

2011年度 日本生殖工学会学術集会  
( シンポジウム&実践セミナー )  
プログラムおよび講演要旨集

2011年9月23・ 24日

麻布大学

1 日目(9 月 23 日)  
「シンポジウム:体外受精」

13:00 ~ 13:05

開会の辞 柏崎 直巳(麻布大)

13:05 ~ 14:00 セッション I:若手発表

座長 牛島 仁(日獣生命大) / 柏崎 直巳(麻布大)

鈴木 希望(麻布大院).....	4
藤原 克祥(麻布大院).....	5
中内 千乃(麻布大院).....	7
谷原 史倫(山口大院, 生物研).....	8

14:00 ~ 15:00 セッション II:一般講演

座長:森本 義晴(IVF なんばクリニック) / 伊藤 潤哉(麻布大)

14:00 ~ 14:30

講演 I: 的場 理子(家畜改良センター).....9  
ウシ個別識別培養システムとそれを利用した卵胞と卵子の発生能の関係

14:30 ~ 15:00

講演 II: 菊地 和弘(生物研).....10  
ブタ体外受精卵の異常と修復について

15:00 ~ 15:20 Coffee Break

15:20 ~ 16:50 セッション III:一般講演

座長:古井 憲司(クリニックママ) / 菊地 和弘(生物研)

15:20 ~ 15:50

講演 III: 藤田 陽子(ウイメンズ・クリニック大泉学園).....11  
ヒト精液中に感染する細菌種の同定と, その内毒素の放出,  
それが精子の機能性・体外受精の成績に及ぼす影響

15:50 ~ 16:20

講演 IV: 大月 純子(永井クリニック).....12  
繊細かつ緻密なヒト体外受精

16:20 ~ 16:50

講演 V: 森本 義晴(IVF なんばクリニック).....13  
体外受精の発展とその応用

16:50 ~ 17:10 セッション IV:総合討論

座長:鈴木 秋悦(東京生殖バイオロジー東京シンポジウム)

17:10 ~ 17:15 閉会の辞 後藤 正幸(明治大)

17:20 ~ 懇親会(会場: 7F ラウンジ)

2 日目(9 月 24 日)

「実践セミナー:マウスの体外受精と胚ガラス化保存」

9:00 ~ 12:00 パート I:「マウスの体外受精」

9:00 ~ 10:00 講義

10:00 ~ 12:00 「精子および卵の準備」、「共培養」

13:00 ~ 15:00 パート II:「胚のガラス化保存」

13:00 ~ 14:00 講義

14:00 ~ 15:00 「胚のガラス化保存および加温」

15:00 ~ 15:20 Coffee Break

15:20 ~ 16:20 パート III:「受精および加温胚生存性の判定」

15:20 ~ 16:00 「受精および加温胚生存性の判定」

16:00 ~ 16:20 「成績のとりまとめ」

16:20 ~ 閉会の辞

# Isobutyl-methylxanthine (IBMX)はマウス C57BL/6J 凍結精子を用いた IVF の受精率・胚発生率を改善する

鈴木 希望<sup>1</sup>・伊藤 潤哉<sup>1,2</sup>・柏崎 直巳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院 獣医学研究科, <sup>2</sup>麻布大学 獣医学部

マウスの精子凍結保存は、系統の維持や効率的な個体作出などのメリットがあるが、新鮮精子に比べて凍結精子は受精能力が低下してしまう。近交系である C57BL/6J マウスにおいて、新鮮精子を用いた体外受精(IVF)では高い受精率が得られるものの、凍結精子では受精率は著しく低くなることが知られており、その原因として、C57BL/6J 凍結融解精子の受精能獲得が不十分である可能性が考えられる。我々は、ラットの体外受精において、phosphodiesterase 抑制剤である Isobutyl-methylxanthine (IBMX)処置により、ラット凍結融解精子に受精能獲得を誘起させ、受精率および胚盤胞率が改善されることを報告した<sup>1)</sup>。そこで本研究では、C57BL/6J マウスの凍結精子に IBMX 処置を適用することで IVF 後の受精率・胚発生率の改善を試みた。

