

—総説—

特集：生殖補助医療における精子処理の基礎と実際

非遠心型精子処理デバイスの導入と展望 Comparison and prospects of centrifugation-free sperm preparation device

辻 暖永^{1*}・福永 憲隆^{1,2}・浅田 義正^{1,2}

Haruhisa Tsuji^{1*}, Noritaka Fukunaga^{1,2} and Yoshimasa Asada^{1,2}

¹医療法人浅田レディースクリニック 〒450-0002 名古屋市

²浅田生殖医療研究所 〒486-0931 春日井市

¹Asada Ladies Clinic, Nagoya Building 4F, 4-6-17 Meieki, Nakamura-ku, Nagoya, Aichi Japan

²Asada Institute for Reproductive Medicine, Renaik4F, 1-4 Matsushin-cho, Kasugai, Aichi Japan

要旨：ARTや人工授精を実施する上で精液の処理は必須な工程である。一般的には密度勾配遠心法や遠心を用いた洗浄，Swim up法が多く用いられるが，最近では遠心処理による物理的なダメージによって生じる精子DNAの断片化が懸念されている。そこで，ZyMöt[®]やMIGLIS[®]をはじめとしていくつかの遠心処理を行わない精子処理デバイスが開発されている。当院でもこれら遠心処理を行わない精子処理デバイス導入に向けて検討を行ってきた。まず，MIGLIS[®]とZyMöt[®]の2種類のデバイスを同一症例の精液を用いて処理し，Sperm motility analysis system (SMAS)にて所見を解析した。その後，解析結果が良好であったZyMöt[®]と現行法である密度勾配遠心法で同一症例の精液を処理し，ICSI後の受精率および発生率を比較した。本稿では非遠心型精子処理デバイスについて検討した結果，ZyMöt[®]を臨床導入できると判断するに至った経緯を紹介すると共に，将来の展望について考察した。
キーワード：密度勾配遠心法，精子DNAの断片化，非遠心型精子処理デバイス，ZyMöt[®]，MIGLIS[®]

はじめに

人工授精およびICSIやIVFをはじめとする高度生殖医療では原精液をそのまま使用するのではなく，目的にあった方法で精液を処理し精子を調整することが必須である。現在の精子調整の方法として，多くの施設では精子の成熟段階の密度の違いを利用した密度勾配遠心法^{1,2)}，その後の遠心を用いた洗浄，ならびに精子の運動能により選別を行うSwim upといった工程が一般的である³⁾。またこれらの操作に付随して，洗浄液の分注，密度勾配遠心用の処理液の分注・重層，操作ごとのダブルチェック，原精液・処理後の精子数カウントおよびカウンティングチャンバーの洗浄といった業務も存在し，多くの時間と人員を要する。

当院では，以前までは単層密度勾配遠心法，遠心による洗

浄およびSwim upを行ってきたが，検討を繰り返し受精率や発生率に影響を及ぼさない事を確認した上で，Swim upの時間短縮，その後Swim upを廃止してきた経緯がある。更にComputer-assisted sperm analysis (CASA) システムであるSperm motility analysis system (SMAS: DITECT, 日本)⁴⁾による精子数カウントの自動化を行い，また現在ディスプレイのカウンティングチャンバーの導入も検討しており，精液処理の最適化・シンプル化を常に行っている。

また，近年では精液処理で行う遠心処理によって精子に物理的なダメージを及ぼすことから活性酸素種が発生し，DNAの断片化を誘導することが懸念されている⁵⁾。しかし，精子DNAの断片化は，卵子内のDNA修復メカニズムによってカバーされることが知られており⁶⁻⁸⁾，その結果，IVF後の転帰に影響を及ぼさない事が報告されている⁹⁾。一方でIVF後の妊娠率や流産率に影響を及ぼす報告もされており¹⁰⁾，生殖補助医療における精子DNAの断片化の影響は未だ統一した見解がないのが現状である¹¹⁾。

近年，この精子DNAの断片化に着目し，非遠心型の精子処理デバイスが開発・使用されるようになった。これらのデバイスを用いることで，処理後の精子のDNAの断片化と活性酸素種が低下し¹²⁾，妊娠率の向上，異数性胚率の減少が

