

ヒト精子 DNA 損傷測定と DNA 損傷精子の排除

Observation of DNA fragmentation in human sperm and their exclusion from ejaculated human semen.

兼子智

Satoru Kaneko

東京歯科大学市川総合病院産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College

Human ejaculates involve the sperm with DNA fragmentation, which may cause by apoptosis during spermatogenesis and maturation. In clinical human assisted reproduction, the measurement of DNA fragmentation in individual sperm and their exclusion by means of group separation techniques are essential to achieve higher pregnancy rate. In asthenozoospermic semen, the rates of sperm with the fragmentation were higher than those in normozoospermia. Human sperm fractionation by means of density gradient centrifugation, equilibrium sedimentation and swim up, swim down methods were useful to separate the sperm without the fragmentation.

1. ヒトにおける不妊

ヒトでは、生殖年齢にある夫婦が避妊することなく2年間経過しても妊娠できない場合を不妊と定義する。女性側では内分泌不全による排卵障害、卵管閉塞、子宮内膜症などが挙げられ、その治療はホルモン測定技術、排卵誘発剤の進歩により妊娠成績が飛躍的に向上した。不妊治療は、assisted reproduction technology (ART) の導入により、不妊治療は大きく進歩した。男性不妊は不妊原因の約50%を占め、ほとんどが造精機能障害による精液所見不良である。造精機能障害に対する薬物療法は有効率が低く、やはりARTが治療の中心となっている。

2. ARTにおける精液評価の重要性

子宮腔内人工授精 (IUI) は洗浄した精子を子宮腔内に注入し、体外受精・胚移植 (IVF-ET) では卵巣から吸引、採取した卵と洗浄した精子を *in vitro* で媒精し、分割した胚を子宮腔内に移植する。さらに卵細胞質内精子注入法 (ICSI) では、卵に精子を人為的に穿刺して受精を図る。IUI から ICSI に至る授精法の改良は、雌性生殖路を *by pass* し、卵近傍へと精子を送達してより少ない精子で受精を図ろうとするものである。IVF-ET は媒精に要する精子濃度が低く、導入当初には重度精液所見治療の切り札と考えられたが、予め運動精子を分離して媒精しても受精率は低く、ICSI が臨床応用されるようになった。本法は全ての精子機能を無視でき、未熟な精細胞を注入しても正常な胚発生が可能であると主張されている。このため精子が卵侵入能を

ヒト精子のDNA損傷

有しない症例に対する唯一の治療法とされている。

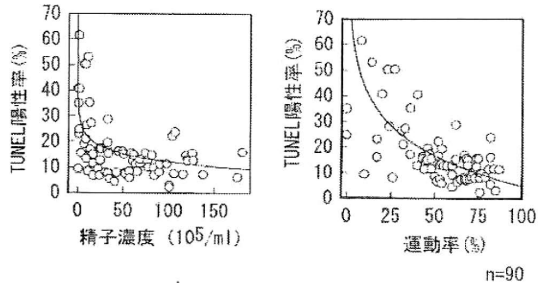


図1 ヒト精子 TUNEL 陽性率と精液所見の相関

現況の ICSI は卵穿刺法については詳細に検討しているが、穿刺精子の評価、選択に明確な基準は存在しない。

精子形成過程において、第2減数分裂以後に生じた精子DNAの傷害は修復されずに蓄積する。体細胞における染色体損傷の様式は多彩である。造精過程の減数分裂前期以降、アポトーシスが関与する精母細胞死により一部の精細胞が消滅している。アポトーシスはDNA2重鎖切断を伴う細胞死であり、消滅を免れて射出に至った精子中にはDNA損傷精子が混在することが明らかとなってきた。精子のDNA損傷はほとんどが欠失である。上口らは透明帯除去ハムスター卵にヒト精子を侵入させて精子染色体分析(G-band法)した結果、15.5%に異常を認めた¹⁾(表1)。

表1 ハムスター卵侵入法によるヒト精子染色体分析

	観察精子	異数性異常(%)	構造異常(%)	計(%)
上口 ¹⁾	15,864	1.4	14.1	15.5
Brandriff ⁵⁾	2,648	1.6	7.7	9.3
Martin ⁶⁾	5,629	4.1	9.4	13.5

文献1,56より改編

得られた数値は正常精液所見を有する個体(子供がいる男性)において卵への侵入能を有する精子のみを観察した結果である。一方、繁殖力の高い個体を選別、継代してきた実験動物の異常率(0.9-1.4%)であり、ヒトの値は実験動物よりはるかに高い。

