

エバネッセント超音波振動が卵子の品質に与える影響

村山嘉延¹⁾

1) 日大工・電気電子

1. はじめに

日本生殖医学会ガイドラインによると、ヒト生殖補助医療（ART）において受精卵移植を行う場合には、体外受精した受精卵（胚）からひとつだけ良質な胚を選ぶ必要がある。良好な胚を選ぶにあたり、現状では、胚の分割スピードや形態評価などによる、主観的な評価法が用いられているが、いずれも術者の主観的判断であり、工学的手法を取り入れた客観的定量化評価法に期待が寄せられている。一方で、私はこれまで、MTSを用いて受精前後の卵子透明帯の弾性率変化を客観的に数値化することにより、卵の品質評価が可能であるとの成果を得ている。MTSの安全性については、これまでにマウスをモデルとし、行動学的異常・形態異常を含めた5世代継代繁殖試験や、産仔の染色体検査などの、最も肝心な産仔安全性試験を行ってきたが、異常は認めていない。しかし、MTS技術をヒトARTに応用するにあたり、さらに胚発生への安全性を確かめる必要がある。

MTSによる弾性率測定は超音波共振子を用いた接触インピーダンス測定を原理としており、100kHz前後の周波数で微弱に超音波振動するガラス針の先端を卵子に対して接触させる。超音波の波長より十分に小さな接触面積からの音波伝搬により、卵子透明帯表層にエバネッセント超音波が発生すると考えられており、エバネッセント超音波は伝搬距離に応じて急速に減少する。超音波卵子に変形は無く機械的な損傷は無いと考えられるが、それでもエバネッセント超音波振動による細胞の成長における影響は明らかにされていない。

そこで、MTS透明帯弾性率測定が胚発生に及ぼす影響について、マウス体外受精胚を用い検討した。胚発生におけるMTSの安全性試験を行うため、MTS測定が胚発生に影響を与えると思われる、以下の二つの点について着目した。

- ①ガラス針の接触、超音波暴露などのMTSそのものと、温度・外気暴露時間・培養液等の測定環境の変化
- ②エバネッセント超音波の影響があるならば、どの発育ステージにおいて影響を受けやすいのか以上について、胚盤胞の品質評価法の1つである胚盤胞到達率と胚盤胞平均細胞数を指標として、安全性を検討した。

2. 実験方法

実験区：MTSの接触や超音波暴露が胚発生に影響を及ぼすのか検討するため、MTS測定時に、チャンパー内に投入した複数の卵を、MTSを接触させる測定群と、MTSを接触させない擬似測定群の2つに分け調査した。他の条件は同一とした。MTS測定はMII（MetaphaseII）期、（第二減数分裂中期）、PN期（前核期）、2cell期（2細胞期）、CM期（桑実胚期）の各ステージで1回ずつ行い、MTS測定区、PN測定区、2cell測定区、CM測定区とした。通常の媒精・培養したものをコントロールとした。

チャンパー作成：容器に透明シリコン：KE-106（信越化学工業株式会社）100gを量り取り、シンナー：CAT-RG 10gを加え攪拌した。裏面に型紙を貼り付け、5mmの厚さに印をつけた10cmシャーレに分注し、固まるまで数日間静置した。シリコンを型どおりに切り抜き、MTS挿入口が直線状に並び、かつ開口部が最小になるよう、シリコナイズして撥水加工したスライドガラスに載せ、上からカバーガラスを載せた。オートクレーブもしくはEOGガス滅菌を施した後に使用した。

MTS測定：測定は既法に従い行った。卵測定の前に、ヤング率の換算式を求めるために4, 6, 8%濃度のゼラチン（SIGMA G2625）の測定を行い、校正を行った。図1にMTSによりエバネッセント超音波を照射している様子を示す。圧電セラミクの超音波駆動電圧は100mV程度と小さく、ガラス針先端の振動や細胞内粒子の振動攪拌などは観察されない。



図1. MTSによるエバネッセント超音波暴露

精子調整：成熟雄マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、エタノール消毒の後、下腹部を切開し、精巣上体尾部を取り出した。精巣上体尾部に眼科バサミにて数箇所切り込みを入れ、精子を精子用

メディアム（媒精培地と同一）200 μ l ドロップ中に懸濁させ、2時間前培養した。その後、血球計算盤（THOMA）を用いて、精子懸濁液を最終濃度が 2×10^5 /ml となるように200 μ l の媒精用ドロップに調整した。