C57BL/6J マウスの凍結融解精子に受精能獲得を誘起させるため、前培養培地 TYH<sup>2)</sup>に IBMX を添加したものを IBMX 区、添加しなかったものを対照区とし、それぞれ前培養した凍結融解精子を受精能獲得の指標として用いられているチロシンリン酸化抗体を用いた Westernblotting に供した。その結果、対照区ではチロシンリン酸化を示すシグナルが認められなかったが、IBMX 区では、培養時間依存的にシグナルが検出された。

次に、IBMX を 200 および 400  $\mu\text{M}$  添加した前培養および受精の各培地(ともに TYH)を用いて IVF を行い、受精率および胚盤胞への発生率を調べた。凍結融解精子は、各濃度の IBMX を添加した TYH 中で 1-2 時間前培養した。一方、過剰排卵処置した雌から卵丘細胞卵子複合体を回収し、IBMX を添加した TYH 中で IVF を行った。IBMX を 200 および 400  $\mu\text{M}$  添加した前培養・受精培地で IVF したときの受精率および胚発生率は、前培養を 1 時間行った場合に前培養 2 時間よりも高い割合を示した。この IBMX 処理を用い、さらに前培養培地から  $\text{Ca}^{2+}$  を除去した場合の受精率について検討したところ、凍結融解精子を  $\text{Ca}^{2+}$  無添加 TYH 中で前培養し、TYH 中で IVF したときの受精率および胚盤胞率は、200  $\mu\text{M}$  区および 400  $\mu\text{M}$  区とも、 $\text{Ca}^{2+}$  添加培地で前培養を行った凍結融解精子に比べ有意に高かった。

以上の結果から、C57BL/6J マウスの凍結融解精子を IBMX で処理することにより、受精能獲得を誘起出来ること、また  $\text{Ca}^{2+}$  無添加培地で 1 時間前培養を行い、IVF を行うことにより、IVF の成績を改善出来ることが明らかになった。今後は、マウス C57BL/6J 系統の卵を用いて IVF を行い、IVF 後に得られた胚を移植し、個体への発生能を検討する予定である。

1) Seita Y *et al.* Biol. Reprod. 2009; 80: 503-510.

2) Toyoda Y *et al.* Jpn. J. Anim. Reprod. 1971; 6: 129-141.

# ラット未受精卵を卵丘細胞卵子複合体の状態でガラス化保存すると その体外受精率は改善する

藤原 克祥<sup>1</sup>・伊藤 潤哉<sup>1,2</sup>・柏崎 直巳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院 獣医学研究科 <sup>2</sup>麻布大学 獣医学部

【目的】哺乳類生殖細胞の超低温保存は、効率的な遺伝資源保存やヒト生殖補助医療として重要な技術である。未受精卵を効率よく超低温保存できれば、保存した未受精卵からの個体復元に体外受精(IVF)に用いる際、雄の遺伝的背景を選択することができ、極めて貴重な技術となる。しかし未受精卵は、受精卵・胚と比較するとその加温後の発生能が著しく低下する。その原因として、未受精卵が低温および凍害保護物質 (Cryoprotective Agents: CPAs)に対する感受性が高いことがあげられる。さらに、高濃度の CPAs に曝されることにより卵細胞質内の  $Ca^{2+}$ 濃度が上昇し、表層顆粒開裂・透明帯硬化が誘起され、細胞膜傷害等により保存卵の精子侵入を妨げられると考えられている。本研究では、ラット未受精卵ガラス化保存の改良を目的とし、平衡液およびガラス化液中のカルシウムの有無と CPAs (Dimethylsulfoxide (DMSO)および Ethylene Glycol (EG))の組み合わせが、加温卵の生存率、受精率・発生率に与える影響を検討した。さらに、ガラス化保存未受精卵の卵丘細胞付着の有無が、保存後の IVF における受精能に及ぼす影響についても検討した。

