

不妊治療の現状と問題点

沖 津 撰・三 宅 馨

三宅医院

はじめに

人類史上初の体外受精児、ルイズ・ブラウンさんが英国で誕生したのは1978年であり、既に20年以上が経過している。この成功に励まされ生殖医療は急速に発展してきた。今や日本でも体外受精を含むART（生殖補助技術）による妊娠例からの出生児数は年間1万人以上となった。昨今のわが国の少子高齢化社会の中で、ARTによって誕生した児の数は全出生児数の1%を占めるまでに至っている。多くの先駆的医科学者たちの努力により、不可能が可能となり、多くの夢が現実となりうる生殖革命ともいわれる時代となった。

本稿では、不妊治療の現状と現在の問題点について紹介する。

不妊症の定義と現状

不妊症は「挙児を希望し2年以上健康な性生活を営んでいるにも拘わらず妊娠しない状態」と定義されており、生殖年齢にある全夫婦の1割がこれに該当する。その原因別の内訳は両側卵管閉塞など女性側に起因するものが約4割、乏精子症など男性側に起因するものが3割、残りが原因不明である。当院不妊治療センター開設以来の7年間における妊娠例約1400名を治療法別に分析した結果、68.4%がタイミング指導（排卵誘発剤を含む）による妊娠で、11.6%がAIH（配偶者間人工授精）、残り20%がARTによる妊娠であった（表1）。

表1. 当院不妊治療センターにおける治療法別妊娠者数

治療法	妊娠者数	占有率(%)
タイミング指導	984	68.4
人工授精	167	11.6
体外受精 (IVF-ET)	95	6.6
顕微授精 (ICSI)	120	8.3
融解胚移植	73	5.1
合計	1,439	100.0

(1995年4月から2002年6月までの治療成績)

・体外受精-胚移植法 (IVF-ET)

IVF-ETは今日では不妊治療を行うほとんどの医療施設で実施されるまでに普及した。しかしIVF-ETの治療周期あたりの妊娠率は約30%程度であり、さらに自然妊娠に比べ流産率(25-30%)、子宮外妊娠率(約5%)が高く、実際に出産にまでいたる割合は、15-18%程度と改善の余地が残されている。従ってほとんどの症例において、反復した治療が必要である(図1)。

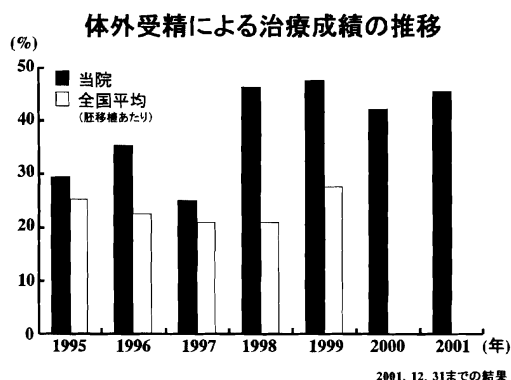


図1. 体外受精・胚移植法(IVF-ET)の臨床成績
(胚移植あたりの臨床的妊娠率の推移)

また1回の治療において子宮内に移植される胚数と妊娠率・多胎率の関係をみると、移植胚数が3個まででは、移植胚数の増加に伴って妊娠率は上昇傾向を示すが、4個以上になると妊娠率の更なる上昇は認められない。一方、多胎率は移植胚数が4個まで、移植胚数の増加に伴い上昇する(表2)。

最近多胎妊娠の回避を目的として胚盤胞移植が実施されるようになった(1)。通常のIVF-ETでは体外受精の結果得られた受精卵を4-8細胞期胚になるまで(1-2日間)体外培養後、その中の2-3個を子宮内に移植する。4-8細胞期では、初期胚のその後の発生能力を見極めるのが困難であり、安定した治療成績を得るためには複数個の初期胚を移植せざるを得ないが、その結果

として多胎妊娠が起こる。

一方、胚盤胞移植では受精卵を *in vitro* で 4-5 日間培養し、胚盤胞まで発育の確認された胚を 1 個のみ移植する。胚盤胞まで発育した胚ではその後の発生能力の判断が形態的基準から容易であり、形態良好胚を 1 個移植することで、妊娠率を低下させないまま、多胎率を減少させることが可能となる。

