

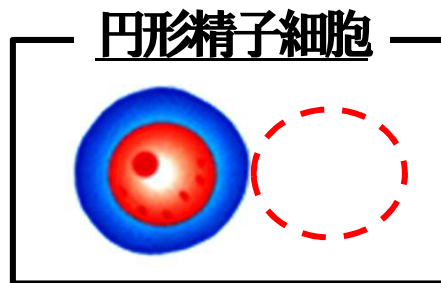
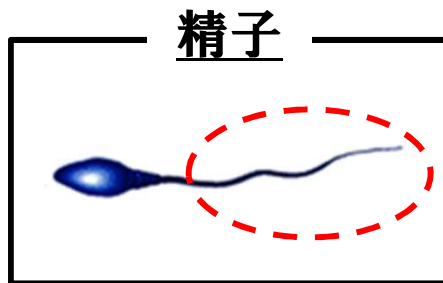
**睪丸内精子が見つからない、または
不動・奇形精子のみと診断された
無精子症の治療法
-精子細胞を用いた治療法:ROSI-**

セントマザー産婦人科医院

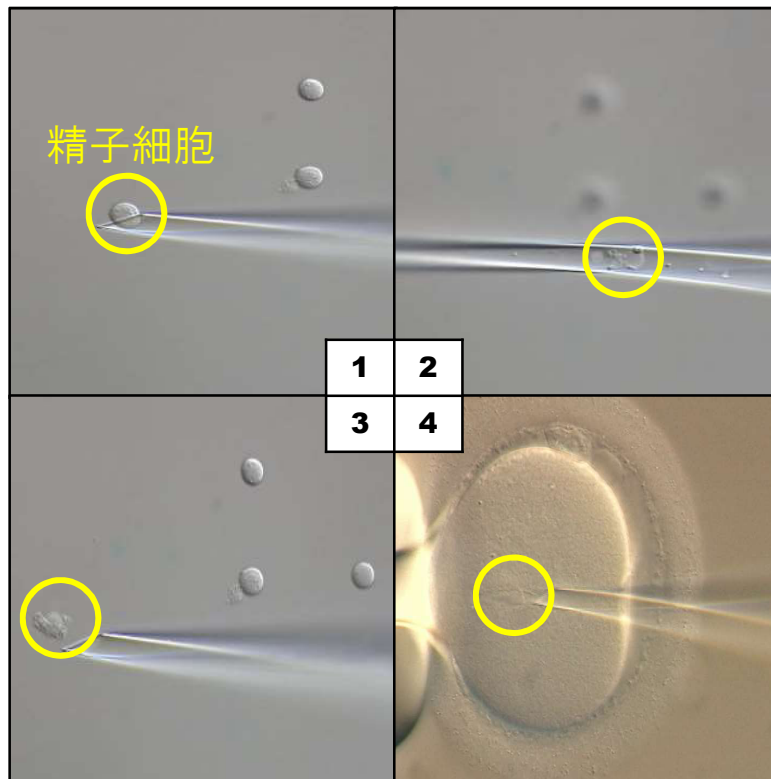
田中 温

ROSIとは？

・円形精子細胞卵子内注入…Round Spermatid Injection



円形精子細胞には鞭毛(尻尾)が生えていないため、卵子内に注入するにはICSI(顕微授精)が必要です。