(受付 2021年7月31日／受理 2021年9月18日)

別刷請求先：〒108-0075 東京都港区港南2-3-13

品川フロントビル3F

浅田レディース品川クリニック

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: h_tuji@ivf-asada.jp

期待できると一部報告されている^{5, 13, 14}。

本稿では当院においてこれらの非遠心型精子処理デバイスを用い、受精率や発生率を低下させることなく、更に最適化・シンプル化した手順で精液処理を行うことができるか否か検討した結果、臨床導入できると判断するに至った経緯を紹介すると共に、今後の展望について考察した。

検討①：2種類の非遠心型精子処理デバイスの比較

本検討では、MIGLIS[®] (メニコン, 日本)¹⁵とZyMöt[®] (ZyMöt Fertility, 米国)⁵の2種の非遠心型のデバイスを用いて精液処理を行い、処理後の所見をSMASにて解析した。また各デバイスの長所と短所を比較し、以降の臨床検討に使用する当院に適したデバイスを選別した。

MIGLIS[®]は容器内にさらに管状の内管が挿入された二重構造をしている。内管の外側に精液を注入し、内管内に培養液を満たし精液上を覆うまで培養液を被覆することで、運動良好精子のみが内管の壁を乗り越え、内管の底部に集まるという仕組みであり、Migration-Gravity Sedimentation Method¹⁶が元になっているデバイスである(図1)。

一方ZyMöt[®]とは8 µmの微孔性フィルターの下部に精液を流し込み、その後フィルター上部に培養液を被覆することで運動が良好で、なおかつ頭部サイズがコンパクトな精子のみが回収できるというデバイスである(図1)。

検討方法は精液検査で使用後、研究への利用の同意を得た精液を、MIGLIS[®]、ZyMöt[®] Multi (850 µL) および参考として単層密度勾配遠心法と遠心を用いた洗浄で処理した群(density gradient centrifugation: DGC群)の3群に分け、それぞれ処理後の精子をSMASにて総精子濃度、運動精子濃度、精子運動率、良好運動率、直線速度、頭部振幅および頭部振動数を解析した。

各々の方法で処理後、SMASにて解析した結果を表1に示した。精子運動率ならびに良好運動精子率においてZyMöt[®]はMIGLIS[®]よりも有意に高い値になった。これはZyMöt[®]がMIGLIS[®]よりも効率的に運動精子を回収できることを示しているが、今回の結果はデバイスへの「揺れ」などの「環境要因」が影響している可能性が考えられる。実際にMIGLIS[®]を用いた大久保らの報告¹⁷によると、我々の検

討より高い割合で運動精子を回収できている。MIGLIS[®]は精液に培養液を被覆後、恒温器内で静置する必要があるが、当院の精子調整室には恒温器がなく培養室内に運ぶ必要があった。この操作による「揺れ」が本来回収されない不動精子や運動不良精子まで回収する結果となった可能性がある。しかし、ZyMöt[®]に関しても同様の操作を行っているにも関わらず精子運動率や良好運動精子率が高かったのは精液と培養液の間に微孔性フィルターが存在することで、「環境要因」による不動精子や運動不良精子が混ざりにくいことを示している。

また本検討にて実際に2種のデバイスを使用した所感から、それぞれの長所と短所を列挙した(表2)。例えば、MIGLIS[®]には蓋が付属しているという長所があるが、揺れに弱いという短所がある。ZyMöt[®] Multi (850 µL) には処理時間が短いという長所があるが、850 µLまでしか処理できないという短所が挙げられた。