表 2. 体外受精・胚移植法 (IVF-ET) における移植胚数と妊娠率・多胎率の関係

移植胚数	妊娠率	多胎率	単胎	双胎	三胎	四胎
1 個	7.6%	0%	100%	0%	0%	0%
2 個	13.9%	11%	89%	11%	0%	0%
3 個	21.8%	17%	83%	14%	3%	0%
4 個	20.0%	28%	72%	19%	9%	0%
5 個	24.8%	24%	76%	17%	7%	0%
6 個	23.6%	21%	79%	10%	7%	3%

注) 新女性医学大系 生殖補助医療 p222 より引用

・卵細胞質内精子注入法 (ICSI)

不妊症の原因の約 30% は男性因子によるものといわれている。実験動物や家畜の精子と比較した場合のヒト精子の形態的特徴として非常に高い奇形率が挙げられる。不妊治療を実施するほとんどの病医院では精液検査の基準値として WHO の正常精液所見を利用しているが、ここ十数年間の 3 回にわたる基準値の改定のたびに奇形率に対する基準値が緩和されている点も、ヒト精子に極めて奇形が多いことを示すものである (表 3)。

表 3. 正常精液所見 (WHO)

	1987 年	1992 年	1999 年
精液量	2ml 以上	→	→
pH	7.2-7.8	→	→
精子濃度	20 x 10 ⁶ /ml 以上	→	→
総精子数	40 x 10 ⁶ /ml 以上	→	→
運動率	50%以上が前進運動 または 25%以上が 活発な直進運動 (射精後 1 時間以内)	→	→
奇形率	50%未満	70%未満	85%未満
白血球数	1.0 x 10 ⁶ /ml 未満	→	→

生殖医療界における体外受精以来の大きな革命といわれるのが、1992 年の卵細胞質内精子注入法 (ICSI) の登場である (2)。今日では、精液中に精子が存在しない無精子症症例においても精巣が造精機能を有していれば、精巣上体精子

を用いた ICSI (MESA-ICSI) や精巣内精子を用いた ICSI (TESE-ICSI) により挙児が可能となった (表 4)。

表 4. 顕微授精関連技術の歴史

年	種	胚発育	報告者	技術
1974	Frog	前核	Burn <i>et al.</i>	ICSI
1976	Hamster	前核	Uehara and Yanagimachi	ICSI
1988	Rabbit	生仔	Hosoi <i>et al.</i>	ICSI
1988	Human	生児	Cohen	PZD
1988	Human	生児	Sathananthan	SUZI
1990	Cow	生仔	Goto <i>et al.</i>	ICSI
1992	Human	生児	Palermo <i>et al.</i>	ICSI
1993	Human	生児	Schoysman	TESE-ICSI
1996	Human	生児	Tesarik	ROSI

ICSI: 卵細胞質内精子注入法, PZD: 部分的透明帯開口術, SUZI: 卵卵腔内精子注入法, TESE-ICSI: 精巣内精子を用いた ICSI, ROSI: 円形精子細胞を用いた ICSI

無精子症症例には、パイプカットやムンプス (おたふく風邪) など後天的な原因による症例も含まれるが、遺伝子の突然変異によるものも多いといわれている。したがって TESE-ICSI などによって挙児を得た場合、児の成人後の生殖能力が問題となるが、この点に関してはさらに十数年の時間の経過が必要である。現時点においては、生殖能力を司る遺伝子は当然卵子内にもあるので、父親が遺伝子の突然変異による無精子症であっても、必ずしも次世代に生殖能力不全が遺伝するとは限らないという見解が優勢である。

・哺乳動物の受精過程における卵子活性化のメカニズム (図 2)

ICSI の登場は、哺乳動物における受精時の卵子活性化メカニズムに関する基礎的な概念にも影響を及ぼした。

受精能を獲得した精子は先体反応を誘起しながら透明帯を通過し、卵卵腔内に侵入する。次に精子の原形質膜と卵細胞膜が融合し、精子の核は卵細胞質内に取り込まれる。卵子活性化プロセスの初期の部分には 2 つの仮説がある。一つ目はレセプター説であり、卵細胞膜上に精子に対するレセプターが存在するというものである。この説では、精子とレセプターとの結合シグナルが G-protein を介し、phospholipase C を活性化する。もう一方は Sperm Factor 説であり、精子がその細胞質中に卵子活性化物質、いわゆる Sperm Factor を有しているというものである (3-5)。この説では、両生殖細胞の膜融合によっ

