

ウサギ ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection) における Piezo-ICSI の有用性の検討

鈴木智草¹、細井美彦^{1,2}、加藤博己²、
松本和也^{1,2}、佐伯和弘^{1,2}、入谷明^{1,2}

要 約

Piezo-ICSI は、マウス、ヒト、ウシにおいて、Conventional ICSI よりも有用であることが報告されている。Piezo-ICSI は Conventional ICSI と比較して、透明帯や卵細胞膜へのダメージが少ないといわれている。本実験では、ウサギ卵子を用いて、Conventional ICSI (Con) と Piezo-ICSI (Piezo) を行い、in vitro と in vivo における発生率を比較、検討した。Con における生存率、卵割率、胚盤胞期胚への発生率はそれぞれ65.1%、83.5%、16.4%であった。対して、Piezo では、69.6%、82.8%、34.3%であった。生存率、受精率に有為な差は見られなかったが、胚盤胞期胚への発生率は、5%水準で有為差が見られた。また、同期化処理をした雌ウサギへの卵管移植の結果、Con 1% (1/70)、Piezo 6% (4/70) の割合で産子が得られた。

以上のことより、ウサギ卵子に対しての Piezo-ICSI は Conventional ICSI よりも有用であることが示唆された。

緒 言

近年、生殖補助医療技術として、細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) は広く行われている。ICSI には2種類の方法があり、それぞれ Conventional ICSI、Piezo-ICSI と呼ばれている。最初に ICSI として知られた方法は Conventional ICSI であり、Uehara と Yanagimachi らがハムスター卵子に精子核を注入したのが始まりである。その後、ウサギ (Hosoi et al.)、ウシ (Goto et al.)、ヒト (Parelmo et al.) において、ICSI で産子が得られている。しかし、マウスの卵子のように、卵細胞質の粘性が低く、卵細胞膜が弱い卵子では Conventional ICSI は困難であったため、Piezo-ICSI により初めて産子が得られた。(Kimura et al.) マウスにおいて、Piezo-ICSI は Conventional ICSI よりも高い生存率と受精率を得ていたため、ヒト卵子に対しても応用するようになった。(Huang et al., Yanagida et al.) ヒトにおいては、Piezo-ICSI により Conventional ICSI よりも生存率、受精率、妊娠率が向上したと報告されている。また、ウシ卵子のように脂肪顆粒が多く、ICSI が困難な卵子に対しても、卵細胞膜を確実に破壊し、精子注入が可能であるため、Piezo-ICSI は有用であると報告されている。(Katayose et al.) このように、Piezo-ICSI は様々な種で有用であるといわれている。

本実験では、ウサギ卵子を用いた Conventional ICSI と Piezo-ICSI を行い、生存率、卵割率、胚発生率を検討するとともに、それぞれの受精卵を同期化処理をした雌ウサギに卵管移植し、妊娠率、誕生率についても検討した。

材料と方法

卵子の準備

NZW 雌 (6 ヶ月齢以上) に FSH0.5AU を12時間おきに6回皮下注射し、採卵の14時間前に hCG75IU

を静脈注射し、過剰排卵を誘起した。屠殺後、卵管を摘出し、余分な脂肪を除去した。TCM 199 (H) に10% FBS を加えた培地で灌流し、卵子卵丘複合体を採取した。それらを0.1% ヒアルロニダーゼで処理をし、さらにピペティングにより、卵子を裸化した。それらは ICSI に用いるまで、38.5°C、5% CO₂ 下で保存した。

精子の準備

精子は NZW 雄 (6 ヶ月齢以上) の精巣上体尾部精子を使用した。精巣上体を摘出後、生理食塩水約 2 ml で灌流をし、精子懸濁液を採取した。精子懸濁液に 199 (E) + 0.3% BSA を加えて、1000rpm・5 分間遠心分離をした。上清を除去し、再び同様の処理をした。沈殿した精子を 199 (E) + 0.3% BSA 中で swim up し、ICSI に用いた。

Conventional ICSI

注入ピペットは内径約 7 μm、針先を約 45° に研磨したものを使用した。精子をキャッチアップし、ピペットとデイッシュの間で精子尾部をこすり合わせる手技により、精子の不動化を行った。精子を注入ピペットに吸引し、卵子に突き刺し、透明体を貫通した。卵細胞膜を吸引し、破壊を確認後、精子を卵細胞質と共に注入した。

Piezo-ICSI

注入ピペットは内径約 7 μm、針先が平らなものを使用した。針に水銀を注入後、セットした。精子をキャッチアップし、精子尾部にピエゾパルス (SPEED 1~5、INTENSITY 1~5) をかけて、精子を不動化した。精子を注入ピペットに吸引し、ピエゾパルス (SPEED 1~5、INTENSITY 1~5) により、透明体に穴を開けた。貫通後、卵細胞膜を透明体と同様にして破り、精子を注入した。

卵子の培養

ICSI 後の卵子は、TCM 199 (E) + 0.3% BSA 中、38.5°C、5% CO₂ 下で培養し、24時間後、96時間後に観察した。

受精卵の胚移植

移植の約 48 時間前にレシピエントに 50IU の hCG を投与し、同期化処理を行った。卵管采からパストゥールピペットを用いて、受精卵約 15 - 20 胚を移植した。約 30 日後、産仔の誕生を確認した。