以上の結果からそれぞれの長所はあるものの、当院の設備環境に適しており、運動良好な精子が得られる割合の高いZyMöt[®]を以降の臨床での検討に用いることとした。

検討②：ZyMöt[®]と密度勾配遠心法におけるICSI後の受精率・発生率の比較

ZyMöt[®]を使用することで受精率および発生率を低下することなく更なる最適化・シンプル化した手順で精液処理を行うことが可能か検討した。

2020年5月～2020年12月の間に受精方法がICSIのみで、また運動精子濃度が 1×10^6 /mL以上の20症例24周期を対象とした。精液をZyMöt[®] Multi (850 µL) で850 µL処理し(ZyMöt群)、残りを単層密度勾配遠心法と遠心を用いた洗浄で処理した(DGC群)後、同一症例の卵子を無作為に半分に分け、それぞれの方法で処理した精子を用いICSIを行い、受精率および培養成績を比較した。

2PN率はZyMöt群84.5% (142/168)でDGC群の82.9% (126/152)と有意な差はなかった。また1PN率(3.0% vs 3.3%)・多前核率(3.6% vs 3.3%)・不受精率(8.3% vs 10.5%)についてもそれぞれ有意な差はなかった(図2)。Day3良好胚率はZyMöt群25.0% (31/124)、DGC群24.5%

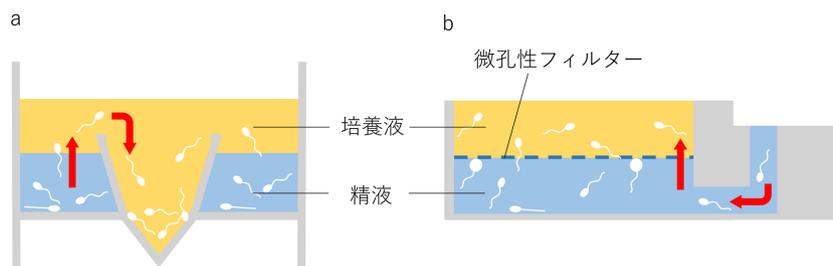


図1 MIGLIS[®]とZyMöt[®]のイメージ
a: MIGLIS[®], b: ZyMöt[®]。

表1 2種類の非遠心型精子処理デバイスで処理後の精子所見

	DGC (参考)	MIGLIS [®]	ZyMöt [®]
症例数 (人)	13	13	13
総精子濃度 (百万/mL)	6.1 ± 10.4	3.6 ± 3.7	2.0 ± 3.8
運動精子濃度 (百万/mL)	2.7 ± 5.5	1.2 ± 2.3	1.8 ± 3.6
精子運動率 (%)	34.0 ± 25.2	25.2 ± 22.5 [†]	83.4 ± 22.6 [†]
良好運動率: 25 μm/秒以上 (%)	19.3 ± 19.9	13.6 ± 16.3 [†]	44.4 ± 33.9 [†]
直線速度 (μm/秒)	23.8 ± 13.4	22.5 ± 15.6	27.5 ± 12.2
頭部振幅 (μm)	1.6 ± 0.7	1.6 ± 0.7	1.5 ± 0.6
頭部振動数 (Hz)	7.6 ± 2.8	7.7 ± 3.4	7.5 ± 1.6

Mean ± SD で表示し、MIGLIS[®]とZyMöt[®]の2群間 (DGCは参考データ) でt-検定を用い統計処理を行った。同項目内の同記号間で有意差あり (P < 0.01)。

表2 デバイスごとの長所と短所

	MIGLIS [®]	ZyMöt [®] **
長所	<ul style="list-style-type: none"> ・1度に3 mL 処理できる ・蓋があるので他の症例と混じる心配がない ・培養液量が多いので浸透圧変化が少ないかもしれない 	<ul style="list-style-type: none"> ・運動良好精子が高率で回収できる ・処理が容易 ・処理時間が短い (30分)
短所	<ul style="list-style-type: none"> ・揺れに弱く良好精子以外も混入する ・スパーサーの利用など操作がやや煩雑 ・処理時間が長い (1時間) 	<ul style="list-style-type: none"> ・蓋が無く別にDishの準備が必要 ・850 μL までしか処理できない ・培養液量が少ないので浸透圧上昇しやすい可能性がある

*ZyMot[®]にはZyMöt[®] Multi (850 μL) を使用。

(27/110) で有意な差はなかった (図3)。最後にDay5胚盤胞率はZyMöt群37.9% (47/124)、DGC群36.7% (40/109)、またDay7までの累計胚盤胞率は54.0% (67/124) および57.8% (63/109) でそれぞれ有意な差はなかった (図4)。