ヒトART技術は、生殖生理学または家畜繁殖学で開発された技術を導入したものがほとんどである。一般に市販マウスは高い生殖能を有するものを選別した近交系動物であり、産仔の効率的生産を目的とする家畜繁殖領域では厳選された種雄が一括して精液を提供し、雄性不妊は研究の対象とならない。一方、ヒトは遺伝的背景が多様であり、男女とも複雑な不妊原因を有する夫婦を治療の対象とし、両

者には大きな生物学的背景差がある。上述したようにヒトとマウス精子のGバンドレベルの染色体損傷は大きく異なっており、マウス、家畜等で得られた結果を直ちにヒト不妊治療の病態モデルとするべきでない。

われわれはDNA断端を組織化学的に検出するTUNEL法を用いてヒト射精精子DNA損傷を観察した結果、射精精液中のDNA損傷精子比率は20-70%程度であり、ICSIは全ての精子にDNA損傷が存在しないことを前提としているが、重度の精液所見不良症例ではその比率が正常精液に比して増加する²⁾

(図1)。さらにIVF-ET、ICSIにより出生した児の染色体異常、先天異常率が増加する可能性が指摘されており³⁾、精液所見不良症

例に対するICSIの適応には、精子DNA

損傷の定量的検出法開発が必要である。

ART に供する精子調製は、雌性生殖路を遡上する過程における選別、変化を *in vitro* で代行することであり、授精法の高度化に対応したより高度な精子調製法が必要となる。ICSI においては、DNA 損傷精子排除が必要である。

3. 精子染色体分析

通常末梢血リンパ球を用いた核型分析は、全ての核が凝縮している精子に適用できない。初めに開発された透明帯除去ハムスター卵に精子を侵入させる方法⁴⁾は本法は手技が煩雑であり、分析精子数が数十匹程度/検体である。しかし後述する他法が DNA レベルの損傷を観察するのに対し、本法は核型レベルの異常を観察し得る唯一の方法である。表 1 に既報の結果をまとめたが、卵侵入能を有する運動精子であっても染色体異常率は 9.3-15.5% に達し、そのうち染色体構造異常率が 7.7-13.5% を占める。

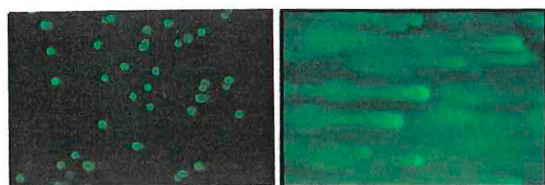


図 2 ヒト精子 DNA 損傷の COMET 電気泳動法による観察

左は DNA 損傷検出限界以下群、右は DNA 損傷群

その後、各染色体に特異的な DNA プローブを用いた FISH 法が開発され、 Robertson 転座、相互転座等の染色体の構成異常の観察が可能となった。本法により、多数の精子の染色体分析が可能となり、不妊男性の精子における染色体の異数性異常に関する報告がなされるようになった。Ohashi ら⁷⁾

も乏精子症では、異数性異常、とくに XY 精子の頻度が高くなることを報告している。

4. DNA 構造異常の評価

精子染色体の評価は、染色体、遺伝子、DNA 各レベルにおける研究が必要である。男性不妊症例において遺伝子レベルで原因が明らかとなる症例はむしろ希であり、ほとんどが原因不明である。ART において、精子染色体損傷は原因、形式のいかんを問わず使用すべきでない。精子臨床検査の観点からは、個々の精子の非特異的 DNA 損傷定量がまず必要である。DNA 傷害の様式は多様であり、1) TUNEL 法 (DNA 断端を組織化学的に検出する)⁸⁾、2) COMET 電気泳動法 (DNA 2 重鎖切断および片側の開裂を電気泳動的に検出する)⁹⁾、3) 8-OH グアノシン ELISA 法 (*in vitro* における精子取扱に伴う酸化的 DNA 損傷を評価する)¹⁰⁾。