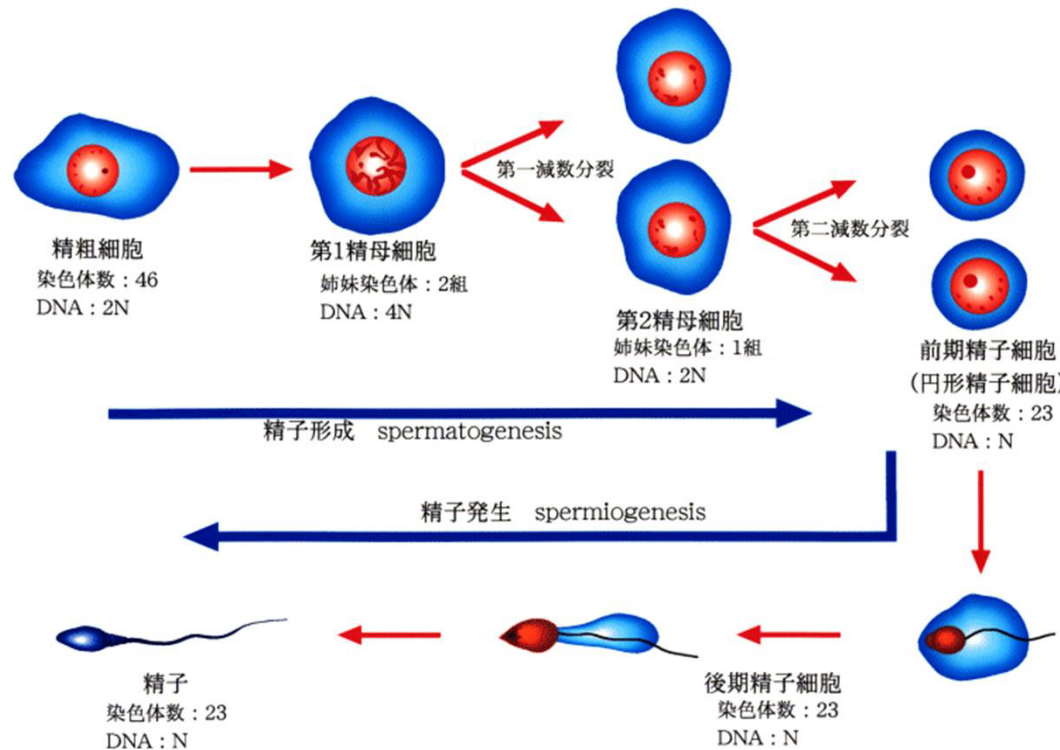
手順

- 1 円形精子細胞をピペット内に吸引
- 2 ピペット内で核と細胞質が分裂
- 3 吹き出すと核と細胞質がバラバラになっているのがわかる
- 4 卵子内に注入

←精子を用いたICSIと比べて針の太さはおよそ2倍になりますが、必要とされるテクニックはそれほど難しくありません。

ROSIの始まり

精子が発生するまでの過程

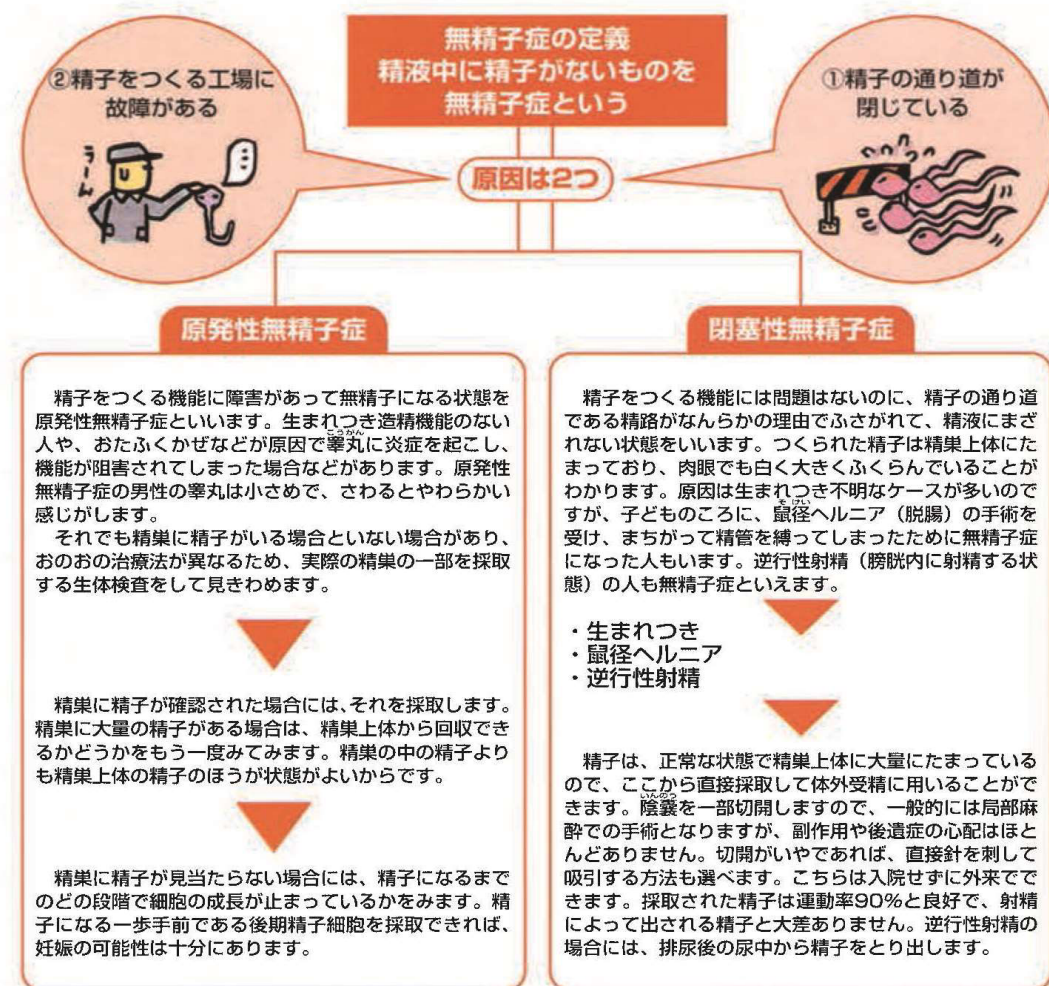


←精子は精祖細胞から始まり、第一精母細胞、第二精母細胞、円形精子細胞と分化し、後期精子細胞、精子へと成熟していきます。

円形精子細胞から後期精子細胞までの精子細胞は、遺伝学的に精子と同様の生殖遺伝能力を持つことが、1993年、マウスを用いた実験の出産例をもって証明されました。そして、哺乳動物の実験でも成功例が生まれて、1996年、遂にROSIによるヒト出産例が報告されました。

画期的治療法として注目を集める

無精子症は、男性の100人に1人という高い割合で発覚します。
そのなかの約8割は、精巣内にある精子を造る機能に障害のある
原発性無精子症（非閉塞性無精子症）と診断されるといわれています。



