる利点がある。すなわち全く運動性が欠如して従来の概念では死滅していると表現される精子でも、DNAが正常でさえあれば使用できる。しかしICSIの問題点は顕微注入後に卵の活性化(activation)が十分に起こらず、受精進行の停止をしばしばみることである。通常の受精過程では、第二成熟分裂の中期で生物学的に静止した状態で排卵された未受精卵は、精子侵入と同時に賦活され生物学的活動を再開する。精子が卵の精子受容体(sperm receptor)に接着すると、G-proteinを介してphospholipase Cが活性化されイノシトール1,4,5三リン酸(IP3)の産生が促され、細胞内の小胞体からCa²⁺が遊離されその濃度が上昇して種々の細胞機能が賦活されるためと理解されている¹³⁾。第二極体が放出され、卵の核は雌性前核に精子の核は雄性前核に発育し、やがて両前核は卵の中央で融合して受精が完了する。しかしICSIでは通常の受精過程とは全く異なる機序で精子が卵に侵入する(させられる)ためか、この活性化が生じにくくなる。両生類などでは針で刺激するだけで未受精卵に単為発生(parthenogenesis)が生じるように、

ICSI でも物理的刺激すなわち injection needle を卵に刺入すること自体が活性化誘起になりうるが、さらに積極的な賦活法を加えねばならない場合が生じる。活性化を促す物質の一つとして細胞膜の Ca-channel に作用して細胞外の Ca^{2+} を細胞内に流入させる Ca-ionophore が知られている¹⁴⁾。Goto らがウシの ICSI にこの Ca-ionophore を応用している⁶⁾し、著者らが本邦で初めて妊娠・分娩に成功した際にも用いられている¹⁵⁾。そのほかの化学物質として直接細胞核に働いて第二極体を放出させるといわれる ethanol があるが、細胞毒性が強くこれが用いられることはあまりない。細胞が一定の強さの電界内に置かれると、細胞膜を構成するリン脂質の二重層の分子配列に乱れが生じ、細胞膜に直径0.5–4 nm の極めて小さな間隙ができる。このような現象は electroporation と呼ばれ、細胞融合や単為発生の研究に利用されている。Electroporation を ICSI 卵の活性化誘起に利用しようとするのが electrostimulation 法である。著者らの検討では375 V/cm, 100 μsec の DC pulse を one shot で与えるのが効果的で

あった¹⁶⁾。

どのような状態の精子を ICSI に用いたらよいかについても定説はない。通常の受精経過を詳細に観察すると、卵細胞内に取り込まれた直後の精子は原形質膜が取り去られて運動性が消失している。そのため、ICSI では最初から不動化させた精子を注入した方が良いようにも思われる。著者らは不動化させた（死滅化させた）精子、運動性を有したままの精子、そして射精時既に死滅している精子（necrozoospermia）について、いくつかの卵活性化法とも組み合わせて検討してみた。結果は表2にまとめたが、成績が最も良かった（受精率・分割率・妊娠率）のは運動性のある精子を用いたものであった。不動化精子（この場合は凍結・融解操作を行うことで運動性をなくしている）を用い、Ca-ionophore や electrostimulation で積極的に活性化を誘起した群の成績がそれに続いている。ベルギーのグループ（Palermo ら^{3,8)}と Van Steirteghem ら⁹⁾）も動きをわずかに抑えた運動精子を顕微注入して良好な成績をあげており、ヒトの ICSI ではできるだけ運

表2. 卵細胞質内精子注入法（ICSI）の成績
（福島県立医科大学，1995年12月現在）

精子の状態	卵賦活法	治療周期	卵総数 ^α	生存卵 ^β (β/α)	受精卵 ^γ (γ/β)	分割卵 ^δ (δ/β)	妊娠例 (/胚移植周期)
不動化精子	細胞質の吸引のみ	14	64	48 (60%)	29 (60%)	11 (23%)	0 (0%)
	Ca-ionophore	42	221	169 (77%)	107 (63%)	69 (41%)	2 (5.9%)
	electrostimulation	14	49	42 (86%)	27 (64%)	19 (45%)	0 (0%)
運動精子	細胞質の吸引のみ	157	949	786 (83%)	496 (63%)	431 (55%)	15 (10.1%)
	electrostimulation	6	38	32 (63%)	21 (63%)	20 (62%)	0 (0%)
不動精子	細胞質の吸引のみ	14	82	67 (82%)	23 (34%)	19 (28%)	0 (0%)

