

—総説—

特集：管理胚培養士セッション～日ごろのラボ業務からもう一步先へ～

顕微授精後に受精させられなかった卵子から何を学ぶか？

What should we learn from the unfertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection?

平岡 謙一郎^{1,2,3}

Kenichiro Hiraoka^{1,2,3}

¹ 亀田IVFクリニック幕張 〒261-8141 千葉市

² 亀田総合病院 〒296-8602 鴨川市

³ 東京医科歯科大学 〒113-8510 文京区

¹ Kameda IVF Clinic Makuhari, 1-3-D3F Nakase, Mihama-ku, Chiba 261-8141, Japan

² Kameda Medical Center, 929 Higashi-cho, Kamogawa, Chiba 296-8602, Japan

³ Tokyo Medical and Dental University, 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

要旨：【目的】顕微授精後に受精しなかった場合の対策を考察する。【方法】過去に行った顕微授精後の受精成績に関する比較検討から、顕微授精後に受精しなかった場合、特に、変性、0PN、1PN、3PNの対策を考察する。【結果】過去の比較検討から、破膜後にICSI針を奥に押し進めたときは、奥に押し進めなかったときに比べて変性率が有意に高いこと（10% vs. 14%）、偏光観察により紡錘糸を確認できなかった卵子（未熟である可能性が高い）は紡錘糸を確認できた卵子（成熟している可能性が高い）に比べて0PN率と3PN率が有意に高いこと（0PN率：5% vs. 15%、3PN率：1% vs. 8%）、精子選別を低倍率（400倍）で実施したときは、高倍率（1,200倍）で実施したときに比べて0PN率が有意に高いこと（3% vs. 11%）、破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量が多い従来法（ $2,746 \pm 940 \mu\text{m}^3$ ）は、破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量が少ないピエゾ法（ $0 \pm 0 \mu\text{m}^3$ ）に比べて変性率と1PN率が有意に高いこと（変性率：5% vs. 10%、1PN率：1% vs. 4%）が示された。【考察】顕微授精後に卵子が変性した場合の対策は破膜後にICSI針を奥に押し進めないこと、および、破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量を少なくすること、0PNだった場合の対策は顕微授精を実施する時期（卵子の成熟度）と精子選別を見直すこと、1PNだった場合の対策は破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量を少なくすること、3PNだった場合の対策は顕微授精を実施する時期（卵子の成熟度）を見直すこと、と考えられた。

キーワード：顕微授精、生存、変性、受精

はじめに

高度生殖補助医療において、胚培養士の主要な業務は受精・培養・凍結の3つと考える。そのなかでも受精、取り分け顕微授精は高度な技術を要する。現在のところ、顕微授精をした卵子全てが受精することは残念ながらない。顕微授精後に受精させられない要因は多岐に渡る。顕微授精後に受精させるために鍵となるのは、いうまでもなく、顕微授精技術・卵子の質・精子の質の3つである。この3つのうち1

つでも欠ければ、正常受精まで至ることが難しくなる。我々胚培養士は顕微授精後に受精させられなかった場合、原因と対策を考えることで成績の向上と維持を目指すことが強く求められている。本稿では、過去の顕微授精後の受精成績に関する比較検討から、顕微授精後に受精させられなかった場合の原因と対策について考察する。

対象と方法

顕微授精後に受精（卵細胞質内に2前核を形成した卵子）しなかった、変性（卵細胞質膜の輪郭が不明瞭で卵細胞質が退行・萎縮した卵子）、0PN（卵細胞質内に前核の形成が無かった卵子）、1PN（卵細胞質内に1前核を形成した卵子）、3PN（卵細胞質内に3前核を形成した卵子）の発生に関与したと思われる要因を明らかにするため、過去に発表した4つ

（受付 2020年7月30日／受理 2020年7月31日）

別刷請求先：〒261-8141 千葉県千葉市美浜区中瀬1-3-D棟3F

亀田IVFクリニック幕張

e-mail: ken.msn.hiraoka@gmail.com

の比較検討を要旨形式で示し、これらの結果から受精させられなかった場合、特に、変性、0PN、1PN、3PNの発生に関与したと思われる原因と対策を考察する。

顕微授精の方法

顕微授精の方法には先端にスパイクが付いたICSI針を用いて透明帯の穿孔を行い、ICSI針の穿刺またはICSI針内への卵細胞質の吸引により卵細胞質膜を破膜後、卵細胞質内へ精子を注入する従来法、あるいは、先端が平坦で複数のピエゾパルスにより透明帯の開孔を行い、ICSI針の穿刺または単一のピエゾパルスにより卵細胞質膜の破膜後、卵細胞質内へ精子を注入するピエゾ法を用いた。従来法とピエゾ法の詳細は過去の文献を参考にして頂きたい¹⁻³⁾。

