

# 症 例 |||||

## ストロンチウムによる卵活性化顕微授精により健児を得た一例

弘前大学医学部産科婦人科学教室

中 村 理 果・藤 井 俊 策・重 藤 龍比古  
谷 口 綾 亮・木 村 秀 崇・福 井 淳 史  
水 沼 英 樹

### A successful pregnancy following intracytoplasmic sperm injection and strontium-induced egg activation

Rika NAKAMURA, Shunsaku FUJII, Tatsuhiko SHIGETO  
Ryosuke TANIGUCHI, Hidetaka KIMURA, Atsushi FUKUI  
Hideki MIZUNUMA

*Department of Obstetrics and Gynecology, Hirosaki University School of Medicine*

#### はじめに

卵細胞質内精子注入法 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) は、通常の体外受精 (in vitro fertilization; IVF) では受精が成立しない男性不妊などに対して広く行われている。しかし、ICSIをもってしても受精が成立しない (ICSI 受精障害) 症例が存在し、ICSIを行った症例あたり 0.9%<sup>1)</sup>、ICSIを実施した周期あたり 5.6%の頻度<sup>2)</sup>と報告されている。ICSI受精障害の原因のひとつとして卵活性化障害があり<sup>3)</sup>、人為的な卵活性化を併用した ICSI が試みられている。われわれは電気刺激による卵活性化を行い妊娠が成立した症例を報告した<sup>4)</sup>が、今回、ストロンチウムを用いた卵活性化により、双胎妊娠が成立し健児を得た症例を経験したので、文献的考察を加え報告する。

#### 症 例

患者：26歳 主婦  
妊娠分娩歴：0妊0産  
月経歴：初経14歳，周期28日型で整順

既往歴：15歳 右鼠径ヘルニア手術。  
18歳・20歳 急性腎盂腎炎で入院加療。  
家族歴：父 高血圧症，父方祖母 慢性腎不全。  
現病歴：1998年12月，22歳で結婚した。2001年9月，25歳時に子宮がん検診を目的に前医を受診した。挙児希望もあったため不妊スクリーニング検査を受けたところ，乏精子症と診断された。2002年5月に不妊治療を目的として当科紹介となった。  
現症：身長158cm，体重56kg。基礎体温は二相性。子宮は前傾前屈，正常大で可動性は良好，両側付属器にも異常を認めなかった。  
検査所見：子宮腔部細胞診はクラスIIで陰性，血算・生化学検査はすべて正常値であった。血清感染症スクリーニング検査と腔細菌培養検査は陰性だったが，血清クラミジアIgA抗体が陽性であった。子宮頸管クラミジアDNA検査は陰性であった。  
不妊検査所見：精液検査は，総精子濃度 $31 \times 10^6/ml$ ，運動率80.6%，奇形率34%と正常で，フーナー試験も正常であった。卵胞期に施行

表 1 ART の経過

No.	採卵数	媒精方法	媒精卵数	受精卵数 (受精率)	培養日数	移植胚数	移植胚 (grade)*	結果
1	10	IVF	9	8 (89%)	4	2	8-cell (III), 16-cell (II)	妊娠不成立
2	7	IVF	6	0 (0%)	—	—	—	キャンセル
3	2	ICSI	2	1 (50%)	3	1	8-cell (IV)	妊娠不成立
4	7	ICSI	6	0 (0%)	—	—	—	キャンセル
5	4	活性化 (E)	1	1 (100%)	—	—	—	キャンセル (全胚凍結)
6	5	活性化 (E)	4	4 (100%)	4	3	8-cell (III, II, II)	妊娠不成立
7	8	活性化 (E)	3	0 (0%)	—	—	—	キャンセル
8	5	活性化 (Sr)	3	3 (100%)	4	3	16-cell (III, III, II)	双胎妊娠
		ICSI	2	2 (100%)				

E=電気刺激処理, Sr=ストロンチウム処理.

