

—原著—

マイクロ流体技術を用いた精子選別の有用性の検討 Evaluation of the efficacy of a microfluidics device for sperm sorting

青井 陽子*・平田 麗・青木 瞳・小郷 真文・花谷 美香・高橋 浩美・
氏平 聖子・田口 可奈・川原 結貴・齊藤 寛恵・川上 典子・小谷 早葉子・
増本 由美・小坂 由紀子・寺田 さなえ・吉岡 奈々子・羽原 俊宏・林 伸旨

Yoko Aoi*, Rei Hirata, Hitomi Aoki, Maya Ogo, Mika Hanatani, Hiromi Takahashi,
Seiko Ujihira, Kana Taguchi, Yuki Kawahara, Hiroe Saito, Noriko Kawakami, Sayoko Kotani,
Yumi Masumoto, Yukiko Kosaka, Sanae Terada, Nanako Yoshioka, Toshihiro Habara and Nobuyoshi Hayashi

医療法人社団岡山二人クリニック 〒701-1152 岡山市
Okayama Couple's Clinic, 285-1 Tsudaka, Kita-ku, Okayama 701-1152, Japan

要旨：体外受精の精子回収方法として、密度勾配遠心分離法（density gradient separation; DGS法）やSwim-up法、両者を組み合わせた方法が多く実施されているが、時間を要し、遠心分離により精子細胞膜が物理的ダメージを受け、活性酸素への暴露によるDNA断片化精子増加が懸念される。精子DNA断片化率が高いと胚発育、妊娠予後が不良になることが報告されている。ZyMöt™ Multiスパームセパレーター（以下ZyMöt法）は遠心分離が不要なデバイスで、精子回収後、DNA断片化精子が減少する報告がある。当院の体外受精反復不成功症例で、DGS法とSwim-up法で精子回収した周期と、その後ZyMöt法で精子回収した周期での胚発育、妊娠予後の比較検討を行った。ZyMöt法周期において、3日目良好分割胚率、5日目胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率、有効胚率がよく、流産率が低かった（ $P < 0.05$ ）。ZyMöt法は体外受精成績を良好にする可能性が示唆された。

キーワード：ZyMöt™ Multiスパームセパレーター、胚の発育、流産率

Abstract: Centrifugation-based sperm swim-up and density gradient separation (DGS) are the most commonly used sperm-sorting methods in IVF/ICSI cycles. However, these methods reduce sperm quality during the repetitive centrifugation steps, since sperm concentrated into solid pellets with incidental inflammatory cells show higher reactive oxygen species (ROS) generation and DNA fragmentation. Sperm samples with a higher level of DNA fragmentation result in lower fertilization rates, impaired embryo development, and lower pregnancy rates. Microfluidic sperm sorting (MSS) can efficiently sort healthy, motile and morphologically normal sperm without centrifugation. Compared to the conventional swim-up method, a significantly higher percentage of the sorted sperm has fewer ROS and less DNA fragmentation. Fertilization and implantation potential, and support of embryonic development of spermatozoa processed by MSS (ZyMöt™) were compared with those of conventional density gradient centrifugation in couples with recurrent assisted reproductive technology (ART) failure. In the ZyMöt™ cycle, there were significant improvements in the numbers of good-quality embryos on day 3, and the good blastocyst, blastocyst utilization and clinical pregnancy rates. There was also a minor improvement in the miscarriage rate. These results suggest that sperm processing using ZyMöt™ may improve the results of ART.

Key words: ZyMöt™, Embryo development, Miscarriage rate

(受付 2021年12月28日/受理 2022年4月23日)

