

卒後研修プログラム3 ARTの最近の話題

1) ICSIの位置づけ

座長：関西医科大学
神崎 秀陽国際医療福祉大学病院
リプロダクションセンター
柳田 薫聖マリアンナ医科大学
石塚 文平

はじめに

卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection, ICSI)は1992年に初めての成功が報告されたばかりであるが、現在では不妊治療の重要な柱になっている。受精障害例に適応されており、短期間で普及した現状を考えると、それだけのニーズがあると考えられる。ICSIは生殖補助医療(assisted reproductive technology, ART)の中で、in vitroでの操作が最も多い手技の一つであり、卵細胞をマイクロニードルで穿刺するので、卵子が受けるダメージはより大きなものになる。この場合、注意すべきは遺伝的リスクである。ここでは、現在収集できるICSIの成績を踏まえてICSIの適応について再検証したい。

1. ICSIの適応の現状

平成4年1月に顕微授精法の臨床実施に関する見解が日本産科婦人科学会から出され、「顕微授精法は、きわめて高度の技術を要する不妊症の治療行為であり、対象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きわめて少ないと判断される夫婦のみに実施する(抜粋)」と記載されている。不妊治療上の具体的な適応は、体外受精で受精障害が起きた場合と体外受精で受精障害が起きることが予測される場合である。後者には、重症男性不妊症例、精子死滅症例、不動精子だけの例、精巣精子や精巣上体精子を用いる場合が含まれる。ここでいう受精障害は狭義には完全受精障害を指し、広義には受精率が25%以下の場合を指す。発表されている論文を検索すると受精障害と呼ばれている低受精率は25%以下であることから、そのように定義した。

ICSIの適応となる状況を具体的に検証する。IVFでの受精障害の発現頻度は10~20%と報告されており、自験例でも13.5%であった。初回に実施したIVFで(完全)受精障害が起きた場合、2回目のIVFで受精障害となる確率は40%(4/10)となった。初回以外のIVFで受精障害となった場合、引き続くIVFで受精障害となる確率は29%(7/24)となっ

Indication of ICSI

Kaoru YANAGIDA

International University of Health and Welfare, Infertility and IVF Center, Tochigi

Key words: IVF・ICSI・fertilization failure・rescue ICSI

た。したがって、IVFで受精障害となった場合は、ICSIの適応であると考えられる。

IVFで受精障害となることが予測される場合については、「重症男性因子例」以外は判断に苦慮することはないが、ICSIの適応となる重症男性因子を客観的に精液パラメーターで規定することが難しい。媒精の方法は、媒精に使用する培養皿、精子前培養時間(媒精時間)、用いる培養液、精子処理法などを考慮すると、多様な方法があり、媒精結果への影響が考えられる。日本生殖医学会のガイドライン(第二版)では、IVFの適応となるパラメーターは、原精液の総運動精子数が 10×10^6 未満で適応となり、 1×10^6 が限界とされている。精液処理後の総運動精子数では $0.3 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 未満で適応になる。

IVFとICSIの実施施設でICSIが行われている割合は、平成15年厚生労働省の科学研究の報告書によれば、ICSIの割合が80%以上を越える施設も存在する。症例が偏っているとも考えられるが、受精障害を考える根拠には乏しいが、適応を緩く考えてICSIを実施することがあるのかもしれない。また、split ICSIが受精障害を回避する対策として多用されていることを反映しているのかもしれない。いずれにせよ、ICSIの適応を考える上での客観的判断基準が定められていないことと、受精障害対策が確立されていないことが背景にある。

2. ICSIに伴うリスク

ICSIを行う場合の遺伝的リスクについては、まだ十分な調査が行われているとはいえないが、エピジェネティクスの異常も含めて、現在考えられていることをまとめると以下のようである。

1) 遺伝的リスク

ICSIによってできた児の染色体異常のリスクについては、出生前診断ではコントロールと比較して有意に高いと Bonduelle et al.(2002)によって報告されている。この時の異常は *de novo* の性染色体異常についてである。しかし、同報告では、新生児についてはコントロールと比較して有意差を認めていない。この報告では乏精子症夫婦での異常率が2.1%で、コントロールの0.24%と比較して高値であり、染色体異常のリスクへの男性因子の関与も示唆されている¹⁾。