\* 移植胚の評価は Boltonら<sup>25)</sup>の方法によって行った。

した LHRH/TRH 負荷試験は基礎値ならびに反応性とも正常であり、子宮内膜日付診を含む黄体機能検査も正常であった。子宮卵管造影検査で両側卵管周囲～采部癒着が疑われた。また、経膈超音波断層法で卵巣が子宮と固着しており、両側卵巣周囲癒着が疑われた。

治療経過：卵管性不妊と診断し、2002年7月に腹腔鏡下子宮付属器癒着剥離術および両側卵管開口術を施行した。両側付属器周囲にはクラミジア感染によると思われる癒着が広範囲に存在し、R-ASRM（アメリカ生殖医学会）癒着スコアは両側とも重症（24点）であった。術後に卵管通水治療とタイミング指導を5周期行ったが、妊娠は成立しなかった。

2003年1月から生殖補助医療（assisted reproductive technology; ART）を開始した。過排卵刺激は、GnRH agonist を併用したロング法で行った（表1）。初回治療周期は通常の媒精により9個中8個（89%）で受精が成立したが、day 4における形態はいずれも不良であった。2回目はすべての卵で受精が成立せず（total fertilization failure; TFF）キャンセルとなった。3回目はICSIを行い、2個中1個で第2極体の放出を確認したものの前核は不明瞭であったが、day 3で grade IV の8細胞期胚となったため胚移植した。4回目はICSIでもTFFとなったため、患者と相談

のうえ、人為的な卵活性化を併用したICSIを行う方針となった。なお、卵活性化については弘前大学医学部倫理委員会の承認を得ており、患者から文書による同意を得て施行した。2004年5月、5回目の過排卵刺激中の経膈超音波断層法で両側卵管水腫が認められた。既報<sup>4)</sup>のごとく電気刺激による活性化ICSIを行い得られた胚を凍結保存した後、同年6月に腹腔鏡下手術を施行した。両側卵管とも全長にわたって著明に腫大しており、今後もARTを継続することを考慮して両側卵管を切除した。同年8月に施行した6周期目の治療では電気刺激処理で4個の卵すべてが受精し、8細胞期胚3個を移植したが妊娠は成立しなかった。5回目の採卵で得られた凍結胚は解凍後に蘇生しなかった。さらに、2005年1月に施行した7周期目の治療は、電気刺激を加えた3個の卵すべてが変性しキャンセルに終わった。

2006年1月、30歳時に治療再開を希望して再来した。電気刺激処理では良好胚が得られなかったため、ストロンチウム処理を行う方針とした。2006年2月に5個の成熟卵を得、うち2個に対し通常のICSIを、3個に対しストロンチウム処理による活性化ICSIを行った。ストロンチウム処理は、Yanagidaら<sup>5)</sup>の方法に従った（表2）。5個すべての卵で正常の受精が成立したが、day 4の胚移植時にお

表2 活性化 ICSI の方法

1) 1M ストロニウムストック溶液 20 $\mu$ l を, Ca <sup>2+</sup> -free HTF medium 1ml に溶解し, 10mM ストロニウム溶液とする。
2) 10mM ストロニウム溶液の 50 $\mu$ l ドロップを 4-well dish (Nunc™, Denmark) に作成し, ミネラルオイルで覆い加温しておく。
3) 通常どおりに ICSI を行った後, P+Cleavage Medium® (SAGE In-Vitro Fertilization Inc., CT, USA) で30分間培養する。
4) ICSI を施行した卵を 10mM ストロニウム溶液のドロップに移し, 洗浄してから60分間静置する。
5) P+Cleavage Medium® で洗浄し培養する。

ける評価では活性化 ICSI 胚のみが形態良好であり, これら3個の16細胞期胚(図1)を子宮腔に移植し, 2 絨毛膜性双胎妊娠が成立した。通常の ICSI 胚は2個とも, 割球の大きさが不均一で fragment も多く廃棄した。

妊婦健診では, 妊娠31週に蕁麻疹に対して投薬治療を行った以外は著変なく経過した。妊娠32週に双胎の周産期管理のため入院となった。入院後, 子宮口の開大と子宮収縮を認めたため塩酸リトドリンを経口投与した。妊娠34週に軽症の肝障害が出現したが, 投薬にて軽快した。妊娠38週に尿酸値の上昇を認めたため, 妊娠38週4日から分娩誘発を開始し, 2007年10月, 妊娠38週5日に双胎を経産分娩した。第1子は男児, 2652g, Apgar score は1分後9点, 5分後9点, 第2子は男児, 2772g, Apgar score は1分後9点, 5分後9点であり, 両児とも外表奇形や神経学的異常を認めなかった。母児とも経過は良好で, 産褥5日目に退院となった。1か月健診でも異常は認められなかった。

### 考 察

哺乳動物の排卵後の卵子は, 第2減数分裂中期 (metaphase-II; M-II) で停止している。先体反応を終えた精子が M-II 卵と融合すると, 卵細胞内の Ca<sup>2+</sup> 濃度が融合部位で上昇し, 次いで卵細胞全体に伝播する。それにより, 表層顆粒が分泌され多精子受精阻止機構

