

## 最新のトピックス

## 生殖補助医療の最新技術 ~ICSI から IMSI へ

信州大学医学部産科婦人科学教室

岡 賢 二

## I はじめに

体外受精法のなかでも卵細胞質内精子注入法 (intra cytoplasmic sperm injection, ICSI) は1個の精子さえあれば、高率に受精卵が得られるため、重症な乏精子症をはじめとした男性不妊症に対して画期的な治療法である。しかし、ICSIにおける精子の選別は、400倍の視野で運動性を基準に選んでいるに過ぎず、自然妊娠における数億分の1の選択に比べれば不十分と言わざるを得ない。

この点を補う可能性がある方法として、近年、超高倍率観察下に選別された形態良好精子を用いた顕微授精である IMSI (intracytoplasmic morphologically selected sperm injection) が注目されている。微分干渉による光学1,000倍にデジタルズームを組み合わせて6,000倍の観察が可能な高分解能顕微鏡を用いた方法である。

## II 体外受精・胚移植の成功から顕微授精法の登場まで

2010年、Robert Edwardsが体外受精・胚移植 (in vitro fertilization and embryo transfer, IVF-ET) に関わる業績に対してノーベル医学生理学賞を受賞した。生物学者であった彼が、産婦人科医で腹腔鏡手術を得意とした Patrick Steptoe と協力して、世界初の IVF-ET による妊娠・出産を成功させたのは1978年のことであった。両側卵管を摘出された女性に対して腹腔鏡下に卵巣より卵子を回収し、体外で受精させた後、子宮に移植し着床させたのである。この画期的な技術の成功により、難治性不妊のほとんどは解決したかのように思われた。しかし、その後の検討により高度の乏精子症や無精子症、精子無力症など重症男性不妊症症例には効果が乏しいことが報告された。IVF-ET における受精の過程は、体外のディッシュ上で起こることを除けば、多数の精子から1個が自然に選別

される点を含め *in vivo* と同様であるが、一定の濃度 ( $1 \times 10^6$ /ml 程度) の精子が得られない症例では受精率が極端に低下したのである。そこで注目されたのが、顕微授精法であった。1980年代後半からヒトに対する臨床応用が始まり、当初は卵に対する侵襲が比較的低いと思われる、透明帯切開法から始まった。酸性 tyrode 液により透明帯に小孔を開け、囲卵腔への精子の侵入を促す方法 (zona drilling: Gordon 1988)、透明帯を穿刺、切開する方法 (partial zona dissection, PZD: Cohen 1988)、囲卵腔に直接精子を注入する方法 (subzonal insemination SUZI: Ng 1988) などが報告されたが、これらの方法の重症男性不妊症症例に対する治療効果は不十分であった。そのため、当時すでに動物実験では受精卵が得られることが確認されていた、卵細胞質内へ1個の精子を直接注入する方法 (ICSI) がヒトでも研究されるようになり、1992年に Palermo らによって初めての妊娠例が報告された。ICSI による受精率、妊娠率は前述の方法に比べると驚異的に高く (IVF で受精卵が得られなかった150例に対して受精率64.2%, 妊娠率44.7%: van Steirteghem 1993), その後の顕微授精法の主流となった。

現在では ICSI により70%以上の受精率が得られるようになり、受精だけを見るなら、かなり良好な成績となっている。しかし近年、胚培養技術の向上に伴って、精子は受精のみに関わるのではなく、受精後の胚発生にも大きく影響することが示されてきた。受精後5~6日、胚盤胞までの体外培養が可能となり、観察期間が延長したことにより、精子の成熟性や、DNA断片化の有無など genetic なクオリティが胚の発達に大きな影響を与えていることがわかってきたのである。妊娠成績の向上のためには、良好な卵子を得ることはもちろんだが、質の高い精子が必要であることが明らかとなり、非常に多数の精子の中から精子が選択される自然妊娠や通常の体外受精と違い、術者が低倍率の視

野で運動性を視標に精子を選択する ICSI では、適切な精子が選択されていない可能性が指摘されるようになった。

### III IMSI

高倍率による精子選別の有用性は2002年 Bartoov, Berkovitz ら<sup>1)</sup>により初めて報告された。彼らは精子の核(形, クロマチン), 先体, 先体後部ラミナ, ミトコンドリア, 頸部, 尾部の詳細な観察を行い, 高倍率下での精子奇型の分類基準を示した。(motile sperm organelle morphology examination: MSOME)。その結果, 核の所見が正常であることが, 引き続き行われた ICSI による受精率, 妊娠率を明らかに上昇させたとした。これにより, 従来法の ICSI で行われている精子の選別では発見できない微細な精子の構造異常が, ICSI による妊娠率に影響を与える可能性を示唆し, IMSI の原型が示された。

