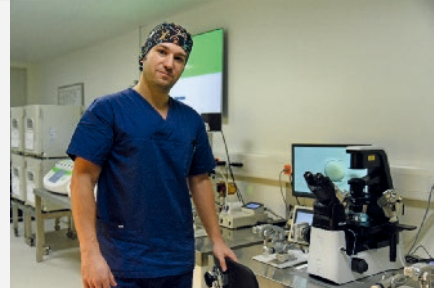




ICSIの最適なパラメーター 高精度の光学機器でICSIを完全なものに

取材ご協力: Alejandro Montoya Ureta, IVF Lab Manager at OVA IVF Clinic Zürich



現在、20~44歳のカップルについて、12カ月以上継続して不妊になる「不妊症」は、世界で約9%ともいわれています^[1]。治療方法としては主に2つの授精技術が用いられ、その1つが標準的な体外受精(IVF)、もう1つが顕微授精(ICSI)です。世界で実施されている不妊治療のうち、従来型のIVFは約33%、ICSIは66%を占めています。ICSIでは50~80%の卵子を受精させることができ^[2]、ICSI後の胚移植1回あたりの平均妊娠率は、2014年の欧州で33%にも達するほどです。この高い妊娠率には他の要因も関係している可能性が考えられますが、ICSIの成功率を最大限に向上させることこそ、妊娠成功の第一歩になると言えます。

スイスのOVA IVF Clinic Zurichは、ICSIで80~90%の受精率を達成しています。同クリニックにおいて、この極めて高いICSI成功率を実現する上で、最適なパラメーターと最高精度の機器がどのように貢献しているかをご紹介します。

アプリケーション

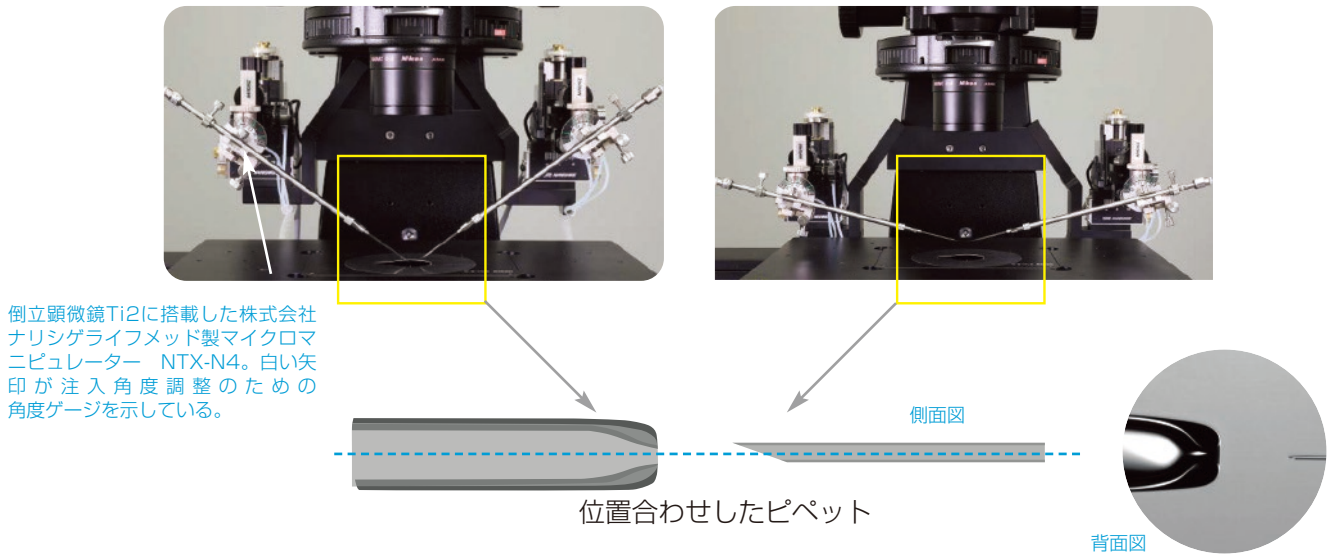
ICSIは、生殖補助医療において、倒立顕微鏡やマイクロマニピュレーターを利用して第二減数分裂中期の成熟した卵子に単一の精子を直接注入することで、生殖細胞の受精を可能にするプロセスです。複数のステップがあり、成功させる上で最も重要なパラメーターは、安定度、精度、速度の3つが挙げられます。

