

序

体外受精-胚移植は今日の生殖医療になくてはならない治療法となっています。1978年7月25日、イギリスの Oldham 病院にて Louise Joy Brown が誕生しました。母親は2回の子宮外妊娠で両側の卵管切除を受けており、同病院の婦人科医の Patrick Christopher Steptoe 医師が体外受精-胚移植を提案し、生物学者の Robert Geoffrey Edwards とともに体外受精を行い、世界で最初の体外受精児が誕生したのです。体外受精の基礎研究は Shenk (1878) がモルモットを用いて、卵胞液と子宮内膜上皮とともに卵胞卵子を精巣上体精子で媒精したことに始まりますが、その後の約70年間は受精の研究が進まず停滞していました。これは受精に必要な受精能獲得を認識できなかったからに他なりません。1951年に Austin と Chang がそれぞれの研究によって、受精に必要な精子側の条件である受精能獲得を発見し同じ年に報告しました。この発見によって、その後はウサギをはじめとして体外受精で受精卵が次々と得られるようになり、研究が急速に進み、Edwards と Steptoe のヒト IVF での成功に繋がったのです。

現在実施されている体外受精の受精率はおおよそ70%であり、そのことを多くの医療者は当然のように受け止めています。生理的な体内での卵管受精では卵子の周囲に存在する精子は10~100個程度ですが、体外受精では100,000個以上の精子で媒精しなければなりません。それなのになぜ受精率が100%にならないのでしょうか。受精のプロセスが本当に解明されているのであれば、体外受精の受精率も格段に向上するはずです。つまり、受精機構は今なおその多くがブラックボックスの中にあるということを認識しなければなりません。さらに、最近の研究では受精の仕方がその後の胚の発生に影響することも指摘されており、どのように受精するか、受精させるかをコントロールしなければならない時代に入ってきていると思われます。

そのような受精を取り巻く環境の中、本書は生殖医療の中での受精を意識して、受精を理解するために最新の知見をふまえて、基礎と臨床の立場からそれぞれのテーマの第一人者に平易に解説していただきました。受精-胚発生-着床という流れの中では、少し影が薄かった受精ですが、始まりだからこそ重要であるという認識を持つことは、今後の生殖医療に大いに貢献すると思われます。生殖医療に携わる ART クリニックや不妊治療センターなどの医師、看護師、胚培養士、生殖カウンセラーなどの医療従事者の皆様には、本書で理解を深めてチーム全体のレベルアップを図っていただければ幸いです。

最後に、この Mook の企画編集の機会を頂いた編集主幹の柴原浩章先生に、そして中外医学社の関係者の方々にお礼を申し上げます。そして、この素晴らしい内容の本書の執筆者の皆様に深甚の謝意を表します。

令和4年10月

国際医療福祉大学大学院教授/リプロダクションセンター長
柳田 薫

1. 受精能について

受精能とは、第二次世界大戦後少し経った頃に別々に示された2つの研究成果^{1,2)}を基に、今に至るまで多くの生殖分野の医療者や研究者に広く共有されている哺乳類精子の受精に関わる機能についての概念である。すなわち、精液中の精子や精巣上体尾部から採取した精子はそのままでは卵と受精することができないが、雌性内性器から得た精子や至適条件下で培養された精子は卵と受精することができるという観察の結果¹⁻³⁾として、哺乳類精子は受精できない状態から受精できる状態に変化し、この変化において受精する能力を有するようになるということである。この卵と受精できる能力を受精能とよび、受精能を有するようになることを受精能獲得（キャパシテーション：capacitation）とよんでいる。

2. 先体反応と超活性化運動

では、受精能とは具体的にどのような反応を指すのであろうか。正確には、現在に至ってもその研究が続いているといえ、統一的な結論が出ているとはいえない。けれども、受精能獲得の過程で精子に認められる現象や受精能をもった精子が示す現象がいくつか報告されている⁴⁻⁶⁾。その代表は、精子頭部で起こる先体反応と運動の変化である超活性化運動であろう。先体反応は、精子頭部の先体領域にある先体胞のエクソサイトーシスで、先体胞中に含まれるプロテアーゼなどの加水分解酵素が放出されるという現象である。先体反応は、古くから透明帯に接触したときに起こると考えられてきたが、透明帯に接触する前から起こっているという説も唱えられている。どちらにせよ、先体反応により加水分解酵素が放出され、卵外被を構成する卵丘細胞層を除き、透明帯を消化しつつ通過するための穴をあける。さらに、先体反応後の精子頭部には卵への結合・融合装置（Izumo など）が表出し、卵と精子の結合と融合が起こる。