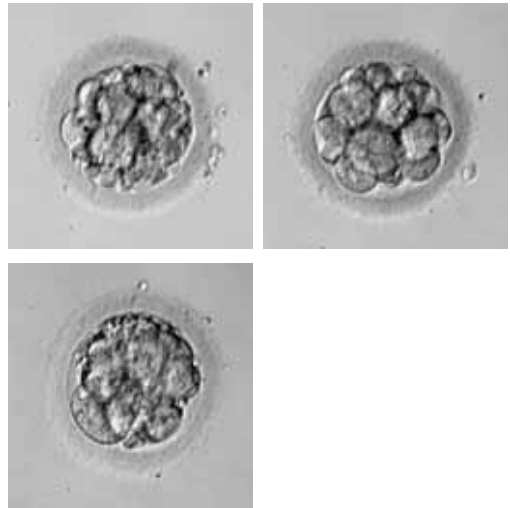


図1 活性化 ICSI による day 4 移植胚  
上段の2個は grade III の16細胞期胚,  
下は grade II の16細胞期胚。

が作動するとともに, 減数分裂が再開して第2極体が形成され, 雌雄前核が融合し受精が完了する。これら一連の現象を「卵活性化」といい, 本態は精子との融合によって引き起こされる卵細胞内 Ca<sup>2+</sup> の周期的な増加反応 (Ca<sup>2+</sup> オシレーション) である<sup>6)</sup>。

卵活性化のメカニズムは, まだ完全には明らかにされていない。多くの体細胞には, 細胞膜の GTP 結合タンパクを介して phospholipase C (PLC) が活性化し, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP2) が分解されて inositol-1,4,5-triphosphate (InsP3) が産生され, InsP3 受容体を介して粗面小胞体から Ca<sup>2+</sup> が放出される細胞内伝達系が存在する。卵子では, 精子や精子抽出物を卵細胞質に注入することで Ca<sup>2+</sup> オシレーションを誘発できるため, 細胞膜の受容体を介さない機構, すなわち精子細胞質にある活性化因子 (sperm factor) が卵細胞質に移入することによって誘起されると考えられている (図2)。2002年に Saunders ら<sup>7)</sup> は精子に特異的に発現する PLC $\zeta$  (zeta) を発見し, PLC $\zeta$  による卵活性化機構の詳細が明らかにされつつある<sup>8)</sup>。細胞内に増加した Ca<sup>2+</sup> はカルモジュリンと結合してユビキチン/プロテオソーム系

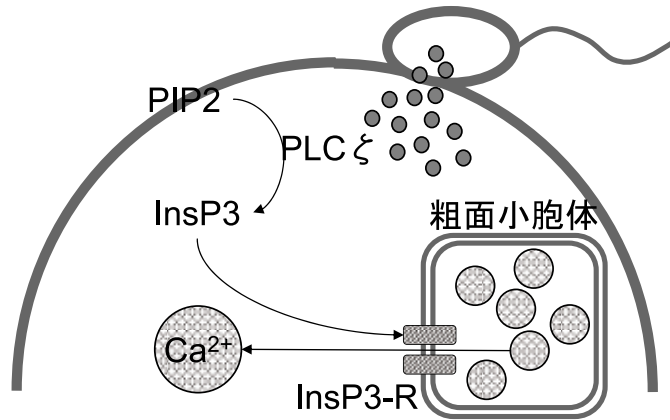


図2 Sperm factor (PLC ζ) による卵活性化のメカニズム  
 PLC = phospholipase C, PIP2 = phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate,  
 InsP3 = inositol-1, 4, 5-triphosphate.