結果

比較検討①：従来法による顕微授精において破膜後のICSI針の動きが受精成績に及ぼす影響

【目的】従来法による顕微授精において破膜後のICSI針の動きが受精成績に及ぼす影響を調べた。

【方法】1,773個の卵子を対象とした。このうち826個はICSI針を卵細胞質直径の50%まで穿刺し卵細胞質をICSI針のなかへ吸引して破膜後、ICSI針をさらに卵細胞質直径の80%まで押し進めてから精子を注入した。947個はICSI針を卵細胞質直径の80%まで穿刺し卵細胞質をICSI針のなかへ吸引して破膜後、ICSI針を動かさずに、その場で精子を注入した。なお、顕微授精の方法には従来法を用いた。

【結果】結果は表1に示した。破膜後にICSI針を押し進めた卵子と押し進めなかった卵子の変性率は14%と10%となり、破膜後にICSI針を奥に押し進めた卵子の変性率が有意に高い値を示した ($P<0.05$)。破膜後にICSI針を押し進めた卵子と押し進めなかった卵子の受精率、変性率、1PN率、3PN率の比較において両群間に有意差は認められなかった¹⁾。

【考察】顕微授精において破膜後にICSI針を奥に押し進めた場合、押し進めなかった場合に比べて変性率は上がることが示唆された。

比較検討②：ピエゾ法による顕微授精において偏光顕微鏡による卵子紡錘糸の可視／不可視が受精成績に及ぼす影響

【目的】ピエゾ法による顕微授精において偏光顕微鏡による卵子の紡錘糸の可視／不可視が顕微授精後の受精成績に及ぼす影響を調べた。

【方法】529個の卵子を対象とした。hCG投与後38-40時間目に偏光顕微鏡により卵子の紡錘糸の観察を行い、卵子内部に紡錘糸が確認できた可視卵子489個と卵子内部に紡錘糸が確認できなかった不可視卵子40個の顕微授精後の受精成績を比較した。なお、顕微授精の方法にはピエゾ法を用いた。

【結果】結果は表2に示した。可視卵子と不可視卵子の受精率は92%と70%となり、可視卵子が不可視卵子に比べて有意に高い値を示した。可視卵子と不可視卵子の0PN率は

5%と15%となり、不可視卵子が可視卵子に比べて有意に高い値を示した ($P<0.05$)。可視卵子と不可視卵子の3PN率は1%と8%となり、不可視卵子が可視卵子に比べて有意に高い値を示した ($P<0.05$)。可視卵子と不可視卵子の変性率と1PN率の比較において両群間に有意差は認められなかった⁴⁾。

【考察】偏光顕微鏡により紡錘糸が不可視であった卵子は、紡錘糸が可視であった卵子に比べて0PN率と3PN率は高くなることが示唆された。

比較検討③：ピエゾ法による顕微授精において精子選別倍率が受精成績に及ぼす影響

【目的】ピエゾ法による顕微授精において精子を選別する倍率(400倍と1,200倍)の違いが顕微授精後の受精成績に及ぼす影響を調べた。

【方法】317個の卵子を対象とした。精子選別を400倍で行った180個と1,200倍で行った137個の顕微授精後の受精成績を比較した。400倍での精子選別は10倍の接眼レンズ、40倍の対物レンズの組み合わせにより実施した。1,200倍での精子選別は、10倍の接眼レンズ、60倍の対物レンズ、中間変倍(2倍)の組み合わせにより実施した。1,200倍での精子選別は以下のように行った。精子をICSI針の中に吸引し、泳いでいる精子の動きから精子頸部に著しい曲がりがないか確認した。次いで、精子頸部の幅が広い部分(図1)と細長い部分(図2)の2方向から見た長さ、幅、形、空胞の有無を確認した。精子頸部が真っ直ぐ、精子頸部の大きさが

表1 従来法による顕微授精において破膜後のICSI針の動きが受精成績に及ぼす影響

	破膜後奥に押し進める	破膜後奥に押し進めない	有意差
ICSI数	826	947	-
受精数(%)	562 (68)	676 (71)	NS
変性数(%)	114 (14)	93 (10)	<0.05
0PN数(%)	100 (12)	112 (12)	NS
1PN数(%)	33 (4)	47 (5)	NS
3PN数(%)	17 (2)	19 (2)	NS

NS = not significant.

