

Title	ヒト精子DNA障害定量法の開発と染色体構造異常精子の排除に関する研究
Author(s)	兼子, 智
Journal	歯科学報, 103(3): 223-230
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/665">http://hdl.handle.net/10130/665</a>
Right	

関連医学の進歩・現状

## ヒト精子 DNA 障害定量法の開発と染色体 構造異常精子の排除に関する研究

兼 子 智

東京歯科大学市川総合病院産婦人科

### はじめに

本稿は、不妊治療における精子 DNA 損傷の定量的評価ならびに DNA 損傷精子の排除の必要性について述べるとともに、平成13年度東京歯科大学学長奨励研究の成果を報告する。

#### 1. 不妊の背景

夫婦が避妊することなく2年間経過しても妊娠できない場合を不妊と定義する。その原因は多岐にわたり、女性側では内分泌不全による排卵障害、卵管閉塞、子宮内膜症などが挙げられる。男性不妊の頻度は想像以上に高く、不妊原因の約50%を占め、ほとんどが特発性造精機能障害による精液所見不良(乏精子症、精子無力症)である。女性不妊の治療は、ホルモン測定技術、排卵誘発剤の進歩により妊娠成績が飛躍的に向上した。一方、男性側の造精機能障害は薬物療法に抵抗性であり、治療に苦慮している現状である。不妊治療は、配偶子(卵、精子)、初期胚を体外で操作して受精、妊娠を介助する assisted reproductive technology(ART)の導入により、不妊治療は大きく進歩した。

#### 2. ART, とくに ICSI における精液の評価

性交により膣に射出された数億匹の精子は子宮頸管、子宮腔、卵管を遡上するにつれ、その数を

減じて受精の場である卵管膨大部に到達する精子は数匹程度と考えられている。子宮腔内人工授精(IUI)は洗浄した精子を子宮腔内に注入し、体外受精・胚移植(IVF-ET)では卵巣から吸引、採取した卵と洗浄した精子を *in vitro* で媒精し、分割した胚を子宮腔内に移植する。さらに顕微授精(卵細胞質内精子注入, ICSI)では、卵に精子を人為的に穿刺して受精を図る。IUI から ICSI への授精法の改良は、雌性生殖路における精子輸送を by pass し、卵近傍へと精子を送達してより少ない精子で受精を図ろうとするものである。IVF-ET は媒精に要する精子濃度が低く、導入当初には重度精液所見(乏精子症、精子無力症)治療の切り札と考えられたが、予め運動精子を分離して媒精しても受精率は低く、ICSI が臨床応用されるようになった。本法は精子を卵細胞質内に注入するので、精子の運動性、先体反応誘起能等の精子機能を無視して応用でき、さらには未熟な精細胞を注入しても正常な胚発生が可能であると主張されている。このため受精能を有しない重度の精液所見不良症例に対する唯一の治療法とされている。現況の ICSI は卵穿刺法については詳細に検討しているが、精子に関しては単に顕微鏡下に精子を pick up しているにすぎず、穿刺精子の評価、選択に明確な基準は存在しない。

精巣においてヒト精子は2回の減数分裂を経て

Satoru KANEKO : Observation of DNA fragmentation in human sperm and its exclusion from ejaculated human sperm (Department of Obstetrics and Gynecology, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental college)

別刷請求先: 〒272 8513 市川市菅野5-11-13  
東京歯科大学市川総合病院産婦人科 兼子 智

形成され、成熟精子になるには74日を要する。第2減数分裂以後に生じた精子 DNA の傷害は修復されずに蓄積する。体細胞における染色体損傷の様式は多彩であるが、精子においてはほとんどが欠失である。ヒト造精過程において減数分裂前期以降、アポトーシスが関与する精母細胞死により一部の精細胞が消滅している。アポトーシスは DNA 2重鎖切断を伴う細胞死であり、消滅を免れて射出に至った精子中には DNA 損傷精子が混在することが明らかとなってきた。上口，立野らは透明帯除去ハムスター卵にヒト精子を侵入させて精子染色体分析(G-band法)した結果、15.5%に異常を認め<sup>1)</sup>(表1)。得られた数値は正常精液所見を有する個体(子供がいる男性)において卵への侵入能を有する精子のみを観察した結果である。一方、繁殖力の高い個体を選別、継代してきた実験動物の異常率(0.9-1.4%)であり、ヒトの値は実験動物よりはるかに高い。

