

ICSI 成績改善の基礎検討：精子懸濁液中 エンドトキシンが受精率に及ぼす影響

杏林大学医学部産科婦人科学教室

勝又木 綿子 神野 正雄 星合 敏久
小菅 浩章 中村 幸雄

Microfertilization for Severe Male Infertility : Influence of Endotoxin in Sperm Suspension on Clinical ICSI Outcome

Yuko KATSUMATA, Masao JINNO, Toshihisa HOSHIAI,
Hiroaki KOSUGE and Yukio NAKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyorin University School of Medicine, Tokyo

概要 我々は、重症男性不妊の治療として、卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) を臨床応用し、技術改良を行うことにより臨床成績の改善を得た。そこで本研究では、重症男性不妊の精子と凍結ハムスター卵で ICSI を行い、臨床成績改善の要因を基礎検討した。ICSI における運動精子濃度を高濃度群： $100 \times 10^4 \sim 400 \times 10^4/\text{ml}$ 、低濃度群： $10 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4/\text{ml}$ とし、受精率を比較した。ICSI 施行卵あたりの受精率は高精子濃度群で 27%、低精子濃度群で 67% と、低精子濃度群で有意に高かった。次に、精子懸濁液の運動精子濃度を $100 \times 10^4 \sim 400 \times 10^4/\text{ml}$ とし、2～3 時間の培養後、2 等分して遠沈により上清を除去し、一方は、分離した上清にて精子 pellet を再懸濁して精子培養液群、他方は新しい培養液で懸濁して新しい培養液群とし、ICSI を施行した。精子培養液群で 33%、新しい培養液群で 63% と、培養液を交換することにより、受精率は有意に上昇した。精子懸濁液中のエンドトキシン濃度は、低精子濃度群に比して高精子濃度群で有意に高かった。一方、精子懸濁液中の運動精子あたりの活性酸素濃度は、高精子濃度群と低精子濃度群で有意差を認めなかった。以上の結果より、ICSI の精子懸濁液の精子濃度が高いと懸濁液中に受精抑制因子が蓄積し、これが ICSI で精子とともに有害量注入され受精率が低下すると考えられた。また、この受精抑制因子の一つはエンドトキシンであることが示唆された。

Abstract Objective : Our purpose is to analyze factors contributing to improvement in the clinical outcome in the previous study of intracytoplasmic sperm injection (ICSI).

Methods : Human sperm from severe male infertility patients was injected into hamster oocytes.

Results : The rate of fertilization by ICSI in hamster oocytes was lower in the group using a high concentration of sperm in the sperm droplet than in the group using a low concentration of sperm. The deterioration in the rate of fertilization was improved by changing the medium in the sperm suspension. The levels of endotoxin in sperm suspension were significantly higher with a high concentration of sperm than with a low concentration.

Conclusions : The high concentration of sperm may induce the accumulation of some fertilization-inhibiting substances in the medium. Probably, in ICSI with a high concentration of sperm, the fertilization-inhibiting substances are injected into the oocyte and they may decrease the rate of fertilization. Endotoxin may be one of these fertilization-inhibiting substances.

Key words : Intracytoplasmic sperm injection · Severe male infertility · Sperm concentration · Endotoxin · Superoxide

緒 言

重症男性不妊では、受精に至る過程で作用する精子機能にさまざまな障害があり、受精能が低下している。産婦人科領域ではこの精子の受精機能障害を代償するために顕微授精が試みられた。顕微授精の中で、卵細胞質内精子注入法¹⁾ (intracytoplasmic sperm injection, ICSI) は、1個の精子をマイクロピペットを用いて卵細胞質に注入する方法である。

我々は、別報研究²⁾において、重症男性不妊の治療として囲卵腔内精子注入法 (snbzonal sperm injection, SUZI) および ICSI を臨床応用し、諸種の技術改良を検討した。その結果、技術改良を行った ICSI において、著しい妊娠率の改善に成功した。そこで本研究では、この成績改善の要因を解析するために、重症男性不妊の精子とハムスター卵を用いて ICSI を施行し、基礎的検討を行った。