別刷請求先：〒701-1152 岡山市北区津高285-1 医療法人社団岡山二人クリニック

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: labo@futari.or.jp

はじめに

体外受精では、良好な運動精子を回収するため、密度勾配遠心分離法 (density gradient separation; DGS法) やSwim-up法、またはそれらを組み合わせた方法を実施するのが一般的である。しかし、これらの精子回収法では、多くの時間を要し、遠心分離により精子細胞膜が物理的ダメージを受け、更に活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) への暴露による精子のDNA断片化の増加が懸念される¹⁾。精子は修復機能を備えておらず、DNAが断片化した精子が受精した場合、卵子側のDNA修復機能により胚の修復が起こると考えられているが²⁾、胚発育が不良な場合や習慣流産患者の卵子は、卵子がもつDNA修復機能そのものが低下している可能性がある³⁾。また精子DNA断片化率が高いと胚の発育停止、特に採卵後3日目以降の胚発生に負の影響を与え⁴⁾、更には妊娠不成立、また妊娠後流産の原因につながることから^{5,6)}、精子DNA断片化を発生させない精子回収が望まれる⁷⁾。ZyMöt法は遠心分離を用いずに短時間で良好運動精子の回収が可能な精子回収キットである。従来行われてきたDGS法やSwim-up法での精子回収法に比べ、作業工程が少なく、操作が簡便で標準化しやすい。さらに精子処理時間が短縮することにより、DNA断片化精子およびROSの産生を有意に減少させ⁸⁻¹⁰⁾、同一症例によるDGS法とZyMöt法での精子回収法の比較検討においてZyMöt法を用いることにより有意にDNA断片化精子が減少すること^{11,12)}、またDGS法と比べZyMöt法では胚の発育、正倍数体率、妊娠率、着床率、流産率が有意に改善したことが報告されている^{1,13)}。

今回、我々は体外受精反復不成功症例に対し、DGS法で回収した精子を使用した周期とZyMöt法で回収した精子を使用した周期において、胚発育およびその臨床成績を検討した。

対象と方法

1. 対象

2020年8月から2021年9月までに体外受精を施行した1424周期 (931症例) のうち、本研究に同意を得られた採卵回数2回以上、顕微授精を実施した反復不成功症例99症例 (従来法99周期、ZyMöt法99周期) を対象とした。

さらに、妊娠予後の検討は融解胚移植を行った69症例 (138周期) を対象とした。

2. 方法

対象患者において、DGS法およびSwim-up法にて精子回収を行った周期 (従来法) とその翌周期に初めてZyMöt法にて精子回収を行った周期 (ZyMöt法) との間で、それぞれ受精率、胚発生率について後方視的に比較検討した。また凍結融解胚移植を行った症例について、従来法とZyMöt法での妊娠予後を後方視的に比較検討した。なお、この研究は当院の倫理委員会の承認 (承認番号: 2020-10) を得て行った。

調節卵巣刺激

調節卵巣刺激法は、年齢、治療歴、胞状卵胞数、抗ミュラー管ホルモン値 (anti-Mullerian hormone; AMH) およびFSH基礎値に基づいて、gonadotropin releasing hormone (GnRH) agonist long法・short法、GnRH antagonist法、progestin primed ovarian stimulation (PPOS) 法、低刺激法 (クエン酸クロミフェンまたはアロマトーゼ阻害剤を内服) のいずれかを選択した。2個以上の卵胞の最大卵胞径が18 mm以上に達した時点でhCG 10,000 IUを注射し、35.5～36.5時間後に経膈超音波ガイド下に採卵した。

精子処理法 (図1)

精液は採卵当日、用手法にて滅菌カップに採取後提出された。提出後、精液量を測定し、精液の液化後Makler counting chamber (Sefi-Medical Instruments, Jerusalem, Israel) にて精子濃度、精子運動率を測定した。その後、従来法またはZyMöt法のいずれかの方法で精子処理を実施し良好精子を回収した。

顕微授精・培養

採卵された卵子は、ICSI Cumulase[®] (ORIGIO, Malov, Denmark) 40 IU/mlを使用し、卵丘細胞を除去し第一極体の有無により卵子の成熟を確認した。Metaphase II卵子に対し、採卵から3～4時間前培養後 (hCG注射39.5時間後) に顕微授精を実施した。

顕微授精後の卵子は、Well of the well dish (LinKID[®] micro25, DNP, 東京, 日本) を用いて培養し、ミネラルオイル (Oil for Embryo Culture, Irvine Scientific, Santa Ana, USA) で被覆した50 µl培養液 (ONE STEP Medium[®], ナカメディカル, 東京, 日本) 中へ胚を入れ、37.0°C, 6.5% CO₂, 5.0% O₂, 88.5% N₂気相条件下で採卵後6日まで連続培養を行った。培養液交換は採卵後2日目に実施した。

胚観察

採卵翌日にタイムラプスiBIS (アステック, 大阪, 日本) 画像にて前核形成を確認し、2前核胚 (2PN胚) を正常受精とした。採卵後3日目、5日目、6日目に倒立顕微鏡下で観察を行った。胚の形態学的評価は採卵後3日目6分割以上かつVeck分類でG1/G2を良好分割とし、採卵後5日目Gardner分類で3BB以上を良好胚盤胞とした。胚盤胞凍結の基準は採卵後5日目または6日目にGardner分類で3以上かつCC以外を凍結可能胚とした。