われわれは DNA 断端を組織化学的に検出する TUNEL 法を用いてヒト射精精子 DNA 損傷を観察した結果、射精精液中の DNA 損傷精子比率は 20-70%程度であり、ICSI の対象となる重度の精液所見不良症例ではその比率が正常精液に比して増加することを報告した<sup>2)</sup>(図1)。現況の ICSI は、全ての精子に DNA 損傷が存在しないことを前提としているが、上記知見はこれを否定するものである。さらに IVF-ET、ICSI により出生した児の染色体異常、先天異常率が増加する可能性が指摘されており<sup>3)</sup>、重度の精液所見不良症例に対する ICSI の適応とその鑑別診断には、精子 DNA 傷害の定量的検出法開発が不可欠である。

表1 ハムスター卵侵入法によるヒト精子染色体分析

	観察精子	異数性異常(%)	構造異常(%)	計(%)
上口 <sup>1)</sup>	15,864	1.4	14.1	15.5
Brandriff <sup>5)</sup>	2,648	1.6	7.7	9.3
Martin <sup>6)</sup>	5,629	4.1	9.4	13.5

文献 1, 5, 6 より改編

精子は雌性生殖路を遡上する過程で、運動精子の選別、精漿、細菌等の除去とともに capacitation、先体反応等の生理的、形態的变化を誘起して卵への侵入が可能となる。ART に供する精子調製はこれらの選別、変化を *in vitro* で代行することであり、授精法の高度化に対応したより高度な精子調製法が必要となる。ICSI においては、分画による DNA 損傷精子排除法の確立が必要である。

### 3. ヒトと実験動物の生物学的背景

ヒト不妊治療の技術は、実験動物の生殖生理学、または畜産領域における家畜繁殖学で開発された技術を導入したものがほとんどである。実験動物(マウス)とヒトでは生物学的背景に大きな差がある。マウスを用いた実験の多くは、近交系動物を用いて行われる。近交系動物は同腹の雌雄を20代以上交配して系統を確立したものであり、一般に高い生殖能を有するものが選別されている。また経済動物を扱う家畜繁殖領域では産仔の効率の生産を目的としており、不妊は治療の対象とならない。さらに雄に関しては詳細な後代検定を行って厳選した種雄が多く、雌に一括して精液を提供する。経済動物では、男性(雄性)不妊は研究、治療の対象とならない。一方、ヒトは遺伝的背景が多様であり、男女とも複雑な不妊原因を有する夫婦を治療の対象とする。さらに不妊原因の遺伝的背景に関しては、不明な点が多い。上述したようにヒトとマウス精子の G バンドレベルの染色体損傷は大きく異なっており、マウス、家畜等で得られた結果を直ちにヒト不妊治療の病態モデル、とくに男性不妊治療に臨床応用するべきでない。本研究の目的である精子 DNA 傷害の定量的検出法開発ならびに分画による DNA 損傷精子排除法の確立には、ヒト精液を用いた研究が不可欠である。

### 4. 精子染色体分析

全ての核が凝縮している精子においては、通常の末梢血リンパ球を用いた核型分析が適用でき

ず、初めに透明帯除去ハムスター卵に精子を侵入させて膨化した精子染色体を分析する方法が開発された<sup>4)</sup>。本法は手技が煩雑であり、原法では培養液中で swim up した運動精子を用い、自身の力でハムスター卵侵入した精子のみが分析可能であるため精液中の全精子を反映する値ではない。また顕微操作により精子を卵に穿刺して分析を行うことも可能であるが、いずれにしる分析精子数が数十匹程度/検体である。しかし本法は後述する他の方法が DNA レベルの損傷を観察するのに対し、核型レベルの異常を観察し得る唯一の方法であり、最終的には本法による分析は不可欠である。表 1 に既報の結果をまとめたが、卵侵入能を有する運動精子であっても染色体異常率は 9.3 - 15.5% に達し、そのうち染色体構造異常率が 7.7 - 13.5% を占める。

