

# ピエゾマイクロマニピュレータを用いた削剥によるアシストハッチング

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
著者	井上, 岳人 松下, 由紀子 江見, 信之 小島, 謙二 小野, 吉行
巻/号	26巻2号
掲載ページ	p. 94-96
発行年月	2009年4月

—レター—

# ピエゾマイクロマニピュレータを用いた削剥による アシストハッチング

## Scrape-Assisted Hatching Using Piezo Micromanipulator

井上 岳人<sup>1</sup>・松下 由紀子<sup>1</sup>・江見 信之<sup>1</sup>・小島 謙二<sup>1</sup>・小野 吉行<sup>1</sup>

Taketo Inoue<sup>1</sup>, Yukiko Matsushita<sup>1</sup>, Nobuyuki Emi<sup>1</sup>, Kenji Kojima<sup>1</sup> and Yoshiyuki Ono<sup>1</sup>

<sup>1</sup>小野レディースクリニック 〒675-1375 小野市

<sup>1</sup>Ono Ladies Clinic, 538-3 Nishihonmachi, Ono, Hyogo 675-1375, Japan

### はじめに

体外培養した胚や凍結融解した胚は透明帯の硬化や肥厚など、質の低下によりハッチング障害が惹起され着床率が低下するとされている。

そこで1990年Cohenら<sup>1)</sup>により物理的に透明帯の一部を切開するアシストハッチング(AHA)が報告された。その後、酸性タイロードや蛋白分解酵素であるプロナーゼを用いた薬剤により透明帯を化学的に溶解する方法<sup>2-5)</sup>、物理的に開孔するピエゾマイクロマニピュレータ(PMM)を用いた方法<sup>6)</sup>およびレーザー装置を用いた方法(LAH)<sup>7-10)</sup>が考案され臨床応用されている。

Cohenらの方法はAHA用ピペットで1時方向から11時方向に透明帯を穿刺貫通した後、ホールディングピペットに擦り合せ透明帯を切開する<sup>1)</sup>。そのため、囲卵腔の狭い胚に対してダメージを与える可能性がある。

薬剤によるAHAは、ホールディングピペットで胚を固定し一部分の透明帯に酸性タイロード(pH 2.5)をマイクロピペットにて吹き付け、透明帯を部分的に開孔したり<sup>2)</sup>菲薄化する方法<sup>3)</sup>と、酸性タイロードやプロナーゼに胚を浸漬し透明帯を完全に除去したり<sup>4)</sup>全周囲菲薄化する方法<sup>5)</sup>がある。しかし、薬剤により透明帯の溶解を行うため、胚への影響が危惧される。

LAHは上述した幾つかの方法のようにAHA準備段階でのマイクロマニピュレータのセッティングの煩雑さはない。操作上も透明帯の状態や薬剤の影響もなく、さらにLAH装置により照射時間や開孔径などが調整できるので術者の技術的なバラツキもほとんどない非常に簡便な方法である。

しかし、レーザー照射による熱が囲卵腔の狭い胚に対してダメージを与える可能性が危惧される。また、LAH装置が高価であるため、初期投資に費用がかかり、治療費の増額へつながる。

そこで、当院ではAHA実施の際の費用を抑制することを考え、安価であるPMMのAHA用アダプタ(Capillary Holder; プライムテック)を購入し、AHAを実施している(図1-a)。

我々は通常、IVFやICSIで得られた全ての胚盤胞をCryotop(北里バイオファルマ)を用いたガラス化法<sup>11)</sup>にて凍結保存をしている。そして母体環境を人工周期や自然周期で整えた後、凍結胚盤胞を融解し移植を行っている。今回、ピエゾAHA用アダプタの特性および凍結胚盤胞の融解の際に当院で実施しているPMMを用いた削剥によるAHAを紹介する。

### ピエゾAHA用アダプタの特性

PMMはピエゾ(圧電素子)の急速変形に伴う慣性力を駆動力としており、ピエゾインパクトドライブユニットから発せられる駆動力を先端に伝導させ極微小で小刻みな前進運動をさせることにより、弾性のある細胞膜や透明帯を貫通させ、細胞膜や細胞質のダメージを軽減できる。ピエゾICSIはこの極微小で小刻みな前進運動を効率よく利用しているため、インジェクションホルダーの中央部にインジェクションピペットを装着する。しかし、ピエゾAHA用アダプタはピエゾインパクトドライブユニットからの駆動力をAHA用マイクロピペットに振動として伝えさせるために、マイクロピペット装着部分がインジェクションホルダーの中央より外されている。当院で実施しているAHAは上述したように故意に生じさせた振動を利用して透明帯を削剥する方法である。従来のピエゾAHAと比較するとマイクロピペット先端の振動幅が広いこと、より簡便に短時間で広範囲の透明帯の菲薄化や切開が可能である。本法はマイクロマニピュレータのセッティングの煩雑さはあるものの、熱や薬剤による胚へのダメージは全くない利点がある。