【方法】過剰排卵処置雌ラット(Crij: Wistar, 3-5 週齢)から未受精卵を採取し、クライオトップによるガラス化保存を行った。(実験 1) 平衡液およびガラス化液中のカルシウムの有無と DMSO および EG の組み合わせが加温後の生存性・発生能に与える影響を検討した。各区のガラス化保存卵の生存性と人為的活性化処置後の発生能を調べた。さらに表層顆粒放出を免疫蛍光染色により調べた。(実験 2) 卵丘細胞付着の有無が加温・IVF 後の受精能に及ぼす影響について検討した。ラット卵丘細胞卵子複合体(COC)はそのままの状態(COC), 裸化した状態(DO)でそれぞれガラス化保存した後に IVF を行った。IVF に用いる精子は雄ラット(Crij: Wistar, 12 週齢以上)の精巢上体尾部から採取し、受精能獲得を誘起するために 5 時間前培養を行った。(実験 3) 実験 2 より COC 区のガラス化保存卵と卵黄液を用いて凍結保存したラット精子による IVF を行った。凍結精子は融解後、受精能獲得を誘起するために 200  $\mu$ M 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX)添加培地で 5 時間前培養した。得られた受精卵をレシピエント雌ラットに胚移植(ET)し、産仔への発生能を評価した。

【結果】(実験 1) カルシウムを含まず EG だけを含むガラス化液でガラス化保存した卵の活性化処置後における胚盤胞率(23.1%)は、カルシウムを含まず DMSO だけを含むガラス化液で保存した区(3.8%)と比較して有意に高い割合を示した( $P<0.05$ )。平衡液およびガラス化液としてカルシウムを添加しないものを用いた場合、受精率は改善しなかったが IVF 後に困卵腔への精子侵入が認められた(55.0%)。カルシウムを含まず EG だけを含むガラス化液で保存した卵は、カルシウムを含み DMSO・EG を含むガラス化液で保存した卵と比較し蛍光発色が少なく、表層顆粒放出が抑制された。(実験 2) 加温・IVF 後の前核期胚率は COC 区で 31%, DO 区では 0%であり、卵丘細胞卵子複合体の状態未受精卵をガラス化保存・IVF することで受精卵を作出できることが明らかとなった。(実験 3) ガラス化保存卵は凍結融解精子との IVF により受精卵が得られ、その受精卵は ET により産仔へ発生した。

【結論】カルシウム無添加, EG を含むガラス化液で卵丘細胞卵子複合体の状態ではガラス化保存することにより, ラット未受精卵のガラス化保存を改良することができた. この改良により, ラットガラス化保存未受精卵は加温後に高い生存性を示し, 表層顆粒放出が抑制される. さらにこの保存された未受精卵は, IVF を介して受精し, 産仔への発生能を有する. ラットにおいては雌雄両配偶子を超低温保存し, 保存後にこれらの IVF からの産仔作出例は我々の知る限りでは初の成功例である.

## IVF 後の余剰精子を用いたラット ICSI 胚の発生能

中内 千乃<sup>1</sup>・伊藤 潤哉<sup>1,2</sup>・柏崎 直巳<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>麻布大学大学院 獣医学研究科, <sup>2</sup>麻布大学 獣医学部

人工授精(Artificial insemination)<sup>1</sup>、卵細胞質内精子注入法(Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI)<sup>2</sup>や体外受精(In Vitro Fertilization, IVF)<sup>3</sup>は、有用動物の効率的作製法として、またヒトにおいては生殖補助医療技術(Assisted Reproductive Technologies, ARTs)として広く用いられている。ラットにおいて、これらの技術は確立されているものの ICSI 胚の発生能は低く、されなる改善が求められる。我々の研究室では、薬剤処理によりラット精子の先体部分を除去することで、ラット ICSI 胚の発生能が改善することを報告した<sup>4</sup>。そこで本実験では、受精能獲得を誘起させたラット精子を ICSI に用いることで、ICSI 胚の発生能の改善を試みた。

雌ラットから採取した卵丘細胞卵子複合体(COCs)を裸化後、雄ラットから採取した精巣上体精子を用いて IVF を行った。IVF 後、残った精子はクライオチューブに回収し、液体窒素中で凍結保存・融解した後、ICSI に用いた(IVF-ICSI 区)。一部の精子は、COCs 非存在下で IVF と同様に培養を行い、回収・凍結後 ICSI に用いた(Pre-ICSI 区)。さらに、ストローにて凍結保存した精子を融解後ただちに ICSI に供したものを対照区とした。精子注入後、雌雄両前核形成率、2 細胞期率および胚盤胞形成率をそれぞれ調べた。また、レシピエントに胚移植を行い、個体への発生を調べた。