プロセス

ICSI実施前

1 機器の準備

角度調節、ピペットの配置、100~200Xでの焦点調節を行います。注入の角度は、胚培養士の好みと使用するピペットによって決定され、OVA IVF Clinic Zurichでは、35°~37°が最も成功率の高い角度と考えられています。



2 生殖細胞の準備

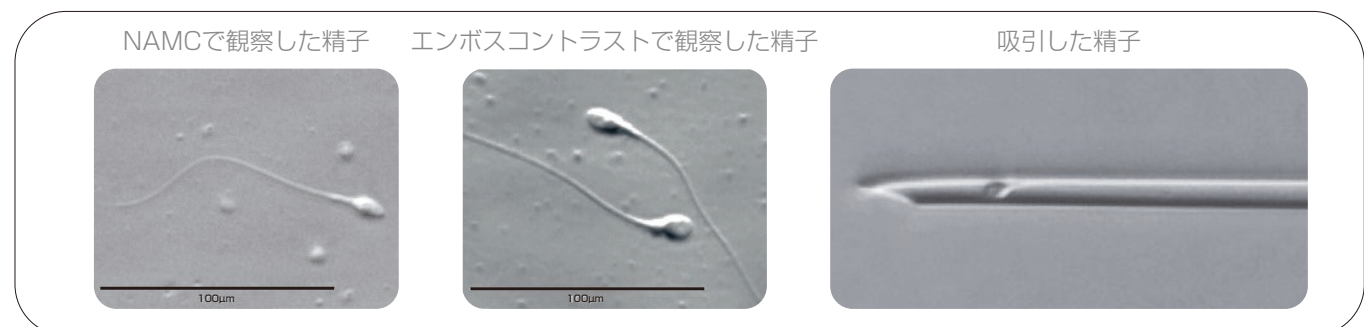
卵子を覆っている細胞層を除去するために化学的または、機械的に裸化し、ICSIディッシュで卵子ドロップの選択と注入を行います。さらに、ICSIディッシュでPVPドロップに精子を注入します。



ICSI

3 精子の選択と捕獲

胚培養士は400Xの倒立顕微鏡を用いて、精子の頭部形態、運動速度と、その運動パターンに基づき、最適な精子を探していきます。理想的な精子は、平坦な形状で、かつ $5.1 \mu\text{m} \times 3.1 \mu\text{m}$ のディスク型の頭部と $50 \mu\text{m}$ の尾部を持つものです。精子は私たちの体内で最も小さな細胞の一つで、その詳細を観察するには、明るく高精度の光学顕微鏡が欠かせません。詳細部分を速やかに判別できなければ、ICSIサイクル全体が失敗に終わってしまうこともあります。選択後は、精子の首にICSIピペットを優しく接触させて誘導し、不動化させてから、通常は尾部からマイクロピペットに取り込みます。



4 卵子の固定

200Xでピペットを操作しながら極体を6時または12時の位置で固定し、卵子を配置します。その際は適切な速度で吸引を行い、所定の位置に優しく配置していきます。極体をこの軸で配置すると、卵子に対して垂直に穿刺できるようになり、紡錘体の損傷リスクを低減することが可能です。