方 法

研究に用いた精子は重症男性不妊症例より同意を得て採取したものとした。重症男性不妊症例は、精液検査にて、精液精子濃度が $800 \times 10^4/\text{ml}$ 以下、又は運動率が20%未満、およびその両方を満たすものとした。精子処理は、swim-up 法2時間で運動精子を回収した後、遠沈して運動精子懸濁液の培養液を交換し、以下に述べる比較群の運動精子 droplet ($30\mu\text{l}$) を作成し、mineral oil (M-5914, Irvine, U.S.A.) でカバーして ICSI に供した。なお PVP は用いなかった。比較群は、a) 精子懸濁液の運動精子濃度を、高濃度群: $100 \times 10^4 \sim 400 \times 10^4/\text{ml}$ 、低濃度群: $10 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4/\text{ml}$ とし、2～3時間の培養後に ICSI 用に droplet を作成し ICSI に供した。b) 精子懸濁液の運動精子濃度を $100 \times 10^4 \sim 400 \times 10^4/\text{ml}$ とし、2～3時間の培養後、2等分して遠沈により上清を除去し、一方は、分離した上清にて精子 pellet を再懸濁して精子培養液群、他方は新しい培養液で懸濁して新しい培養液群とした。両群とも運動精子濃度は、 $10 \times 10^4 \sim 20 \times 10^4/\text{ml}$ とし、ただちに ICSI に供した。swim-up 後の培養液は、3mg/ml Bovine albumin (A-4503, Sigma, U.S.A.) 添加 modified-HTF を用い、培養条件は、37.0°C, in air とした。

凍結ハムスター卵(日本農産工業社製)は、室温にて解凍後、37°C 下で、3mg/ml Bovine albumin 添加 HTF にて3回洗浄し、凍害保護剤を除去した。解凍後40分以内でかつ第一極体を認める卵のみを ICSI に供した。ICSI は、既報²⁾の技術改良後 ICSI にて行った。

ICSI 後のハムスター卵は、ただちに、3mg/ml Bovine albumin 添加 HTF に移動し、37.0°C, 5% CO_2 in air で、8～10時間の培養後、前核形成を認めるものを受精とし、a), b) の各群間で受精率を比較した。

運動精子懸濁液の精子濃度が、培養液に及ぼす影響の原因を検討するため、高濃度群と低濃度群のエンドトキシン濃度と活性酸素濃度を測定した。

エンドトキシンの測定には、エンドトキシン特異的テスト³⁾ (chromogenic endotoxin-specific test, EST, エンドスペシー法: 生化学工業, 東京) を用いた。検体は、高濃度群および低濃度群の運動精子懸濁液を遠沈により精子を除去した上清の培養液とした。EST は、カプトガニ C 因子系に発色合成基質 (Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) を加え主剤とする。これにエンドトキシンが作用すると C 系因子が活性化され、発色合成基質を水解し、その結果遊離されたパラニトロアニリンをジアゾカップリングし、生成したアゾ色素を比色定量する。EST 試薬は、測定時に 0.2mol/ml Tris-HCl 緩衝液に溶解し、その 0.1ml に検体 0.1ml を加え、30分反応させた後、0.04% 亜硝酸ナトリウム、0.3% スルファミン酸ナトリウム、0.07% N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩を各 0.5ml 順次加えてジアゾ化し、545nm にて比色定量した。

活性酸素の測定には luminol 依存性 chemiluminescence 法を用いた⁴⁾。検体は、高濃度群と低濃度群の運動精子懸濁液を用いた。luminol は、 O_2^- 又は H_2O_2 の存在下で酸化され励起状態となり、それが基底状態に遷移する過程で発光する。検体は、高濃度群と低濃度群の運動精子懸濁液を用いた。検体 $250\mu\text{l}$ とコントロールの 3mg/ml Bovine albumin 添加 modified-HTF $250\mu\text{l}$ に、4mM Luminol を $5\mu\text{l}$ 加え攪拌後、Luminescence reader により発光

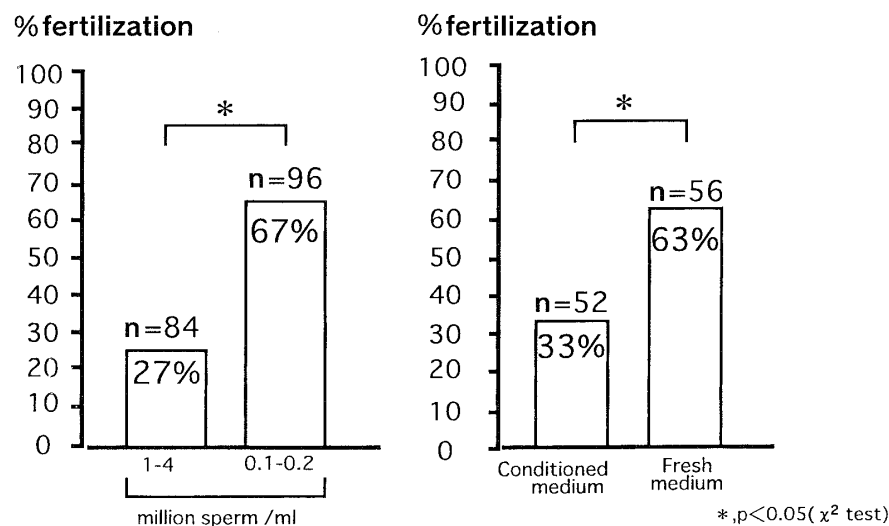


Fig. 1 Effect of sperm concentration in sperm droplet (a) and conditioned medium by sperm incubation (b) on the rate of fertilization in ICSI.