凍結融解胚移植

すべてホルモン補充周期で実施した。前月経周期3日目から中容量ピルを21日内服し、内服終了後の月経3日目夜から経皮吸収型エストラジオール製剤 (エストラーナテープ[®] 0.72 mg) 4枚を貼付し、2日毎に貼り替え、月経周期9-13日目に内膜8 mm以上と両側卵巣内に10 mm以上の卵胞がないことを確認して移植日を決定した。移植日は月経周期

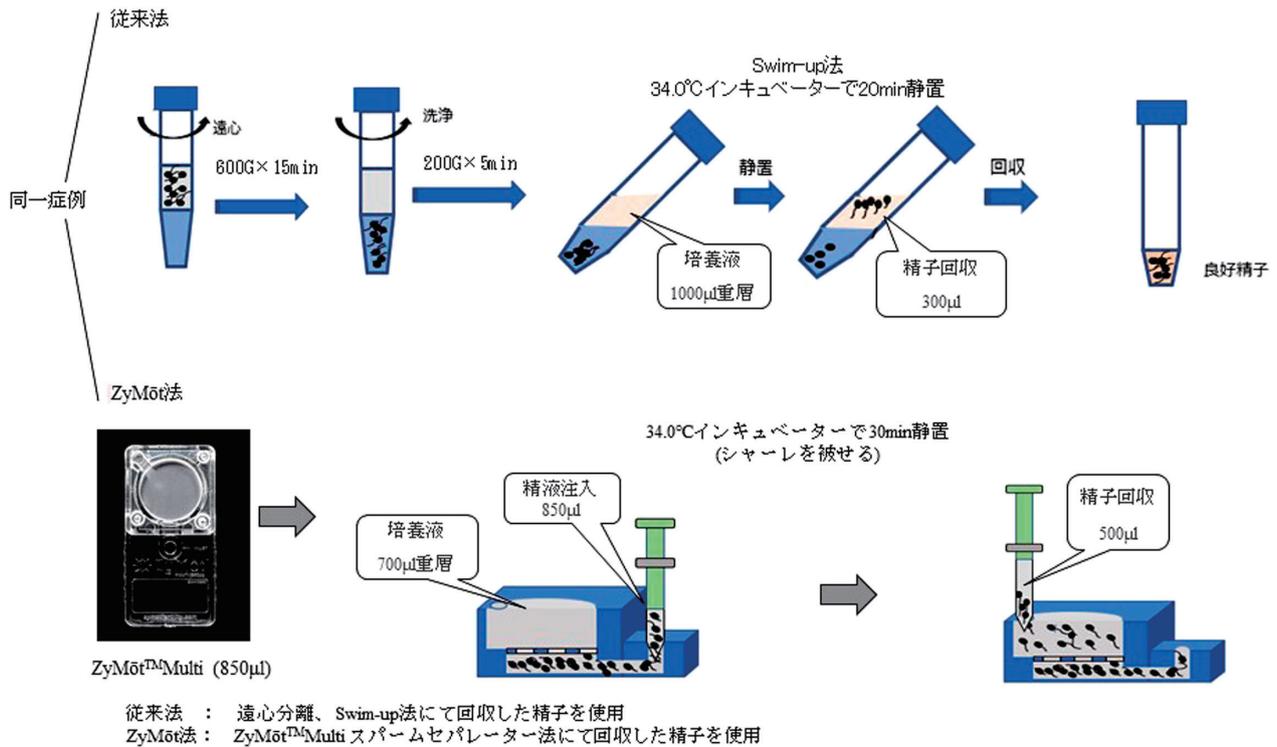


図1 精子調整法

I. DGS法およびSwim-up法での精子回収 (従来法)

精液検体を Multipure Handling Medium™ 3 ml (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) と混和し, ISolate® Sperm Separation medium (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) 2層 (90%, 45%) もしくは1層 (90%単層のみ) を1 ml下層へ重層後, 洗浄濃縮した (600×g, 15分). その後, 上清を除去した沈査を Multipure Handling Medium™ 3 ml に混和して遠心洗浄した (200×g, 5分). その後, 上清を除去した沈査へ Insemination medium (ナカメディカル, 東京, 日本) を1000 µl重層し, 20分間 34.0°C インキュベーターにて静置後, 培養液上層部から 300 µl回収した運動精子を顕微授精に使用した.