て Sperm Factor が卵細胞質内に流入し、それが G-protein を介し、phospholipase C を活性化する。

ヒトをはじめ多くの動物種において、精子と卵子の細胞膜の融合過程をバイパスした ICSI によって高率に卵子が活性化されることから、今日では Sperm Factor 説が有力とされている。

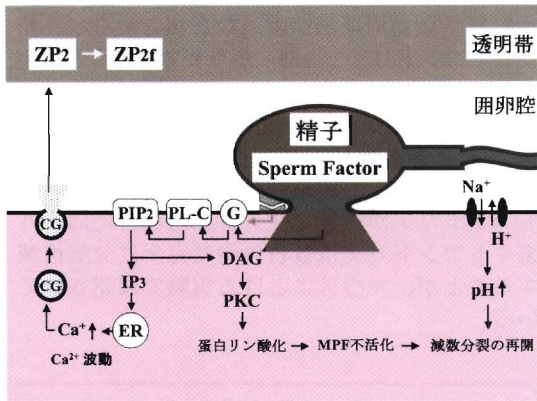


図 2. 哺乳動物における受精過程での卵子活性化メカニズム

不妊治療の問題点

・加齢

ART による妊娠率は女性の加齢に従って徐々に低下し、41 歳以上では 10% 前後となる。一方、流産率は加齢に伴い上昇し、41 歳以上では 62.5% に達する (図 3) (6)。アメリカなどでは第 3 者からの卵子の提供が認められており、20 代の女性から卵子提供を受けた 60 代の女性が妊娠・出産をしたということが報告されていることから、加齢による妊娠率の低下は子宮の機能低下より、むしろ染色体異常も含めた、卵子の質の低下によるという考えが一般的である。

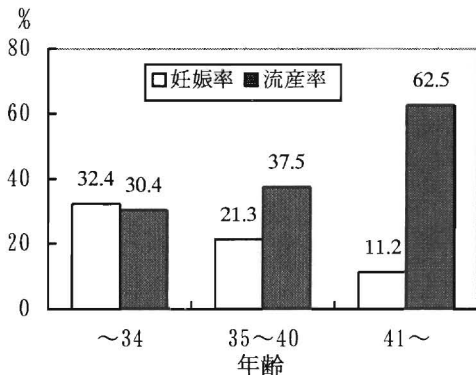


図 3. 女性の年齢と IVF-ET による妊娠率、流産率との関係

・cytoplasmic fragmentation (卵細胞質の断片化)

着床前のヒト初期胚はその形態や発生能について非常にばらつきの大きいことが知られているが、その原因については不明な点が多い (図 4, 表 5)。そのため臨床での IVF-ET や ICSI での胚移植あたりの妊娠率は 15-25%、また体外培養による胚盤胞への発生率は 30-50% と改善の余地が残されている。

初期胚 (4 細胞期胚) の形態的分類: Veeck の方法

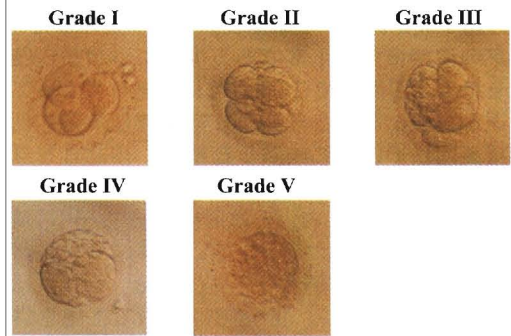


図 4. ヒト初期胚 (4 細胞期胚) の形態的分類 (Veeck の分類法)

表 5. 受精 2 日後の胚質と胚盤胞への発生能

胚質	胚数	胚盤胞形成			
		合計(%)	4 日後	5 日後	6 日後
GI	36	22 (61.1) ^a	3	12	7
GII	37	19 (51.4) ^a	0	13	6
GIII	14	2 (14.3) ^b	0	2	0
GIV, V	11	1 (9.1) ^b	0	0	1

a, b: $P < 0.05$

ヒト初期胚に認められる細胞質の断片化は *in vivo*, *in vitro* に関わらず極めて高頻度に認められる現象であるが、その発生の原因やメカニズムについてはほとんど解明されていない。この断片化はアポトーシス過程で発生するアポトーシス小体と形態的に類似している。しかし軽度の断片化はその後の発生能に影響を及ぼさないようであり、少なくとも Veeck の分類でいう Grade II の初期胚では細胞質の損失がほとんどないまま発生が継続することから、アポトーシス小体であるとは考えにくい。アポトーシスの特徴の一つである DNA の断片化が発育の停止した初期胚 (7) や発育を継続中であっても細胞質の断片化を著しく起こした形態不良胚 (8) において認められるという報告がある一方で、極度の断片化を起こしていても発育を継続しているヒト