原発性無精子症と 診断後の選択肢

- 1) 自分の子を諦める
- 2) AID（非配偶者間人工授精）
- 3) 養子进行う



**精子細胞には精子と同様の
生殖遺伝能力がある**

4) ROSI

精子がいなくても精子細胞が見つければ、妊娠することが可能となりました。

忘れられていくROSI

1996年、ヒトでの成功例が報告されると、世界中の男性不妊を治療している医師はROSIを早速取り入れてみました。

しかし、ROSIによる妊娠症例は多く報告されましたが、出産率は低く、正式な出産児数は現在まで世界中で7名と非常に少ない状況でした。

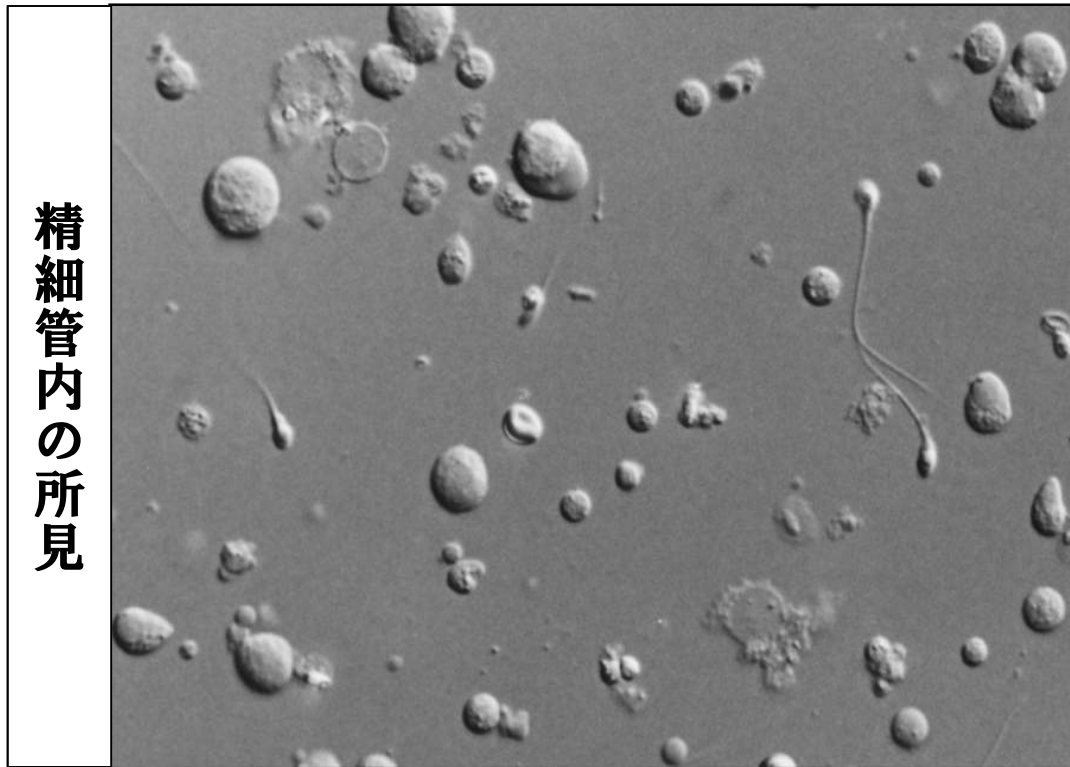
そして2000年以降、新しい報告は認められなくなり、
「ROSIは不可能である」「治療に値しない」と言われていき
徐々に忘れられていきました。
なかにはROSIを禁じている国もあるとのことでした。

しかし私は、ROSIが必ず男性不妊症の治療に役立つと信じ、
なぜうまくいかないかを研究しました。

そして、**越えなければならないハードルが2つあること**が
判明しました。

問題点① -円形精子細胞の鑑別が困難-

円形精子細胞は、精巣内にある精細管（精子を作る管）の中から探しますが、**精細管の中には似たような細胞が数種類あります。**



円形精子細胞

←この中から円形精子細胞だけを正確に見つけなければなりません

この技術の習得は非常に難しいです。円形精子細胞でない細胞を間違ってピックアップしてももちろん受精しません。そのため、ほとんどの研究者がこの問題を解決することができず、諦めました。