ZyMöt[®]を用いてDNAの断片化が少ない精子を選別できているとしても、受精率や胚盤胞への発生率は変化しないことが明らかとなった。この要因の一つとして、まず卵子内のDNA修復機構が挙げられる⁶⁻⁸⁾。すなわちICSI後の精子のDNAの断片化も修復されるため、遠心処理によってDNAの断片化があったとしても、受精やその後の胚発生に影響は及ぼさないと考えられる。もう一つの要因としては精子の運動性とDNAの断片化には逆相関の関係があることである¹⁸⁾。すなわちICSIでは顕微鏡下で運動良好な精子を選んでいるので、遠心処理を行ったとしても結果的にその中からDNAの断片化が少ない精子を選んでいることになる。これらの理由からZyMöt[®]を用いDNAの断片化が少ない精子を回収しても、ICSI後の受精率や発生率は変化しなかったと考える。

しかし逆にいえばZyMöt[®]を用いても受精率や発生率に負の影響を及ぼすことがないことが明らかとなった。その為、当院では精液処理の複雑な工程をシンプル化し無駄な遠心処理を行わずに運動良好精子を回収できることが示されたZyMöt[®]を臨床導入できると判断するに至った。

将来の展望

現在のところ当院ではZyMöt[®]の対象をICSIのみの症例

に限定すると考えている。それは、ZyMöt[®]は一部の精液(850 μL)しか処理できないため、全量の精液を密度勾配遠心法で処理した場合に比べ、処理後の総運動精子数が少なくなり、本来ならIVFを実施できたはずの患者にIVFを実施できなくなることを危惧しているからである。しかし、IVFにこそ精子DNAの断片化を防げる非遠心型の精子処理デバイスを用いるべきかもしれない。何故ならICSIでは運動良好な精子を選ぶことでDNAの断片化の少ない精子を選別できており受精率や発生率に影響を及ぼさないが、IVFでは受精に至る精子は任意なものであるため、IVFに用いる精子の大多数が運動良好でDNAの断片化が少ないことが望ましいと考えるからである。既にIVFにも使用している施設もあるようだが、患者に不利益を及ぼさないよう検討を重ねていく必要がある。

更に、無精子症や高度な乏精子症を除く全症例に非遠心精子処理デバイスを適用することで、遠心機やクリーンベンチといった大掛かりな機器の設置の必要性がなくなる。加えて、処理の簡便化により精液処理に専任するスタッフを置く必要がなくなるため、培養室内で同一人物が他の業務をしながら同時に精液処理を行うことが可能となる。これが実現すれば「精子調整室」という概念さえなくなる日が来るかもしれない。また培養室自体を拡張することもでき、培養室が小さいと言われている日本の施設からすれば喜ばしいことではないだろうか。