もう一方の現象である超活性化運動は、精子が受精能をもつようになる過程で起こる運動変化である。培養条件下で精子の運動を観察すると、概要として初め活性化運動とよばれる運動を、その後超活性化運動とよばれる運動を観察することができる（図1, 2）。活性化運動から超活性化運動への運動変化は数時間にわたって徐々に起こる。この変化に必要な時間は動物によって異なる。また、その運動の様式も動物ごとに違いがあるが⁴⁾、概ね活性化運動は前進性が高く、超活性化運動は前進性が低いという共通した特徴がある。ハムスター精子は、培地に懸濁されると頭部を小さく振り、全体としては円を描きながら前進する活性化運動を示して泳ぎ出す（図1）。他方、マウス精子では頭部を小さく振り、全体としては直線的に前進する活性化運動を示して泳ぎ出す（図2）。ハムスター精子もマウス精子も活性化運動をした後、そのまま数時間にわたって培養を続けると受精

正常形態率と負の相関関係にある⁹⁾。精子 DNA 断片化の原因として、全身性の酸化ストレスが原因の 1 つとして考えられている。このような酸化ストレスに対し、食事やサプリメントにより抗酸化物質を摂取し、酸化ストレスを軽減 (解消) することで DFI 値を下げる事が提唱されており⁴⁾、今後の研究の進展と不妊症治療への効果が期待されている。

文献

- 1) González-Marín C, Gosálvez J, Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci.* 2012 ; 13 : 14026-52.
- 2) Aoki VW, Moskovtsev SI, Willis J, et al. DNA integrity is compromised in protamine-deficient human sperm. *J Androl.* 2005 ; 26 : 741-8.
- 3) Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in humans. *Cong Anom.* 1994 ; 34 : 1-12.
- 4) Wright C, Milne S, Leeson H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress : modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2014 ; 28 : 684-703.
- 5) Evenson DP, Darzynkiewicz Z, Melamed MR. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science.* 1980 ; 240 : 1131-3.
- 6) Evenson DP, Jost LK, Corzett M, et al. Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever : a case study. *J Androl.* 2000 ; 21 : 739-46.
- 7) Sánchez-Peña LC, Reyes BE, López-Carrillo L, et al. Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in Mexican agricultural workers. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 ; 196 : 108-13.
- 8) Matsuura R, Takeuchi T, Yoshida A. Preparation and incubation conditions affect the DNA integrity of ejaculated human spermatozoa. *Asian J Androl.* 2010 ; 12 : 753-9.
- 9) Yang H, Li G, Jin H, et al. The effect of sperm DNA fragmentation index on assisted reproductive technology outcomes and its relationship with semen parameters and lifestyle. *Transl Androl Urol.* 2019 ; 8 : 356-65.
- 10) Speyer BE, Pizzey AR, Ranieri M, et al. Fall in implantation rates following ICSI with sperm with high DNA fragmentation. *Hum Reprod.* 2010 ; 25 : 1609-18.
- 11) Chi HJ, Kim SG, Kim YY, et al. ICSI significantly improved the pregnancy rate of patients with a high sperm DNA fragmentation index. *Clin Exp Reprod Med.* 2017 ; 44 : 132-40.
- 12) Gandini L, Lombardo F, Paoli D, et al. Full-term pregnancies achieved with ICSI despite high levels of sperm chromatin damage. *Hum Reprod.* 2004 ; 19 : 1409-17.
- 13) Evenson D, Wixon R. Meta-analysis of sperm DNA fragmentation using the sperm chromatin structure assay. *Reprod Biomed Online.* 2006 ; 12 : 466-72.