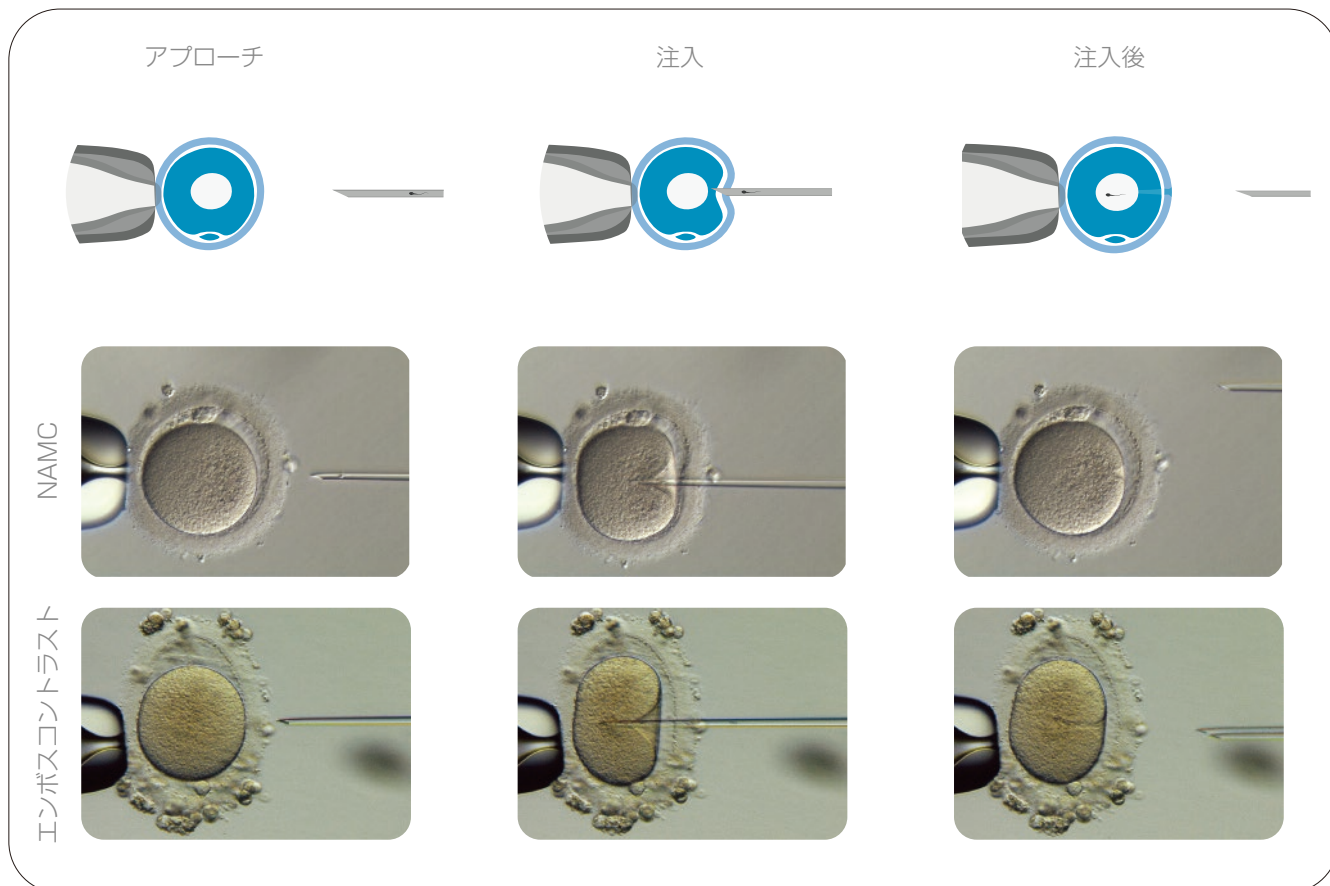


5 ICSI

インジェクション・ピペット内の余分な媒体を出して精子を先端部まで移動させ、鮮明な合焦点で卵子と注入地点を揃えた上で、注入作業を進めていきます。膜を穿破すると少量の細胞質がピペット内に吸引されますが、精子や最少の媒体と一緒に卵子に再注入します。このとき、吸引と注入の量を最小限に抑えるために、正確で応答性の良いマイクロインジェクターが必要になるのはもちろんですが、最終的には、精子と液体の位置の詳細を適確に把握することこそが、ICSIの成否の鍵を握ると言えます。

受精卵はその後、胚の発生と観察のため、培養液に戻されます。

ICSIの全プロセスは、通常15分から20分で完了しますが、この間、生殖細胞はインキュベーターから出て、最大のストレスを受けることになります。そのため、作業時間をできる限り短縮する必要があり、スピードが極めて重要です。



参考

1. ARTファクト・シート (ESHRE)
2. <https://www.reproductivefacts.org/news-and-publications/patient-fact-sheets-and-booklets/documents/fact-sheets-and-info-booklets/what-is-intracytoplasmic-sperm-injection-icsi/>

関連するパラメーター

生殖細胞、特に卵子がストレスを受けないようにするには、ICSI実行中のコンディションを安定させることが極めて重要です。ICSI用顕微鏡にセットしたサーモプレートのガラスヒーターによって、細胞の温度は37℃に保たれます。