動性のある精子を使用し、運動性のない精子を用いざるを得ない場合は卵細胞に対し積極的に活性化処置を加えるのが良いようである。

顕微授精の臨床応用とその適応

現段階における顕微授精法の適応については1994年に日本産科婦人科学会が示した“顕微授精法の臨床実施に関する見解”のなかで以下のように定められている¹⁷⁾。

「本法は、難治性の受精障害で、これ以外の治療によっては妊娠の見込みがないか極めて少ないと判断される夫婦のみを対象とする。」

すなわち、通常の体外受精・胚移植を施行しても受精の認められない受精障害の症例や、通常の体外受精・胚移植が行えないほどの高度の乏精子症・極端な精子無力症が対象となる。

未熟な精子や精細胞を用いた顕微授精

精巣上体精子や精巣精子を用いたICSIでの妊娠・分娩例も報告され¹⁸⁾、未熟な精子や精細胞への応用も進みそうである。乏精子症のみならず、閉塞性無精子症の症例でも精巣上体や精巣から精子を採取する事でICSIが可能になる¹⁹⁾。さらに原発性無精子症の20-30%には精巣に円形精子細胞が存在し、この未熟な精細胞によるICSIも可能である。円形精子細胞は形態的には精子と全く異なった細胞であるが、既に減数分裂は完了しており、染色体は精子と同じhaploid (半数体) である。従ってこの円形精子細胞を卵細胞質内に注入すれば原発性無精子症であっても正常な受精卵を獲得することが出来る。精子細胞による受精、及びその発生能に関する研究のパイオニアはOguraとYanagimachiである。彼らはハムスターを用いて裸核化した精子細胞核をあらかじめ電気刺激により活性化した卵細胞質内に注入し、生存卵のほぼ全てに精子細胞核由来の前核が形成されるこ

と、その前核がDNAの合成能を有していることを報告し²⁰⁾、次いでマウス精子細胞をマウス卵子の囲卵腔に注入 (SUZI) した後に電気刺激を加え細胞融合で得られた2細胞期胚を移植して産仔を得、精子細胞の受精能、発生能を初めて証明した²¹⁾。その後、KimuraとYanagimachiはマウス円形精子細胞の卵細胞質内注入 (ICSI) により産仔を得ている²²⁾。

精細胞 (spermatogenic cell) がどの成熟段階で発生のための準備を終えるかは未だ明らかにされていない。哺乳類では正常な胚発育のために雌雄それぞれの配偶子で異なったgenomic imprinting がなされることが必要とされている^{23,24)}が、それがいつ始まりいつ完了するかは不明である。最近、KimuraとYanagimachiはマウスの第2精母細胞核をマウスの未受精卵内に注入し、産仔が得られたこと報告している²⁵⁾。第2精母細胞は減数分裂途中の細胞で、その染色体は精子あるいは精子細胞 (1N haploid) の2倍のDNAを有している (2N haploid)。卵細胞質内に注入された第2精母細胞核の染色体は先ず premature chromosome condensation を起こし、その後染色体に microtubules が付着して spindle が形成される。この時期に人為的に卵子を活性化すると、卵子核の減数分裂とともに精母細胞核も減数分裂し、卵子の第二極体放出現象と同様に精母細胞由来の極体も放出され、残った半数の染色体同士が融合して正常核型 (2N diploid) の受精卵が得られるという画期的な実験である。正常な産仔が獲得されたことから、第2精母細胞の段階で精細胞は genomic imprinting を終了していることが証明された。今後はさらに前段階の第1精母細胞や精原細胞の発生能に関する研究が進むものと期待されている。

さすがに精母細胞を用いた例はないが、円形精子細胞の卵細胞質内注入は既に一部の施設で臨床応用されている。しかし、異常核型胚出現の危険性の問題は未解決であり、日本不妊学会の倫理委員会報告でも「円形精子細胞の補助生殖技術への臨床応用には動物実験を含む基礎的

な研究が不足していることから、これらの問題の解明を待って実施されるべきであり、日本不妊学会倫理委員会としては我が国における本法の臨床応用に慎重であることを希望する」との見解が出されている。臨床応用に際しては今後とも実験動物での更なる基礎研究の積み重ねが不可欠である。

おわりに

現在、難治性不妊症の治療法として最も期待され注目されているのが ICSI である。本法を用いれば成熟精子はもちろん未熟精子や死滅精子でも受精が可能となり、従来の reproduction に対する概念や生命そのものに対する考え方を変えてしまう可能性も生じている。1993年に顕微授精法の臨床応用を日本産科婦人科学会に登録したのは47施設で、顕微授精全体によるその年の分娩数は130例（出生児149例）と報告されている。1995年3月現在の登録は87施設に増え、出生児数も698例と増加の一途をたどっている（表3）。インフォームドコンセントはもちろん、社会からのコンセンサスも十分得られるよう配慮しながら、難治的不妊症の治療法として発展させていくべきであろう。