〈小林 護 吉田 淳〉

生命誕生の第一歩は、雌雄の配偶子である精子と卵子が受精することである。受精が障害されればその後の胚発生は起こらず、受精卵（胚）として子宮に着床することはない。卵巣から排卵された卵子と腔内に射精された精子が卵管内で正常に受精するためには、生体内の巧妙な仕組みが必要である。受精には、精子と卵子ともに適した条件や時間帯があり、特に卵子では排卵後からの時間が重要である。一方、母体の加齢は女性の妊孕力の低下の原因として重要であるが、受精障害は母体の加齢による卵子の質の低下に起因する可能性がある。本稿では、ヒト体外受精（*in vitro* fertilization: IVF）治療における、さまざまな卵の加齢（aging）が受精に与える影響について概説する。



1. 卵の加齢 (oocyte aging) の定義

卵の加齢について定義をする **表1**。卵の加齢には、排卵前の卵の加齢（pre-ovulatory oocyte aging）と排卵後の卵の加齢（post-ovulatory oocyte aging）がある¹⁻³⁾。排卵前の卵の加齢は母体年齢の増加（加齢）に伴うものであり、排卵後の卵の加齢は、黄体化ホルモンやヒト絨毛性ゴナドトロピン（human chorionic gonadotropin: hCG）などの生理的、または人工的な排卵刺激により排卵した卵子がすぐに受精せず、卵管内または体外において一定時間経過するものを示す。前者は遅延受精に相当し、後者はIVF治療に相当する。

卵の加齢，“oocyte aging”をPubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>)などで文献検索すると、“排卵前”または“排卵後”の両者の卵の加齢がヒットする。また、卵の加齢に関する論文を詳細に読むと、卵子レベルでの変化について両者を混同して引用している場合が少なくない。その理由として、いずれの卵の加齢においても、受精や受精後の胚発生に対する影響や細胞レベルでの変化が一部共通であることが考えられる。しかしながら、「排卵前の卵の加齢」と「排卵後の卵の加齢」において、共通の変化が起きていることが知られている一方、おのおのの卵の加齢のメカニズムについては不明点が多く、必ずしも同じメカニズムが関与しているとはいえない^{2,3)}。すなわち、これらの卵の加齢による変化を別々に論じる必要がある。

表1 Aging 卵の種類と臨床的意義

Aging 卵の種類	説明	臨床的意義
排卵前の加齢卵	母体の年齢の増加（加齢）	高齢女性における不妊治療など
排卵後の加齢卵		
<i>In vivo</i> aging 卵	排卵後卵管内での時間経過	ヒトでは遅延受精に相当する
<i>In vitro</i> aging 卵	採卵後体外培養での時間経過	IVF 治療における前培養または媒精（ICSI）までの時間

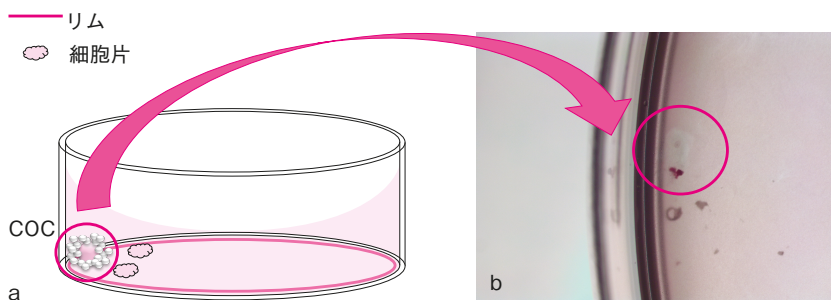


図3 シャーレの場所により見え方が異なる

a: シャーレ中央付近と比較すると、壁際は液面が高いため COC がみえにくい。

b: シャーレの壁とリムにより壁際が暗いため COC がみえにくい。

どめることが望ましい。

■ みえにくい場所に注意を払う

シャーレの壁 (well) は底面に対して垂直になっていることが多く、卵胞液を入れた場合、表面張力によりシャーレ中央部分よりも液面は高くなるとともに細胞片や泡が集まりやすい。また、底面の外周には傷防止やシャーレを重ねた際に安定させるためのリムがあり、リムとシャーレ底面の縁は暗く、影になりやすいため視認性が悪い (図3)。このように視認性が悪い場所では見落としが発生しやすいため、予め把握したうえで注意深く観察する。