対照区の注入後の雌雄両前核形成率、2 細胞期率および胚盤胞率率は、91.3%、63.8%および 23.8%であった。一方、IVF-ICSI 区では、それぞれ 91.1%、73.3%および 35.6%であった。さらに Pre-ICSI 区では、それぞれ 92.5%、84.9%および 34%であり、IVF-ICSI 区および Pre-ICSI 区の胚盤胞率は、対照区に比べ高い割合であった。また、対照区の産子率は 8%であり、Pre-ICSI 区では、15.7%であった。精子先体除去率において、IVF-ICSI 区及び Pre-ICSI 区は、対照区に比べて有意に高い割合を示した。そして、ラット精子における PLC $\zeta$  は、全ての試験区で確認された。さらに、受精能獲得の指標となるチロシンリン酸化は、IVF-ICSI 区および Pre-ICSI 区で確認された。

以上のことから、受精能獲得を誘起させた精子を IVF に用いることで、ICSI 胚の発生率が向上する可能性があることが明らかとなった。また、受精しなかった精子を回収し、ICSI に用いることが可能であることが明らかとなった。この知見は、ヒト ART へも応用できる可能性があると考えられる。

- 1) Kashiwazaki N *et al.* Method. Mol. Biol. 2010; 597: 311-322.
- 2) Hirabayashi M. J. Reprod. Dev. 2008; 54: 95-99.
- 3) Seita Y *et al.* Biol. Reprod. 2009; 80: 503-510.
- 4) Seita Y *et al.* J. Reprod. Dev. 2009; 55: 475-479.

## ブタ卵母細胞の多精子侵入を許容するメカニズム:その解明にむけて

谷原 史倫<sup>1,2</sup>, 中井 美智子<sup>2</sup>, 野口 純子<sup>2</sup>, 金子 浩之<sup>2</sup>, 菊地 和弘<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> 山口大学大学院連合獣医学研究科, <sup>2</sup> 農業生物資源研究所

ブタ卵母細胞(以下、卵)は他の哺乳類に比較して体外受精(IVF)の際の多精子侵入が多発し、胚発生率が低い主要因となっている。しかし、多精子拒否に関する研究を行う上でよい材料となり得る。多精子侵入を防ぐ機構としては、一般に知られている透明帯反応と、マウス等で報告されている卵細胞膜による拒否機構があり、ブタではこれらが不完全であると考えられている。本研究は、ブタ体外成熟卵の多精子侵入を許容する機序に関して以下の検討を行った。

【実験1】体外成熟培養後、ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去した。第一極体を放出し透明帯を有する成熟卵(ZP(+))と、ZP(+))卵をプロナーゼ処理後にピペティングにより透明帯を除去した卵(ZP(-))を用いた。ZP(+))卵とZP(-))卵に、4頭の種雄豚からの凍結精巣上体精子にてIVFを行い、IVF開始10時間後に固定し染色後に精子侵入状況を調べた。4頭中2頭の種雄豚において、ZP(+))卵と比較しZP(-))卵で精子侵入卵率は有意( $P<0.05$ )に低く、4頭中3頭で平均侵入精子数が有意( $P<0.05$ )に低かった。

【実験2】実験1で使用した精子のうち、透明帯の有無で精子侵入に差があり、その差がもっとも大きかった精子を用いて、ZP(+))卵とZP(-))卵における1、2、3、4、5および10時間での精子侵入状況を確認した。ZP(+))卵、ZP(-))卵共に時間経過に伴い精子侵入卵率が増加し、ZP(+))卵では平均侵入精子数も増加したが、ZP(-))卵では平均侵入精子数に差はなかった。

【実験3】実験2ではZP(-))卵の平均侵入精子数に差はなく、一見すると卵細胞膜による多精子拒否が起きているようであった。そこで、実験3ではZP(-))卵を用い、媒精時間を延長した2実験区(5時間、対照区は3時間)について、IVF開始3、5および10時間後の精子侵入状況を確認し、卵細胞膜による多精子拒否についてより詳細に調べた。IVF5時間の区では対照区と比較し10時間後の精子侵入卵率・平均侵入精子数が有意( $P<0.05$ )に増加した。

【結論】ブタでは透明帯反応と卵細胞膜による多精子拒否が不十分であること、逆に透明帯が存在しない卵では精子の侵入が抑制される可能性が示された。

【今後の展開】本研究では、透明帯がないと精子侵入卵率・平均侵入精子数が下がるという、予想と反する結果が得られた。これは、透明帯を除去する際の酵素(プロナーゼ)処理が卵細胞膜に何らかの影響を及ぼした可能性がある。そこでマイクロマニピュレーターを使用し、酵素処理をせずに透明帯を機械的に除去した卵にIVFを行い、受精におよぼす影響を検討する。