続いて彼らは, この結果が良好な核の形態を持つ精子を選別したことによるものであることを示すために, MSOME において正常な形態の核を持つ精子を選択できた群: positive 群38周期と, 何らかの異常所見があり, 厳密に正常な形態の核を持つ精子が選択できなかった群: negative 群38周期で ICSI の結果を比較した。その結果, 受精率, 良好胚率, 着床率のすべてにおいて positive 群で優位に良好であった。(受精率  $71.3 \pm 20.8\%$  vs  $50.3 \pm 24.1\%$ , 良好胚率  $34.9 \pm 31.3\%$  vs  $19.4 \pm 27.1\%$ , 着床率  $25.0 \pm 25.9\%$  vs  $5.9 \pm 12.9\%$ )。また, 流産率は positive 群において有意に低かったとした ( $10.0\%$  vs  $57.1\%$ )<sup>2)</sup>。

この研究では, 核の形態は, 核の大きさ, 形, 大きな空胞(全体の4%を超える)の有無で検討されたが, negative 群で正常基準を満たさなかった所見としては“大きな空胞を持つ(核の大きさ, 形は正常)”が最多であった(18/38周期)。そこで彼らは核の形態の中でも空胞の有無に着目し, 核の形と大きさは正常だが大きな空胞を持つ精子しか選択できなかった群: 試験群28周期と, 厳密に正常な形態の核を持つ精子を選択した群: 対照群28周期とを比較した<sup>3)</sup>。この検討では, 受精率, 良好胚率に差はみられなかったが, 妊娠率は有意に試験群で不良であり(試験群18% vs 対照群50%), 流産率も高かった(80% vs 7%)。これらの結果より妊娠率, 流産率に影響を与える要素として, 精子の核の形態, 特に“大きな空胞”の有無が重要とされた。

これらの結果はインパクトをもって受け入れられ, IMSI の有用性を示唆する報告が後に続いた。2010年には IMSI に対する最初のメタアナリシスが報告され<sup>4)</sup>, 従来法の ICSI 群と IMSI 群で受精率に差はないものの, 着床率, 妊娠率は IMSI 群で有意に高く, さらに流産率は IMSI 群で有意に低い(40%以上低下)という結果が示された。

### IV IMSI の問題点, 課題

IMSI システムで観察されるのは, 超高倍率観察による精子の微細な形態であり, 直接精子の質を評価できるものではない。現在精子の微細構造のうち, 最もよく検討されているのは精子頭部の空胞であるが, 機能的な評価として DNA 断片化との関連が示唆されているものの, 明らかな相関が証明されているわけではない。また, IMSI システムでは空胞内部の構造までは観察できないため, 電顕レベルで解析された空胞とは同一でない可能性が指摘されている<sup>5)</sup>。IMSI の現況は, 形態良好な精子は質的にも良好であることを前提に, 主として精子頭部の空胞の有無に着目して精子を選別し, ICSI を行ったところ臨床成績が向上したという段階である。今後の発展のためには, 適切な形態解析項目のさらなる検索とその妥当性を裏付ける質的評価法の確立が必要と思われる。

当院では2010年4月に IMSI システムを導入し, ICSI 反復不成功例を中心に臨床応用を開始した。現段階では前述の精子頭部の空胞による評価を主体としているが, 新しい試みとして近年, 生物学の分野で注目されている形態測定手法である, 幾何学的形態測定法によるデータの蓄積を開始した(図1)。幾何学的形態測定法は, 形態学的に相同な点(標識点), またはそれに類する点(準標識点)の相対的な位置を標本間で比較することによって, わずかな形態の差異を統計的に検出可能にする。IMSI システムで撮影した精子の画像に対して幾何学的形態測定を行うことで, 精子間のわずかな形態の差異を数値で表し, 精子の形態と精子の質との関連をこれまでより詳細に評価できる可能性があると考えている。

### V おわりに

IMSI システムがもつ精子の微細構造の観察能力は非常に高く, 良好な精子を選択するための有用な手技となる可能性を持っている。しかし臨床応用されてから日が浅く, 質的な評価に裏打ちされた評価項目が確