II. ZyMötを使用して精子回収 (ZyMöt法)

マニュアルに従い ZyMöt の精子回収口へ Insemination medium® 50 µl を注入し, 次に精子注入口へ精液 850 µl を注入し, 最後に回収チャンバーへ Insemination medium 700 µl を注ぎ, 34.0°C インキュベーターにて静置した. 30分後, ZyMöt の精子回収口から 500 µl精子液を回収し, 顕微授精に使用した.

18日目～30日目の間とし, 移植5日前朝から黄体ホルモン腔錠 (ルティナス腔錠® 100 mg) の使用を開始, 同日 h CG 注射を行った. 移植日の10日後に血中 h CG を測定し, その後経腔超音波下での胎嚢確認の有無により妊娠判定を行った. なお, 対象69症例 (138周期) の内訳は, 従来法の採卵周期で得られた胚盤胞から凍結融解胚移植した46症例 (103周期) (うち, 従来法から得られた胚盤胞を移植後, ZyMöt法の採卵周期で得られた胚盤胞を凍結融解胚移植した32症例 (38周期) と, 従来法の採卵周期で胚盤胞が得られず, その後ZyMöt法の採卵周期で得られた胚盤胞を凍結融解胚移植した17症例 (27周期) と, 先に両法の採卵を実施し得られた胚盤胞の中からグレードの良い順に凍結融解胚移植した6症例 (8周期) であった.

①検討

1. 胚培養成績の比較

従来法とZyMöt法の両周期間において, 2PN率 (2PN数 /

ICSI数), 採卵後3日目良好分割胚率 (3日目良好分割胚数 / 2PN数), 採卵後5日目胚盤胞到達率 (5日目胚盤胞数 / 3日目以降追加培養胚数), 良好胚盤胞到達率 (5日目良好胚盤胞数 / 3日目以降追加培養胚数), 有効胚率 ((ET数 + 凍結数) / 2PN) について比較検討した.

2. 妊娠予後の比較

対象治療周期で得られた胚盤胞を凍結融解胚移植した周期について, 妊娠率, 流産率を比較検討した.

②統計学的手法

統計ソフト JMP® ver.11 (SAS Institute Japan) を用いて, Wilcoxon の符号付順位検定, χ^2 検定 (chi-square test) を実施した. $P < 0.05$ をもって統計学的有意とした.

結果

①患者背景

患者背景として, 採卵時年齢, IVF回数, 採卵個数,

表1 患者背景

	従来法周期	ZyMöt法周期	P value
採卵時年齢 (歳)	38.5 ± 4.8	38.8 ± 4.9	1
IVF回数 (回)	2.6 ± 2.4	3.6 ± 2.4	1
採卵個数 (個)	8.4 ± 6.6	8.7 ± 7.6	0.55
AHM (ng/ml)		1.8 ± 1.4	
採卵当日精液量 (ml)	2.8 ± 1.1	2.7 ± 1.2	0.13
精子濃度 (10 ⁶ /ml)	82.1 ± 62.7	75.9 ± 60.2	0.94
精子運動率 (%)	57.0 ± 18.5	54.0 ± 18.4	0.09

表2 胚培養成績

	従来法	ZyMöt法	P value
採卵数	834個	863個	
2PN率	79.2% (476/601)	80.9% (514/635)	0.44
Day3良好分割胚率	60.1% (286/476)	67.1% (345/514)	0.02*
Day5胚盤胞到達率	31.1% (144/460)	39.1% (199/509)	0.01*
良好胚盤胞到達率	8.9% (41/460)	15.1% (77/509)	< 0.01*
有効胚率	27.3% (118/476)	35.4% (179/514)	< 0.01*

