

Perspectives of Reproductive Science

vol.

3



今号の表紙画像は画像生成AIを用いて制作しました。

編集会議

編集委員長 吉村やすのり^{いのち}生命の環境研究所 吉村 恭典 先生

編集委員 順天堂大学医学部附属順天堂医院 産科・婦人科 教授 河村 和弘 先生
東京医科大学病院 産科・婦人科 准教授 小野 政徳 先生

特集論文

● 高周波超音波で運動不能精子を運動可能に

Making immotile sperm motile using high-frequency ultrasound

● マウスの卵細胞質内精子注入は世代を超えた異常を引き起こす

Intracytoplasmic sperm injection induces transgenerational abnormalities in mice

● 非重度男性因子による不妊症カップルに対するICSIとconventional IVFの比較： 多施設共同非盲検無作為化比較試験

Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilisation for couples with infertility with non-severe male factor: a multicentre, open-label, randomised controlled trial

編集委員長



Yasunori Yoshimura

吉村やすのり
いのち
生命の環境研究所
吉村 泰典 先生

編集委員



Kazuhiro Kawamura

順天堂大学医学部附属順天堂医院
産科・婦人科 教授
河村 和弘 先生

編集委員



Masanori Ono

東京医科大学病院
産科・婦人科 准教授
小野 政徳 先生

高周波超音波による精子運動性の改善

吉村 (司会) 1992年ベルギーのPalermoらのICSIによるヒト顕微授精の成功を受け、ICSIはまたたく間に男性不妊に対する生殖補助医療技術として世界に広がりました。わが国でも1994年に、福島県立医科大学の柳田先生がICSIによる初めての妊娠出産例を報告されています。現在では、世界の体外受精の半数以上の症例でこのICSIが用いられるようになっています。今回はICSIに関する論文を取り上げています。最初の論文は、ヒト精子の運動性改善効果について、単一細胞解析技術を用いて評価したものです。河村先生、まず、どうしてこの論文を取り上げられたかをご説明いただけますか。

河村 精子の運動性は、受精とその後の妊娠後に大きく関わっています。精子無力症や不動精子症の患者の精子の運動性を改善することが可能となれば、ICSIを回避しconventional IVF (cIVF) での受精が期待できます。本論文は、精子を超音波処理することで非侵襲性に運動性を改善することを報告しています。本法は、既存のペントキシフィリンなどの化学薬品による方法で懸念される胚毒性や、化学薬品を洗浄する過程で生じる精子のDNA損傷を回避できるため、将来の臨床応用が期待されます。

吉村 本研究で使用した超音波処理が、精子の運動性を改善

することは以前から分かっていたのですか。少し原理を分かりやすく説明して下さい。

河村 超音波処理による精子の運動性の改善は、オーストラリアのモナシュ大学の同じグループがウシでの成功を2022年に発表しています。本研究では、表面音響波 (SAW: surface acoustic waves) により精子の細胞代謝を向上させ、運動性を高めるという方法を、マイクロ流体デバイスを用いることで個々の精子に対して行っています。

精子の運動性の向上は、精子の鞭毛運動を制御する生体エネルギー機構の調節の変化によるものと考えられています。鞭毛は、ATP加水分解からの化学エネルギーが機械的エネルギーに変換され、リズムカルな拍動をもたらします。超音波暴露の結果、精子の代謝活性が増加し、エネルギー産生率が上昇して精子の運動性が向上する可能性が説明されています。

このような超音波による非侵襲的アプローチは他にもあり、私達の研究チームでは集束超音波治療 (FUS) の原理を応用した初期卵胞の活性化について検討しています。

吉村 小野先生、結果について説明していただけませんか。

小野 精子の運動性を単一細胞レベルで経時的に解析するため、個々の精子を微小な液滴に封入し、800mW、40MHzの超音波で20秒間処理しました (P.5の図1A、B)。そして精子の超音波処理前後の運動を測定しました。超音波処理により、精子運動の改善が認められました (P.5の図1C)。

吉村 不動精子についても検討されていますが、その結果はどうでしたか。

小野 世界保健機関 (WHO) のガイドラインに従い、精子運動レベルをGrade A (25 μ m/秒以上)、Grade B (25 μ m/秒未満、5 μ m/秒以上)、Grade C (5 μ m/秒未満) に分類しました。特に不動精子すなわちGrade Cの精子での運動改善が大きく認められました。

吉村 超音波による精子の運動性の改善は、ミトコンドリア機能の変化によるものと思われませんが、河村先生いかがですか。

河村 本研究では、超音波暴露により精子のミトコンドリアの膜電位の低下が報告され、ミトコンドリアの機能が変化することが示されていますが、どのように精子の代謝活性化を向上



したかは、本論文では明らかにされていません。

吉村 この研究の臨床的意義についてはいかがでしょうか。

河村 精子無力症や不動精子症の患者の精子の運動性を改善できれば、ICSIを回避しcIVFでの受精が期待できます。さらに、大幅な運動性の改善が可能となれば、人工授精でも妊娠可能となる技術に発展するかもしれません。しかし、運動性に異常のある精子は遺伝形質に欠陥がある可能性があるため、安全性についてさらなる解析が必要です。

小野 運動性の低い精子を超音波処理することで精子の運動性を上げ、受精率の向上が期待できます。また、不動精子の中から生存精子を識別することも可能になるため、染色剤を使用した従来の識別法に比べて侵襲性の低い条件でICSIが実施可能になります。

ICSIによる子孫への影響

吉村 2つ目の論文は、ICSIの問題点に関する検討です。ICSIは理論的には一匹の精子があれば妊娠可能であり、重篤な男性不妊症に応用されていますが、これまで先天異常やインプリンティング異常など、ICSIが次世代に与える影響についてもさまざまな結果が発表されてきています。河村先生、このマウスを用いた研究について、方法を分かりやすく説明していただけますか。

河村 癌治療を受け、無精子症となった患者の精子形成を再生させるため、当該患者のiPS細胞などから作製された精原幹細胞 (SSC: spermatogonial stem cell) の精細管移植による治療が検討されています。その手法の安全性を検証するため、本研究ではマウスの培養精子幹細胞 (GS cell: germline stem cell) を、c-kit 遺伝子に突然変異があり精子形成が認められないマウスに移植し、精子形成を再成する系で試験を行っています。そこで得られた精子を用いてICSIを行い、得られたF1 (GS-F1) について詳細な検討を行いました。この研究では、精巣で自然に形成された精子を対照群 (ICSI-F1) として用いています。

吉村 まず、F1世代に与える影響についてはいかがですか。

河村 GS-F1はICSI-F1よりも産仔数が少なく、胎児のない胎盤のみのものが増加していました (5.2% vs. 0.4%)。GS-F1産仔の体重および胎盤重量はICSI-F1産仔よりも重いものの、産仔数と胎盤効率の指標となる体重/胎盤重量比については同等、つまり妊娠胎児が少ないため、GS-F1産仔の体重および胎盤重量が重くなっただけという結果でした。主要なインプリンティング遺伝子のメチル化について比較検討されていますが、GS-F1とICSI-F1群のどちらも異常は認められませんでした。