問題点② -卵子の活性化が不十分-

精子が卵子の中に入り受精が成立すると、精子頭部から特殊なタンパク質(スパームファクター)が出て卵子を活性化させることにより受精現象が起きるとされています。

このメカニズムは複雑で一言では言い表せませんが、要点は、精子にはこの特殊なタンパク質が十分に備わっているが円形精子細胞は量が少ない、つまり

ROSIは卵子の活性化が不十分であるということです。

卵子の活性化が不十分だと、受精後の胚の分割が上手くいかず妊娠・出産に至ることが難しくなります。

この問題点により、**ROSIでも通常精子での受精と同等の環境を作ること**が課題として挙げられ、そのためには卵子活性化は不可欠となりました。

研究グループの結成

- ① 円形精子細胞の鑑別が困難
- ② 卵子の活性化が不十分

この2つのハードルを乗り越えるため、
大学の専門家との共同研究を始めました。

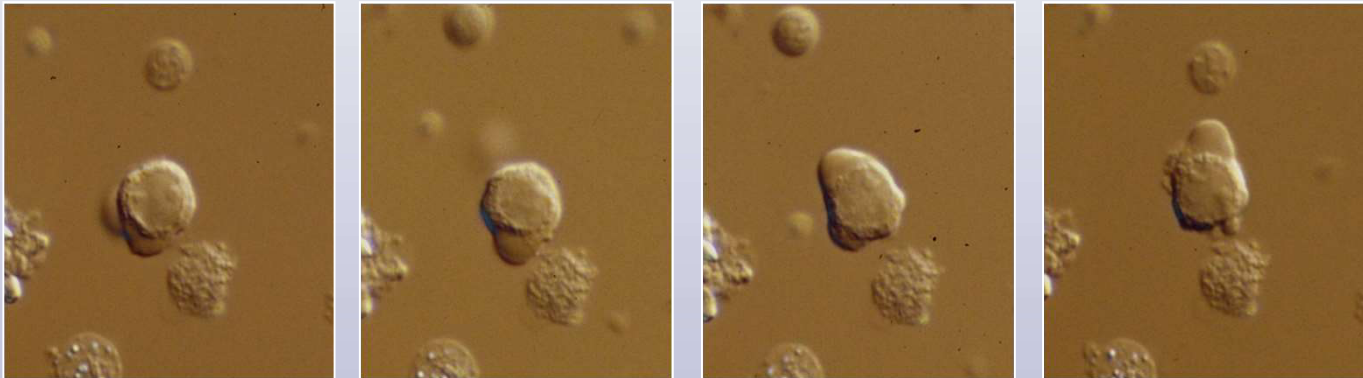
共同研究によって、「不可能」と判断されたROSIを
有効な治療法にできるよう試みました。

対策① -精祖細胞との違いと染色体検査-

円形精子細胞と最も鑑別が困難な細胞は、**精祖細胞**です。
そこで、精細管内にある一つひとつの細胞の観察を行い
形態学的違いはないか、研究を始めました。

すると、**偽足を出す細胞**がいくつか見つかりました。
この細胞を調べてみると、**精祖細胞の一種**だと判明したのです。

偽足を出すヒト精祖細胞



これらの静止像を元に、円形精子細胞との形態学的違いは
他にもないか、検証を始めることになりました。

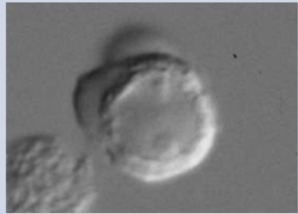
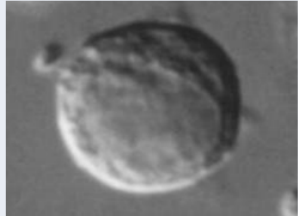
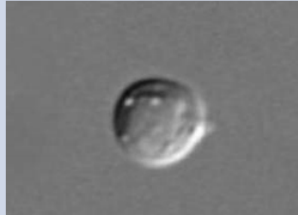
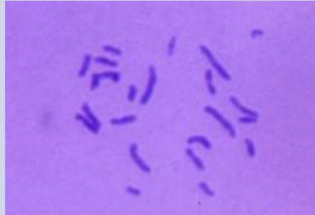
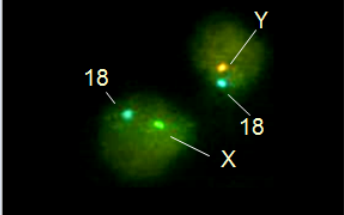
対策① -精祖細胞との違いと染色体検査-