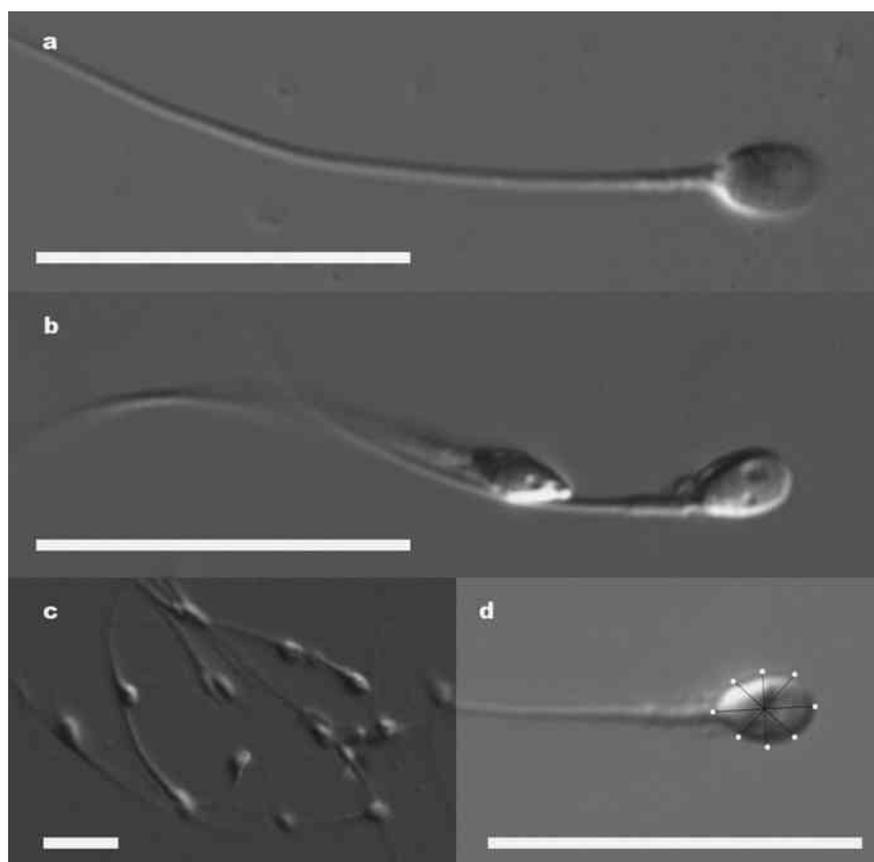


図1 微分干渉顕微鏡で見た精子の写真  
スケールバーは20  $\mu\text{m}$  を示す。

(a) 頭部に空胞がない精子, (b) 頭部に空胞がみられる精子, (c) 通常の ICSI の視野,  
(d) 幾何学的形態測定法

8つの標準識点。2次元画像上で、精子頭部の長軸に線分を引き、その線分の中心点と45°、90°、135°の角度でそれぞれ交差する3本の直線を引いた。これらの線と精子の輪郭が交わる点を標準識点とした。これらの標準識点は、同じ精子の写真であればいつでもほぼ同じ座標にプロットできる。

立されているとは言えない。そのポテンシャルを十分  
生かすためには、さらなる解析項目の検討、およびそ

れらとリンクする精子の質的評価法の確立を進める必  
要がある。

## 文 献

- 1) Bartoov B, Berkovitz A, Eltes F, Kogosowski A, Menezo Y, Barak Y: Real-time fine morphology of motile human sperm cells is associated with IVF-ICSI outcome. *J Androl* 23: 1-8, 2002
- 2) Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A, Bartoov B: The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 20: 185-190, 2004
- 3) Berkovitz A, Eltes F, Ellenbogen A, Peer S, Feldberg D, Bartoov B: Does the presence of nuclear vacuoles in human sperm selected for ICSI affect pregnancy outcome? *Hum Reprod* 21: 1787-1790, 2006
- 4) Hazout A, Dumont-Hassan M, Junca AM, Cohen Bacrie P, Tesarik J: High-magnification ICSI overcomes paternal effect resistant to conventional ICSI. *Reprod Biomed Online* 12: 19-25, 2006
- 5) 年森清隆, 伊藤千鶴: ヒト精子の超微形態と妊孕性. *J Mamm Ova Res* 25: 232-239, 2008