しかし、ICSI-F1マウス、GS-F1マウスと自然交配によるマウス (Control-F1マウス) を比較した行動解析では、GS-F1マウスに種々の異常が報告されています。また、ICSI-F1マウスにも行動異常が認められました。GS-F1マウスはダーク/ライト遷移テストでの移動距離が減少するなど、活動量が低下していることが示されました。さらに、GS-F1マウスの音響刺激に対する驚愕反応が顕著に低下しており、プレパルスによる抑制がより顕著なことから、聴覚障害ではないことが示されました。また、ICSI-F1マウスとGS-F1マウスでは社会行動の異常および不安反応の増加が見られ、ICSI-F1マウスにはGS-F1マウスでは認めない記憶保持の障害が認められました。

吉村 F2世代への影響も検討していますが、その結果はいかがですか。

河村 F1世代マウスの精子と野生型の卵子を用いてICSIを行ったところ、GS-F2産仔ではControl-F2産仔よりも体重および胎盤重量が有意に重くなりました。ICSI-F2産仔では着床率が有意に低下し、胎児のない胎盤のみの頻度がICSI-F1産仔の16.8倍に増加しました。また、水頭症と無眼球症がICSI-F2に、水頭症はGS-F2に認められました。

ICSI自体が先天異常を引き起こすかを検討するために、約25ヵ月齢のControl-F1マウスおよびICSI-F1マウスの精子と野生型の卵子を用いてICSIを行い、F2世代マウスを比較しました。この場合、ICSI-F2マウスの17.6%が死亡または胎児のない胎盤のみであったのに対し、Control-F2マウスでは3.8%と低値でした。全体として、ICSI-F2子孫の11.2%に先天異常が見られ、同様の異常はControl-F2産仔でも15.4%に先天異常が確認されました。若齢のControl-F1マウスからのControl-F2産仔にはこのような異常が認められなかったことから、高齢マウスの精子を用いたICSIが先天異常の頻度を増加させたと考えられます。

行動解析では、GS-F2マウスではICSI-F2マウスよりも全体的に顕著な異常が認められました。GS-F2マウスは、GS-F1マウスで認めた多くの欠陥を示し、音響驚愕反応およびプレパルスによる抑制の異常は、GS-F2マウスにおいても明確に保持されていました。また、GS-F2マウスではGS-F1マウスにはない新たな異常行動も見つかりました。

吉村 F3世代にも影響を与えるのですか。

河村 ICSI-F3産仔においても同様に無眼球症および水頭症が観察されました。さらに、ICSI-F3およびGS-F3産仔には、頭部と四肢が欠損した重度の欠陥が見られました。

吉村 この論文の結果より、ヒトのICSIの臨床応用にあたっての何かサジェスションはありますか。

河村 この論文では、マウスを用いた試験において、GS cellから得られた精子を用いたICSI後の産仔に先天異常が多く見つかっています。また興味深いことに、ICSIそのものによっても先天異常が発生しています。体細胞ではICSIによって誘導される遺伝子転写変化は8週までに消失するとの報告もありますが、ICSI-F1マウスの生殖細胞は不可逆的な損傷を受け、異常の発生率が上昇した可能性があり、先天異常が次の世代にまで残る可能性を完全に排除することはできないデータとなっています。

この原因として、筆者らは卵子内にICSIによって先体が入り込むことの可能性を挙げています。先体は一連の加水分解酵素が含まれており、通常DNAを保護するタンパク質を損傷する可能性があります。

ヒトの先体はマウスと比べ小さく、卵子は大きいため、先体の影響はマウスほど顕著ではない可能性があります。しかし、ヒトのICSIで産まれた児の長期予後解析はまだ十分でなく、SSCやGS cellを精細管に移植して形成した精子の安全性はもちろんのこと、通常の精子を用いたICSIに関しても注意が必要であり、ヒトに近い動物モデルを用いた試験での確認が重要と考えます。





非重度男性不妊カップルのICSI

吉村 最後の論文は、ICSIとcIVFを比較した多施設共同研究です。ICSIは、男性不妊のみならず、現在では原因不明不妊にも汎用されていますが、ICSIが生産率改善に効果があるかどうかを検討した論文です。小野先生、患者背景ならびに研究方法について説明していただけませんか。

小野 完全受精障害歴のない非重度男性因子による不妊症カップル2,387組を対象に、ICSIとcIVFの有効性および安全性を非盲検無作為化試験で比較しました。本研究での非重度男性因子の定義は「WHOヒト精液検査と処理のための手引き(第5版)」に基づき、乏精子無力症(精子濃度 $5\sim 15\times 10^6$ 個/mLかつ前進運動率 $10\sim 32\%$)、乏精子症(精子濃度 $5\sim 15\times 10^6$ 個/mLかつ前進運動率 32% 以上)、または精子無力症(精子濃度 15×10^6 個/mL以上かつ前進運動率 $10\sim 32\%$)と定義されました。奇形精子症は、正常な形態の精子が4%未満とされました。

ICSI群では、卵子卵丘細胞複合体をヒアルロナーゼで除去し、成熟卵子に精子を注入しました。一方、cIVF群では、卵子卵丘細胞複合体を、前進運動精子数が $0.1\sim 0.2\times 10^6$ 個/mLの精液で受精させました。いずれの方法も排卵誘発後39~42時間後に実施し、ICSIまたはcIVFから16~18時間後(1日目)に受精評価をしました。胚質は67~69時間後(3日目)に評価されました。

吉村 受精率、妊娠率、生産率などの結果はいかがでしたか。

小野 Intention-to-treat (ITT) 集団における初回胚移植後の生産率は、ICSI群33.8%、cIVF群36.6%と、有意差は認められませんでした。完全受精障害率についても、ICSI群3.6%、cIVF群4.8%で、有意差を認めませんでした。ICSI群ではcIVF群と比較して、3日目の移植可能胚数が少なく、着床率も低い結果でした。累積生産率を比較した解析では、ICSI群の累積生産率がcIVF群より低く、ICSI群44.5%、cIVF群50.9% ($p=0.0041$)でした。被験者あたりの2前核期胚数、卵子1個あたり受精率、3日目の良好胚数中央値、胚移植方法(新鮮胚移植、凍結融解胚移植、卵割期胚移植、胚盤胞胚移植、単一胚または2個胚移植)、異所性妊娠率、流産率および継続妊娠率は、両群間で有意差を認めませんでした。

吉村 母体合併症や新生児合併症についてはいかがですか。

小野 母体合併症(中等症以上の卵巣過剰刺激症候群、妊娠糖尿病、妊娠高血圧症候群、分娩前出血)および新生児合併症(早産、出生時体重、先天異常、周産期死亡、新生児死亡を含む)のリスクは、両群で同程度でした。