4. 前培養

一般的に LH サージ開始後 36~40 時間程度で排卵が起こる。しかし、体外受精の場合、排卵する前に卵子を採取するため、排卵卵子と比較すると未成熟な可能性がある。そのため受精操作を行う前に数時間程度、体外培養することがある (前培養)。前培養時間は LH サージから採卵するまでの時間、受精方法 (C-IVF の場合、精子が侵入するまでの時間を前培養としてとらえることも可能) などを考慮して決められている。またシャーレ上で COC の卵丘細胞層を伸展させ、卵核胞や第一極体の有無から核成熟を確認することで未成熟卵子だけを分別し、前培養時間を延長することもできる。しかし、第一極体を確認できたからといって、卵子の成熟が完了しているとはいえない。卵子の成熟を考えるうえで細胞質成熟も重要であり、未熟な場合は前核形成などが不良となる。また、核成熟と細胞質成熟は同時に完了するわけではなく、時間的ギャップがある。その一例として、第一極体放出後 (核成熟が完了)、紡錘体が一時的に消失する間期が存在し、ICSI 症例ではあるが、消失している期間に精子を注入された卵子は、紡錘体を観察できている卵子と比較して受精率が低下する。しかし、間期後に紡錘体の出現した卵子では受精率の低下はみられないとの報告がある¹⁰⁾。

5. 媒精作業

媒精だけでなく検卵を含めたインキュベータ外の作業は短時間で行うと同時に、培養液の温度管理にも注意を払う必要がある。

■ 人為的卵活性化処理のタイプ

1) Artificial oocyte activation (AOA)

前回の ICSI で受精障害となったケースや、受精障害が予測されるケースに対して行う。後者の場合には、不動精子の場合や奇形精子の場合がある。また、卵活性化処理を行うタイミングは、ICSI の前後 30 分以内が報告されている。

2) Rescue oocyte activation (ROA)

ICSI 後 4~5 時間で卵子を観察して第二極体の放出を確認できなかった場合、受精障害が濃厚に考えられるとして人為的卵活性化処理を追加する。ICSI 後、卵活性化が起こらず 4~6 時間経過すると精子頭部が PCC を起こすことがあり、その場合は染色体が障害される。よって、遅いタイミングでの ROA は好ましくない。また、ICSI 後、速やかに精子-卵子相互作用が進行するように確実な精子不動化処理が重要となる。また、卵活性が起きない卵子内にある脱凝縮した精子頭部は premature chromosome condensation (PCC) を起こすことがある。ヒト精子をマウス卵子に顕微注入すると卵子が活性化していない状況では、ICSI 後 4~5 時間経過すると精子核が PCC を起こしてくると報告されているので、ROA のタイミングは PCC が誘起される前がよい。



5. 人為的卵活性化処理法

臨床研究として実施されている方法は、カルシウムイオノフォア (A23187 や ionomycin) 処理、電気刺激法 (electroporation, electrostimulation ともいう)、およびストロンチウム処理、puromycin 処理などがある **表 3**。これらの方法はいずれも ICSI の受精障害例に対して実施され、分

表 3 臨床研究で使用されている卵活性化法

卵活性化法 (妊娠・分娩報告例)	特徴 (卵活性化機序など)
A23187 (Hoshi, 1995)	カルシウムイオノフォア A23187 を含む培養液で卵を培養する。細胞外カルシウムを細胞内に導入し、単発性の卵細胞質内一過性カルシウムイオン上昇を介して卵を活性化する。カルシウムオシレーションは発生しない。処理によるカルシウムイオンの上昇は処理後約 1 分で最大に達してから漸減し、3~5 分で元に戻る。 妊娠・分娩例多数あり。
ionomycin (Moazo, 2006)	カルシウムイオノフォア 作用機序は A23187 と同じ、作用は A23187 より強い。カルシウムオシレーションは発生しない。 妊娠・分娩例あり。
Electrical stimulation (Electroporation) (Yanagida, 1999)	細胞融合装置の電極間にパルス電圧を印加して生じた電界によって、電極間に置かれた卵の細胞膜に多数の小孔が形成され、細胞外カルシウムイオンが卵細胞内に導入され卵が活性化される。小孔はすぐに修復、閉じられる。卵細胞質内カルシウムイオン上昇は一過性でカルシウムオシレーションは発生しない。カルシウムイオン濃度の変化は刺激直後から急増し 1 分以内に最大値となり、3~5 分で元のレベルに戻る。 妊娠・分娩例あり。
Strontium chloride (Yanagida, 2008)	Sr^{2+} (Ca^{2+} free) を含む培養液で培養し、その後通常の培養液で培養する。 マウスではカルシウムオシレーションが起こるが、ヒトでは確認されていない。 妊娠・分娩例あり。
Puromycin (Murase, 2004)	蛋白合成阻害作用により MPF の合成を抑制することによる。 A23187 との併用例が報告されている。 妊娠・分娩例あり。