初期胚では DNA の断片化は認められないという報告もあり(9)、報告者により一致した見解が得られていない。

万能性を有する初期胚は細胞質の断片化によって若干量の細胞質のロスがあっても個体への発生能には影響を受けないが、IVF や ICSI を反復施行しても Grade IV や V の初期胚しか得られない症例に対する妊娠率向上のためには初期胚の細胞質断片化の原因解明が急務となっている。

今後の展望

・未成熟造成細胞の体外培養

無精子症症例のうち閉塞性無精子症症例など、精巣の造精機能が正常である場合には精巣内精子を用いた顕微授精(TESE-ICSI)の施行によって挙児が可能となった。しかし造精機能不全症例で精巣内に形態的に成熟した精子が確認されない場合には現在においても挙児は困難である。1996 年 Tesarik J *et al.* は射出精液中の円形精子細胞(減数分裂は完了しているが未分化の精細胞)をヒト卵子に注入(round spermatid injection; ROSI)し、世界ではじめて生児を得た(10)。それ以来、今日まで世界中で ROSI が施行されているが、その成績は良好とはいえない。その原因として、円形精子細胞と白血球や減数分裂の完了していない精細胞(一次精母細胞や二次精母細胞など)との判別が困難であること、円形精子細胞には卵子活性化因子(sperm factor)が存在しておらず、顕微注入後の卵子活性化率が低いことなどが挙げられる。ヒト卵子は Ca^{2+} ionophore や電気刺激などによって人為的に活性化させることが可能であるが、現在のところ日本国内ではヒト卵子の人為的な活性化は倫理的に認められていない。最近、田中らは造精機能が低下していても精巣内に未熟な精細胞が存在する場合には、それらを Vero 細胞と体外で共培養することによって減数分裂を再開させ、尾部の存在する精子を得たことを発表した。しかし本法は全ての maturation arrest の症例に対して有効ではないこと、また尾部の確認される精子までの精細胞の成熟・分化率が極めて低いことから、今後の培養系の確立を期待したい。

・卵細胞質移植法

最近ヒト初期胚の質の改善を目的として卵細胞質移植法が施行されはじめている(11, 12)。図 5 は Cohen J. *et al.* によって報告された方法であり、ICSI 施行に際してあらかじめ donor の細胞質を injection pipette 内に吸引しておき、続いて不動化した夫の精子を吸引する。次に患者の卵細胞質内に精子と共に donor の細胞質を

注入し、受精卵を作出する。本法は手技が簡便というメリットがあるが、その一方で donor 細胞質注入量が微量で、常に十分な効果が期待できるとは限らないという欠点もある。実際、改善の効果には賛否両論があり(12, 13)、またそのメカニズムについても不明な点が多い。移植される細胞質因子としてはミトコンドリア、mRNA、紡錘糸を形成する微小管をはじめとする細胞内小器官や細胞周期調節因子などが考えられ、特にミトコンドリアと mRNA が重要であろうと推定されている。しかしながら、どの因子が後の胚発生を制御するのかを特定することは、現在のところ動物実験レベルでも結論が出ていない(14)。少なくとも卵細胞質内に別個体由来のミトコンドリアが微量に注入された場合には、外来ミトコンドリアは数日以内に完全に分解消滅することが、マウスにおける実験で確認されている。