吉村 この論文を先生が取り上げられた理由についてご説明い

ただけですか。

小野 現在、ICSIの使用は非重度男性不妊症にも拡大し、世界全体で行われている生殖補助医療の約2/3を占めています。欧州や北米でのICSI施行率は約70%であり、さらに低/中所得国では約100%に達する国もあります。これは、重度男性因子が男性不妊症のうちの最大でも約30%であることを考えると、はるかに高い割合といえます。

ICSIの使用拡大は、ICSIが完全受精障害を解決し、移植可能な胚数を増やし、生産率を高めるかもしれないという仮説に基づいています。しかし、これらの知見は小規模な非無作為化試験に基づいており、軽度から中等度の男性不妊症に対するICSIの推奨やコンセンサスは存在しません。過去には標準的な精子濃度と精子運動性を持つ不妊症カップルにICSIを使用しても、cIVFに対して生産率が改善されないことが報告されています。また、ICSIは受精における自然選択を回避する侵襲的な方法であるため、先天異常や神経発達遅滞など、児の健康に対する潜在的なリスクが懸念されています。

本研究は、非重度男性因子による不妊症カップルにおけるICSIの有効性を評価した臨床研究であり、ご紹介いたしました。

吉村 本日はICSI関連のトピックスを取り上げてみましたが、両先生から今後のICSIの臨床応用にあたってのtake home messageをいただきたいと思います。

河村 ICSIの安全性に関して、特に長期予後に関する安全性についてはまだ議論の余地が残されており、特にビジネス目的の不要なICSIは避けるべきだと思います。また、新しい技術の開発は生殖医療の進歩に繋がり、患者に福音をもたらすと思いますが、一方で有効性・安全性の証明をどのようにしていくかが課題であり、精子は動物種によりかなり異なるため、マウスだけではなく霊長類などを用いる等、解析の工夫が必要であると考えます。

小野 超音波処理で運動精子を増やし、受精率の向上が期待できます。一方で、ICSIの世代を超えた長期的影響やリスクの理解を深めていくことが重要です。これまでに、男性因子あるいは受精障害歴のない不妊症カップルに対するICSIの有効性は否定的とされてきました。今回ご紹介した臨床研究では、非重度の男性因子不妊症においても、ICSIの有効性が否定的でした。ICSIの適応に関して、客観的なデータに基づき、個々の患者の状況を考慮して選択することが重要といえます。

吉村 本日はお忙しいところありがとうございました。

お二人の先生方にお集まりいただき、貴重なお話を伺うことができました。



高周波超音波で運動不能精子を運動可能に

Making immotile sperm motile using high-frequency ultrasound
 Vafaie A, et al. Sci Adv. 2024; 10(7): eadk2864.

Point

高周波超音波によるヒト精子の運動性改善効果について、単一細胞解析技術を用いてより詳細に評価した。

ヒト精子の運動性を高める迅速かつ非侵襲的なアプローチとして、高周波超音波が期待されている。今回、液滴マイクロ流体工学による精子の単一細胞解析により、超音波処理によるヒト精子の運動性改善効果について評価した。運動性の低い(Grade C)精子において最も顕著な改善が認められ、72% (13/18個)が前進性(5 μ m/秒以上)へと変化した。この結果は、精子の運動性を改善する迅速かつ非侵襲的な方法を提供し、卵細胞質内精子注入法(ICSI)における侵襲性を抑えるため、生殖補助医療の成績向上に繋がると期待できる。

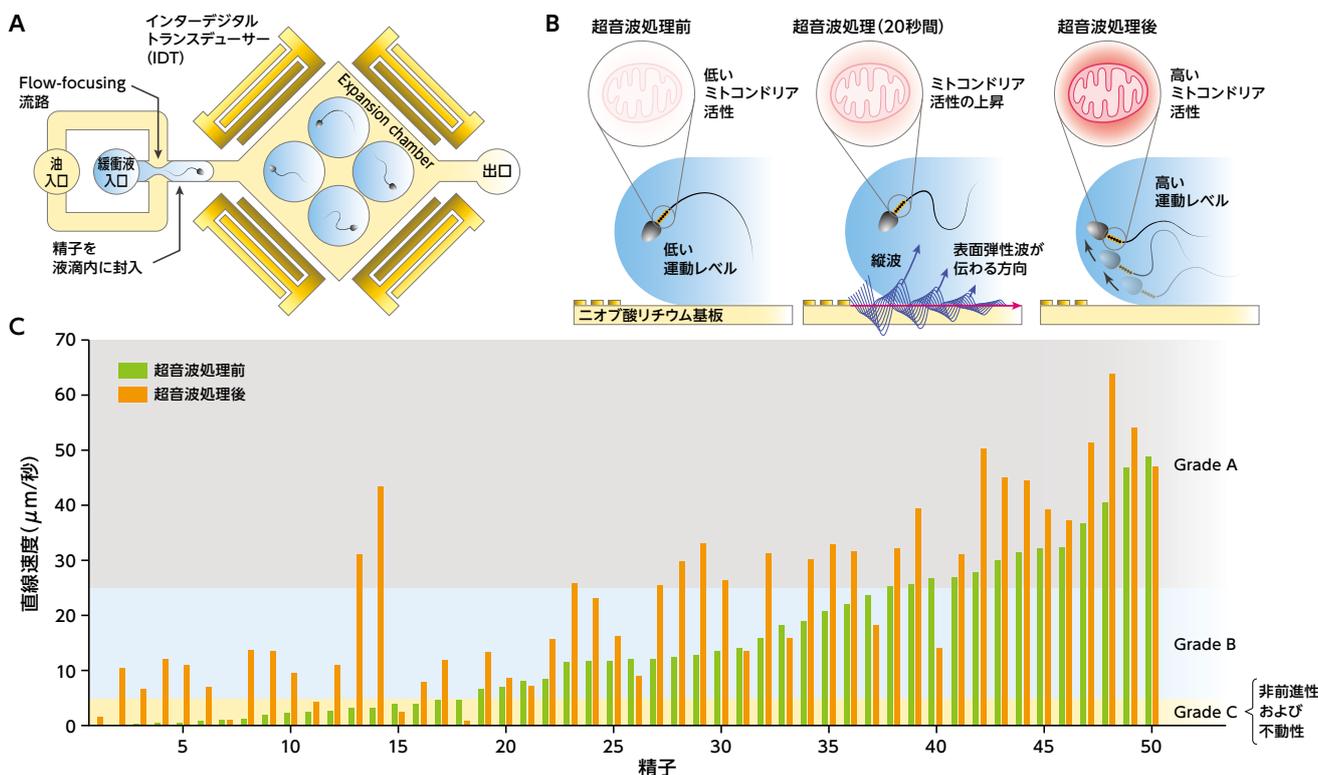
学術的背景

精子の運動性は自然受精の成功率に大きな影響を与え、運動性が10%増加するごとに妊娠率は8%向上する。また、生殖補助医療においては、精子の運動性が高ければ、より侵襲性が低く費用対効果の高い治療が選択可能となる。ICSIの場合、不動精子による成功率が20%であるのに対し、運動精子による成功率は48%であり、妊娠率が約25%向上する。また、精子の運動