精祖細胞と円形精子細胞との形態学的違いを探し出した結果、2つの特徴を見つけることができました。

それらの特徴に注意した上で鑑別を行い、円形精子細胞と判断した細胞に染色体検査を試みました。

円形精子細胞であれば、染色体本数は精祖細胞や第一精母細胞、第二精母細胞に比べて半分(23本)です。

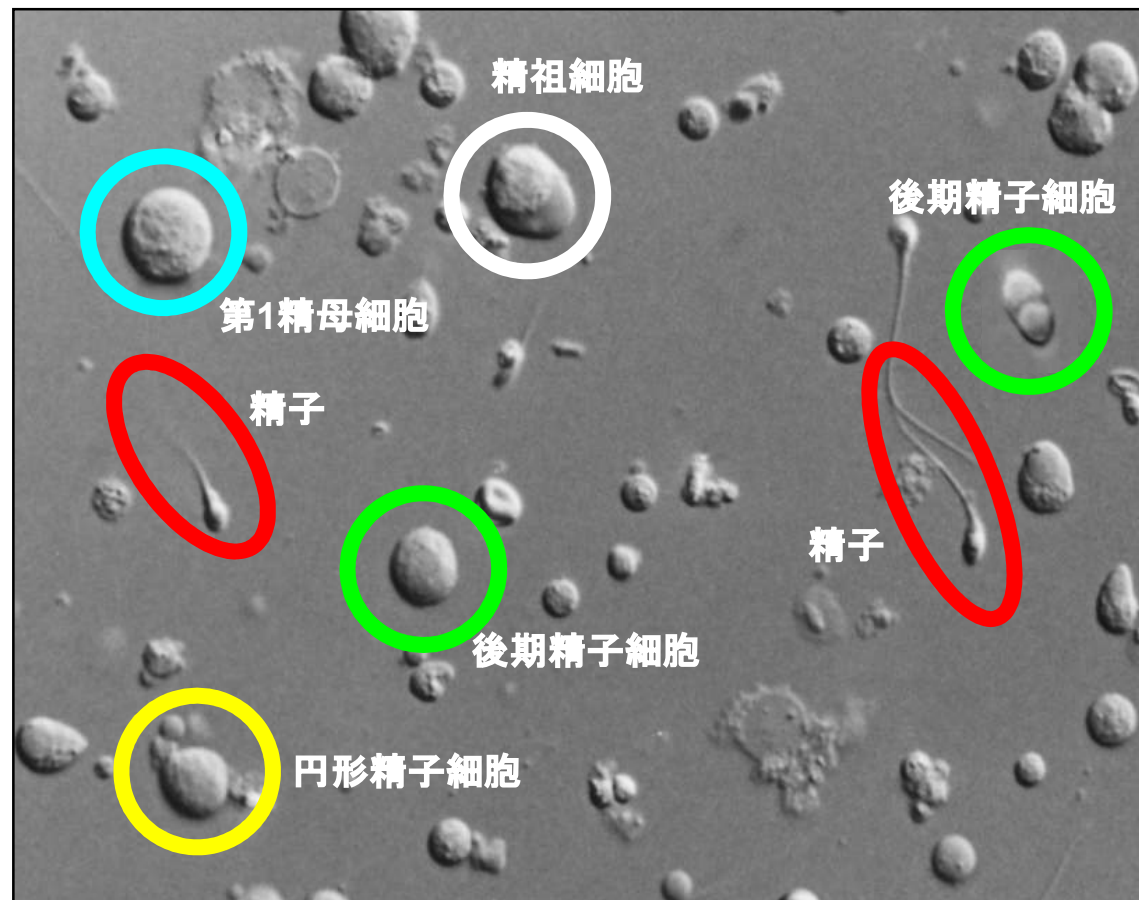
(⇒P.2『精子が発生するまでの過程』参照)

	各種造精細胞	ギムザ染色	FISH 染色
精祖細胞			
第一精母細胞			
円形精子細胞			

その結果、判別した細胞の染色体本数は全て23本でした。

対策① -精祖細胞との違いと染色体検査-

形態学的違いに基づく円形精子細胞の鑑別を行い、
その細胞に対して染色体検査を行って間違いがないと実証されました。
これにより、**鑑別はほぼ完全である**と裏付けることができました。