を活性化し、サイクリン B1 の分解を促し、maturation-promoting factor (MPF) を失活させることにより、減数分裂を再開させる。

Ca<sup>2+</sup> オシレーションは受精直後から前核形成までの数時間、継続して観察される。しかし、卵活性化に Ca<sup>2+</sup> オシレーションは必須ではなく、1～2 回の Ca<sup>2+</sup> の一過性上昇 (Ca<sup>2+</sup> スパイク) があればよいと報告されている<sup>9)</sup>。人為的に卵活性化を起こすためには、卵細胞質内 Ca<sup>2+</sup> の一過性上昇、もしくはサイクリン B1 の合成阻害により、MPF の低下を誘導させればよい。前者には Ca イオノフォア、電気刺激、エタノール、およびストロンチウムなどが用いられ、後者にはタンパク合成阻害剤であるピューロマイシンやシクロヘキシミドなどがある。ヒトにおいては、Ca イオノフォア<sup>10-12)</sup>、電気刺激<sup>14)</sup>、およびストロンチウム<sup>5,13,14)</sup> が臨床応用され、妊娠分娩例が報告されている。われわれは以前、非生理的な化学物質を用いない電気刺激処理を選択してきたが、刺激条件によっては卵子が壊れてしまうため、ストロンチウム処理を第一選択にするようになった。Ca イオノフォア処理や電気刺激では単発の Ca<sup>2+</sup> スパイクしか得られないが、ストロンチウムは InsP3 受容体を介して作用する<sup>15)</sup> ため、生理的な受精に近い Ca<sup>2+</sup> オシレーションを誘発することがで

き<sup>16)</sup>、配偶子の染色体にも影響しない<sup>17)</sup>。しかし、ストロンチウム処理による卵活性化は動物種によって有効性にばらつきがあり、他の方法と比較して活性化率が低いと報告されている<sup>18)</sup>。

また、ICSI の手技も卵活性化に影響する。Tesarik ら<sup>19,20)</sup> はインジェクション・ピペットを細胞質内で動かし、細胞質を繰り返して吸引することにより、細胞内小器官からの Ca<sup>2+</sup> 放出が促進され、卵活性化が促進されると報告している。過去の ICSI で受精率が低かった症例に対しては、卵活性化を試みる前に ICSI の手技を変えてみるのも一法かもしれない。

人為的卵活性化は、卵活性化能を欠如した奇形精子症を対象として始められたものであるが、現在は精子の形態異常の有無にかかわらず ICSI 受精障害例に行われている。ICSI 受精障害は、TFF 症例に限定したのではない。既報の症例<sup>4)</sup>と同様に、本症例でも低率ではあるが受精は成立していた。これは症例の精子に sperm factor が欠如しているわけではなく、不足していると考えれば、卵活性化の適用に問題は生じないと思われる。われわれの施設で卵活性化を施行したのは、ICSI の適応となった 417 例中 13 例 (0.3%) であり、そのうち 4 例で妊娠が成立した。また、13 例中 6 例は精巣精子 (testicular sperm extract-

ion; TESE)-ICSI症例であり, TESE-ICSI症例に限れば卵活性化障害の頻度は患者あたり9% (6/66) と高率である。今後, TESE-ICSI症例の増加に伴い, 卵活性化の適応症例は増加することが予想される。さらに, ICSI施行後に受精を確認できなかった卵を活性化することにより rescue できる可能性<sup>21,22)</sup> や,  $Ca^{2+}$  オシレーションの異常が種々の哺乳動物で後期胚や胎仔の発生異常を引き起こす可能性も報告されている<sup>23,24)</sup>。受精障害のみならず, 良好胚が得られない症例や胚の発生停止が頻発する症例でも, 卵活性化障害を疑う必要があるかもしれない。

精子と卵子の細胞膜の相互作用をバイパスするICSIで発生した卵活性化障害は, sperm factor の問題と推測される。現時点では, ICSI 施行前に卵活性化障害の有無を予測することは困難であるが, ストロニウム処理をはじめ人為的卵活性化によりある程度は克服が可能である。しかし, いずれの方法もヒトにおける安全性は確立されておらず, 出生児のフォローを継続していくとともに, 効率的かつ安全に卵活性化を誘発できる条件について基礎的な検討が必要と思われる。

## 文 献

- 1) Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Sato A, Yanagimachi H, Yanagimachi R. Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Hum Reprod.* 14 : 1307-11, 1999.
- 2) 柳田 薫 : 難治性受精障害への対応. *日産婦誌.* 56 : N485-N488, 2004.
- 3) Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD. Aetiology of failed and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 10 : 2623-2629, 1995.
- 4) 柞木田礼子, 藤井俊策, 福井淳史, 水沼英樹: 電氣的卵子活性化後の卵細胞質内精子注入法により妊娠が成立した難治性不妊症例. *青森臨産婦誌.* 18 : 13-17, 2003.
- 5) Yanagida K, Morozumi K, Katayose H, Hayashi S, Sato A. Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of

fertilization. *Reprod Biomed Online.* 13 : 801-6, 2006.