その後、各染色体に特異的な DNA プローブを用いた FISH 法が開発された。本検査は、用いたプローブに対応する DNA 配列の異常を観察するものであり、ロパートソン転座、相互転座等の染色体の構成異常の観察が可能となった。本法により、多数の精子の染色体分析が可能となり、不妊男性の精子における染色体の異数性異常に関する報告がなされるようになった。Ohashi ら<sup>7)</sup>も乏精子症では、異数性異常、とくに X Y 精子の頻度が高くなることを報告している。

## 5. DNA 構造異常の評価

精子染色体の評価に際しては、染色体、遺伝子、DNA 各レベルにおける詳細な研究が必要とされる。精子形成不全による男性不妊の原因として Y 染色体部分欠失 (AZFa, AZFb, AZFc) があり、中でも AZFc 領域の欠失は最も頻度が高いことが知られている。しかし、男性不妊症例において、遺伝子レベルで原因が明らかとなる症例はむしろ希であり、ほとんどが原因不明である。ART に供する精子において、染色体損傷は原因、形式の如何を問わず全て使用不可である。従って、ART における精子臨床検査の観点からは、個々の精子の非特異的 DNA 損傷、とくに

DNA 断片化による欠失を簡易かつ定量的に検出する方法の確立がまず必要である。DNA 傷害の様式は多様であるため、上述した 2 法に加え、以下に示す 3 つの観察法を用いて多面的に観察を行い、どの手法が精子 DNA 損傷検出に最も効果的なのかを検討する必要がある。1) TUNEL 法<sup>8)</sup>: DNA 断端を組織化学的に検出する、2) COMET 電気泳動法<sup>9)</sup>: DNA 2 重鎖切断および片側の開裂を電気泳動的に検出する、3) 8-OH グアノシン ELISA 法<sup>10)</sup>: 前 4 法が射精前の精子 DNA 損傷を評価しようとするのに対し、本法は *in vitro* における精子取扱に伴う酸化的 DNA 損傷を評価する。

われわれは、1, 2 の TUNEL 法、COMET 法について定量的観察法の開発を行った<sup>11, 12)</sup>。これらの方法はすでにキットが市販され、多くの論文が報告されている。しかし、観察条件を詳細に検討した結果、標本作成法、細胞溶解法、電気泳動条件等をヒト精子に対して最適化しないと偽陽性、偽陰性、さらに操作中における DNA 切断が見られることが明らかとなった。これまでに、標本作成においてスライドガラスへの塗抹に代わるフィルタートラップ法、ハロゲン化塩を用いる細胞融解法を開発した。COMET 電気泳動法においては、汎用されるサブマリン電気泳動槽に代わる顕微電気泳動装置の開発を行っている。図 2 に本研究において改良を行った修正 COMET 電気泳動法を模式的に示した。アガロースに精子を懸濁し、プラスチックフィルム上に厚さ 10 $\mu$ m のゲルを形成した。これを DTT, 界面活性剤, 蛋白分解酵素 (trypsin) 溶液中で融解する。0.43 V / cm の低電圧で 30 分間電気泳動を行い、DNA 蛍光染色する。図 3 に精子泳動像を示した。彗星状の泳動像は、DNA 断片化により生じた短鎖 DNA による。