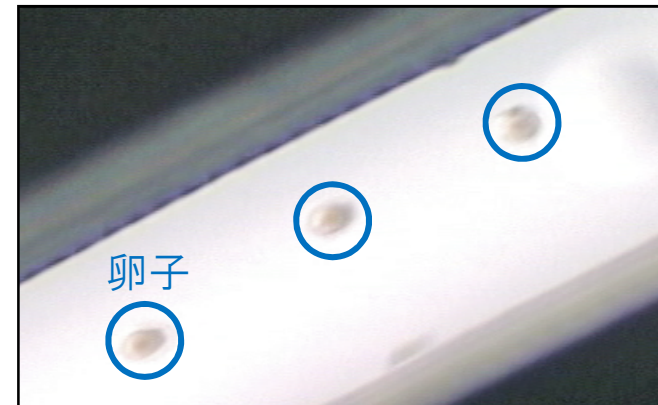
対策② -電気刺激法による卵子活性化-

卵子の活性化法は、クローニング（受精卵クローン）などでも検討されており、さまざまな方法が報告されています。

そのなかでも**電気刺激法**は最も多く実施されて安全性も高いため、ROSIでもこの方法を採用することになりました。

まずは、ヒト卵子に合った電気刺激の条件（電圧や刺激後ROSIを行うまでの間隔）を見つけるため、検討を重ねました。

電気刺激中の卵子→



そして、適切な刺激条件が見つかり、**約80%の確率で卵子は活性化すること**が確認されました。

対策後の結果

1996年にROSIが誕生し、一度は「価値のない治療法」として認識されましたが、三者共同の研究を進めた結果
現在までの出生児数は少なくとも150名以上に達しています。

異常児のリスクについての詳細は下表の通りです。
異常児の率は正常妊娠の場合と大差ないことが確認できます。

1. **先天奇形** 2.0% (3/150)
鎖肛 1例
心室中隔欠損症 2例
2. **染色体異常** 1.2% (1/83)
父親由来の均衡型転座
3. **精神発達遅滞** 0.6% (1/150)

ROSIの問題点について

1. 出生児の正常性について

現在までのROSIで生まれた子どもの数は非常に少なく、その遺伝学的な正常性について検討することは困難である。岸上等やCalvin Simerly等の報告ではマウスでROSIを施行したところ異常児が生まれたという報告があるが、それ以外で異常が発生したという報告例はない。当院ではすでにROSIで150例以上の出生児がいるが、明らかな染色体異常、遺伝子異常、エピジェネティック異常の報告は今のところない。ただし、今後検査の精度が高まるにつれて異常の頻度が上がる可能性は十分にあるので、そのフォローアップには注意をしていきたい。

2. 高い流産率について

流産率が高い理由としては卵子の活性化が不十分であること、中心小体の機能不全などが考えられ卵子の活性化法の改善が重要と考えられる。卵子活性化法を改善することによって流産率は低下するものと期待している。

ROSIの問題点について

3. 胞状奇胎について

流産の大半は染色体異常を伴わない自然流産であるが、この中に注意すべき流産がある。部分胞状奇胎と全胞状奇胎である。部分胞状奇胎は3倍体が原因と考えられ、円形精子細胞を注入する際に誤って体細胞を注入した場合が考えられる。全胞状奇胎は、染色体は2倍であるが雄性発生をしており卵子の関与が全く見られない場合に発生する状態で、この状態が悪化した場合、絨毛性疾患となる可能性もあるので十分な注意が必要である。



November 24, 2015

vol. 112 no. 47

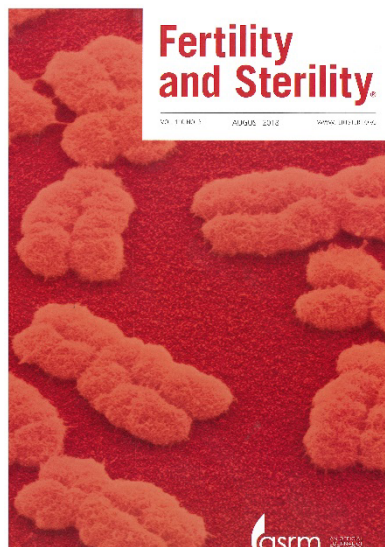
Developmental Biology

Fourteen babies born after round spermatid injection into human oocytes

Atsushi Tanaka^{a,1}, Motoi Nagayoshi^a, Youichi Takemoto^a, Izumi Tanaka^a, Hiroshi Kusunoki^b, Seiji Watanabe^c, Keiji Kuroda^d, Satoru Takeda^d, Masahiko Ito^e, and Ryuzo Yanagimachi^{f,1}