## ウシ個別識別培養システムとそれを利用した卵胞と卵子の発生能の関係

的場 理子

独立行政法人 家畜改良センター

ウシは体内では1個の胚が育ち単体で生まれてくるが、体外受精胚は集合培養されることが一般的である。体外培養環境が体内環境に比べて劣るため、1個の胚の自己分泌因子だけでなく、複数胚の相互分泌因子等の成長促進因子によって、体外発生を補助すると考えられているためである。一方、卵胞構成物のパラメーターと卵子の発生能の関係を詳細に調べるためには、集合培養と同等の発生率を達成する個別識別培養システムの開発が重要である。過去に研究されている哺乳動物の個別培養では、大多数が体外受精を終了した胚を体外発生培養する段階から始められている。個別培養によって未成熟卵子を胚盤胞まで発生させた研究が少数報告されていたが、その胚盤胞発生率は著しく低く、卵胞と卵子の発生能の関係を研究するには不十分だった。著者らは、個別培養しながら、集合培養の利点を利用し、ウシの未成熟卵子を胚盤胞まで発生させる3種類の培養システム: the Well-of-the-Well (WOW)、Cell-Tak およびポリエステルメッシュが有効であることを明らかにした (Matoba *et al.*, *Reproduction, Fertility and Development* 2010; 22: 839-851.)。

開発した個別識別培養システムの Cell-Tak を用い、卵胞構成物の値によって、体外発生における卵子の発生能を予測可能か検討した。食肉処理場由来卵巣から、直径 4.5mm 以上の卵胞を個別に切開採取した。卵胞構成物のパラメーターとして、各卵胞液のテストステロン、エストラジオールおよびプロジェステロン濃度、各卵胞の顆粒膜細胞および莢膜細胞の Gene Expression による転写産物量、さらに卵胞内代謝物である水溶性代謝物および脂肪酸濃度を分析した。卵子の発生能を、卵割後に胚盤胞に発生した卵子および卵割後に変性した卵子の2群に分け(ステロイドホルモンでは卵割しなかった卵子も加えた3群に分け)、これらのパラメーターを用いて比較した。その結果、卵胞内ステロイド濃度は卵子の発生能に関連していなかった。一方、転写産物量の結果では、卵割後に胚盤胞へ発生した卵子の顆粒膜細胞の *LHCGR* が、莢膜細胞の *ESR1* および *VCAN* が高い値を示した。卵胞液の代謝プロファイルでは、アミノ酸の L-アラニン、グリシン、L-グルタミン酸およびクエン酸、脂肪酸のリノレイン酸濃度が胚盤胞に発生した卵子と正の相関があり、尿素、炭水化物、脂肪酸の飽和脂肪酸 (SFAs) およびパルミチン酸で正の相関が認められた。以上から、顆粒膜細胞、莢膜細胞の Gene Expression、卵胞液の代謝プロファイルは、体外での卵子の発生能を非侵襲的に予測することが可能なマーカーとなりうることを示唆された。