最後に、非遠心型の精子処理デバイス導入によりコスト

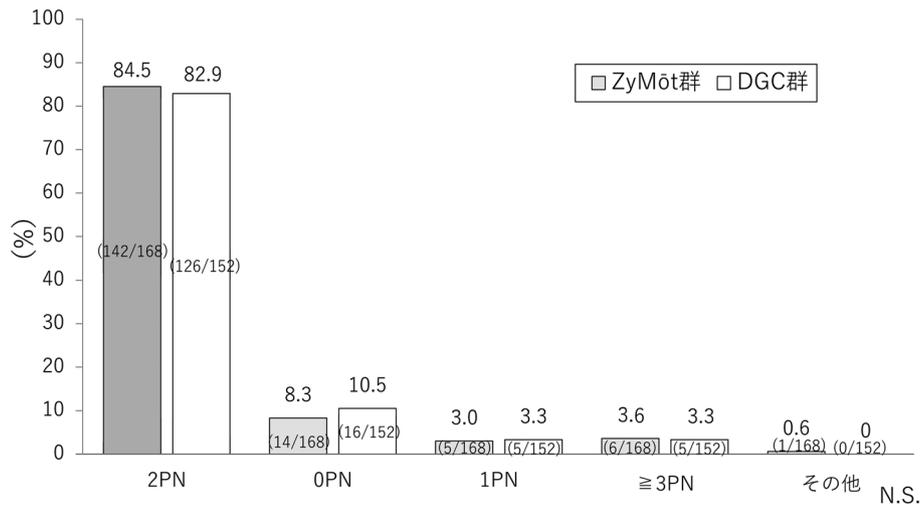


図2 処理方法ごとの受精率の比較

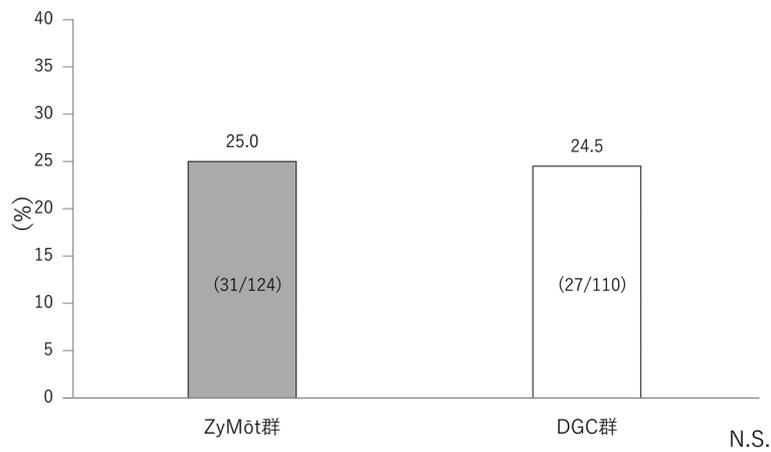


図3 処理方法ごとのDay3良好胚率の比較

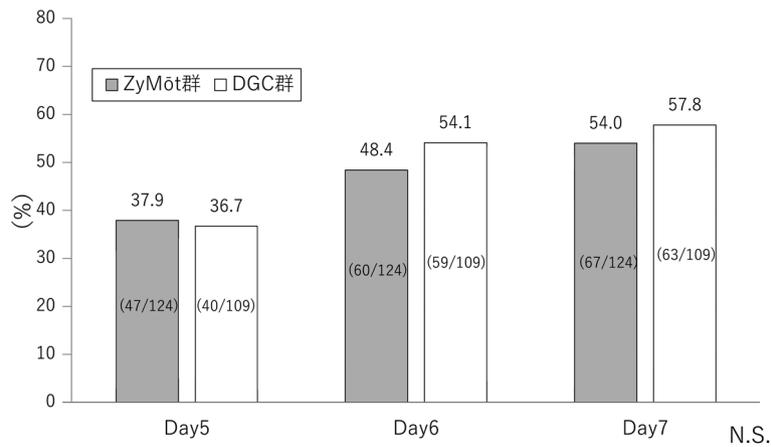


図4 処理方法ごとの胚盤胞発生率の比較

が増加することは避けたいところである。もっとも、非遠心型のデバイスを使用することにより遠心管やピペット類などの消耗品のコストは削減でき、そして上記したように遠心機やクリーンベンチが必要最低限の台数にできる。なおかつ作業時間が短くなることで、今まで精液処理に要していた人員を他の業務に充てる事ができ、また作業が簡便であるため新人教育にかかる時間も短縮できることを考慮すれば、業務効率が向上し、コスト増に見合ったメリットがあるはずである。

結 語

精子調整方法を変えるだけで精子DNAの断片化が防ぐことができるということは、非常に魅力的である。一方、精子の調整方法を変えるだけでは劇的にICSI後の受精率や発生率を向上させることは困難であることは理解しなければいけない。それは精子DNAにも効果を発揮する卵子の持つ驚くべきDNAの修復機能が関係しているのかもしれない。また簡単に成績は向上しないからこそ、私たち胚培養士は一つ一つの技術に対して日々研磨し、常に努力改善していなくてはならない。