表2 ピエゾ法による顕微授精において偏光顕微鏡による卵子紡錘糸の可視／不可視が受精成績に及ぼす影響

	可視卵子	不可視卵子	有意差
ICSI数	489	40	-
受精数(%)	450 (92)	28 (70)	<0.05
変性数(%)	7 (1)	2 (5)	NS
0PN数(%)	23 (5)	6 (15)	<0.05
1PN数(%)	4 (1)	1 (3)	NS
3PN数(%)	5 (1)	3 (8)	<0.05

NS = not significant.

大き過ぎず・小さ過ぎず，精子頭部の形が左右対称，精子頭部の空胞が無い精子を選別した。ほぼ全ての精子頭部に空胞が見られる場合，精子頭部の大きさと形を優先し，極力，空胞の数が少なく小さいものを選別した。なお，顕微授精の方法にはピエゾ法を用いた。

【結果】結果は表3に示した。400倍で精子選別を行った卵子と1,200倍で精子選別を行った卵子の正常受精率は77%と92%となり，400倍に比べて1,200倍が有意に高い値を示した ($P<0.05$)。400倍で精子選別を行った卵子と1,200倍で精子選別を行った卵子のOPN率は11%と3%となり，1,200倍に比べて400倍が有意に高い値を示した ($P<0.05$)。400倍で精子選別を行った卵子と1,200倍で精子選別を行った卵子の変性率，1PN率，3PN率の比較において両群間に有意差は認められなかった⁵⁾。

【考察】顕微授精において400倍での精子選別は1,200倍

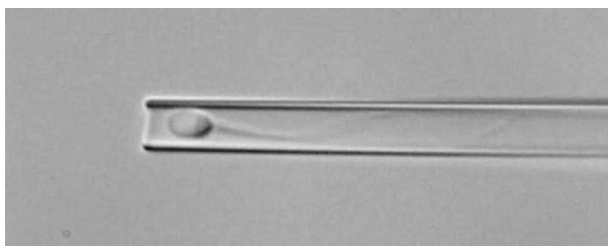


図1 精子選別の様子 (精子頭部，幅が広い部分を観察)

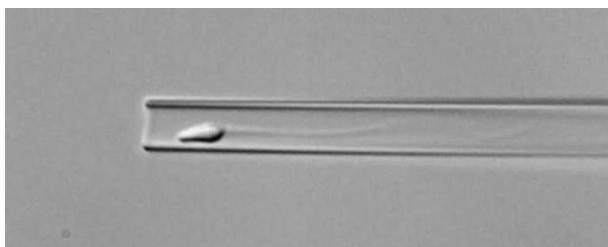


図2 精子選別の様子 (精子頭部，細長い部分を観察)

での精子選別に比べてOPN率は高くなることが示唆された。

比較検討④：顕微授精において手技の違い(従来法とピエゾ法)が受精成績に及ぼす影響

【目的】顕微授精の方法(従来法とピエゾ法)の違いが受精成績に及ぼす影響を調べた。

【方法】1,341個の卵子を対象とした。このうち顕微授精を従来法で行った624個とピエゾ法で行った717個の顕微授精後の受精成績を比較した。また，破膜時にICSI針内に吸引した卵細胞質を比較した。従来法では破膜時，ICSI針内部に吸引された卵細胞質が最も奥まで達した地点を記録し，ICSI針先端からの距離により吸引卵細胞質を算出した。なお，ピエゾ法ではピエゾパルスにより破膜し，その際，卵細胞質をICSI針内に一切吸引しなかった。