(受付 2009年1月10日/受理 2009年2月24日)

別刷請求先: 〒675-1375 兵庫県小野市西本町538-3

小野レディースクリニック

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: taketoein@yahoo.co.jp

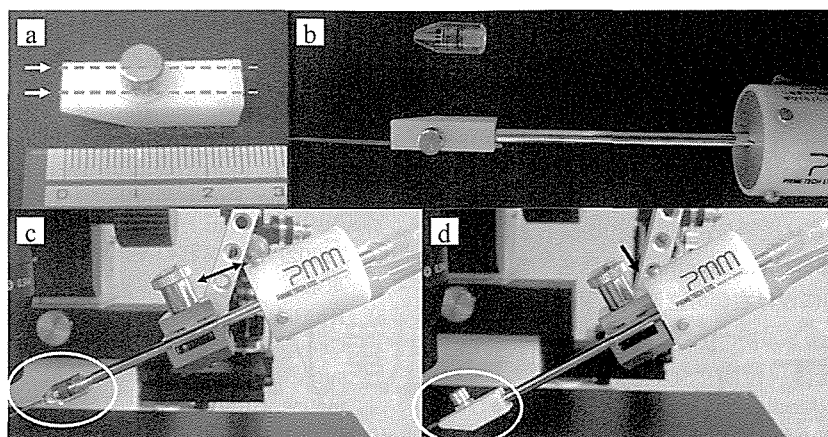


図1 ピエゾAHA用アダプタと設置

a : 矢印で示した2本の点線の部分にAHA用マイクロピペットを装着するための溝がある. b : インジェクションホルダーの中央部よりマイクロピペット装着部分が外にずれていることで、ピエゾインパクトドライブユニットからの駆動力を振動として効率よくマイクロピペット先端に伝わる. c : ピエゾICSIの際のピエゾインパクトドライブユニットの設置は極微小で小刻みな前進運動をさせるため、インパクトユニットとスライドユニットの間の空間(矢印)をつくる. d : ピエゾICSI (c) とは異なりインパクトユニットとスライドユニットとの間の空間をなくし(矢印)、極微小で小刻みな前進運動を防ぐ.

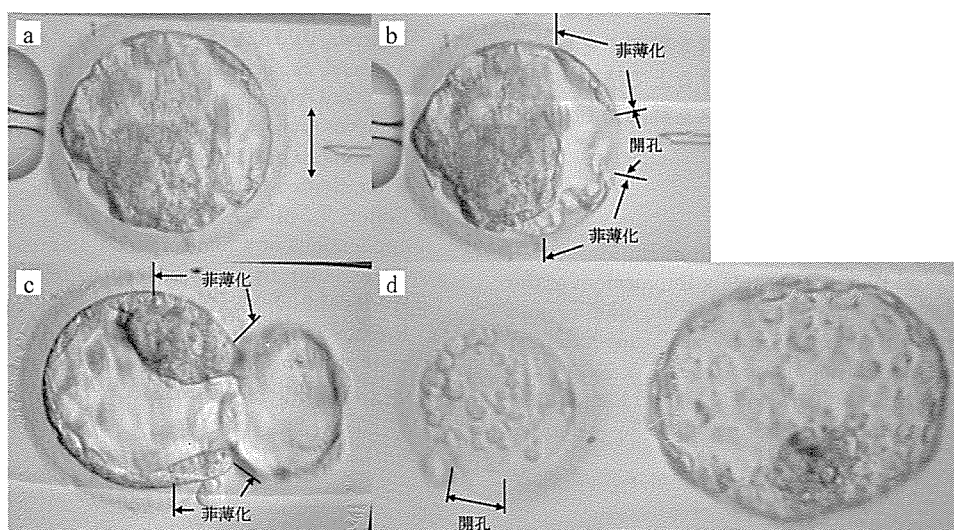


図2 AHAの施行と培養結果

a : 上下の矢印方向にAHA用マイクロピペットの先端が振動する. b : 12時方向から6時方向に向け右側の透明帯を非薄化し、3時方向の透明帯を切開した. c : 回復培養3時間後. d : 回復培養24時間後. 矢印の部分がAHA施行により開孔している.

## AHA

凍結胚盤胞の融解をする前に予め、PMMのインジェクションホルダーキャップをAHA用アダプタに交換しConventional ICSI用マイクロピペット (HUMAGEN) を設置する (図1-b). この際、インパクトユニットとスライドユ

ニットの間の空間をなくし、極微小で小刻みな前進運動を防ぐ (図1-c, 図1-d).