表3. 顕微授精の治療成績

	'92	'93	'94
患者総数	610	1,780	3,804
治療周期総数	963	2,608	5,510
妊娠数	42	176	759
移植当たりの妊娠率	810%	14.4%	18.4%
採卵当たりの妊娠率	4.5%	7.2%	14.2%
生産分娩数	30	130	559
生産率(移植当たり)	517%	10.2%	13.6%
出生児数	35	149	698

文 献

- 1) Steptoe P, Edwards RG. Birth after the reimplantation of human embryo. *Lancet* 1978; **2**: 336.
- 2) Malter HE, Cohen J. Partial zona dissection of the human oocyte: a nontraumatic method using micromanipulation to assist zona pellucida penetration. *Fertil Steril* 1989; **51**: 139-148.
- 3) Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; **340**: 17-18.
- 4) Uehara T, Yanagimachi R. Microsurgical injection of spermatozoa into hamster eggs with subsequent transformation of sperm nuclei into male pronuclei. *Biol Reprod* 1976; **15**: 467-470.
- 5) Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K, Iritani A. Development of rabbit oocytes after microinjection of spermatozoa. *Proc 11th Cong Anim Reprod AI (Dublin)* 1988; 3 abstr: 331.
- 6) Goto K, Kinoshita A, Takuma Y. Fertilization of bovine oocytes by the injection of immobilized, killed spermatozoa. *Vet Rec* 1990; **127**: 517-520.
- 7) Kimura Y, Yanagimachi R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol Reprod* 1995; **52**: 709-720.
- 8) Palermo G, Joris H, Derde MP, *et al.* Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1993; **59**: 826-835.
- 9) Van Steirteghem AC, Liu J, Joris H, *et al.* Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycle. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1055-1060.
- 10) Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, *et al.* High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1993; **8**: 1061-1066.
- 11) Van Steirteghem AC, Nagy Z, Liu J, *et al.* Intracytoplasmic sperm injection. *Bailliere's Clinical Obstet Gynecol* 1994; **8**: 85-93.
- 12) Hoshi K, Yanagida K, Yazawa H, *et al.* Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon. *Fertil Steril* 1995; **63**: 1241-1245.
- 13) Miyazaki S, Shirakawa H, Nakada K, Honda

- Y. Essential role of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor / Ca^{2+} release channel in Ca^{2+} waves and Ca^{2+} oscillations at fertilization of mammalian eggs. *Dev Biol* 1993; **158**: 62–78.
- 14) Hoshi K, Yanagida K, Sato A. Pretreatment of hamster oocytes with Ca^{2+} ionophore to facilitate fertilization by ooplasmic microinjection. *Hum Reprod* 1992; **7**: 871–875.
 - 15) Hoshi K, Yanagida K, Yazawa H, *et al.* Pregnancy and delivery after intracytoplasmic injection of an immobilized, killed spermatozoon into an oocyte. *J Assist Reprod Gene* 1994; **11**: 325–326.
 - 16) 柳田 薫, 木村康之, 片寄治男, ほか. ハムスターとヒト卵子における electrical stimulation による egg activation. *哺乳卵学誌* 1993; **10**: 86–87.
 - 17) “顕微授精法の臨床実施に関する見解” に対する解説. *日産婦誌* 1992; **44**: 129–130.
 - 18) Silber SJ. The use of epididymal sperm in assisted reproduction. In: Tesarik J, ed. *Frontiers in endocrinology*, vol. 8 Male factor in human infertility. Rome: Ares-Serono Symposia Publications, 1994; 335–367.
 - 19) Nagy Z, Silber S, Liu J, *et al.* Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1995; **63**: 808–815.
 - 20) Ogura Y, Yanagimachi R. Round spermatid nuclei injected into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol Reprod* 1993; **48**: 219–225.
 - 21) Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci* 1994; **91**: 7460–7462.
 - 22) Kimura Y, Yanagimachi R. Mouse oocytes injected with testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* 1995; **121**: 2397–2405.
 - 23) Monk M. Genomic imprinting. *Genes Dev* 1988; **2**: 921–925.
 - 24) Solter D. Differential imprinting and expression of maternal and paternal genomes. *Ann Rev Genet* 1988; **22**: 127–146.
 - 25) Kimura Y, Yanagimachi R. Development of normal mice from oocytes injected with secondary spermatocyte nuclei. *Biol Reprod* 1995; **53**: 855–862.