また新規デバイスや手法を選択する際は各々のメリット・デメリットをしっかりと掴み、解析結果はもちろんであるが、施設の設備や環境、方針にマッチするデバイス・手法を選ぶべきである。遠心を用いない精液処理は未だ発展途上で統一した見解がないのが現状であるため、議論を重ねると同時に、更なる改善が期待される。

文 献

- 1) Ord, T., Patrizio, P., Marello, E., Balmaceda, J.P. and Asch, R.H. (1990): Mini-Percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum. Reprod.*, 5, 987–989.
- 2) Egbase, P.E., al-Sharhan, M., Ing, R. and Grudzinskas, J.G. (1997): Pregnancy rates after intracytoplasmic sperm injection in relation to sperm recovery techniques. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 14, 317–320.
- 3) Henkel, R.R. and Schill, W.B. (2003): Sperm preparation for ART. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1, 108.
- 4) Isobe, T. (2012): New method to estimate the possibility of natural pregnancy using computer-assisted sperm analysis. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 58, 339–347.
- 5) Parrella, A., Keating, D., Cheung, S., Xie, P., Stewart, J.D., Rosenwaks, Z. and Palermo, G.D. (2019): A treatment approach for couples with disrupted sperm DNA integrity and recurrent ART failure. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 36, 2057–2066.
- 6) Ashwood-Smith, M.J. and Edwards, R.G. (1996): DNA repair by oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 46–51.
- 7) Ménézo, Y., Dale, B. and Cohen, M. (2010): DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote.*, 18, 357–365.
- 8) Sakkas, D. and Alvarez, J.G. (2010): Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil. Steril.*, 93, 1027–1036.
- 9) Esbert, M., Pacheco, A., Vidal, F., Florensa, M., Riqueros, M., Ballesteros, A., Garrido, N. and Calderón, G. (2011): Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 23, 704–710.
- 10) Borini, A., Tarozzi, N., Bizzaro, D., Bonu, M.A., Fava, L., Flamigni, C. and Coticchio, G. (2006): Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.*, 21, 2876–2881.
- 11) Humm, K.C. and Sakkas, D. (2013): Role of increased male age in IVF and egg donation: is sperm DNA fragmentation responsible? *Fertil. Steril.*, 99, 30–36.
- 12) Gode, F., Bodur, T., Gunturkun, F., Gurbuz, A.S., Tamer, B., Pala, I. and Isik, A.Z. (2019): Comparison of microfluid sperm sorting chip and density gradient methods for use in intrauterine insemination cycles. *Fertil. Steril.*, 112, 842–848.
- 13) Hancock, K., Parrella, A., Goldman, M., Rosenwaks, Z. and Palermo, G.D. (2019): Microfluidic sperm selection enhances ICSI outcomes by selecting spermatozoa with the highest chromatin integrity. *Hum. Reprod.*, 34, i198.
- 14) Parrella, A., Rosenwaks, Z. and Palermo, G.D. (2019): Selecting spermatozoa with intact chromatin may reduce embryo aneuploidy. *Fertil. Steril.*, 112, e284.
- 15) Tatsumi, K., Tatsumi, T., Uchida, T., Saito, K. and Saito, H. (2020): New device for sperm preparation involving migration-gravity sedimentation without centrifugation compared with density-gradient centrifugation for normozoospermic intrauterine insemination. *F&S. Rep.*, 1, 106–112.
- 16) Tea, N. and Jondet, M. (1983): A ‘migration-gravity sedimentation’ method for collecting human motile spermatozoa. *Pathol. Biol. (France)*, 31, 688.
- 17) Okubo, T., Higuchi, K., Hayashi, T., Onda, N., Matsuo, R., Omi, K. and Segawa, T. (2020): Evaluation of motility and DNA fragmentation of sperm purified by microfluidics and Migration-Gravity sedimentation. *J. Mamm. Ova. Res.*, 37, 107–111.
- 18) Palermo, G.D., Neri, Q.V., Cozzubbo, T. and Rosenwaks, Z. (2014): Perspectives on the assessment of human sperm chromatin integrity. *Fertil. Steril.*, 102, 1508–1517.