性を高めるために、胚毒性を引き起こす化学薬品が一般的に使用されるが、数段階の洗浄工程が必要なため、精子DNAが損傷を受ける。

今回の報告と同じ研究チームは、超音波によりヒトやウシの精子の運動性が高まることを2022年に発表している。

図1 超音波による精子運動性の改善



(A) 超音波が個々の精子に与える影響を解析するために開発された液滴音響流体プラットフォーム。
 (B) インターデジタルトランスデューサー (IDT) から発生した振動が、ニオブ酸リチウム基板の表面から液滴に伝わり、代謝レベルを高めることで精子の運動性を改善する。
 (C) 精子50個の超音波処理前後における運動性レベルの変化。3人の検体を用い、独立した実験を3回実施。

● 800mW、40MHzの超音波処理 ……………

精子の運動性を単一細胞レベルで経時的に解析するため、個々の精子を微小な液滴に封入し、800mW、40MHzの超音波で20秒間処理した(図1A、B)。精子50個について超音波処理前後における直線速度を測定した(図1C)。精子の運動レベルを世界保健機関(WHO)のガイドラインに従い、Grade A(25 μ m/秒以上)、Grade B(25 μ m/秒未満、5 μ m/秒以上)、Grade C(5 μ m/秒未満)に分類した。曲線速度については、超音波処理した精子の86%以上において改善が認められた。

● Grade Cの精子が最も運動性を改善 ……………

超音波による精子の運動性パラメータの変化を評価した(図2A)。Grade Cの精子では、全ての運動性パラメータにおいて有意な上昇を示し、処理後に曲線速度が109%(15 μ m/秒 \rightarrow 32 μ m/秒)、平均速度が159%(5 μ m/秒 \rightarrow 12 μ m/秒)、頭部の振幅が112%(1.1 μ m \rightarrow 2.3 μ m)、頭部の振動数が44%(3.7Hz \rightarrow 5.3Hz)、直線性が153%(13% \rightarrow 34%)増加した。これらのデータは超音波により前進運動が改善したことを示しており、鞭毛の波打ち運動の振幅および振動数が増加し、遊泳軌道の偏角が減少することで、より直線的に遊泳するようになったと考えられた。Grade Bの精子は処理後に曲線速度が27%

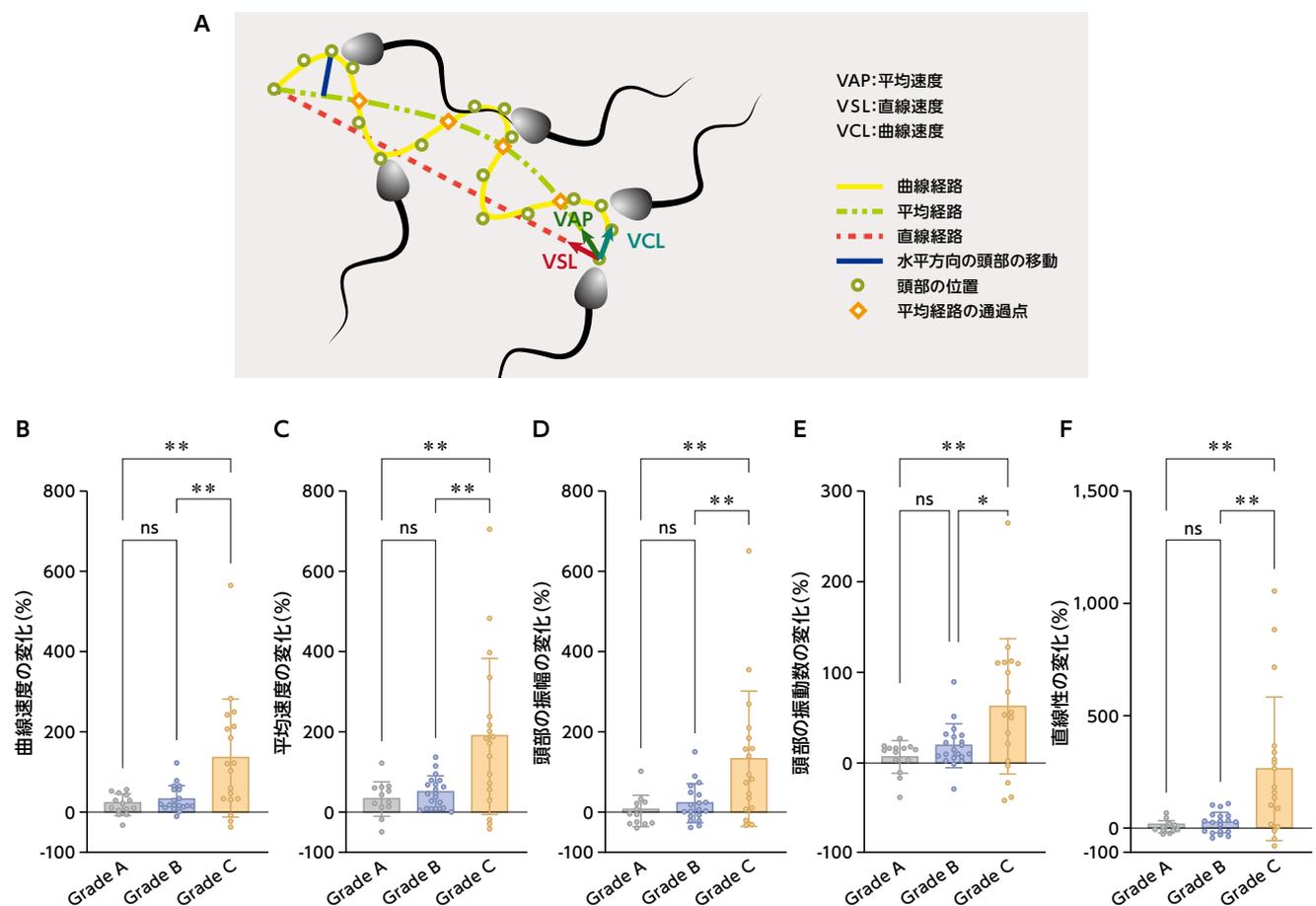
(38 μ m/秒 \rightarrow 49 μ m/秒)、平均速度が48%(14 μ m/秒 \rightarrow 21 μ m/秒)、頭部の振動数が16%(6.6Hz \rightarrow 7.7Hz)増加し、有意な改善を認めたが、頭部の振幅および直線性については有意な改善を認めなかった。Grade Aの精子は、曲線速度が20%(51 μ m/秒 \rightarrow 61 μ m/秒)および平均速度が29%(31 μ m/秒 \rightarrow 40 μ m/秒)増加し、有意な改善を認めた。