## 6. 精製による DNA 損傷精子の排除

われわれは ART に供する精子の調製法に関して研究を行ってきた。これまでは、成熟した運動精子の選別とともに精漿、細菌、ウイルスの除去

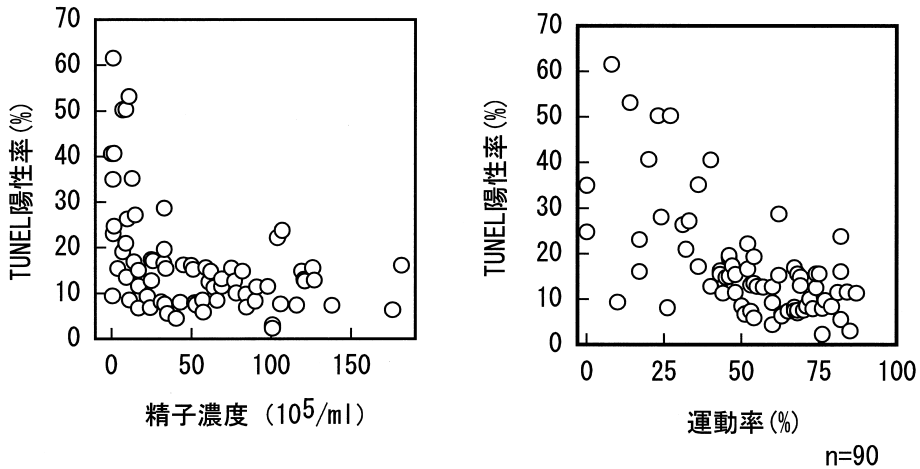


図1 ヒト精子 TUNEL 陽性率と精液所見の相関 文献2から改編

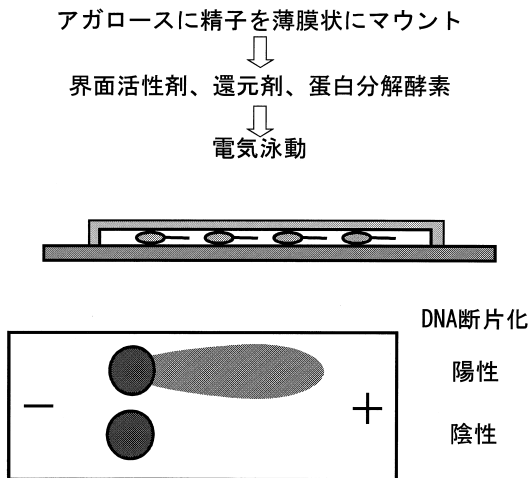


図2 ヒト精子 DNA 損傷の COMET 電気泳動法による観察

を目標とし、精漿、細菌の除去に関しては Inner-column 法を開発した<sup>13)</sup>。近年、本邦でも AIDS 患者の増加が報告されているが、抗ウイルス薬の開発に伴いその予後は著しく改善されている。それに伴い HIV 陽性男性の拳児希望が寄せられるようになった。われわれは Inner-column 法を改良して HIV 陽性男性の精液から Percoll 密度勾配遠心法および swim up を用いた HIV 除去法を確立した<sup>14)</sup>。すでに臨床応用が開始され、6 例の妊娠、出産例を得ている。図4は現在、われわれ

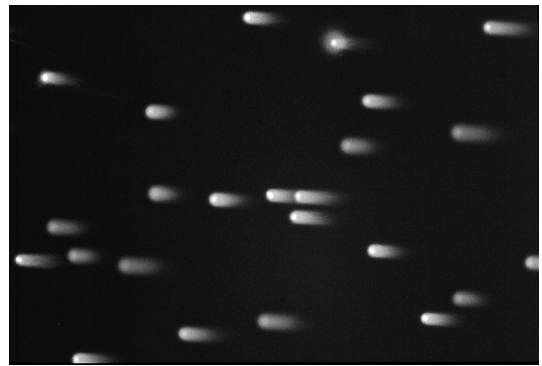


図3 個々の精子 DNA 損傷の COMET 電気泳動像

が HIV 除去に用いている Separable Fine Neck Tube (SFNT) を用いる連続密度勾配法を示している。SFNT は精液からの細菌、HIV の除去とともに運動精子の分離が可能である。さらに受精を by pass する ICSI においては、精子の卵侵入に不可欠な先体反応を誘起誘起する精子を選択的に分画することが有用である。われわれはコンカナバリン A をリガンドとする cell affinity chromatography 法を開発した<sup>15)</sup>。

われわれは DNA 損傷精子の排除を目的とした精子分画法の開発を試みた。SFNT を用いる Percoll 密度勾配遠心分離した精子を swim up 法により運動精子を分離し、得られた精子の DNA 損傷を TUNEL 法、COMET 法を用いて観察した。