- 6) Miyazaki S, Yuzaki M, Nakada K, Shirakawa H, Nakanishi S, Nakade S, Mikoshiba K. Block of  $Ca^{2+}$  wave and  $Ca^{2+}$  oscillation by antibody to the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in fertilized hamster eggs. *Science.* 9 : 251-255, 1992.
- 7) Saunders CM, Larman MG, Parrington J, Cox LJ, Royse J, Blayney LM, Swann K, Lai FA. PLC zeta: a sperm-specific trigger of  $Ca^{2+}$  oscillations in eggs and embryo development. *Development.* 129 : 3533-44, 2002.
- 8) Swann K, Saunders CM, Rogers NT, Lai FA. PLCzeta (zeta): a sperm protein that triggers  $Ca^{2+}$  oscillations and egg activation in mammals. *Semin Cell Dev Biol.* 17 : 264-73, 2006.
- 9) 黒田恵司, 宮崎俊一: 卵活性化のメカニズム—卵活性化における精子ファクターとカルシウムの役割—. *産と婦.* 6 : 743-748, 2006.
- 10) Hoshi K, Yanagida K, Sato A. Pretreatment of hamster oocytes with  $Ca^{2+}$  ionophore to facilitate fertilization by ooplasmic micro-injection. *Hum Reprod.* 7:871-875, 1992.
- 11) Tesarik J, Testart J. Treatment of sperm-injected human oocytes with  $Ca^{2+}$  ionophore supports the development of  $Ca^{2+}$  oscillations. *Biol Reprod.* 51:385-91, 1994.
- 12) Eldar-Geva T, Brooks B, Margalioth EJ, Zylber-Haran E, Gal M, Silber SJ. Successful pregnancy and delivery after calcium ionophore oocyte activation in a normozoospermic patient with previous repeated failed fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 79:1656-1658, 2003.
- 13) Fraser LR. Strontium supports capacitation and the acrosome reaction in mouse sperm and rapidly activates mouse eggs. *Gamete Res.* 18:363-74, 1987.
- 14) Okada K, Miyano T, Miyake M. Activation of pig oocytes by intracytoplasmic injection of strontium and barium. *Zygote.* 11:159-65, 2003.
- 15) Zhang D, Pan L, Yang LH, He XK, Huang XY, Sun FZ. Strontium promotes calcium oscillations in mouse meiotic oocytes and early embryos through InsP3 receptors, and requires activation of phospholipase and the synergistic action of InsP3. *Hum Reprod.* 20:3053-61, 2005.
- 16) Tomashov-Matar R, Tchetchik D, Eldar A,

- Kaplan-Kraicer R, Oron Y, Shalgi R. Strontium-induced rat egg activation. *Reproduction*. 130:467-74, 2005.
- 17) Tateno H, Kamiguchi Y. Parthenogenetic activation of Chinese hamster oocytes by chemical stimuli and its cytogenetic evaluation. *Mol Reprod Dev*. 47:72-8, 1997.
- 18) 柳田 薫, 藤倉洋子, 佐々木志野, 新免昭恵: 卵活性化法. 森崇英, 久保春海, 高橋克彦編: コメディカル ART マニュアル. p99-p103, 永井書店, 東京, 2006.
- 19) Tesarik J, Rienzi L, Ubaldi F, Mendoza C, Greco E. Use of a modified intracytoplasmic sperm injection technique to overcome sperm-borne and oocyte-borne oocyte activation failures. *Fertil Steril*. 78:619-24, 2002.
- 20) Tesarik J, Sousa M. Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique:  $Ca^{2+}$  fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertil Steril*. 64:770-6, 1995.
- 21) Zhang J, Wang CW, Blaszczyk A, Grifo JA, Ozil J, Haberman E, Adler A, Krey LC. Electrical activation and in vitro development of human oocytes that fail to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 72:509-12, 1999.
- 22) Nakagawa K, Yamano S, Moride N, Yamashita M, Yoshizawa M, Aono T. Effect of activation with Ca ionophore A23187 and puromycin on the development of human oocytes that failed to fertilize after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 76:148-52, 2001.
- 23) Knott JG, Kurokawa M, Fissore RA, Schultz RM, Williams CJ. Transgenic RNA interference reveals role for mouse sperm phospholipase Czeta in triggering  $Ca^{2+}$  oscillations during fertilization. *Biol Reprod*. 72:992-6, 2005.
- 24) Ozil JP, Huneau D. Activation of rabbit oocytes: the impact of the  $Ca^{2+}$  signal regime on development. *Development*. 128:917-28, 2001.
- 25) Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parsons JH. Development of spare human preimplantation embryos in vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J Vitro Fert Embryo Transfer*. 6: 30-35, 1989.
-