運動性の改善に関するGrade間の比較では、Grade Cの精子が最も超音波処理による恩恵を受けることが明確に示された(図2B~F)。Grade Cの精子は運動性の改善が最も顕著に認められたが、Grade BやGrade Aの精子よりも改善の程度にばらつきを認めた。これは、Grade Cに重度の運動障害や構造異常を有する運動不能な精子が含まれるためと考えられた。

● 不動精子に対する検討 ……………

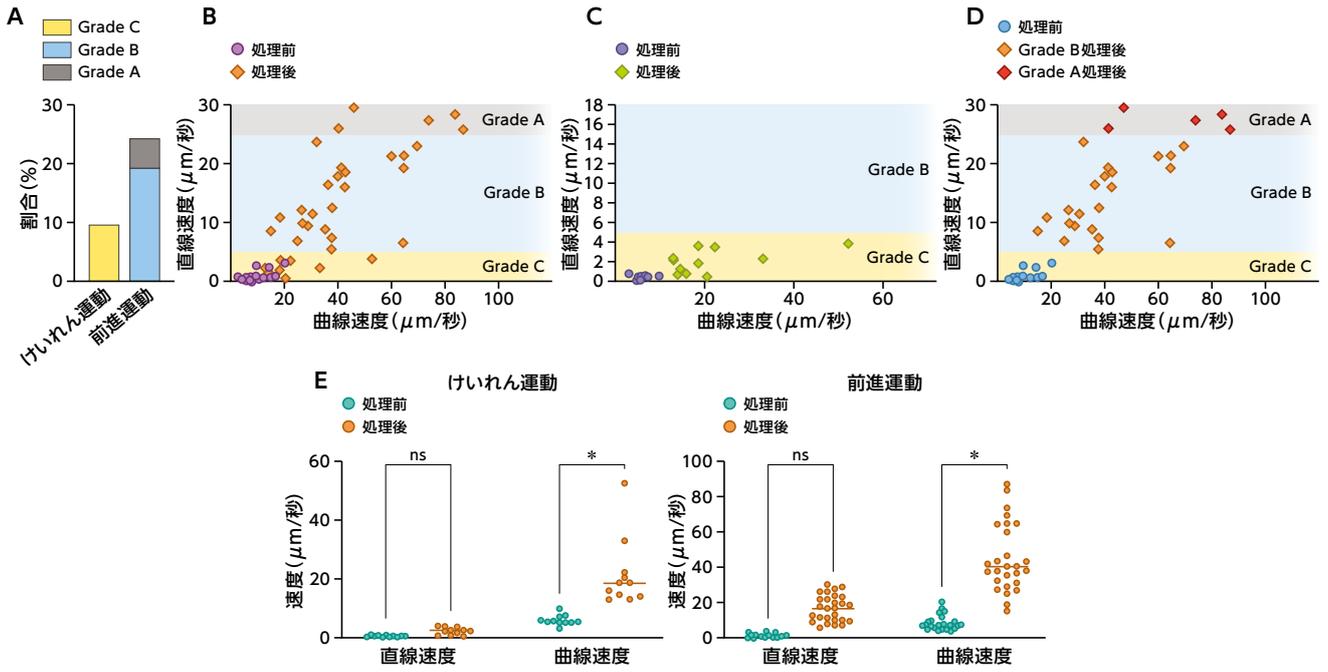
染色剤で生存が確認された不動精子111個を超音波処理し、運動性の改善について評価した。全体の25%以上が超音波処理後に前進運動を示すようになり、曲線速度および直線速度が有意に増加した。また、9%が超音波処理後にけいれん運動を示した(図3A)。超音波処理後の精子は0.5~29.5 μ m/秒の直線速度と12.9~87.2 μ m/秒の曲線速度を示した(図3B~D)。けいれん運動を示した精子では直線速度の有意な増加は認めなかったが、

図2 超音波による精子運動性の変化に関するGrade間の比較



(A) 精子運動性パラメータ。(B) 曲線速度。(C) 平均速度。(D) 頭部の振幅。(E) 頭部の振動数。(F) 直線性の変化率。3人の検体を用い、独立した実験を3回実施(各Gradeについて13個以上解析)。
* p \leq 0.05, ** p \leq 0.01, ns 有意差なし、Tukeyの多重比較検定を用いた一元配置分散分析

図3 不動精子に対する超音波の効果



(A) 超音波処理により、けいれん運動または前進運動を示した不動精子の割合(n=111、3人の検体による独立した6回の実験より)。(B~D) 超音波処理前後における、不動精子の直線速度と曲線速度。(B) 運動性を示した精子(n=38)。(C) けいれん運動を示した精子(n=11)。(D) 前進運動を示した精子(n=27)。(E) けいれん運動または前進運動を示した精子の超音波処理前後における直線速度と曲線速度。
* $p \leq 0.0001$ 、ns有意差なし、Bonferroniの多重比較検定を用いた二元配置分散分析

曲線速度は268%増加した。一方、前進運動を示した精子では、直線速度と曲線速度がそれぞれ2348%と435%増加した(図3E)。

- **超音波によるミトコンドリア機能の変化**
超音波による精子の運動性改善のメカニズムを解明するために、ミトコンドリア膜電位(MMP)レベルを評価した。超音波による精子運動性の向上にはMMPレベルの低下が伴い、超音波により精子ミトコンドリアの機能が変化することが示された。

まとめ

超音波により運動精子の割合を高めることで、受精率の向上が期待できる。また、超音波により生存精子の識別が可能であるため、染色剤を用いた識別よりも侵襲性の低い条件でICSIが実施可能となる。

Keyword

ミトコンドリア膜電位(MMP)

ミトコンドリア内膜を横切る電気勾配であり、ミトコンドリアでのATP産生に利用される。MMPレベルの変化は、細胞内のエネルギー供給の変化を示しており、ATP産生と精子の運動性に影響を与える。

マウスの卵細胞質内精子注入は世代を超えた異常を引き起こす

Intracytoplasmic sperm injection induces transgenerational abnormalities in mice
 Kanatsu-Shinohara M, et al. J Clin Invest. 2023; 133(22): e170140.