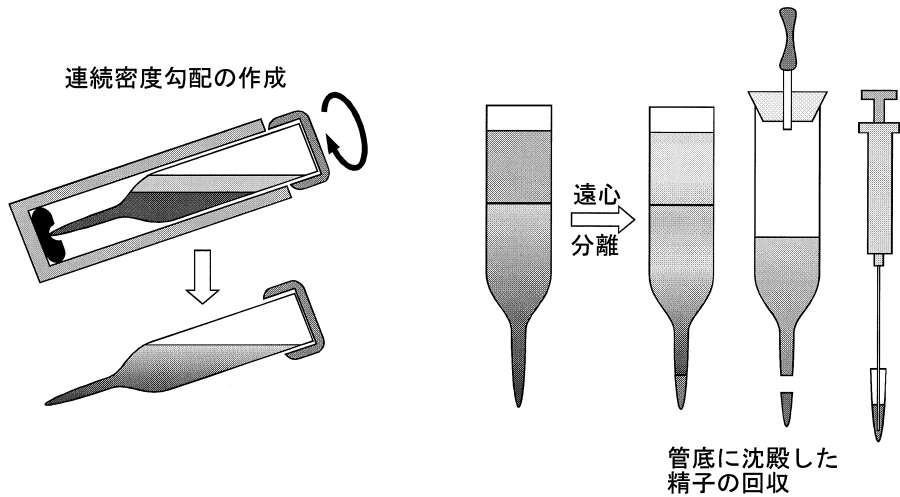


図4 Separable Fine Neck Tube を用いるヒト精子の濃縮および精漿の除去

本法により，DNA 損傷精子比率は 1 - 2 % 程度に低下させることが可能であった。今後，さらに効率のよい分画法を検討するとともに種々の検出法を用いた観察を行い，DNA 損傷精子の排除を確立したい。さらに本法の臨床応用が予定される重度精液所見不良症例では精子濃度が低く，現在汎用されている精子の分画手法では極少量の精子を取り扱うことが困難であるので，新たに微小環境精子操作技術の開発が必要となる。このための専用デバイスの開発を行っている。

#### 7. ART における卵，胚の DNA 評価

本稿は主としてヒト精子の DNA 損傷に関して述べたが，ART の実施に当たっては配偶子形成，受精，胚培養の各過程における染色体損傷の可能性を考慮する必要がある。卵形成過程では，過排卵誘発卵の一部には染色体損傷を有するものが混在することが報告されている<sup>16,17)</sup>。

受精段階では卵，精子の染色体損傷の有無により組み合わせが生じる。さらに培養環境の不備は胚のアポトーシス誘発，高酸素下における培養は酸化的 DNA 損傷を招く。IVF - ET における余剰胚の分析においても染色体異常が報告されている<sup>18)</sup>。一般に培養胚の良否は光学顕微鏡観察によ

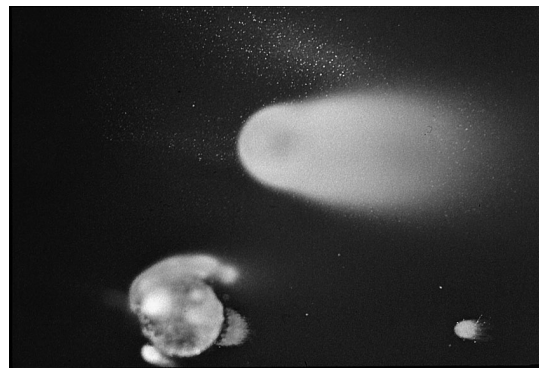


図5 DNA 損傷胚の COMET 泳動像

る胚形態で判断されることが多いが，胚盤胞段階の低分化胚では染色体損傷と胚形態の相関は明らかでない。今後は，精子のみならず，卵，胚においても分子生物学的手法を取り入れた臨床検査法の導入が必要である。

精子と異なり，生命であるヒト胚の DNA を侵襲的に評価することはできないため，ヒト胚に関する研究は困難を伴う。われわれは患者の同意を得て廃棄する分割不良胚の DNA 断片化を図 2 に示した COMET 法により観察した結果，高率に DNA 断片化像を認め，上述した報告を支持する結果を得ている。図 5 に DNA 損傷胚の COMET