## ブタ体外受精卵の異常と修復について

菊地 和弘

独立行政法人 農業生物資源研究所 動物科学研究領域

家畜・大動物において、特にウシでは、体外胚生産技術いわゆる卵母細胞（以下、卵）を体外成熟・受精しさらにその受精卵を体外培養して胚を作製する技術が、子畜生産の現場に導入されている。ブタにおいても、この技術が遺伝資源の保存や利用上で重量な技術となっている。いずれにおいても作製された体外生産胚は正常な発生を担保するものであることが求められる。しかしながら、特にブタでは正常な胚を効率的に作製する上で2つの重大な問題点が残っている。1つは多精子受精に起因する、もう1つは未成熟段階での精子が侵入することにより起因する体外生産胚の倍数性の異常の問題である<sup>1-3)</sup>。いずれも異常倍体（多倍体）の胚となり、胚発生の過程で発生を停止し死滅してしまうと考えられている。これらの問題点を回避するためには、体外受精の前に成熟卵を慎重に選抜すること、そして受精の過程が正常に進行しているかどうか（多精子進入でないか、あるいは1個の雄性前核が形成されているか）を確実に確認して正常受精卵を選抜することが重要となる。ところが、私たちの最近の研究では、多精子受精より由来した受精卵（多倍体卵と考えられる）のいくつかは、正常な発生能を有する二倍体胚へ発生することを確認している<sup>4)</sup>。しかし、多倍体受精卵が正常な状態へと発生する機構についてはあまりよく知られていない<sup>5,6)</sup>。この機構を解明することにより、ブタに限らず他の動物種を含めて、体外胚生産技術さらには体外成熟卵を用いた形質転換やクローン動物作製といった技術の効率化につながるものと思われる。そして、ヒトの生殖補助技術の進展にも貢献するものと期待される。本シンポジウムでは、ブタにおける体外成熟ならびに体外受精による異常倍体胚の作出について解説し、胚発生過程での倍数性修復可能性について検討を行う。

- 1) Kikuchi K *et al.* J. Reprod. Fertil. 1999; 116: 143-156.
- 2) Kikuchi K *et al.* Reprod Dom Anim, 2008;43 Suppl. 2: 401-406..
- 3) Kikuchi K *et al.* Reproduction, Suppl. 2009; 66: 135-147.
- 4) Somfai T *et al.* Anim. Reprod. Sci. 2005; 90: 307-328.
- 5) Somfai T *et al.* Reproduction 2006; 132: 559-570.
- 6) Somfai T *et al.* Anim. Reprod. Sci. 2008; 107: 131-147.

## ヒト精液中に感染する細菌種の同定と、その内毒素の放出、 それが精子の機能性・体外受精の成績に及ぼす影響

藤田 陽子  
ウイメンズ・クリニック大泉学園

精液中には細菌が感染していること、細菌感染が妊娠率を低下させること、凍結精液や液状保存精子の運動性を低下させることが知られている。ペニシリンなどの溶菌性抗生物質が保存液へ添加されているが、その効果は部分的であるため、精液への細菌感染と精子の機能との関係は不明な点が多い。本研究において、ヒト精液中から *E. coli* などのグラム陰性菌や、*Staphylococcus sp.* などのグラム陽性菌が検出された。ブタ射出精液を抗生物質無添加、37 度で培養した結果、採精直後の精液中細菌数と培養 3 時間後の精子運動率との間に負の相関関係があること、この負の作用がペニシリンでは影響を与えないが、グラム陰性菌の LPS を不活化させる Polymyxin B により克服された。すなわち、グラム陰性菌から LPS が放出され、精子に直接的に影響を与えていると推察され、実際に精液から LPS が検出され、それは溶菌性の抗生物質により増加した。そこで、ブタ、マウス、ヒト精子における LPS 受容体である TLR4 の発現を検出した結果、精子先体部に局在していた。さらに、LPS の添加は、いずれの種の精子の先体部を損傷させ、Caspase 活性によるアポトーシスを引き起こし、精子生存率を低下させた。グラム陰性菌の作用が LPS-TLR4 を介した直接的影響であることを確認するため、*Tlr4*<sup>-/-</sup> マウスを用いた結果、*Tlr4*<sup>-/-</sup> マウスの精子では LPS や不活化細菌による影響は認められなかった。以上の結果から、精子は TLR4 を発現し、それが精液中の細菌感染を認識し、アポトーシスにより生存性を低下させるという、精子の初期免疫応答が初めて明らかとなった。我々は、体外受精における精子処理、精子の凍結保存や液状保存において、処理液や保存液中への溶菌性抗生物質と Polymyxin B の複合処理が、人工授精や体外受精における受胎率や受精率を向上させることも確認していることから、精子の自然免疫応答の解析は、ヒトの高度生殖補助医療にも大きく貢献するものである。