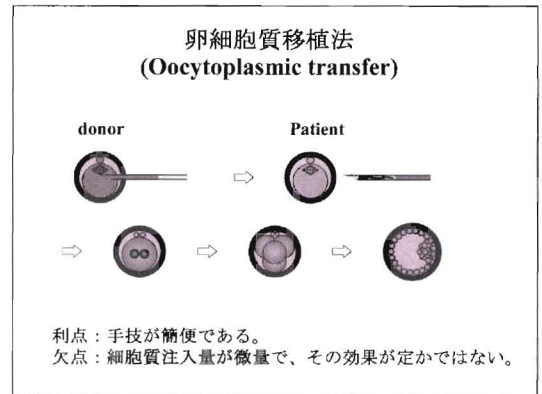


図 5. 卵細胞質移植法

高齢女性(特に 40 歳以上)では卵子の減数分裂過程で染色体異常の発生頻度が急増することが知られており、そのような症例に対しては上述した成熟卵に対する細胞質移植法の効果は期待できない。そこで Takeuchi T. *et al.* (15) は第一減数分裂前の未熟卵の段階で、高齢女性の卵殻胞(germinal vesicle; GV)を除核された若齢女性の卵細胞質に核移植し、再構築卵を体外成熟させることにより、卵子の受精後の発生能を改善させることができると報告した(図 6)。この手法では細胞質置換量が多く、また染色体異常の回避の可能性が高いが、その一方で高度な技術が必要であり、またヒト未熟卵子の体外成熟培養法が未だ十分に確立されていないという欠点もある。さらに高齢女性では卵巣表面にそれほど多くの GV 期卵子が存在しないという現実もある。

そこで上記手法（GV 期核置換法）によって作出された再構築卵子に ICSI を施行し、得られた初期分割期胚（8 細胞期胚）に対し、さらに受精卵クローン作出技術を施行するという方法（図 7）も考えうるが、未だ報告はない。受精卵クローン作出技術では一つの初期胚から多数の初期胚の作出が可能であり、また既に実験動物や家畜においてその安全性が確認されている。多数の卵子の採取が困難な高齢女性に対しては、有効であると考えられる。

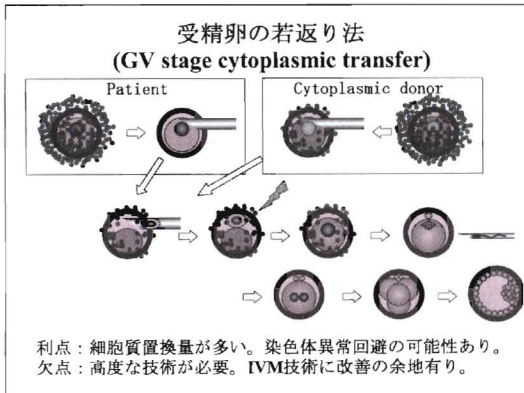


図 6. 卵殻胞 (GV) 期核置換による細胞質移植法

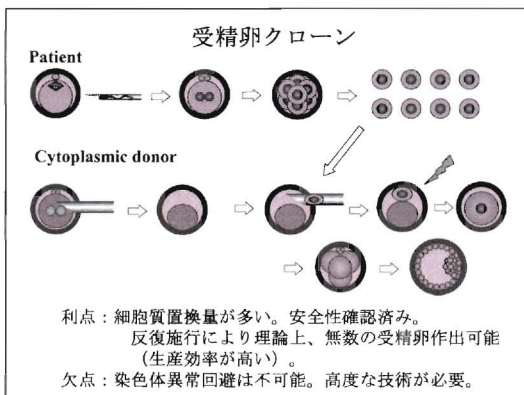


図 7. 受精卵クローン作出技術

・体細胞クローン

最近、イタリア人医師、セベリノ・アンティノリ氏が不妊治療として体細胞クローン技術を使った女性が妊娠したことを発表した（図 8）。

この件に関連して、クローン羊「ドリー」の生みの親であるウィルムット博士はこれまで誕生したすべての体細胞クローン動物は遺伝的・身体的に異常があることを発表しており、「クローン個体には広範な問題が発生しており、果たして完全な正常なクローンが存在するか否かとい

う疑問にたどりついた」とコメントしている。これまでに確認された異常には、過大児、胎盤の肥大、発育異常、短命、心臓や肺などの臓器不全、免疫不全などがある。その一方でこれらの異常のいくつかは、クローン動物作出技術の改善により、ある程度回避可能となったことも報告されている。いずれにしても技術面において解決すべき問題が山積しているというのが現状である。