卵子採取・媒精：6～8週例BDF1雌マウスにPMSG（妊馬血清性性腺刺激ホルモン：SIGMA G4877）（10IU）を投与し、48時間後にhCG（ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン：SIGMA C0684）（5IU）を投与して過排卵処理を行った。MII測定用卵は、hCG投与15時間後に頸椎脱臼にて雌マウスを安楽死させ、エタノール消毒後に腹部を切開し、卵管を取り出した。シャーレ中のミネラルオイル（REPROLINE 451202）下にて1ml針付シリンジ（TOP）を用いて膨大部を裂き、卵・卵丘細胞複合体（cumulus oocyte complex：COC）を採取したのちに、ヒアルロニダーゼ（SIGMA H4272）を用いて卵丘細胞を除去した。MTS測定後に20 μ l TYHドロップへ移し媒精を行った。他の卵はhCG投与17時間後に採取し、精子調整済みの媒精用ドロップに移し媒精した。

発生・培養：媒精6時間後、ピペッティングにて卵丘細胞を除去し、第2極体もしくは2前核を有するものを受精卵（PN）とし、受精を確認した。その後、初期胚培養用メディアムに移し替え、測定もしくは継続培養した。培養は37.0°C、5%CO₂ in air、湿度飽和条件下のCO₂インキュベーターで行った。媒精48時間後に後期胚培養用メディアムに移し替え、媒精96時間後に胚盤胞到達したものの数を算出し、106時間後にヘキスト染色（Hoechst 33342）を行い、総細胞数をカウントした。

培養液：精子調整及び媒精にはTYH（株式会社三菱化学ヤトロン）を用い、初期発生培地にはI-2メディアム、後期発生培地にはI-3メディアムを用いた。

3. 実験結果

各区における胚盤胞到達率は、MII測定区において46.3%（19/41）、MII擬似測定区において38.9%（15/35）、MIIコントロールにおいて38.9%（7/18）、PN測定区において86.0%（43/50）、PN擬似測定区において78.0%（39/50）、2cell測定区において85.0%（34/40）、2cell擬似測定区において70.0%（28/40）、CM測定区において97.8%（44/45）、CM擬似測定区において77.8%（35/45）、コントロールにおいて84.4%（130/154）であった。

平均細胞数 \pm S.D.（n）は、MII測定区において60.7 \pm 21.8（20）、MII擬似測定区において58.7 \pm 11.7（9）、MIIコントロールにおいて74.3 \pm 22.0（7）、PN測定区において61.3 \pm 17.8（40）、PN擬似測定区において59.1 \pm 17.7（36）、2cell測定

区において50.3 \pm 13.4（27）、2cell擬似測定区において51.8 \pm 12.6（26）、CM測定区において72.1 \pm 24.2（37）、CM擬似測定区において76.1 \pm 28.1（31）、コントロールにおいて98.8 \pm 35.3（110）であった。

胚盤胞到達率において、CM群にのみ測定群と擬似測定群の間に有意差が見られ、測定群のほうが高い結果となった。また、CM測定区とコントロールの間に有意差が見られ、CM測定区のほうが高い結果となった。異なったステージ間での有意差はなかった。胚盤胞平均細胞数において、すべての測定ステージにおいて、測定群と、擬似測定群との間に有意差はみられなかった。しかし、すべての測定ステージにおいて、測定群・擬似測定群ともにコントロール区よりも平均細胞数が有意に少ない結果となった。また、平均細胞数は、すべてのステージ区においても有意に異なり、2cell区において最も低い結果となった。

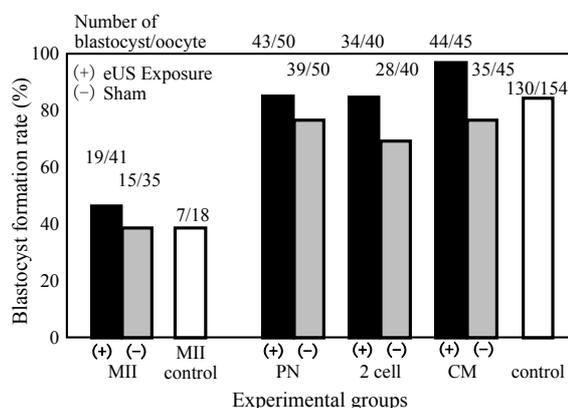


図2. MTS測定群、擬似測定群、コントロール群における胚盤胞到達率

4. まとめ

MTS接触やエバネッセント超音波暴露による胚発生への負の影響は、胚盤胞到達率・胚盤胞細胞数ともに認められなかった。面白いことに、MII期およびCM期においては、MTSによるエバネッセント超音波振動に暴露した方が、コントロール群に比べて胚盤胞到達率が1.19倍、1.16倍と高い結果を得た。エバネッセント超音波暴露が卵子の成長において何かしら良い影響を与えているとすると非常に興味深い。

しかし、コントロールと比較して、測定群・擬似測定群ともに胚盤胞細胞数が少なかったことは、MTS測定作業に伴う外気への暴露や温度などの環境変化が原因である可能性がある。その影響は2cell期卵において顕著であった。よって、MTS測定を行うにあたり、測定時の卵を取り巻く環境を適した状態に改善することが、MTSの安全性をさらに高めるためにも重要であると考えられる。