【結果】結果は表4に示した。従来法とピエゾ法の正常受精率は68%と75%となり，従来法に比べてピエゾ法が有意に高い値を示した ($P<0.05$)。従来法とピエゾ法の変性率は10%と5%となり，従来法がピエゾ法に比べて有意に高い値を示した ($P<0.05$)。従来法とピエゾ法の1PN率は4%と1%となり，従来法がピエゾ法に比べて有意に高い値を示した ($P<0.05$)。従来法とピエゾ法のOPN率と3PN率の比較において，両群間に有意差は認められなかった。従来法とピエゾ法の破膜時のICSI針内への平均吸引卵細胞質量は， $2,746 \pm 940 \mu\text{m}^3$ と $0 \pm 0 \mu\text{m}^3$ となり，従来法がピエゾ法に比べて多かった³⁾。

表3 ピエゾ法による顕微授精において精子選別倍率が受精成績に及ぼす影響

	400倍	1,200倍	有意差
ICSI数	180	137	-
受精数(%)	139 (77)	126 (92)	<0.05
変性数(%)	5 (3)	3 (2)	NS
OPN数(%)	19 (11)	4 (3)	<0.05
1PN数(%)	6 (3)	2 (1)	NS
3PN数(%)	11 (6)	2 (1)	NS

NS = not significant.

表4 顕微授精において手技の違い(従来法とピエゾ法)が受精成績に及ぼす影響と破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量

	従来法	ピエゾ法	有意差
ICSI数	624	717	-
受精数(%)	424 (68)	537 (75)	<0.05
変性数(%)	65 (10)	37 (5)	<0.05
OPN数(%)	99 (16)	122 (17)	NS
1PN数(%)	24 (4)	7 (1)	<0.05
3PN数(%)	12 (2)	14 (2)	NS
平均吸引卵細胞質量 (μm^3)	$2,746 \pm 940$	0 ± 0	

NS = not significant.

【考察】破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量が多い従来法は、破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量が少ないピエゾ法に比べて変性率と1PN率は高くなることが示唆された。

考 察

過去の比較検討から顕微授精後、変性、0PN、1PN、3PNが発生した原因を考察する。

変性：破膜後に針を押し進めている（顕微授精技術の問題）

比較検討①「従来法による顕微授精において破膜後のICSI針の動きが受精成績に及ぼす影響」から、卵細胞質膜破膜後にICSI針を卵子内部の奥に押し進めることで、変性率は高くなることが示唆された。特に多く見受けられたのは、ICSI針を押し進めている途中で破膜が起きているものの、破膜に気付かずICSI針をそのまま奥に押し進めてしまったことによる変性であった。破膜後にICSI針を奥に押し進めることにより、刺し口が広がってダメージが大きくなり、刺し口の卵細胞質膜の修復が妨げられることで、変性率が高くなると考えられた。

0PNと3PN：卵子の紡錘糸が不可視⇔卵子が未熟（卵子の質の問題）

比較検討②「ピエゾ法による顕微授精において偏光顕微鏡による卵子紡錘糸の可視／不可視が受精成績に及ぼす影響」から、偏光観察による紡錘糸の可視／不可視は受精に影響し、紡錘糸が「不可視」卵子は「可視」卵子に比べて、0PN率と3PN率は有意に高くなった。紡錘糸が「不可視」の場合の要因は色々考えられる。温度の低下⁶⁾、あるいは、pHの上昇⁷⁾により紡錘糸が見えなくなる環境的要因を除外すると、紡錘糸が「不可視」の要因は大きく分けて未熟と過熟の二つの場合が考えられる。我々は偏光観察により紡錘糸が「不可視」だった場合、顕微授精を実施せず1-2時間後に再度観察すると、紡錘糸が「可視」となる卵子が約60%あったことから、「不可視」の場合、卵子が未熟である(Telophase IからMetaphase IIへの移行途中であるProphase II)可能性が高いと考えられる。したがって、卵子が未熟な状態で精子を注入すると、受精のタイミングが早過ぎることで0PN率、あるいは、3PN率は高くなると考えられた。

0PN：精子選別が不十分（精子の質の問題）

比較検討③「ピエゾ法による顕微授精において精子選別倍率が受精成績に及ぼす影響」から、精子選別を400倍で行った場合、1,200倍で行った場合に比べて0PN率は高くなった。1,200倍の高倍率で形態的に良好な精子を選別することは、高い受精率を得るために重要である。精子選別を低倍率で行い形態的に不良な精子を選別すると、0PN率は高くなると考えられた。