結 果

ICSI 後のウサギ胚培養の結果を表 1 に示した。Conventional ICSI における生存率、卵割率 (2 - 8 細胞期)、胚盤胞期胚への発生率はそれぞれ 65.1% (140/214)、83.5 (117/140) %、16.4 (23/140) % であった。対して、Piezo-ICSI では、69.6 (163/234) %、82.8 (135/163) %、34.3 (55/163) % であった。生存率、卵割率には有意な差は見られなかったが、胚盤胞期胚への発生率には、5% 水準で有意差が見られた。また、ICSI 後の胚発生の写真を図 1 に示した。

また、ICSI 後 24 時間後の胚 (2 - 4 細胞期) を同期化処理をした雌ウサギに移植した結果、Conventional ICSI では 1% (1/70)、Piezo-ICSI では 6% (4/70) の割合で産仔が得られた。(表 2)

表1：ウサギにおける ICSI 後の胚発生率

	注入卵子数 (実験回数)	生存胚数(%) ¹	卵割胚数(%) ² (24 時間後)	胚盤胞期胚数(%) ² (96 時間後)
Conventional	214(5)	140(65.1)	117(83.5)	23(16.4)
Piezo	234(5)	163(69.6)	135(82.8)	55(34.3)

表2：ウサギ ICSI 胚の移植結果

	仮母親数	移植胚数	産仔数(%)
Conventional	4	70	1(1)
Piezo	4	70	4(6)

考 察

ウサギ卵子において、Piezo-ICSI は Conventional ICSI よりも有効であることが示された。生存率、卵割率に有意差は見られなかったが、胚盤胞形成率、誕生率においては、Piezo-ICSI の方が高かった。これらの原因として考えられるものは、卵子へのダメージの差が考えられる。Conventional ICSI は、針で卵子を突き刺すことにより、透明体を貫通し、卵細胞膜を吸引によって破ってから精子注入を行っている。この際、卵子は形が変形するほど押し潰されるため、卵子に圧力がかかると思われる。また、卵細胞膜吸を破壊する時、細胞質をも吸引するため、膜・細胞質ともにダメージを受けていると考えられた。しかし、Piezo-ICSI では、ピエゾパルスで透明体に穴を開けてからピペットを注入するため、卵に必要な以上の圧力をかけることもなく、また、卵細胞膜も同様にピエゾパルスで破壊が可能のため、膜に対するダメージも軽減されている。これらの違いにより胚盤胞期発生率、誕生率に差が生じているものと思われた。このような差はマウス卵子やヒト卵子でも見られており、両方とも Piezo-ICSI の方が良い結果を示していた。

ウサギ胚発生に関して、Conventional ICSI・Piezo-ICSI の他に、交配後採取した受精卵 (in vivo)、IVF 胚との胚盤胞期胚への発生率を比較した。それぞれの発生率は in vivo 胚54% (27/50)、IVF 胚47.3% (81/171)、Conventional ICSI 胚16.4% (23/140)、Piezo-ICSI 胚34.3% (55/163) と、Piezo-ICSI 胚は in vivo 胚や IVF 胚に近い値を示していた。Piezo-ICSI は、生存率の上昇の可能性があるため、より高い発生率を示す可能性も考えられる。

胚移植の結果は、胚盤胞期胚への発生率と比較して、非常に低い結果であった。これはウサギ胚移植になんらかの問題点があるように思われる。

引用文献

1. Uehara T & Yanagimachi R. : Biol. Reprod. 15 : 467-470 (1976)
2. Uehara T. & Ynagimachi R. : Biol. Reprod. 16 : 315-321 (1977)
3. Iritani A. & Hosoi Y. : Prog Clin Biol Res : 294 : 145-149 (1989)
4. Hosoi Y, Miyake M, Utsumi K & Iritani A. : Proc 11th Int Cong Anim Reprod AI (Dubrin) P-331 (1988)
5. Hosoi Y & Iritani A. : Mol Rep Dev : 36 : 282-284 (1993)
6. Goto K., Kinoshita Y., Takuma K. & Orura K. : Vet Res : 24 : 517-520 (1990)
7. Plermo G., Joris H., Devtoey P., Van Steirteghem AC. : Lanset : 340 : 17-18 (1992)
8. Kimura Y. & Ynagimachi R. : Biol. Reprod. 52 : 790-720 (1995)
9. Huang T., Kimura Y. & Yanagimachi R. : J Assi Reprod Gen : 13 : No. 4 : 320-328 (1996)
10. Yanagida K., Katayose H., Yazawa Y., Kimura Y., Konnnai K. & Sato A. : Hum Reprod : 14 : No. 2 : 2 : 448-453 (1998)
11. Katayose H., Yanagida K., Shinoki T., Kawahara T., Horiuchi T. & Sato. A : Therio : Nov : (1999)

英文要旨

Efficiency of Rabbit Piezo-ICSI (Intracytoplasmic Sperm Injection)
compared to Conventional ICSI.

C. Suzuki¹, Y. Hosoi^{1, 2}, H. Kato², K. Matsumoto^{1, 2},
K. Saeki^{1, 2}, A. Iritani^{1, 2}

It reported that Piezo-ICSI (Piezo) is more efficient than Conventional ICSI (Con) in mouse, human and bovine oocytes. It has less damages of zona pellucida and oolemma in Piezo. We examined the efficacy of Piezo versus Con in survival rate, cleavage rate, development to blastocyst rate and birth rate. Con vs Piezo showed survival rate (65.1% vs 69.6%), cleavage rate (83.5% vs 82.8%), blastocyst rate (16.4% vs 34.3%, $p < 0.05$) and birth rate (1% vs 6%). In this results, Piezo was more efficient than Con in rabbit oocytes.

1. Dept of Genetic Engineering, Faculty of Biology Oriented Science & Technology
2. Research Institution of Biology Oriented Science & Technology, Kinki University