泳動像を示した。

## 8．DNA 損傷精子排除と再生医学 - 良好ヒト胚盤胞の育成

1984年に培養皮膚を用いた熱傷患者の救命に成功し、欠損した組織の機能を培養組織で代替しようとする再生医療が脚光を浴びようになった。その研究を行う再生医学領域においては、幹細胞を用いた組織再生が注目されている。幹細胞とは、組織、器官を構成する分化細胞を生み出すとともに、自らを複製する能力を有する細胞である。多細胞生物の発生初期においてはすべての細胞種に分化し得る可塑性に富む未分化な多能性幹細胞が存在し、これを基に多様な組織、器官が形成される。1981年、3 5日マウス培養胚の内部細胞塊から樹立された<sup>19)</sup>embryonic stem cells (ES 細胞)が胎盤を除く全ての胚組織形成に参与することが明らかとなり、さらにこれを分化させた造血、神経、心筋細胞等をマウスに移植することにより組織再生の可能性が示唆された。

ES 細胞はその未分化なポテンシャルを維持したまま培養を行うことが可能であり、さらに培養環境を変化させることにより様々な方向性に分化誘導させることができる。発生、分化の基礎的研究に応用可能であり、さらに組織作成への夢が語られている。この細胞は無限増殖能を有するが、一般の株化細胞におけるような不死化、癌化は起こっていないと考えられている。

1998年にはヒト ES 細胞が樹立され<sup>20)</sup>、その分化制御研究の進歩はヒトにおける再生医療の夢を膨らませた。ヒト ES 細胞からドーパミン産生ニューロン(パーキンソン病)、インスリン産生細胞(糖尿病)、造血幹細胞(白血病)、心筋細胞(心筋梗塞)などに関する基礎研究は、移植医療におけるドナー不足問題と関連してその成果が期待されている。さらにクローン動物作成に用いられた体細胞核クローン胚技術は、免疫学的拒絶反応を呈さない自己 ES 細胞作出の可能性を示した。

しかし、研究の現状は、マウス以外では上述したヒトを含めメダカ、ニワトリ、ブタ等の動物に

においても ES 細胞樹立が報告されてはいるが、長期間維持培養することが困難である場合が多く、再現性良く ES 細胞を樹立するのは困難である。またマウスにおいても発生工学的研究応用に耐えうる ES 細胞が樹立できるのは特殊な近交系に限られ、ヒト ES 細胞を臨床に結びつける展開研究(translational research)にはまだ多くの問題がある。

再生医療に供するヒト胚盤胞は不妊治療における余剰胚が予定される。法的妥当性に基づき倫理委員会の承認を得て、胚盤胞を再生医学研究者に提供する。これまでヒト ES 細胞における問題点として、生命である胚を分解するという倫理的問題が論議されてきた。ヒト ES 細胞の樹立研究に際して内部細胞塊の染色体が正常であることが研究の前提となっている。しかし、本稿で述べたように、現状の ART 技術において得られたヒト胚には染色体損傷を有するものが混在している可能性がある。高品質 ES 細胞作出には、媒精に供するヒト精子および卵の DNA 損傷評価ならびに損傷配偶子の排除法の確立、培養環境における胚の DNA 損傷を回避する高精度培養技術の確立が良好胚育成に不可欠である。同時にこれらの研究は、不妊治療における妊娠率向上、児の健全性確保に必須である。

## 9．良好胚の育成を目的とした高精度培養システムの開発

これまで射精以前に生じた精子 DNA 損傷の評価と排除について述べてきたが、射精後の *in vitro* 精子操作、さらには培養環境における胚の DNA 保護についても留意しなくてはならない。図 5 に示したように分割不良胚に DNA 損傷が見られたことは、培養環境(培養装置、培養液)の最適化が重要であることを示唆している。以下に、われわれが行っている培養法高精度化への試みを紹介する。

一般にヒト胚培養は、株化細胞の長期継代培養を主目的として設計された CO<sub>2</sub>インキュベーターを使用している。CO<sub>2</sub>インキュベーターは培養液