変性と1PN：卵細胞質内への注入液量が多過ぎる（顕微授精技術の問題）

比較検討④「顕微授精において手技の違い（従来法とピエゾ法）が受精成績に及ぼす影響」から、顕微授精において破膜時にICSI針内への吸引卵細胞質量が多くなると、変性率と1PN率は高くなることが示唆された。ICSI針内への吸引卵細胞質量が多くなると、その分、精子注入時に卵細胞質内への注入液量も多くなり、そのことが原因で刺し口近辺の膜の修復が妨げられることで変性率が高くなり、また、精子周辺の注入液量が多くなると、精子から卵子への卵子活性化物質の伝達が妨げられることで1PN率は高くなると考えられた。

結 論

以上の考察から、顕微授精後、変性、0PN、1PN、3PNとなった場合の各対策は以下の通りと考える。

変性（顕微授精技術の問題）

破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量を少なくする、また、破膜後にICSI針を奥に押し進めないよう心掛ける。

0PN（卵子と精子の質の問題）

顕微授精を実施する時期（卵子成熟度）の見直しを行い（採卵のタイミングが早い場合は特に注意が必要）、形態的に良好な精子を選別するよう心掛ける。

1PN（顕微授精技術の問題）

破膜時のICSI針内への吸引卵細胞質量を少なくするよう心掛ける。

3PN（卵子の質の問題）

顕微授精を実施する時期（卵子成熟度）の見直しを行う。0PNでの対策と同様、採卵のタイミングが早い場合は特に注意が必要である。

以上、過去の比較検討から顕微授精後、変性、0PN、1PN、3PNとなった原因と対策を臨床成績から考察した。今回は独断で断定的に原因を特定したが、顕微授精技術・卵子の質・精子の質単独の問題ではなく複数の要因が重なることによって受精に至らないことも考えられる。受精しなかったとき、変性してしまったときに「そんなこともあるよ、しょうがない」と流さず、正解でなくとも、何らかの原因を特定し次の顕微授精に活かそうとする姿勢が胚培養士には必要と考える。今後、顕微授精後、変性、0PN、1PN、3PNとなる正確なメカニズムが解明され、より詳細で具体的な原因と対策を明らかにすることで、世界中の顕微授精成績が向上し維持されることを期待する。

文献

- 1) 平岡謙一郎・淵脇恩美・平岡夏織・絹谷正之・絹谷一雄 (2006) : ICSI の工夫点. *J. Mamm. Ova Res.*, 23, 184-185.
- 2) 平岡謙一郎・平岡夏織・田巻智慧・名田康子・桐明千晶・吉江正紀・宇都博文・吉田宏之・北村誠司・桑山正成 (2013) : 極薄ピペットを用いた Improved-Piezo-ICSI 法の臨床的有効性. *J. Mamm. Ova Res.*, 30, 53-58.
- 3) Hiraoka, K. and Kitamura, S. (2015): Clinical efficiency of Piezo-ICSI using micropipettes with a wall thickness of 0.625 μm . *J. Assist. Reprod. Genet.*, 32, 1827-1833.
- 4) Hiraoka, K., Tatsumi, T., Tajima, M., Ishikawa, T. and Kawai, K. (2019): Effect of meiotic spindle imaging in human oocytes following Piezo-ICSI on oocyte fertilization and embryo development. *Fertil. Steril., Suppl.* 112, e274.
- 5) Hiraoka, K., Otsuka, Y., Ishikawa, T., Kawai, K. and Harada, T. (2017): Effect the sperm selection magnification (400x vs. 1,200x) on fertilization results and embryo development in human Piezo-ICSI. *Fertil. Steril., Suppl.* 108, e147.
- 6) Wang, W.H., Meng, L., Hackett, R.J., Odenbourg, R. and Keefe, D.L. (2001): Limited recovery of meiotic spindles in living human oocytes after cooling-rewarming observed using polarized light microscopy. *Hum. Reprod.*, 16, 2374-2378.
- 7) Montag, M. and van der Ven, H. (2008): Symposium: innovative techniques in human embryo viability assessment. Oocyte assessment and embryo viability prediction: birefringence imaging. *Reprod. Biomed. Online*, 17, 454-460.