当院では胚の凍結および融解は北里バイオファルマのVitrification Kitを用い室温にて実施している.

AHAは胚の融解にて2回目の洗浄液 (WS2) に5分間浸漬させている間、つまり脱水により胚盤胞が収縮し困卵腔が

確認できる段階で洗浄液 (WS2) 内にて施行する。围卵腔が広がっている部分を3時方向にし、9時方向よりホールディングピペット (北里バイオファルマ) で固定する (図2-a)。

ピエゾインパクトドライブユニットを駆動 (Speed 16, Intensity 16) させながら振動するインジェクションピペットを3時方向より接近させ透明帯を削削し、切開および菲薄化を行う。AHA施行部分はNakayamaらの報告<sup>6)</sup>を参考に12時方向から6時方向にかけ右側の透明帯を菲薄化し、3時方向の透明帯を切開する (図2-b)。

洗浄液 (WS2) 内で浸漬時間が5分経過した後、Blast Assist System Vial2 (Medicult) のドロップで5回洗浄し同培地にてインキュベータ内で回復培養させ、胚盤胞移植をする。図2-c, 図2-dはそれぞれAHA施行後3時間培養および24時間培養した写真である。

### おわりに

LAH装置など初期投資に費用がかかれば、その分、治療費を増額せざるを得なくなり、年間200症例前後の胚移植を実施している当院のような小規模施設では、患者一人に対するAHA実施費用が高騰する。今回紹介した方法はマニピュレータ操作を必要とするため、ランニングコストの面ではLAHよりも高いものの、初期投資の費用はわずかであるため、総合的に小規模施設において治療費を抑制できるのではないかと考えている。不妊治療を受ける上で精神的にも経済的にも負担の大きい患者のストレスを経済面で少しでも軽減できるのではないかとと思われる。

### 文 献

- 1) Cohen, J., Elsner, C., Kort, H., Malter, H., Masev, J., Maver, M.P. and Wiemer, K. (1990): Impairment of the hatching process following IVF in the human and improvement of implantation by assisting hatching using micromanipulation. *Hum. Reprod.*, 5, 7-13.
- 2) Cohen, J., Alikani, M., Trowbridge, J. and Rosenwaks, Z. (1992): Implantation enhancement by selective

assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum. Reprod.*, 7, 685-691.

- 3) Gordon, J.W. and Dapunt, U. (1993): Restoration of normal implantation rates in mouse embryos with a hatching impairment by use of new method of assisted hatching. *Fertil. Steril.*, 59, 1302-1307.
- 4) 山内一也, 豊田 裕, 岩倉洋一郎, 森 庸厚, 佐藤英明 (訳) (2002): マウス胚の操作マニュアル, pp. 189, 近代出版, 東京.
- 5) Khalifa, E.A., Tucker, M.J. and Hunt, P. (1992): Cruciate thinning of the zona pellucid for more successful enhancement of blastocyst hatching in the mouse. *Hum. Reprod.*, 7, 532-536.
- 6) Nakayama, T., Fujiwara, H., Tastumi, K., Fujita, K., Higuchi, T. and Mori, T. (1998): A new assisted hatching hatching technique using a piezo-micromanipulator. *Fertil. Steril.*, 64, 784-788.
- 7) Obruca, A., Strohmer, H., Sakkas, D., Menezo, Y., Kogosowski, A., Barak, Y. and Feichtinger, W. (1994): Use of lasers in assisted fertilization and hatching. *Hum. Reprod.*, 9, 1723-1726.
- 8) Schiewe, M.C., Neev, J., Hazeleger, N.L., Balmaceda, J.P., Berns, M.W. and Tadir, Y. (1995): Developmental competence of mouse embryos following zona drilling using a non-contact holmium: yttrium scandium gallium garnet (Ho: YSGG) laser system. *Hum. Reprod.*, 10, 1821-1824.
- 9) Antinori, S., Selman, H.A., Caffa, B., Panci, C., Dani, G.L. and Versaci, C. (1996): Zona opening of human embryos using a non-contact UV laser for assisted hatching in patients with poor prognosis of pregnancy. *Hum. Reprod.*, 11, 2488-2492.
- 10) Ebner, T., Moser, M. and Tews, G. (2005): Possible applications of a non-contact 1.48 microm wavelength diode laser in assisted reproduction technologies. *Hum. Reprod.*, 11, 425-435.
- 11) Rall, W.F. and Fahy, G.M. (1985): Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196 degrees C by vitrification. *Nature*, 313, 573-575.