DAZなどの造精機能関連遺伝子に異常がある乏精子症例や無精子症例から、男児が誕生する場合も、それらの遺伝子異常が児へ伝搬されることは周知の事実である。

2) 遺伝外的リスク

後天的遺伝子修飾(エピジェネティクス)により特定の遺伝子に対して遺伝的刷り込み(ゲノムインプリンティング)が行われている。エピジェネティクスは環境因子から影響を受け、DNAのメチル化やヒストン修飾の異常を来し遺伝子発現を変化させることが知られている。エピジェネティクスの異常の動物モデルの報告では、マウス胚をFCS(fetal calf serum)を含むM16で培養し胚盤胞移植すると、低体重児となることが報告されている。それらの場合では、インプリンティング遺伝子である *H19*, *IGF2*, *Grb7*(growth factor 受容体)の発現が低下していた²⁾。ヒツジでマニピュレーションや胚の体外培養が胎児形成異常(Large offspring syndrome: LOS)と関連が指摘され、*Igf2R*のインプリンティング制御部位のメチル化の欠如が判明した³⁾。ヒトでも癌、行動異常、先天異常の種々の疾患に関与することが報告されており、ARTとエピジェネティクス異常の関連性も示唆されている。IVF/ICSI例にBeckwith-Wiedemann症候群が多いこと⁴⁾、ICSI例にAngerman syndromeが多いことなどが報告された⁵⁾。

このような種々のリスクを考慮すると、治療法としてのICSIの評価については以下の

ように考えられる。ICSIの臨床成績はIVFと同等であり、多くの子供が生まれているが、マニピュレーションなど *in vitro* 操作がより顕著であり、遺伝的リスクについては十分に配慮する必要があるが、その評価は十分にできていない。また、配偶子や初期胚が *in vitro* 操作によりエピジェネティクスの異常を生じている可能性もある。よって、ICSIはまだ臨床研究のレベルと考えられるので、その適応を拡大しないで、必要があるときにのみ実施することが肝要と考えられる。

3. ICSIの適応を適正に選択するために

1) Normozoospermia 例では IVF と ICSI のどちらが成績がよいのか

Severe male factor に対しては IVF が成績不良である。しかし、male factor でない場合では ICSI の方が成績がよいかということについては、コクランレビューに報告がある。それによれば、ICSI の妊娠率については IVF と差を認めなかった。しかし、生産率、流産率、児の形態異常率については比較した研究成果がない。よって、ICSI の成績は IVF を越えるものではないので、男性因子でない例に対しては、IVF は ICSI より好ましいと考えられる⁶⁾。

2) 媒精卵子が1個の場合は ICSI の方が有利か

IVF の媒精卵数毎の受精障害の発現頻度を調べると、媒精卵が1個では26%、2個では19%、3個では19%、4個では6%となる。ICSI の場合は、ICSI 卵が1個では29%、2個では16%、3個では9%、4個では7%となる(表1)。いずれの方法でも受精障害が起こる頻度は同じであった。単純に比較すると ICSI 卵子で高い。したがって、明らかな ICSI の適応がない限りは、IVF を行うことを選択すべきと考えられる。

3) 男性因子例での考え方

男性因子例で不必要な ICSI を避けるためには、IVF での受精障害対策が必要である。精液パラメーターによる IVF の守備範囲の適応値の設定は、統一的に基準値を設定できないことが問題である。培養皿、媒精時間、培養液、配偶子前培養時間、精子処理法などによって受精成績が影響されるので、各施設での精液パラメーターのデータ解析より、各施設の IVF 実施基準を作成することが必要である。筆者らの施設で作成した基準を表に示した。自施設では、媒精は Falcon 3037 を用い、1 dish に最多4個の卵子まで媒精する。媒精時の最終運動精子濃度は原則 2×10^5 / ml とし、精子処理法は swim up 法である。

(表 1) 媒精卵子数と受精障害発現の頻度(IVF, ICSI)

媒精卵数	受精障害の発現頻度 (%)	
	IVF	ICSI
1	25.9	28.7
2	18.5	16.2
3	19.4	9.3
4	6.5	7.0
5	8.3	2.0
6	8.3	3.8
7	3.8	2.1
8	5.0	2.8
9	0.0	2.2
10	7.7	1.4
11	9.1	3.9
12	8.3	4.4
13	0.0	2.9
14	6.7	0.0
15	0.0	0.0
16	0.0	0.0
17	0.0	0.0
18	0.0	0.0
19	0.0	0.0
22	0.0	0.0
30	0.0	0.0