Point

生殖補助医療はマウスに形態学のおよび機能的欠陥を引き起こし、その一部は次世代において表面化する可能性がある。

精原幹細胞 (SSC) 移植は、癌治療後の若年患者の妊孕性を回復させる新たな生殖補助医療として登場した。生殖細胞の体外操作が子孫の行動に及ぼす影響を調べるため、SSC移植と卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の2つの生殖補助医療を組み合わせることでF1マウス (GS-F1マウス) を作製した。同時に野生型精子のICSIによるF1マウス (ICSI-F1マウス) も作製したが、いずれのF1マウスにおいても行動異常が確認され、F2世代においても同様の行動異常が認められた。さらに、正常に見えるF1世代マウスの精子と野生型卵子の体外受精 (IVF) によるF2世代産仔において、無眼球症や水頭症、四肢欠損など、さまざまなタイプの先天異常を認めた。

学術的背景

ICSIは少数の精子があれば実施可能のため、無精子症や球状精子症などの男性に起因する不妊症に適応されている。ICSIは重大な先天異常との関連性は認められないものの、大規模な疫学研究では、低出生体重や軽微な異常、インプリンティング異常のリスク増加が示されている。また、ICSIが次世代に与える影響については、ヒトの生殖周期が長いこと、殆ど知られていない。

最近ではSSC移植が登場し、癌治療を受けた男児における妊

孕性の回復が期待されているが、子孫の健康に与える影響については不明である。

胚細胞は実験操作による刺激に敏感であり、胚盤胞前胚の *in vitro* 培養は、ウシやヒツジに過剰な出生体重、大きな舌、臍ヘルニア、低血糖、内臓肥大といった“offspring syndrome”を引き起こすことが知られている。

結果

● SSC移植とICSIによるF1世代マウス ……………

SSC移植が生殖補助医療の結果に与える影響を調べるため、緑色蛍光タンパク質を全身に発現するGFPマウスの生殖系列幹 (GS) 細胞を先天性不妊マウスの精細管に移植し、発育した精子を採取してICSIを実施した (図1A、右)。比較対照として、GFPマウスの精子を用いてICSIを実施した (図1A、中央)。

GS-F1産仔の体重および胎盤重量はICSI-F1産仔よりも重いものの、産仔数と胎盤効率の指標となる体重/胎盤重量比については同等であった (図1B、C)。

● F1世代マウスの行動解析 ……………

F1世代の雄マウスを用いて行動解析を実施した。ICSI-F1マウス、GS-F1マウスと自然交配によるマウス (Control-F1マウス) を比較した。

GS-F1マウスはControl-F1マウスと比べ体重が重いものの、握力テストやワイヤーハンギングテストでは差異を認めず、熱刺激に対する異常な感受性も示さなかった。しかし、ダーク/ライト遷移テストでの移動距離が減少するなど、活動量が低下していることが示された。

GS-F1マウスの110dBおよび120dBの音響刺激に対する

驚愕反応が顕著に低下していたが、プレパルスによる抑制がより顕著なことから、聴覚障害ではないことが示された。また、ICSI-F1マウスとGS-F1マウスでは社会行動の異常および不安反応の増加が見られた。

● F2世代マウスにおける着床不全および先天異常 ……………

F1世代マウスの精子と野生型卵子によるIVFを行った (図1A)。GS-F2産仔ではControl-F2産仔よりも体重および胎盤重量が有意に重かった。ICSI-F2産仔では着床率が有意に低下し、胎盤のみの頻度はICSI-F1産仔の16.8倍に上昇し、死亡および胎盤のみの産仔が29.6%を占めた。水頭症は8.5%、無眼球症は1.7%に認められた。

ICSI自体が先天異常を引き起こすかを検討するために、約25ヵ月齢のControl-F1マウスおよびICSI-F1マウスの精子と野生型卵子によるIVFを行い、F2世代マウスを比較した。ICSI-F2産仔では11.2%に先天異常を認め、同様の異常はControl-F2産仔の15.4%でも確認された。若齢のControl-F1マウス (15ヵ月齢) からのControl-F2産仔にはこのような異常が認められなかったことから、高齢マウスの精子を用いたIVFが先天異常の頻度を上昇させることが示唆された (図1D)。

図1 ICSIにより生まれた子孫における先天異常

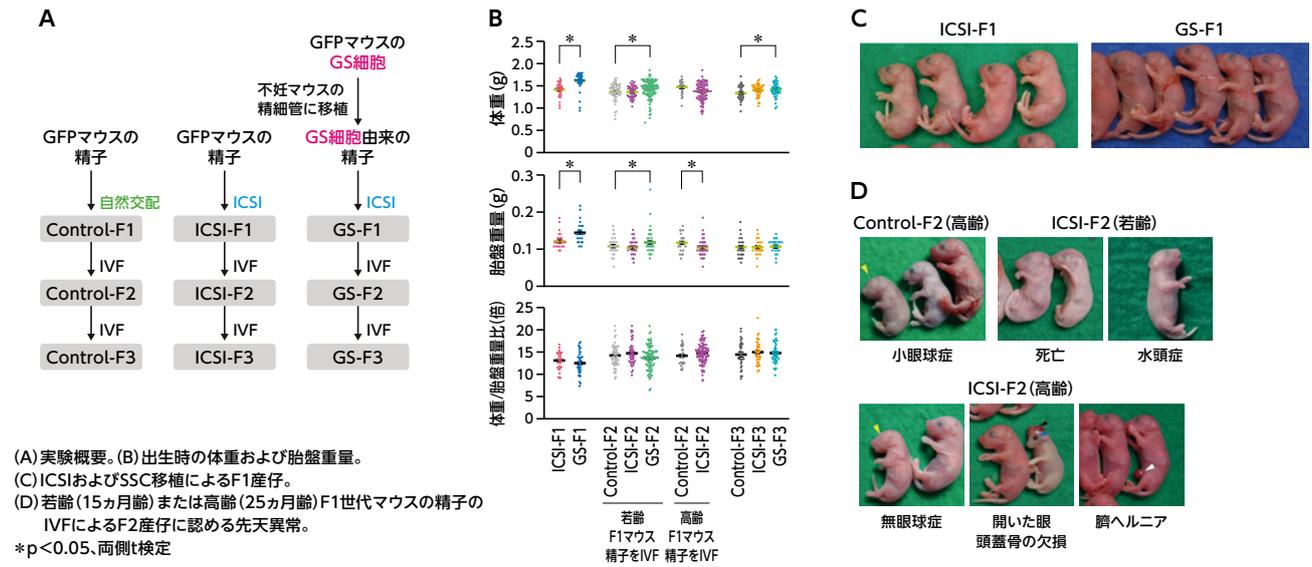
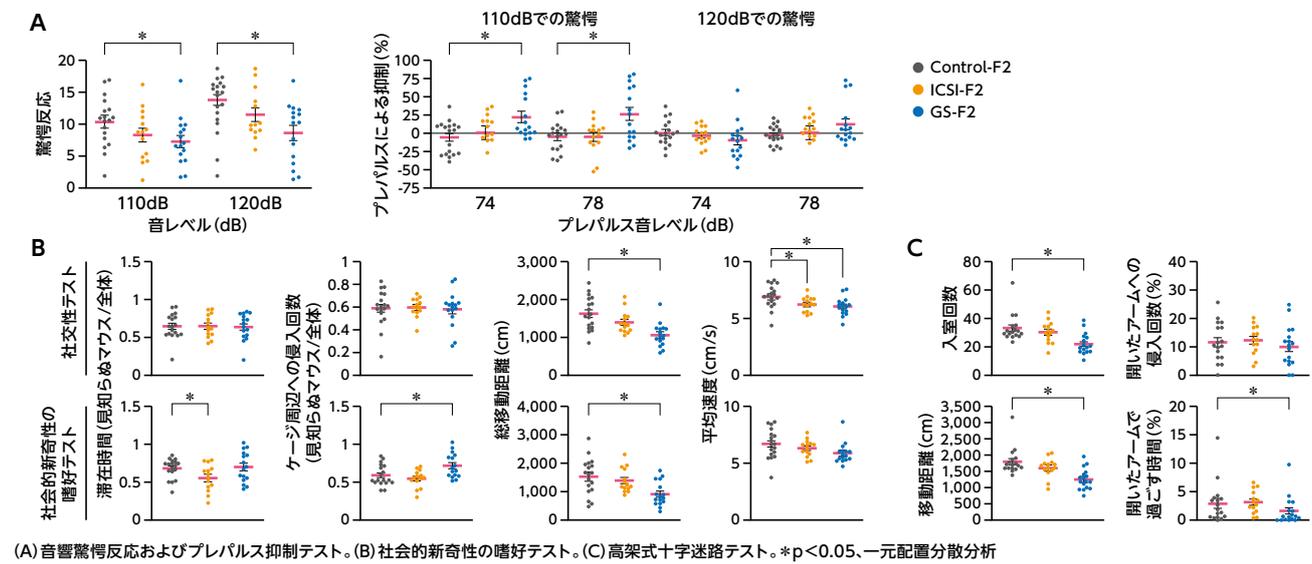