精度については、胚培養士の経験に左右されますが、使用するツールの正確さも重要な要素です。倒立顕微鏡の光学系やマイクロマニピュレーターの性能が、ICSIを成功に導く上で大切な役割を果たします。正確なICSIを実現するには、シャープで焦点の合った高コントラストな観察ができる優れた倒立顕微鏡が必要です。

ICSIにおいて、失敗の最大の原因となるのは精度不足です。高精度でない倒立顕微鏡のもとでは、精子を識別することが難しくなり、選択と吸引において問題が生じるほか、ピペットを同じ面で位置合わせできないために注入場所に問題が発生し、その結果、過剰な陥入になったり、卵子の劣化に結びついたりして、ICSIのプロセスが失敗に終わってしまうことさえあるのです。

マイクロインジェクターについても、高精度でないものを用いると、卵子を保持する際に強い力が加わり、結果的にストレスを与えたり、細胞の劣化につながったりする恐れがあります。また、精子と一緒に過剰な媒体を注入してしまうと、空胞形成が生じて、健康的な胚の発達が妨げられることにもつながりかねません。

テクノロジー

ICSIは、適切なコントラストが得られる倒立顕微鏡で行われます。ニコンの倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2とTs2Rは、これまでも高い評価を得ているNAMC（ニコンアドバンストモジュレーションコントラスト）観察が可能で、Ts2Rにおいては、Ts2R専用開発されたアクセサリにより、エンボスコントラスト観察も可能です。これらにより、シャープで明るい画像を得ることが可能です。NAMCでは奥行き感が出るようになっており、エンボスコントラストではフォーカス面で疑似レリーフ画像が生成されます。80～90%という高い受精成功率を実現している OVA IVF Clinic Zurich の Alejandro Montoya Ureta さんは、次のように語っています。

「どちらの方法も、ICSIを成功させる上で大きな貢献をしています。決定的な要因は、胚培養士の経験と、いかに快適にICSIをできる環境にあるかということです。」

エンボスコントラストは、高価な対物レンズや光学素子が不要であることから、費用対効果の高い光学技術と言えます。エンボスコントラストでは、明るい視野の対物レンズとエンボスコントラスト用スライダーとモジュールを利用するだけで、位相差観察ではハローが出てしまうiPS細胞などの厚い試料についても、疑似三次元のグレアフリーの画像を得ることが可能です。また、培養チャンバーの材質が、ガラスでもプラスチックでも対応可能な観察方法です。

ECLIPSE Ti2には、1.5X/2X（オプション）の中間変倍機能があり、胚培養士は、顕微鏡のレボルバーを操作することなく、顕微鏡前面のレバーの切り替えにより、倍率を200Xから300X/200Xから400X（オプション）まで上げることができるので、ICSIのスピード面において、大きなメリットとなります。

Ts2Rは、臨床アプリケーションにおけるコストパフォーマンスを最優先に設計されています。コンパクトで占有面積も小さく、設置の場所をとりません。防振設計とエンボスコントラストを備えた最高精度の倒立顕微鏡で、ICSIを成功へと導きます。エルゴノミクス・デザインにより、胚培養士は、より快適にICSIを行えるので、顕微鏡授精の成功率の向上にもつながります。

NAMCおよびエンボスコントラスト

NAMC
ポライザー取付位置

NAMC
コンデンサーモジュール

NAMC
対物レンズ

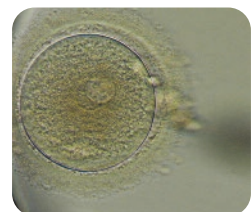
エンボスコントラスト
コンデンサーモジュール

エンボスコントラスト
スライダー



NAMCで観察した受精卵

マイクロマニピュレーター TAKANOME、
空圧式マイクロインジェクターと
倒立顕微鏡Ts2R-FLとの
組み合わせ



エンボスコントラストで観察した
受精卵



株式会社 **ニコン**
108-6290 東京都港区港南2-15-3 (品川インターシティ C棟)
<https://www.healthcare.nikon.com/ja/>

株式会社 ニコンインステック

https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/

バイオサイエンス営業本部 140-0015 東京都品川区西大井1-6-3 (株式会社ニコン 大井ウエストビル3F)
製品お問い合わせ (フリーダイヤル)

電話 (03)3773-8138
電話 0120-586-617