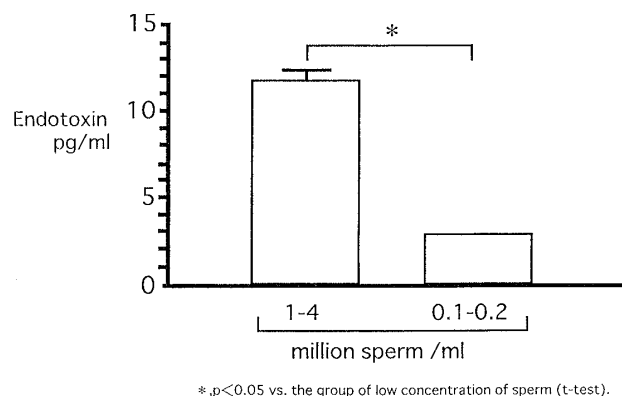


Fig. 2 Effect of sperm concentration on endotoxin levels in sperm droplet.

強度 (luminescent intensity) を測定した。

結果は、t 検定、 χ^2 検定を適宜用いて分析し、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

対象となった重症男性不妊30例の精液所見の平均は、量： 3.1 ± 1.3 ml，数： $367 \pm 209 \times 10^4$ /ml，運動率： $28.6 \pm 16.7\%$ であった。Fig. 1に運動精子濃度が、受精率に及ぼす影響と精子培養後の培養液が受精率に及ぼす影響を示す。ICSI 施行卵あたりの受精率は高精子濃度群で27%，低精子濃度群で67%と、低精子濃度群で有意に高かった。また、精子培養液群で33%，新しい培養液群で63%と、培養液を交換することにより、受精率は有意に上昇した。

精子懸濁液中のエンドトキシン濃度は、低精子濃度群に比して高精子濃度群で有意に高かった (Fig. 2)。一方、精子懸濁液中の運動精子あたりの活性酸素濃度は、高精子濃度群と低精子濃度群で有意差を認めなかった (Fig. 3)。

考 察

本研究において、精子懸濁液の精子濃度が高いと ICSI の受精率が低下し、この受精率の低下は、懸濁液の培養液を新しい培養液に交換することにより回復した。また、通常体外受精において、媒精時の卵と精子の共培養時間が長いと胚発育率が低下し、これは媒精時間の短縮で改善するとの報告がある⁵⁾。したがって、精子処理後の運動精子から卵の受精発育を阻害する何らかの物質が産生され、長時間培養することにより卵に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

ICSI では、精子を卵細胞質に注入する際に、極めて少量であるが培養液も卵細胞質に注入される。そこで、高精子濃度で運動精子を培養することにより精子懸濁液中に何らかの受精抑制因子が蓄積し、この物質が ICSI の際に精子とともに卵に有害量注入され、受精率が低下したと考えられる。そこで、精子懸濁液中のエンドトキシン濃度を測定したところ、受精率の低い高濃度群で有意に高く、エンドトキシンが受精抑制因子の一つであることが示唆された。