*有意差あり

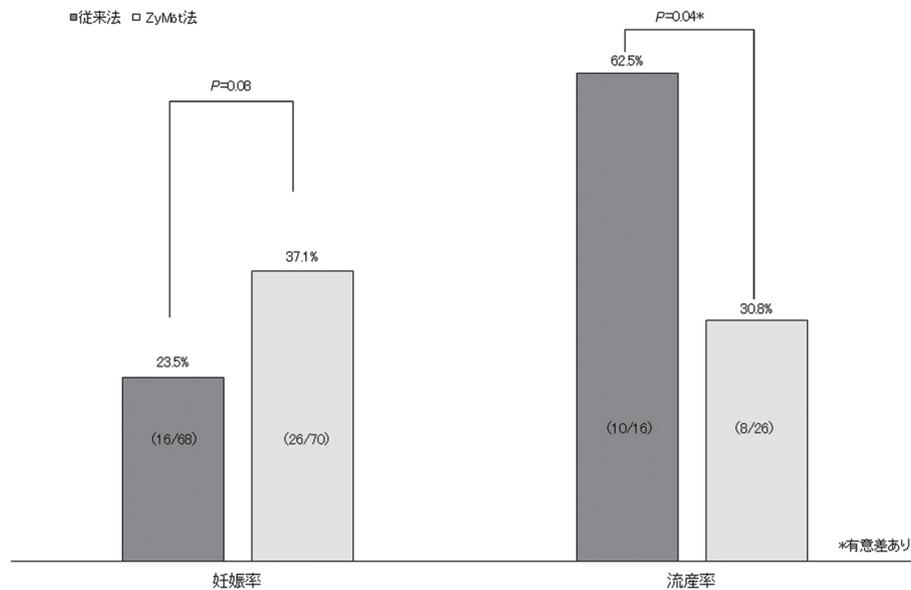


図2 凍結融解胚移植の臨床成績

AMH, 採卵当日の精液所見 (精液量, 精子濃度, 精子運動率) を調査した (表1)。本研究は同一症例における連続した採卵周期間の比較検討であり, 採卵時年齢, IVF回数, 採卵個数に有意差は認めなかった。また採卵当日の精液所見においても, 両周期で差は認められなかった。

適応について, 男性因子65, 原因不明22, 内膜症6卵管6, 免疫1, POR 1, 高齢1であった (重複含む)。

②培養成績の比較

2PN率は従来法, ZyMöt法で両者に有意差は認められな

かった。採卵後3日目良好分割胚率, 採卵5日目胚盤胞到達率, 良好胚盤胞到達率, 有効胚率においてZyMöt法が有意に高値だった (表2)。

③妊娠予後の比較

凍結融解胚移植での妊娠予後について, ZyMöt法で獲得した胚盤胞を凍結融解胚移植した周期において流産率が有意に低い結果となった (図2)。

考 察

本検討の結果、同一症例（体外受精反復不成功症例）において、精子処理の違いによる胚培養成績および妊娠予後を比較した結果、ZyMöt法の有用性が示唆された。

ZyMöt法は従来法と比較し、採卵後3日目良好分割胚率、採卵後5日目胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率、有効胚率が高値だった（表2）。この結果は従来法と比べZyMöt法で胚発育が改善したとするParrellaらの報告¹⁾と一致する。

体外受精の精子処理にZyMöt法を用いることで、従来法で懸念されていた遠心分離による精子細胞膜の物理的ダメージによるDNA断片化精子やROSの発生を抑え、その結果、胚培養成績が改善されたと考えられる^{1, 11, 12)}。精子は採卵後3日目以降の胚発生に大きな影響を与えることが知られており（Late Paternal Effect）、DNA断片化のない正常な精子が受精することで、卵子側のDNA修復機能では改善できなかった^{2, 3)}原因不明不妊のART成績が向上する報告があり^{4, 7)}、今回体外受精反復不成功症例において、その有用性が示された。但し、こちらはZyMöt法と密度勾配遠心法におけるICSI後の受精率・発生率に差はなかった¹³⁾と報告しており、Margeらも精子DNA断片化率によって胚発生に差はないと報告している¹⁴⁾。我々の結果とは反しており、今回ZyMöt法が有効であった体外受精反復不成功症例を含め、今後ZyMöt法を実施する対象を更に検討する必要がある。

ラボワークにおいて、ZyMöt法はDGS法やSwim-up法と比較して、専用キットを使用するのみで単純作業のため作業工程が少なく、また精子処理時間の短縮、ならびに作業効率の改善につながった。