われわれは、TUNEL 法、COMET 法について定量的観察法の開発を行った^{11、12)}。これらの方法はすでにキットが市販され、多くの論文が報告されている。しかし、観察条件を詳細に検討した結果、標本作成法、細胞溶解法、電気泳動条件等をヒト精子に対して最適化しないと偽陽性、偽陰性、さらに操作中における artifact (DNA 切断) が見られることが明らかとなった。これまでに、標本作成においてスライドガラスへの塗沫に代わるフィルタートラップ法、汎用されるサブマリン電気泳動槽に代わる顕微電気泳動装置を開発した。アガロースに精子を懸濁し、基盤上に厚さ 10 μ m のゲルを形成した。これを DTT、界面活性剤、蛋白分解酵素 (trypsin) 溶液中で融解する。0.43V/cm の低電圧で 30 分間電気泳動を行い、DNA 蛍光染色する。図 2 に本研究において改良を行った修正 COMET 電気泳動法を示した。彗星状の泳動像

は、DNA断片化により生じた短鎖DNAによる。

5. 精製によるDNA損傷精子の排除

われわれはARTに供する精子の調製法に関して研究を行ってきた。これまでは、成熟した運動精子の選別とともに精漿、細菌、ウィルスの除去を目標とし、精漿、細菌の除去に関してはInner-column法を開発した¹³⁾。近年、本邦でもAIDS患者の増加が報告されているが、抗ウィルス薬の開発に伴いその予後は著しく改善されている。それに伴いHIV陽性男性の挙児希望が寄せられるようになった。われわれはInner-column法を改良してHIV陽性男性の精液からPercoll密度勾配遠心法およびswim upを用いたHIV除去法を確立した¹⁴⁾。すでに臨床応用が開始され、6例の妊娠、出産例を得ている。図3は現在、われわれがHIV除去に用いているSeparable Fine Neck Tube (SFNT)を用いる連続密度勾配法を示している。SFNTは精液からの細菌、HIVの除去とともに運動精子の分離が可能である。さらに受精をby passするICSIにおいては、精子の卵侵入に不可欠な先体反応を誘起する精子を選択的に分画することが有用である。われわれはコンカナバリンAをリガンドとするcell affinity chromatography法を開発した¹⁵⁾。

われわれはDNA損傷精子の排除を目的とした精子分画法の開発を試みた。現在、研究が進行中であるが、フィルター濾過、遠心分離(速度法、平衡法)、swim up、swim down法による運動精子分離などを組み合わせたgroup separation手法により、DNA損傷精子比率を検出限界に低下させることができる可能が示唆された。今後、さらに効率のよい分画法を検討するとともに種々の検出法を用いた観察を行い、DNA損傷精子の排除を確立したい。

さらに本法の臨床応用が予定される重度精液所見不良症例では精子濃度が低く、現在汎用されている精子の分画手法では極少量の精子を取り扱うことが困難であるので、新たに微小環境精子操作技術の開発が必要となる。このための専用デバイスの開発を行っている。



図3 Separable Fine Neck Tubeを用いるヒト精子の濃縮

6. ART(家畜繁殖を含む)におけるDNA保護の意義

再生医学領域において胚性幹細胞を用いた組織再生が注目されている。培養胚の内部細胞塊から樹立されたembryonic stem cells (ES細胞)が胎盤を除く全ての胚組織形成に関与することが明らかとなり、組織再生の可能性が示唆された。再生医療に供するヒト胚盤胞は不妊治療における余剰胚が予定される。これまでヒトES細胞における問題点として、生命である胚を分解するという倫理的問題が論議されてきた。ヒトES細胞の樹立研究に際して内部細胞塊の染色体が正常であることが研究の前提となっている。

本稿では精子DNA損傷とその排除について概論したが、卵についても同様なことが言える。過排卵誘発をして得られる卵に関してもDNA損傷の可能性

が知られており、将来的には過排卵誘発過程におけるDNA損傷を可及的に防止する技術開発が求められる。現状のART技術において得られたヒト胚には染色体損傷を有するものが混在している可能性がある。高品質ES細胞作出には、媒精に供するヒト精子および卵のDNA損傷評価ならびに損傷配偶子の排除法の確立、培養環境における胚のDNA損傷を回避する高精度培養技術の確立が良好胚育成に不可欠である。同時にこれらの研究は、不妊治療における妊娠率向上、児の健常性確保に必須である。

7. 培養環境における胚DNA保護

良好な胚を得るためには、培養環境（培養装置、培養液）の最適化が重要である。一般にヒト胚培養は、株化細胞の長期継代培養を主目的として設計されたCO₂インキュベーターを使用している。CO₂インキュベーターは培養液交換時以外には扉を開閉しないことが使用の前提となっているが、IVFの臨床においては頻繁に扉を開閉するためガス環境の維持が困難である。生殖細胞、特に胚は気相の酸素分圧にも配慮する必要がある。受精と胚の初期発生が起こる卵管の酸素分圧は低く、ヒト胚培養には混合ガス（5.0%CO₂、2.0–5.0%O₂、90–93%N₂）が用いられる。

