

2 - b ヒト試験管内受精条件に関する基礎的検討

徳島大学医学部産科婦人科学教室

森 崇英・松下 光彦
野田 保人・山野 修司

研究目的

近年治療不可能な卵管性不妊の治療法として、ヒト体外受精と子宮内胚移植が脚光を浴びているが、諸報告にみる限りでは成功率は低いのが現状である。安定した高い成功率を得るためには、今後いろいろの観点からの改良が必要であろうが我々は *in vitro* での受精率の向上を目的として卵細胞の体外培養条件に関する基礎的検討を行なった。

研究方法

まず *medium* として modified Krebs - Ringer bicarbonate buffer (m-KRB) を用いた (図 1) 次に手順は (図 2) に示す如くである。用いたヒト卵は月経周期の卵胞期のみならず黄体期に開腹手術した卵巣の摘出標本より needle puncture により得た。こうして得られた卵胞卵を卵丘細胞が付着したままの状態 で 40~40.5 時間 CO₂ incubator にて培養し、germinal vesicle breakdown (GVB) を期待した。他方、精子は妊孕性の明らかな健康男性より得られた精液を室温にて 20~30 分間放置して精漿を自然融解させた後、2~3 ml の m-KRB を加え 30 g 10 分間遠沈し、まず比較的大きな固型不純物を取り除いた。その後上澄みを取り同様の *medium* を加え 300 g 10 分間遠沈するという洗浄操作を 2 回行ない最終的に沈渣を 2 ml の m-KRB 中に suspend した。この浮遊液より 20~40 μl を取り、あらかじめパラフィンオイル内に封入した 0.4 ml の m-KRB に注入し、これを CO₂ incubator 内で 3 時間前培養して capacitate させた。この中に上述の培養卵を加え 10 時間後に固定、aceto lacmoid 染色を行ない精子貫入の有無を判定した。

研究結果

表 1 はヒト卵の体外成熟に関する結果である。月経周期の 1~12 日目までを卵胞期、13~15 日目までを排卵期、16~37 日目までを黄体期とし、それぞれ 11 人、6 人、11 人の計 28 人より採取した。卵は各々 55 個、29 個、60 個の計 144 個が得られた。そして 40~40.5 時間培養後明らかに変性の認められる卵は除いた。それ

ぞれ 22 個、18 個、40 個の計 80 個が変性像を示し、この段階での変性卵のパーセントは 55.9% であった。その他の卵のうちこの時点でいくつかの卵は鏡検し成熟度を調べた。Metaphase II まで達していたのは卵胞期では 9 個中 3 個、排卵期では 3 個中 1 個、黄体期では 4 個中 2 個の計 16 個中 6 個 (37.5%) であった。その他 GV, 変性卵, Metaphase I は表の通りである。

表 2 はヒト卵の体外受精に関する結果である。実際に受精実験に使用した卵は卵胞期 24 個、排卵期 8 個、黄体期 16 個の計 48 個である。そのうち精子の貫入が認められたのは各々 6 個、6 個、7 個の計 19 個 (39.6%) であり、そのうち雄性および雌性前核を観察し得たのはそれぞれ 5 個、4 個、5 個の計 14 個 (29.2%) であった。このように月経周期により受精率に差があり、卵胞期 (25%) や黄体期 (43.8%) と排卵期 (75%) の間には精子貫入率に明らかな有意差が認められた。

考察と要約

この結果 m-KRB は受精を目的とした培養液として充分であり Ham-F10, その他の *medium* を用いた報告に比べて優るとも劣らない成績といえる。しかし採卵の時期は受精の成否に非常に大きな比重をしておき、排卵期の卵胞卵の体外受精能が他の時期のそれと比べて際だって優れていることが判明した。さらに変性卵を少なくし GVB 到達する卵を多くするためには多くの問題が残されている。それと共にさらに卵割まで進ませるためには *medium* も含め培養条件など検討の余地があると考えられ現在進行中である。

☒. 1

Preparation of the medium

Stock sol. I (500 ml) :

NaCl 3319 mg
 KCl 216
 Ca Cl₂ • 2 H₂O 150
 KH₂ PO₄ 97
 Mg SO₄ • 7 H₂O 174
 1% phenol red 0.1 ml

Stock sol. II (200 ml) :

NaHCO₂ 2600 mg
 1% phenol red 0.04 ml
 (iassed with CO₂ for 15 min)

Mixture : Stock sol. I, 83.35 ml Stock sol. II, 16.28 ml

Glucose 100 mg
 Streptomycin 5
 Penicillin 7.5
 Na-pyruvate 5.5
 Na-lactate 0.37 ml

+ BSA 4mg/ml (Just before use)

Note : The final solution (mixture) should be sterilized through a filter sterilizer.