交換時以外には扉を開閉しないことが使用の前提となっているが、IVFの臨床においては頻りに扉を開閉するためガス環境の維持が困難である。生殖細胞、特に胚は気相の酸素分圧にも配慮する必要がある。受精と胚の初期発生が起こる卵管の酸素分圧は低く、胚培養には5.0%CO<sub>2</sub>、空気ではなく、混合ガス(5.0%CO<sub>2</sub>、2.0-5.0%O<sub>2</sub>、90-93%N<sub>2</sub>)が用いられる。

われわれはヒト胚の低酸素培養を目的として、新たに培養装置を開発した。市販のCO<sub>2</sub>インキュベーターは全ての機能が一体となっており、カビ、細菌汚染すると滅菌が困難である。われわれの方法は、機器は温度制御のみを行い、湿度、ガス制御は着脱可能な容量500mlのミニボトルが担当する。培養容器がガラスおよび耐熱材料で構成され、300による超高温滅菌が可能である。ボトル内には予め調整した混合ガスを少量通気した。これによりCO<sub>2</sub>インキュベーターのガスセンサーは不要となり、センサー劣化によるガス濃度の誤差を考慮する必要がなくなった。患者ごとに1つのミニボトルを使用して容器の開閉を最小限とし、ガス環境の乱れを防いだ。さらに通常の培養系は細胞が接する液体を培養液と定義するが、本システムではボトル内に約220mlの補助培養液を入れ、環境全体がガス緩衝系を構成する。補助培養液は細胞培養液と同一のガス緩衝系を有し、温度、pH、湿度の維持に寄与する。CO<sub>2</sub>インキュベーターの基本的機能は培養液の温度、pHの維持である。われわれは精度管理を目的としてミニボトルにpHメーターの電極を設置し、補助培養液のpH、温度を常時モニターし、pH7.37-7.40、37.0-37.2を保持している。さらにミニボトルの開閉に際しては、ボトル内酸素パージを行っている。

市販の培養液は全成分を超純水に溶解して、浸透圧、pHなどを調整、ろ過滅菌して作成されるが、これまで保存中の成分安定性についてはあまり考慮されなかった。例外として、グルタミンは用時添加が行われてきた。初期胚の培養に繁用されるピルビン酸の水溶液中での半減期は数時間、

ペニシリンG、硫酸ストレプトマイシンの有効期限は数日間程度である。アミノ酸は分解するとアンモニアを生成する。

われわれは培養液中の保存性向上を目的として不安定成分を数群にモジュール化し、各々の最適条件下に調製、凍結保存した。用時、各モジュールを混合することにより初めて培養液を完成させ、調製後は72時間以内に使用している。成分保護の一例として、グルタチオンの安定化を挙げる。初期胚の活性酸素抵抗性にグルタチオンの有用性が報告されているが、グルタチオンは弱アルカリ水溶液中では不安定である。しかし、酸性下にシステイン、ビタミンCを共存させることにより安定性が向上する。そこで、これらをピルビン酸酸性下にpH4.5に調整して凍結保存した。

細胞外液の水素イオン濃度を一定に保つことは、homeostasis維持に最も重要である。エネルギー代謝における酸化還元過程は水素イオン濃度変化に敏感である。また両性電解質である蛋白質の立体構造や機能も水素イオン濃度に影響を受ける。細胞に対して低毒性なGood緩衝液であるHepesはpKaが7.4であり、Earle型培養液に10-20mM添加するとH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>-Hepes緩衝系を形成し、生理的pHである7.4付近で強力な緩衝能を発揮する。そこで、培養液にHepesを14.0mM添加し、さらに上述した補助培養液、ミニボトルを使用することにより、さらに培養液のpH安定性を向上させた。

#### ま と め

本稿は、ICSIにおける精子DNA障害の評価とそれを指標としたDNA損傷精子の排除の重要性について述べてきた。これまで不妊治療において、精子、胚は主として光学顕微鏡による形態観察により評価してきた。本研究は、それに加えてDNA等の分子生物学的評価が重要であることを示した。今後、研究をさらに展開し、卵、胚のDNA障害評価およびそれを指標とした*in vitro*における胚DNA保護を考慮した高精度培養システムの確立を目指したい。