図2 F2世代マウスの行動異常



● F2世代マウスにおける行動異常

GS-F2マウスではICSI-F2マウスよりも全体的に顕著な異常が認められた。GS-F2マウスは、GS-F1マウスで認めた多くの欠陥を示し、音響驚愕反応およびプレパルスによる抑制の異常は、GS-F2マウスにおいても明確に保持されていた(図2A)。また、社会的な新奇性の嗜好を評価するテストでは社会行動の欠陥が(図2B)、高架式十字迷路テストでは不安行動が示唆された(図2C)。

GS-F2マウスではGS-F1マウスにはない新たな表現型として、熱感受性や社会的な新奇性の嗜好テストにおける異常が確認された。一方、記憶についてはT字型迷路テストやバーズ迷路テストでGS-F1マウスよりも有意な改善が認められた。

ICSI-F2マウスにおいても、社会的な新奇性の嗜好テストで軽度の異常を有し、活動量の低下など、ICSI-F1マウスでは見られなかった新たな表現型も確認された。

● F3世代マウスにおける先天性奇形

GS-F3産仔はControl-F3産仔よりも体重が重いことが確認された。産仔数および体重/胎盤重量比は3群間で同等であった。

ICSI-F3産仔においても同様に、無眼球症および水頭症が観察された。さらに、ICSI-F3およびGS-F3産仔には、頭部と四肢が欠損した重度の欠陥が見られた。

● インプリンティング異常の解析

F1~F3産仔の尾から抽出したDNAのメチル化状況(H19, Meg3 IG, Igf2r, Snrpn遺伝子)について解析したが、いずれのマウスにも異常は見られなかった。

まとめ

ICSIが出生児の健康に悪影響をもたらす可能性がある。

Keyword

インプリンティング

遺伝的刷り込みともいわれ、一部の遺伝子が片方の親から受け継いだ遺伝子のみ発現すること。

非重度男性因子による不妊症カップルに対するICSIと conventional IVFの比較:多施設共同非盲検無作為化比較試験

Intracytoplasmic sperm injection versus conventional in-vitro fertilisation for couples with infertility with non-severe male factor: a multicentre, open-label, randomised controlled trial
Wang Y et al. Lancet. 2024; 403(10430): 924-934.

Point

非重度男性因子による不妊症カップルにおいて、ICSIはconventional IVFに対して生産率を改善しなかった。

中国の生殖医療センター10施設で、受精不良歴のない非重度男性因子による不妊症カップル2,387組を対象に、非重度男性不妊症にまで使用拡大されている卵細胞質内精子注入法 (ICSI) と体外受精 (conventional IVF: cIVF) の有効性および安全性を非盲検無作為化試験で比較した。Intention-to-treat (ITT) 集団における初回胚移植後の生産率はICSI群で33.8%、cIVF群で36.6%であった。母体および新生児合併症のリスクは両群で同程度であった。

学術的背景

ICSIは、cIVFでは妊娠に至らなかった重度男性不妊症カップルのために1992年に導入された。以来その使用は非重度男性不妊症にまで拡大し、今日では世界全体で行われている生殖補助医療のうち約2/3を占める。特に欧州や北米でのICSI施行率は約70%、低/中所得国では約100%に上る場合もある。これは重度男性因子が男性不妊症の最大30%であることを考えると、はるかに高い割合である。

重度男性不妊症以外にもICSIの使用が拡大したのは、ICSIが完全受精障害を避け、移植可能な胚数を増やし、生産率を高めるといった仮説に基づく。しかし、これらの知見は小規模な非無作為化試験によるもので、軽度から中等度の男性不妊症カップルに

ICSIを使用することについての推奨やコンセンサスはない。

過去の多施設共同無作為化試験では、標準的な精子濃度と運動性の不妊症カップルにICSIを使用しても、cIVFに対して着床率や生産率は改善されないことが示されている。また、ICSIは受精における自然選択を回避する侵襲的な方法のため、先天異常、神経発達遅滞など、児の健康に対する潜在的なリスクが懸念されている。

本研究は、非重度男性因子の不妊症カップルにおけるICSIとcIVFの有効性と安全性を評価した大規模な無作為化試験である。

結果

2018年4月4日から2021年11月15日の間に、中国10施設において3,879組のカップルをスクリーニングした。有効性評価対象のITT集団には、適格基準を満たしたICSI群1,154組とcIVF群1,175組が含まれた。患者背景は両群で類似しており、初診時の乏精子無力症、乏精子症、精子無力症、奇形精子症の割合は両群で同様であった(表1)。

初回胚移植後の生産率は、ICSI群で33.8%、cIVF群で36.6%と有意差を認めなかった(表2)。完全受精障害率についても、ICSI群で3.6%、cIVF群で4.8%と有意差を認めなかった。cIVF群に対してICSI群では3日目の移植可能胚数が少なく、着床率が低かった。累積生産率を比較した事後解析では、cIVF群に対してICSI群の方が低かった(ICSI群44.5%、cIVF群50.9%、 $p=0.0041$)。

女性被験者あたりの2前核期胚数、採卵あたりの受精率および3日目の良好胚数の中央値や、胚移植の方法(新鮮胚移植、凍結融解胚移植、卵割期胚移植、胚盤胞胚移植、単一胚または