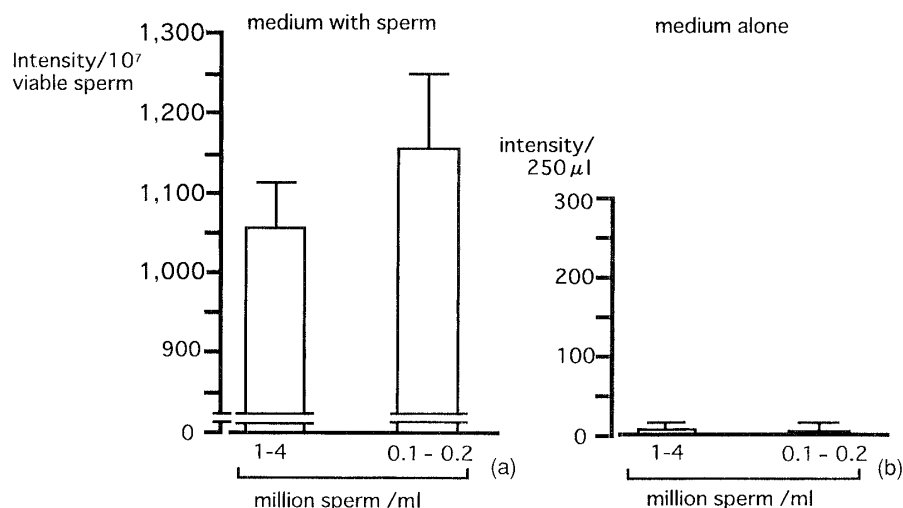


Fig. 3 Effect of sperm concentration in sperm droplet on the level of reactive oxygen species.

IVFにおいて、培養液中のエンドトキシン濃度が高いと受精率、胚分割率が低下することが知られている⁶⁾。また、ICSIに用いた洗浄後の精子懸濁液中のエンドトキシン濃度とICSIの受精率、卵割率との関係をみるとエンドトキシン濃度が高い場合、有意に受精率、卵割率が低値であったとの報告がある⁷⁾。エンドトキシンは、大腸菌などのグラム陰性細菌の細胞外膜の主成分であるリポ多糖類である³⁾。採精および精子処理は滅菌容器を用いて行うが、用手法により採取する射精精液はどうしても細菌汚染しやすい。男性不妊においては、精巣、精巣上体、前立腺などの慢性感染症が随伴していることも多いため、さらに精液に細菌が混入しやすくなる。こうした細菌は、精子処理による洗浄によっても完全には除去されず、運動精子懸濁液に遺残し、ICSI前の培養の間にエンドキシンの産生源となった可能性が考えられる。

男性不妊では、精液中に活性酸素をより多く産生する未熟精子や白血球が多く存在する⁸⁾。活性酸素は、精子細胞膜の不飽和脂肪酸を過酸化して、精子細胞膜構造を変化させ⁹⁾、受精能を低下させる¹⁰⁾¹¹⁾。また活性酸素を代謝する superoxide dismutase を培養液に添加すると、胚発育が改善するとの報告があり¹²⁾、活性酸素は卵に対しても有害と考えられる。そこで、本研究での受精抑制因子が活性酸素である可能性を考え、運動精子懸濁液

中の活性酸素濃度を測定した。活性酸素濃度は、高精子濃度群と低精子濃度群で有意差を認めず、本研究の受精抑制因子は活性酸素ではないと示唆された。運動精子が放出する代謝産物は数多く考えられ、エンドトキシン、活性酸素以外の物質に関しても、今後さらに検討する必要があると考える。

文 献

1. Palermo G, Joris H, Devereoy P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into oocyte. Lancet 1992; 340: 17—18
2. 神野正雄, 勝又木綿子, 星合敏久, 小菅浩章, 中村幸雄. 当教室における重症男性不妊の顕微授精治療成績. 1999; 51: 833—839
3. 大林民典, 田村弘志, 田中重則, 大木 誠, 高橋昭治, 荒井幹雄, 増田美保子, 河合 忠. エンドトキシに特異的な新しい比色定量法の開発. 臨床病理 1985; 33: 639—644
4. 八木國夫, 中野 稔. 活性酸素—化学・生物学・医学—. 東京: 医歯薬出版, 1987; 93—95
5. Quinn P, Lydic M L, Ho M, Bastuba M, Hendee F, Brody SA. Confirmation of the beneficial effects of brief coincubation of gametes in human in vitro fertilization. Fertil Steril 1998; 69: 399—404
6. Fishel S, Jackson P, Webster J, Faratian B. Endotoxins in culture medium for human in vitro fertilization. Fertil Steril 1988; 49: 108—111
7. 浅田義正, 鈴木省治, 岡村尚子, 森脇崇之, 安藤智子, 安藤寿夫, 石原 豊, 近藤育代, 菅原信彦.

- ICSIにおける顕微操作の卵細胞に及ぼす影響の検討. 日受着会誌 1997; 14: 19—22
8. *Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB.* Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl* 1989; 10: 214—220
9. *Jones R, Mann T, Sherins R.* Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril* 1979; 31: 531—537
10. *Aitken RJ, Clarkson JS.* Cellular basis of sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fert* 1987; 81: 459—469
11. *Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC.* Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am Obstet Gynecol* 1991; 164: 542—551
12. 野田洋一, 松本 央, 森 崇英. Superoxide Dismutase によるマウス2-Cell block の解除. 日産婦誌 1989; 41: 751—752
(No. 8038 平10・11・18受付 平11・6・7採用)
-