本稿は、平成13年度東京歯科大学学長奨励研究報告として第274回東京歯科大学学会総会(平成14年10月19日、千葉)において発表した。

### 謝 辞

稿を終えるに臨み、本研究を学長奨励研究にご推薦くださいました石川達也学長、市川総合病院院長 高橋正憲教授に感謝します。また研究の推進にあたり、ご指導を賜った産婦人科部長田辺清男教授に厚くお礼申し上げます。

### 参 考 文 献

- 1) 上口勇次郎, 立野裕幸: 配偶子の染色体分析. 産婦実録, 43: 925~930, 1994.
- 2) 西田智保, 兼子智, 野澤資亜利, 岩本晃明: 若年男性集団における精子 DNA 断片化の解析. 聖マリアンナ医学雑誌, 29: 541~549, 2001.
- 3) Hansen, M., Kuriczuk, J. J.: The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. The New England J. Med., 346: 725~79, 2002.
- 4) Kamigushi, Y. and Mikamo, K.: An improved, efficient method for analyzing human sperm chromosome using zona free hamster ova. Am. J. Hum. Genet., 38: 724~740, 1986.
- 5) Brandriff, B., Gordon, L.: Chromosomes of human sperm: variability among normal individuals. Human Genet, 70: 18~24, 1985.
- 6) Martin, R. H., Ko, E., Rademaker, A.: Distribution of aneuploidy in human gametes; comparison between human sperm and oocytes. Am. J. Med. Genet., 38: 321~331, 1991.
- 7) Ohashi, Y., Miharu, N., Honda, H., Samura, O., Ohama, K.: High frequency of XY disomy in spermatozoa of severe oligozoospermic men. Human Reprod., 16: 10~106, 2001.
- 8) Gavrieli, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S. A.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J. Cell Biol., 119: 493~501, 1992.
- 9) Connell, M. O.: Mitochondrial DNA deletions and nuclear DNA fragmentation in testicular and epididymal human sperm. Human Reprod., 17: 1565~1570, 2002.
- 10) Okamoto S., Ochi, H.: Monoclonal antibody to 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and hybridomas producing the monoclonal antibody. Chemical Abst., 129859a
- 11) 兼子 智, 郡山 智, 木戸 進, 佐久間雄一, 富永英一郎, 中川博之, 田辺清男: 修正 TUNEL 法によるヒト精子核 DNA 損傷の組織化学的検出. 日不妊会誌, 47: 306, 2002.
- 12) 兼子 智, 郡山 智, 木戸 進, 佐久間雄一, 富永英一郎, 中川博之, 田辺清男: 修正コメット電気泳動法によるヒト精子核 DNA 2重鎖切断の観察. 第20回日本受精着床学会学術講演会抄録集, P101, 2002.
- 13) Kaneko, S., Oshio, S., Kobanawa, K., Kobayashi, T., Mhori, H., Iizuka, R.: Purification of human sperm by a discontinuous Percoll density gradient with an innercolumn. Biol. Reprod., 35: 1059~1063, 1986.
- 14) Hanabusa, H., Kuji, N., Kato, S., Tagami, H., Kaneko, S., Tanaka, H., Yoshimura, Y.: An evaluation of semen processing methods for eliminating HIV-1. AIDS, 14: 1611~1616, 2000.
- 15) Kuroda, Y., Kaneko, S., Matsuda, Y., Akihama, S., Nozawa, S.: Selective isolation of acrosome reacted human sperm with progressive motility by using cell affinity chromatography on concanavalin A Sepharose. andrologia, 28: 7~13, 1996.
- 16) Lim, A. S., Ho, A. T., Tsakok, M. F.: Chromosomes of oocytes failing in vitro fertilization. Human Reprod., 10: 2570~2575, 1995.
- 17) Nakaoka, Y., Okamoto, E., Miharu, N., Ohama, K.: Chromosome analysis in human oocytes remaining unfertilized after in vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate. Human Reprod., 13: 419~424, 1998.
- 18) Zenzes, M. T., Wang, P., Casper, R. F.: Chromosome status of untransferred (spare) embryos and probability of pregnancy after in vitro fertilization. Lancet, 340: 391~394, 1992.
- 19) Martin, G. R.: Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 7634~7638, 1981.
- 20) Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282: 1145~1147, 1998.