(表2) IVF 媒精のための精液パラメーター基準例

精子回収処理後のパラメーター	IVF 実施の条件 (すべてを満たす場合- 自施設の基準)
精子濃度	$10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上
精子運動率	80% 以上
媒精精子浮遊液量	20 μl 未満
Kruger's strict criteria	4% 以上

この場合、精子処理後の精子パラメーター(精子濃度、精子運動率、奇形率(kruger's strict criteria))および媒精精子浮遊液量と IVF 受精率との関係より、表2に示した基準値を外れると受精が成立していないという事実が得られた。この基準で52例に IVF を実施し、正常受精率73.1%(MⅡ卵に対しては86.8%)であり、split ICSI を実施した例はない。受精障害例もないが、症例を重ねて必要があればこの基準値を修正する必要がある。

4) IVF 媒精後の受精障害対策

例えば一つの工夫として、IVF 媒精後の早期に受精の評価を行い、受精障害があると判断されたら ICSI を追加することがある。いわゆる rescue ICSI と呼ばれている手法であるが、ICSI の時期が遅くなると卵子の ageing のために有効性が低下する。IVF の媒精後17~22時間では ageing の影響が顕著であり有効性が低い(22時間では有効性はない)が、媒精後6時間に受精を判定し、完全受精障害時に ICSI を行う方法が紹介された⁷⁾。この方法では、通常の ICSI と妊娠率は同レベルで、受精卵に3個の前核を認めた頻度は6.6%であった。これらの卵には第二極体の放出障害も含まれるので、余計な精子を注入した確率はもっと低いと思われる。なお、IVF での多精子受精率は5~6%である。媒精から6時間程度では ageing の影響がないと言える。もっとも、通常の ICSI でも6時間程度の卵子前培養を行っているのが現状である。もちろんこの方法では、余計な ICSI を避けるために、完全受精障害の時だけ rescue ICSI を行っている。この方法を実際に運用すると、培養室の業務時間が10時間程度になり、通常の勤務時間内では実施困難である。これを解消するために筆者らは IVF 初回例と前回受精率30%以下の例に対してだけ、媒精後4.5時間で第二極体の有無で受精の判定を行い、受精障害を回避する方法を実践している。受精判定時に第二極体や断片化している極体を確認された場合は、98%の卵子が受精していた。第1極体のみ確認できた場合でも83%の卵子が受精していた。よって、すべての卵子で第二極体を確認できない場合だけ、さらに2時間培養し再評価を行う。そのときにすべての卵子に第二極体を確認できない場合に rescue ICSI を行う。このような流れにすることによって培養室の負担が軽減される。

まとめ

ICSI は容易に受精を図れ、受精障害の発生も低い。しかし、その安全性については今なお不十分な理解であり、ICSI は臨床研究の範囲を出ていない。したがって、不必要な ICSI を避ける必要があるが、そのためには以下の努力が必要と思われる。

- 1) IVF の適応となる精液パラメーターなどは、自施設の結果を解析し、自施設のパラメーター基準値を求める必要がある。
- 2) IVF の受精障害への対応策(rescue ICSI など)を立てておく。

《参考文献》

1. Bonduelle M, Van Assche E, Joris H, Keymolen K, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Prenatal testing in ICSI pregnancies : incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 2600—2614
2. Khosla S, Dean W, Reik W, Feil R. Culture of preimplantation embryos and its long-term effects on gene expression and phenotype. *Hum Reprod Update* 2001 ; 7 : 419—427
3. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet* 2001 ; 27 : 153—154
4. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet* 2003 ; 72 : 156—160
5. Cox GF, Burger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu BL, Horsthemke B. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet* 2002 ; 71 : 162—164
6. van Rumste MME, Evers JLH, Farquhar CM. Intra-cytoplasmic sperm injection versus conventional techniques for oocyte insemination during in vitro fertilisation in patients with non-male subfertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2003 ; Issue 2. Art. No. : CD001301
7. Chen C, Kattera S. Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. *Hum Reprod* 2003 ; 18 : 2118—2121