☒. 2

PROCEDURES OF FERTILIZATION
 IN VITRO OF HUMAN EGGS

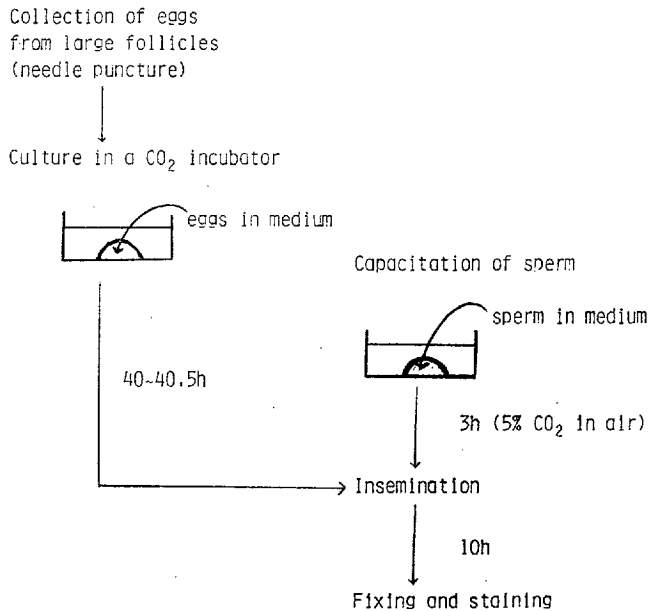


Table 1. Maturation in culture of human oocytes in a chemically defined medium

Menstrual cycle (days)	No. of patients	No. of oocytes			Matured to MII (%)	No. of immature oocytes at the stage of:		No. of oocytes inseminated*
		Cultured	Showing cytoplasmic degeneration after culture (%)	Examined*		GV/Deg.	M1	
1-12	11	55	22 (40.0)	9	3 (33.3)	3	3	24
13-15	6	29	18 (64.3)	3	1 (33.3)	1	1	8
16-37	11	60	40 (66.7)	4	2 (50.0)	1	1	16
Total	28	144	80 (55.9)	16	6 (37.5)	5	5	48

GV, Deg. germinal vesicle or degenerating; M1, MII, metaphase of the first and second meiotic divisions.

*Oocytes showing cytoplasmic degeneration under a dissecting microscope 40 h after culture were not used for examination of maturity or for insemination.

Table 2. Conditions of penetrated and unpenetrated oocytes 10 h after insemination

Menstrual cycle (days)	No. of oocytes inseminated	No. of oocytes penetrated			No. of unpenetrated oocytes at the stage of:		
		Total (%)	With enlarged sperm head but without polar bodies†	with male and female pronuclei	GV/Deg.	M1	MII (with PB1)
1-12	24	6 (25.0)*	1	5 §	10	6	2
13-15	8	6 (75.0)*	2	4	0	2	0
16-37	16	7 (43.8)	2	5	5	3	1
Total	48	19 (39.6)	5	14	15	11	3

GV/Deg. germinal vesicle or degenerating; M1, MII, metaphase of first and second meiotic divisions; PB1, first polar body.

* Significantly different ($P < 0.02$; χ^2 test).

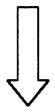
† With the exception of one oocyte which had indistinct female chromatin, all the other oocytes were at metaphase of first meiotic division.

‡ First and second polar bodies, and penetrating sperm tail(s) were clearly recognized in these oocytes.

§ One oocyte had 2 male pronuclei and their corresponding sperm tails.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



研究目的

近年治療不可能な卵管性不妊の治療法として、ヒト体外受精と子宮内胚移植が脚光を浴びているが、諸報告にみる限りでは成功率は低いのが現状である。安定した高い成功率を得るためには、今後いろいろの観点からの改良が必要であろうが我々は in vitro での受精率の向上を目的として卵細胞の体外培養条件に関する基礎的検討を行なった。