従来法を実施した周期から得られた胚盤胞と、ZyMöt法を実施した周期から得られた胚盤胞での凍結融解胚移植実施後の妊娠成績において、ZyMöt法で流産率が低値となった（図2）。Borgesら¹²⁾はDNA断片化精子の割合が低いと、受精卵の胚質と妊娠率が有意に高く、流産率が低下したと報告しており、またAndersonら¹⁵⁾もZyMöt法において、DNA断片化精子の産生が減少し、妊娠率、流産率が改善したと報告している。いずれも今回我々が得た結果と一致しており、ZyMöt法を実施することで、精子のDNA断片化やROSが減少し、良好胚ならびに正倍数体胚の獲得増加につながり、その結果、妊娠率、流産率が改善されたことを示唆する結果と考えられる。但し、媒精に用いた精子のDNA断片化率を測定していない点、移植胚の核型分析を行っていない点、従来法・ZyMöt法での採卵を先に実施し得られた胚盤胞で、良いグレードから融解胚移植した症例が含まれる点から、培養成績、妊娠成績改善とZyMöt法の関連性については限定的である。今回の検討は、同一症例において、従来法で精子を回収し体外受精を実施した周期と、その後ZyMöt法で精子回収をした周期での比較であり、その関連性については、今後更に対象範囲を広げ症例数を増やした検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) 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.
- 2) Ménéz, Y., Dale, B. and Cohen, M. (2010): DNA damage and repair in human oocytes and embryos: a review. *Zygote*, 18, 357–365.
- 3) 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.
- 4) Tesarik, J. (2005): Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. *Reprod. Biomed. Online*, 10, 370–375.
- 5) Malić, Vončina, S., Golob, B., Ihan, A., Kopitar, A.N., Kolbezen, M. and Zorn, B. (2016): Sperm DNA fragmentation and mitochondrial membrane potential combined are better for predicting natural conception than standard sperm parameters. *Fertil. Steril.*, 105, 637–644.e1.
- 6) Sakkas, D., Ramalingam, M., Garrido, N. and Barratt, C.L. (2016): Sperm selection in natural conception: what can we learn from Mother Nature to improve assisted reproduction outcomes? *Hum. Reprod. Update*, 21, 711–726.
- 7) Horta, F., Catt, S., Ramachandran, P., Vollenhoven, B. and Temple-Smith, P. (2020): Female ageing affects the DNA repair capacity of oocytes in IVF using a controlled model of sperm DNA damage in mice. *Hum. Reprod.*, 35, 529–544.
- 8) Tasoglu, S., Safaee, H., Zhang, X., Kingsley, J.L., Catalano, P.N., Gurkan, U.A., Nureddin, A., Kayaalp, E., Anchan, R.M., Maas, R.L., Tüzel, E. and Demirci, U. (2013): Exhaustion of racing sperm in nature-mimicking microfluidic channels during sorting. *Small*, 25, 3374–3384.
- 9) Quinn, M.M., Jalalian, L., Ribeiro, S., Ona, K., Demirci, U., Cedars, M.I. and Rosen, M.P. (2018): Microfluidic sorting selects sperm for clinical use with reduced DNA damage compared to density gradient centrifugation with swim-up in split semen samples. *Hum. Reprod.*, 33, 1388–1393.
- 10) Asghar, W., Velasco, V., Kingsley, J.L., Shoukat, M.S., Shafiee, H., Anchan, R.M., Mutter, G.L., Tüzel, E. and Demirci U. (2014): Selection of functional human sperm with higher DNA integrity and fewer reactive oxygen species. *Adv. Healthc. Mater.*, 3, 1671–1679.
- 11) 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.e1.
- 12) Borges, E. Jr., Zanetti, B.F., Setti, A.S., Braga, D.P.A.F., Provenza, R.R. and Iaconelli, A. Jr. (2019): Sperm DNA fragmentation is correlated with poor

embryo development, lower implantation rate, and higher miscarriage rate in reproductive cycles of non-male factor infertility. *Fertil. Steril.*, 112, 483-490.

- 13) 辻 暖永・福永憲隆・浅田義正 (2021) : 非遠心性精子処理デバイスの導入と展望. *J. Mamm. Ova. Res.*, 38 (2): 55-59.
- 14) Esbert, M., Pacheco, A., Vidal, F., Florensa, M.,

Riqueros, M., Ballesteros, A., Garrido, N. and Calderon, G. (2011): Impact of sperm DNA fragmentation on the outcome of IVF with own or donated oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 23, 704-710.

- 15) Anderson, R.A. and Gilchrist, R.B. (2020): Autoimmune ovarian insufficiency: broadening indications for in vitro maturation. *Fertil. Steril.*, 114, 757-758.