われわれはヒト胚の低酸素培養を目的として、新たに培養装置を開発した。市販のCO₂インキュベーターは全ての機能が一体となっており、カビ、細菌汚染すると滅菌が困難である。われわれの方法は、機器は温度制御のみを

行い、湿度、ガス制御は着脱可能な容量500mlのミニボトルが担当する。培養容器がガラスおよび耐熱材料で構成され、300℃による超高温滅菌が可能である。ボトル内には予め調整した混合ガスを少量通気した。これによりCO₂インキュベーターのガスセンサーは不要となり、センサー劣化によるガス濃度の誤差を考慮する必要がなくなった。さらに通常の培養系は細胞が接する液体を培養液と定義するが、本システムではボトル内に約220mlの補助培養液を入れ、環境全体がガス緩衝系を構成する。補助培養液は温度、pH、湿度の維持に寄与する。さらにミニボトルの開閉に際しては、ボトル内酸素パージを行っている。

われわれは培養液中の保存性向上を目的として不安定成分を数群にモジュール化し、各々の最適条件下に調製、凍結保存した。用時、各モジュールを混合することにより初めて培養液を完成させ、調製後は72時間以内に使用している。

まとめ

本稿は、ICSIにおける精子DNA障害の評価とそれを指標としたDNA損傷精子の排除の重要性について述べてきた。将来的には、精子、胚の光学顕微鏡による形態観察に加え、分子生物学的評価が重要であることをのべた。今後、研究をさらに展開し、卵、胚のDNA障害評価およびそれを指標としたin vitroにおける胚DNA保護を考慮した高精度培養システムの確立を目指したい。

ヒト精子のDNA損傷

文献

1. 上口勇次郎、立野裕幸：配偶子の染色体分析. 産婦実際、43：925-930, 1994
2. 西田智保、兼子智、野澤資重利、岩本晃明：若年男性集団における精子DNA断片化の解析. 聖マリアンナ医学雑誌、29：541-549, 2001
3. Hansen, M., Kuriczuk, J. J. : The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *The New England J. Med.*, 346:725-79, 2002
4. Kamigushi, Y. and Mikamo, K. : An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosome using zona free hamster ova. *Am. J. Hum. Genet.*, 38:724-740 1986
5. Brandriff, B., Gordon, L. : Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. *Human Genet*, 70:18-24, 1985
6. Martin, R.H., Ko, E., Rademaker, A. : Distribution of aneuploidy in human gametes; comparison between human sperm and oocytes. *Am. J. Med. Genet.*, 38:321-331, 1991
7. Ohashi, Y., Mihar, N., Honda, H., Samura, O., Ohama, K. : High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. *Human Reprod.*, 16:10-106, 2001
8. Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, 119 : 493-501, 1992
9. Connell, M.O. : Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. *Human Reprod.*, 17: 1565-1570, 2002
10. Okamoto S., Ochi, H. : Monoclonal antibody to 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and hybridomas producing the monoclonal antibody. *Chemical Abst.*, 129859a
11. 兼子智、郡山智、木戸進、佐久間雄一、富永英一郎、中川博之、田辺清男 : 修正 TUNEL 法によるヒト精子核 DNA 損傷の組織化学的検出. 日不妊会誌、47：306, 2002
12. 兼子智、郡山智、木戸進、佐久間雄一、富永英一郎、中川博之、田辺清男 : 修正コメット電気泳動法によるヒト精子核 DNA 2 重鎖切断の観察. 第 20 回日本受精着床学会学術講演会抄録集、P101, 2002
13. Kaneko, S., Oshio, S., Kobanawa, K., Kobayashi, T., Mhori, H., Iizuka, R. : Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. *Biol. Reprod.*, 35: 1059-1063, 1986
14. Hanabusa, H., Kuji, N., Kato, S., Tagami, H., Kaneko, S., Tanaka, H., Yoshimura, Y. : An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. *AIDS*, 14 : 1611-1616, 2000
15. Kuroda, Y., Kaneko, S., Matsuda, Y., Akihama, S., Nozawa, S., : Selective isolation of acrosome reacted human sperm with progressive motility by using cell affinity chromatography on concanavalin A Sepharose. *andrologia*, 28: 7-13, 1996