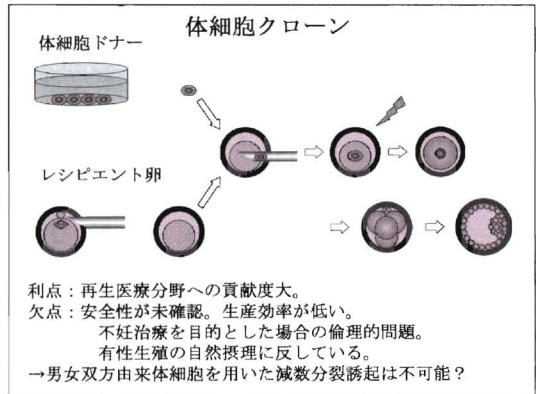


図 8. 体細胞クローン作出技術

クローン動物の作出は、家畜や実験動物などにおいては、優れた能力を持つ個体の大量生産という観点から有用性が高い。また不妊治療分野においては閉経後の女性や生殖細胞を造る能力の欠損した個人に遺伝上の子孫を残すという観点から有用性はあると思われるが、有性生殖の摂理に反しているという点など、クローン固体作出は倫理的にも重要な問題を含んでいる。

まとめ

ART の進歩はそれまで挙児を諦めざるを得なかった夫婦に恩恵をもたらしてきたが、その一方でいつの時代においても治療の限界が存在するのも事実である。また、現在のところ IVF や ICSI などの ART は健康保険の対象になっておらず、患者は高額な医療費の負担を強いられているのが現状である。さらに AID (非配偶者間人工授精)、Egg donation (卵子提供)、代理母出産やクローン技術の人への応用などは「親子とは何か？」という問いを新たに投げかけている。今後、ART の進歩とともに、子に恵まれることのなかった夫婦や不妊を経験した上で子を得た夫婦、特に代理母など倫理的問題点を含む治療により子を得た夫婦などへの心理的および社会的支援制度の必要性が唱えられている。

引用文献

- 1) Gardner KD, Phil D, Vella P, *et al.* (1998) Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduce the need for multiple embryo transfer. *Fertil. Steril.*, **69**, 84-88.
- 2) Palermo G, Joris H, Devroey P, *et al.* (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, **340**, 17.
- 3) Swann K (1990) A cytosolic sperm factor stimulates repetitive calcium increases and mimics fertilization in hamster eggs. *Development*, **110**, 1295-1302.
- 4) Swann K (1994) Ca^{2+} oscillations and sensitization of Ca^{2+} release in unfertilized mouse eggs injected with a sperm factor. *Cell Calcium*, **15**, 331-339.
- 5) Okitsu O, Yamano S and Aono T (2001) Activation of bovine oocytes matured in vitro by injection of bovine and human spermatozoa or their cytosolic fractions. *Zygote*, **9**, 89-95.
- 6) 宮城博子、神山茂、照屋陽子、金澤浩二 (1995) 「高齢女性」 臨床婦人科産, **49**, 955-957.
- 7) Jurisicova A, Varmuza S and Casper RF (1996) Programmed cell death and human embryo fragmentation. *Mol. Hum. Reprod.*, **2**, 93-98.
- 8) Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, *et al.* (1998) Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Hum. Reprod.*, **13**, 998-1002.
- 9) Antczak M and Van Blercom J. (1999) Temporal and spatial aspects of fragmentation in early human embryos: possible effects on developmental competence and association with the differential elimination of regulatory proteins from polarized domains. *Hum. Reprod.*, **14**, 429-447.
- 10) Tesarik J, Rolet F, Bami C, *et al.* (1996) Spermatid injection into human oocytes. III. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.*, **11**, 780-783.
- 11) Cohen J, Scott R, Schimmel T, *et al.* (1997) Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet*, **350**, 186-187.
- 12) Cohen J, Scott R, Alikani M, *et al.* (1998) Ooplasmic transfer in mature human oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, **4**, 269-280.
- 13) Opsahl MS, Thorsell LP, Geltinger ME, *et al.* (2002) Donor oocyte cytoplasmic transfer did not enhance implantation of embryos of women with poor ovarian reserve. *J. Assist. Reprod. Genet.*, **19**, 113-117.
- 14) 竹内 巧、Palermo GD. (2001) 「Cytoplasmic transfer」 体外受精 Update, **3**, 341-346.
- 15) Takeuchi T, Gong J, Veeck LL, *et al.* (2001) Preliminary findings in germinal vesicle transplantation of immature human oocytes. *Hum. Reprod.*, **16**, 730-736.