2個胚移植)、臨床的妊娠、異所性妊娠、流産および継続妊娠の割合は両群間で差はなかった。

表1 患者背景

		ICSI群 (1,154組)	cIVF群 (1,175組)
年齢中央値 (IQR)	女	34歳 (31-37)	33歳 (30-37)
	男	34歳 (31-38)	34歳 (31-38)
cIVFまたはICSI初回		91.1% (1,051組)	90.9% (1,068組)
乏精子無力症 [†]		13.3% (153組)	10.7% (126組)
乏精子症 [†]		7.3% (84組)	7.7% (91組)
精子無力症 [‡]		79.5% (917組)	81.5% (958組)
奇形精子症 [¶]		60.3% (590/979組)	60.8% (599/986組)

[†], [‡]: 精子濃度5~15×10⁶個/mLかつ[前進運動率10~32% (†) あるいは32%以上 (‡)]; [§]: 精子濃度15×10⁶個/mL以上かつ前進運動率10~32%; [¶]: 正常形態4%未満

母体合併症（中等症以上の卵巣過剰刺激症候群、妊娠糖尿病、妊娠高血圧症候群、分娩前出血）および新生児合併症（早産、

出生時体重、先天異常、周産期死亡および新生児死亡を含む）のリスクは両群で同程度であった（表2）。

まとめ

非重度男性因子による不妊症カップルにおいて、ICSIはcIVFに対して生産率を改善しないことが分かった。本研究では新生児合併症リスクに差を認めなかったが、ICSIは侵襲的な処置でありcIVFよりもコストが掛かるため、児の健康に対する潜在的リスクを考慮すると、このようなカップルにはcIVFが選択されることが望ましいと考えられる。

Keyword

ICSI (intracytoplasmic sperm injection : 卵細胞質内精子注入法)

本邦の生殖医療ガイドラインでは、重度の男性不妊症はcIVF、ICSIの適応とされるものの、コンセンサスの得られた定義はない。cIVFとICSIのいずれを用いるかのcut-off値についても、一定の基準値は存在せず、例えば総運動精子数100万、正常な形態の前進精子50万/mLまたは調整後の精子で前進運動精子20~100万をcut-off値とするなど、施設ごとの経験をもとにそれぞれ決定されている。

表2 臨床アウトカムの結果 (ITT解析)

	ICSI群 (1,154組)	cIVF群 (1,175組)	調整RR (95%CI)	調整p値
初回胚移植後の生産率、% (n)	33.8 (390)	36.6 (430)	0.92 (0.83, 1.03)	0.16
着床率 (胎嚢数/移植胚数)、% (n)	34.3 (564/1,642)	37.7 (620/1,644)	0.91 (0.83, 1.00) *	0.045*
臨床的妊娠率、% (n)	40.1 (463)	42.4 (498)	0.95 (0.86, 1.04)	0.28
継続妊娠率、% (n)	34.8 (402)	37.6 (442)	0.93 (0.83, 1.03)	0.18
女性被験者あたりの2前核期胚数、中央値 (IQR)	6 (3, 10)	6 (3, 10)	-	0.12
採卵あたりの受精率、中央値 (IQR)	59.0 (42.0, 75.0)	60.0 (40.0, 75.0)	-	0.90
完全受精障害率、% (n)	3.6 (42)	4.8 (56)	0.77 (0.52, 1.14)	0.19
3日目の移植可能胚数、中央値 (IQR)	4 (2, 8)	5 (2, 9)	-	0.0009
3日目の良好胚数、中央値 (IQR)	2 (1, 5)	3 (1, 5)	-	0.19
移植率、% (n)	89.2 (1,029)	86.7 (1,019)	1.03 (1.00, 1.06)	0.076
新鮮胚移植率	56.8 (655)	54.3 (638)	1.04 (0.97, 1.12)	0.22
凍結融解胚移植率	32.4 (374)	32.4 (381)	1.00 (0.89, 1.12)	0.99
中等症以上の卵巣過剰刺激症候群発現率、% (n)	1.3 (15)	1.4 (17)	0.90 (0.45, 1.79) *	0.76*
異所性妊娠率、% (n)	0.8 (9)	1.1 (13)	0.70 (0.30, 1.64) *	0.42*
流産率、% (n)	5.0 (58)	3.7 (43)	1.38 (0.94, 2.02)	0.10
先天異常率、% (n)	0.6 (7)	1.1 (13)	0.55 (0.22, 1.37) *	0.19*
周産期死亡率、% (n)	0.3 (4)	0.5 (6)	0.68 (0.19, 2.40) *	0.75*
新生児死亡率、% (n)	0.2 (2)	0.1 (1)	2.04 (0.18, 22.43) *	0.62*

*: 未調整RRまたは未調整p値

試験概要

試験デザイン	多施設共同非盲検無作為化比較試験
対象患者	初回または2回目のcIVFまたはICSIを予定しており、男性パートナーが初回評価時に非重度男性因子を示した不妊症のカップル
主な除外基準	ドナー精子または卵子、凍結精液の使用、着床前遺伝子検査の実施、過去cIVFによる受精率が25%以下、卵子非採取、または採卵日に受精可能な総前進運動精子数が 0.1×10^6 個/mL未満など
プロトコール	非重度男性因子の定義はWHOヒト精液検査と処理のための手引き (第5版) に従い、乏精子無力症 (精子濃度 $5 \sim 15 \times 10^6$ 個/mLかつ前進運動率 $10 \sim 32\%$)、乏精子症 (精子濃度 $5 \sim 15 \times 10^6$ 個/mLかつ前進運動率 32% 以上) または精子無力症 (精子濃度 15×10^6 個/mL以上かつ前進運動率 $10 \sim 32\%$) と定義された。奇形精子症は正常な形態が4%未満の精子と定義された。GnRHアゴニスト法またはGnRHアンタゴニスト法によって卵巣刺激を行い、少なくとも2つの卵胞が直径18mm以上に達した時点でヒト絨毛性ゴナドトロピンを投与し、約36時間後に採卵した。ICSI群では、卵子卵丘細胞複合体をヒアルロニダーゼで除去し、成熟卵子のみに単一の精子を直接注入した。cIVF群では、卵子卵丘細胞複合体を、前進運動精子数が $0.1 \sim 0.2 \times 10^6$ 個/mLの精液を用いて受精させた。ICSIとcIVFのいずれも、排卵誘発後39~42時間後に実施し、精子注入または受精16~18時間後 (1日目) に受精を評価した。卵割期の胚の質は精子注入または受精67~69時間後 (3日目) に評価した。
臨床アウトカム	【主要】初回胚移植後の生産率 (妊娠22週以降に生存の徴候を示す児が少なくとも1人出生) 【副次】受精率、3日目の移植可能胚数、3日目の良好胚数、着床率、臨床的妊娠率、継続妊娠率、完全受精障害率など
統計解析	主要統計解析は、不適格者等を除く無作為化された全参加者を含むITT集団で行った。対数二項回帰を用いて、調整リスク比 (RR)、未調整RRおよび95%CIを算出した。対数二項回帰モデルが収束しない場合は、ポアソン回帰を用いるか未調整RRと95%CIのみ算出した。