conventional IVF, ICSI (intracytoplasmic sperm injection) において、正常受精は媒精後、約 16～20 時間後に倒立顕微鏡にて 2 個の前核 (PN) の出現の観察によって決定される。しかし、時に PN が確認できない (0 PN)、1 個 (1 PN)、または 3 個 (3 PN)、もしくはそれ以上観察される異常受精もみられる¹⁾。一般的に 1 PN, 3 PN は半数体、多倍体の染色体異常胚とみなされ、胚移植は行われないことが多い。

当院での過去 3 年間のそれぞれの出現率は、0 PN が 16.2% (2,333/14,363)、1 PN が 3.1% (447/14,363)、3 PN が 2.7% (386/14,363) であった (図 1)。



1. 0 PN (受精未確認胚)

受精の指標となる雌雄前核は媒精後約 23 時間で消失するが、早い場合は 17 時間で消失する場合もある。定時での受精確認では、9.7% の前核早期消失胚を非受精と誤判定しているとの報告もある²⁾。タイムラプスでは連続して顕微鏡焦点を変更した撮影ができ、動画処理を行い、動画と静止画で観察ができるため前核早期消失胚を非受精との誤認は起こらない³⁾。

胚盤胞到達率について Chen らの報告では、6,466 個の胚のうち 1,121 個が胚盤胞に達し、0 PN 胚は 18.2% (204/1,121) であった。そして顕微授精のほうが、通常の体外受精に比べて胚盤胞形成率は低かった。受精確認は媒精後 16～18 時間後に行っていた⁴⁾。Fu らは、2 PB で 0 PN の胚盤胞到達率は 69.17% であり、その凍結融解胚移植の臨床妊娠率は 56.25%、着床率 47.62% で 2 PN (正常受精) (59.79%, 47.24%) と比べても有意差はなく、臨床的価値をもつと報告している⁵⁾。

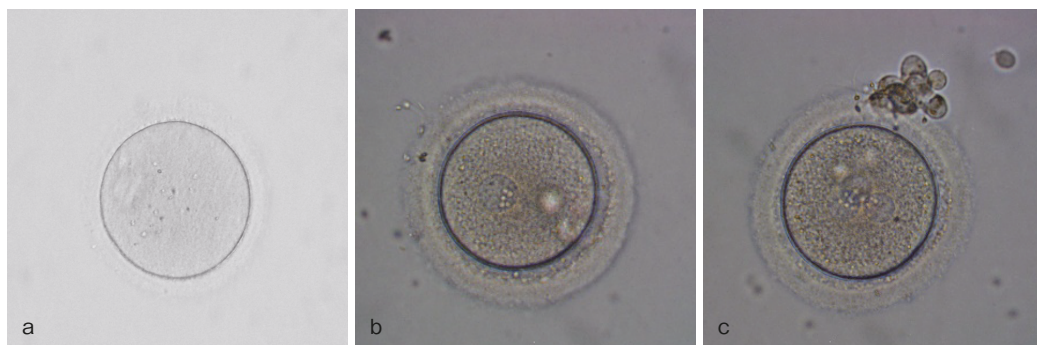


図 1 0 PN, 1 PN, 3 PN 写真

- a: 0 PN (前核が 0 個)
- b: 1 PN (前核が 1 個)
- c: 3 PN (前核が 3 個)