

中空ヒアルロン酸マイクロカプセルを用いた少数精子凍結法の確立

富田和尚<sup>1,2)</sup>、境真司<sup>3)</sup>、Medhi Khanmohammadi<sup>3)</sup>、矢持隆之<sup>1)</sup>、佐藤学<sup>1)</sup>、橋本周<sup>1)</sup>、中岡義晴<sup>1)</sup>、田谷正仁<sup>3)</sup>、細井美彦<sup>2)</sup>、森本義晴<sup>4)</sup>

- 1) 医療法人三慧会 IVF なんばクリニック
- 2) 近畿大学大学院生物理工学研究科
- 3) 大阪大学大学院基礎工学研究科
- 4) 医療法人三慧会 HORAC グランフロント大阪クリニック

【目的】

高度乏精子症や精巣内精子を用いて顕微授精を行う症例では、精子探索に長時間を要する場合がある。これらの症例では採卵周期前に凍結保存した精子を用いることが一般的である。凍結融解後、探索に時間を要する理由は下記の通りである。1.融解後の精子運動率が低いこと。2.精子の損失を避ける為、精子以外の細胞との分離をせず凍結を行うことから、顕微授精時に多種の細胞の存在下で探索を行う必要があること。3.顕微授精で一度に探索できる検体量は数マイクロリットルほどであるが、Cryotube や straw を用いた凍結では、融解後の精子は数百マイクロリットルほどの培養液に希釈されることが挙げられる。第 2 及び 3 の問題は少数の精子のみを凍結融解でき、マニピュレーター下で精子を回収できる容器があれば解決される。そこで本研究では、直径数百マイクロメートルの中空カプセル中に、マニピュレーターを用いて精子を注入し、凍結融解後、精子の回収率を検討した。

【方法と材料】

ゲルの材料としてヒアルロン酸を選択した。層流原理を用い、カプセル芯部がゼラチンゲル、被膜がヒアルロン酸ゲルのカプセルを調製した。0.4%トリプシン EDTA によりカプセル芯部を分解し、中空ヒアルロン酸ゲルカプセル(HA-CAP)を調製した。HA-CAP にマニピュレーターで体外受精後の余剰の運動精子を 1 カプセル当たり 3 細胞注入した。次に、カプセルを 0.1 M スクロースを耐凍剤とする凍結液とともに Cryotop®上へのせ、LN<sub>2</sub>蒸気上で 2 分間インキュベート後、LN<sub>2</sub>中に 24 時間以上保存した。37°Cの培養液で融解し、カプセルを 10 uL の 40 IU/mL ヒアルロニダーゼドロップ中で分解した。対照区は顕微授精後、未受精となった卵子から細胞質を除いた透明帯に精子を注入し、凍結融解後、精子を吸引し回収したものとした。カプセル分解後の精子回収率、運動率を比較した。

【結果】

カプセルの平均直径は  $218.6 \pm 18.4 \mu\text{m}$ 、HA ゲルの厚さは  $29.8 \pm 6.5 \mu\text{m}$  であった。一般的な顕微授精用マニピュレーターを用いてカプセル内に精子を注入できた。凍結-融解後の HA-CAP 区におけるカプセル回収率は 100.0%、精子回収率  $90.9 \pm 15.5\%$ 、精子運動率  $15.1 \pm 17.4\%$ であり対照区と比べ有意差はなかった(100.0%、 $97.0 \pm 10.0\%$ 、 $21.2 \pm 16.8\%$ 、N=11)。

【考察】

凍結融解後の精子回収率は 90%以上であった。卵子への精子注入を模して操作を行うことで高率な回収率が得られたと考えられた。一方、融解後の精子運動率は約 20%であり、改善する必要がある。動物の精子では非浸透型と浸透型凍結剤を組み合わせる方法で、高い運動率が得られていることから、ヒト少数精子の凍結に応用できるか検討する必要がある。