## 緻密かつ微細なヒト体外受精

大月純子  
永井クリニック

一人でも多くの不妊治療をしている患者さんに授かってほしい。それが生殖医療に携わる我々の共通の願いであり、ヒト体外受精は安全かつ染色体異常・遺伝子異常を増やさないうように非常に緻密な作業が求められる。卵巣過排卵刺激、体外受精などの人為的な手法が不良卵子(胚)を作る可能性が示唆されていると同時に、ヒト卵子(胚)では自然周期卵子においても他の動物の卵子と比べて高率に染色体異常が起こっていることが報告されている。異数体の形成が加齢と共に上昇することから、環境や労働・精神面でのストレスによる影響を受けている期間が長いことが卵子の質に影響を及ぼす為と考えられているが、その原因とメカニズムには未だ不明な点が多い。我々はその原因を探るべく、ヒト卵子の形態異常に着目してきた。また、ヒト卵子の染色体を倒立顕微鏡下(無染色)にて可視化することに成功し、減数分裂時の染色体の動的解析を行った結果、ヒト卵子とマウス卵子の減数分裂においてさまざまな相違点が見つかった。本講演では我々が今までに報告してきたヒト卵子とマウス卵子間での様々な違いを紹介すると共に、ヒト体外受精の緻密さを追求したい。

## 体外受精の発展とその応用

森本 義晴

IVF なんばクリニック

体外受精技術が開発されて30有余年を過ぎたが、その内容は当初とかなり様変わりしている。1978年産婦人科医師である Steptoe 博士と、生物学者である Edwards 教授が10年以上の試行錯誤の末、体外受精児の誕生に成功した。Steptoe 博士はピアノを学会で披露されるほどの幅広い人間性をお持ちであったようであり、一方 Edwards 教授は極めて厳格な学者であり昨年ノーベル賞を受賞されたことは衆知のことである。私も、プライベートに Edwards 教授とご一緒させて頂いたことがあるが、大変ジョークのお好きな英国紳士であったと記憶している。

さて、体外受精技術における最初の技術革新は何と言っても採卵法にある。初期の体外受精では採卵は全て腹腔鏡で行っていた。そのため、患者の入院、麻酔医の確保などとても煩雑で多数の患者に実施することが困難であったが、その後経腹超音波プローブに次いで経膈超音波プローブが開発され、採卵は極めて容易にそして迅速に効率よく行われるようになった。その次の進歩は卵巣刺激法である。最初の症例は、自然発育した卵胞を穿刺していたが、いつ何時卵胞が成熟するかわからず、患者も医療者側も不便を強いられていた。現在では、遺伝子組み換え FSH が登場し、GnRH アゴニスト、アンタゴニストが市場に投入され、まさにハイテク制御型卵巣刺激法が可能となって、採卵数も向上し、意図するままに成熟卵子が得られるようになった感がある。今後は、long-acting FSH が患者の注射の負担を減らすだろうし、経口 FSH や経口 hCG の開発によって、注射が不要な卵巣刺激も可能になるだろう。さらに、究極の体外受精法として無刺激で行う In Vitro Maturation (IVM) がある。IVM は現在主に多嚢胞性卵巣症候群の患者に応用されているが、もう少し妊娠効率が上がれば、全ての体外受精に応用されることになると考えている。胚移植法も当初の方法より大変進歩し、現在多くの移植用カテーテルが市販されている。初期胚と胚盤胞を別々に移植する二段階胚移植法は着床障害例に、頸筋層的胚移植法は移植困難例に応用される特殊な新しい胚移植法である。

体外受精技術の進歩のなかでさらに特筆すべき点が二点ある。それは培養法と凍結法の進歩である。培養技術はヒト胚の胚盤胞までの培養を可能にした。現在、同じ培養液で最後まで培養する方法と、途中で培養液を変える Sequential method がある。一方、胚凍結法はガラス化法が凍結融解後の生存率を著しく改善し、凍結はあらゆるステージで使用されるようになった。これによって、現在、卵巣組織や未成熟卵子の凍結も可能となっている。

さて、未来に目を向けて見よう。胚性幹細胞からの精子や卵子などの配偶子の作出は眼前に迫っている。iPS 細胞から配偶子が得られる事になれば、体細胞を原材料とするため、その利用価値は計り知れない。今後、さらなる展開が予想され、まだまだこの分野は進歩すると考えられ、それは多くの人を幸せにし、本来の生殖医療の目的を達成することになるだろう。

SRE

2011 年度 日本生殖工学会学術集会

講演要旨集

編集・発行 SRE[日本生殖工学会]

発行代表者 柏崎 直巳

〒252-5201

神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

麻布大学 獣医学部 動物繁殖学研究室内

電話:042-769-2339

FAX:042-769-1762

発行 平成 23 年 9 月 23 日