PNAS(米国科学アカデミー紀要) 2015年掲載

この論文の趣旨は、従来「円形精子細胞がいる症例では必ず精子がいる」と言われており、円形精子細胞注入の意義が疑問視されていましたが、その間違いを証明したのです。すなわち、第一回目の**Micro-TESE**を他施設で行い、精子が全く認められずに妊娠は不可能と診断された方で、当院で2回目の**Micro-TESE**を行い精子は認められなかったが円形精子細胞を認めた症例で**ROSI**を行い正常出産に至った12例（14名の児）を報告しました。この報告により従来言われていた世界的に正しいと考えられていた「円形精子細胞がいる症例は必ず精子がいる」又は「精子がない症例では円形精子細胞はいない」という考えを正確に訂正した結果となりました。この論文掲載を機に国内外において**ROSI**の評価が高まることとなりました。



April 24, 2018
vol.110 no.3

FERTILITY AND STERILITY®

Ninety babies born after round spermatid injection into oocytes: survey of their development from fertilization to 2 years of age

Atsushi Tanaka, M.D., Ph.D.,^a Kohta Suzuki, M.D., Ph.D., M.P.H.,^b Motoi Nagayoshi, M.D.,^a
Akihiro Tanaka, M.B.I.T.,^a Youichi Takemoto,^a Seiji Watanabe, Ph.D.,^c Satoru Takeda, M.D., Ph.D.,^d
Minoru Irahara, M.D., Ph.D.,^e Naoaki Kuji, M.D., Ph.D.,^f Zentaro Yamagata, M.D., Ph.D.,^g
and Ryuzo Yanagimachi, Ph.D.^h

^a Saint Mother Obstetrics and Gynecology Clinic and Institute for Assisted Reproductive Technologies, Fukuoka, Japan;

^b Department of Health and Psychosocial Medicine, Aichi Medical University School of Medicine, Aichi, Japan;

^c Department of Anatomic Science, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki, Japan; ^d Department of

Obstetrics and Gynecology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan; ^e Department of Obstetrics and

Gynecology, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, Tokushima, Japan; ^f Department of

Obstetrics and Gynecology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan; ^g Basic Science for Clinical Medicine, Division of

Medicine, Graduate School Department of Interdisciplinary Research, University of Yamanashi, Yamanashi, Japan; and

^h University of Hawaii Medical School, Honolulu, Hawaii

Fertility & Sterility 2018年掲載

2015年の論文でROSIの治療としての意義を報告しましたが、はたしてこの治療で生まれてきた子どもが正常児であるかという点は不明でありました。その後2年間で90名のROSIで生まれた児の追跡調査をし、身体的発育、認知能力について客観的に調査し、専門家にデータ解析をして頂いた結果、自然妊娠で生まれた児との間に全く有意差がないことが証明され、ROSI児の安全性は現在のところ問題ないと確認されました。

今後の課題

・新しい卵子活性化法

現在までの出生率は約10%と決して高くなく、
流産率も正常な精子を用いた治療の倍以上です。

これらの課題を解消するためには、新しい卵子活性化法
『PLC ζ (phospholipase C zeta)法』が最も有力視されています。
今後、ROSIの成功率をさらに向上するものと期待されています。

・ROSIで産まれた子供の予後調査

今回当院で開発した治療 -ROSI- のポイント

(1) 一度は画期的な治療法として期待されたROSIですが、実際の成功率は非常に低く、臨床的評価は失われ、全く行われることのない治療法になってしまいました。しかし、2つのハードルをクリアすることにより、当初より高い成功率を実現することができました。

これは、iPS細胞のような新たな技術や画期的な治療薬の開発という類のニュースではありませんが、埋もれた治療法が20年の時を経て遂に認められ、有望なものと判明したという内容です。

(2) 2つのハードルを越えるため、染色体工学と生殖繁殖学の専門医との協力研究が大きく貢献しました。

この三者共同の研究スタイルは、日本の将来を担う上で非常に重要と考えられます。

(3) 非閉塞性無精子症は、これからも世界中で一定の割合で発症していきます。この治療法がなければ、「精子がない」と診断されると自分の遺伝子を持つ子供が永遠にできなくなります。

ROSIの誕生は、日本の少産少子の現状を救うのみならず、一度は子供ができないと診断された方々に大いなる希望を与えられるのです。