

生殖補助医療技術における ICSI/IMSI と紡錘体観察[†]

三宅 範夫

ICSI/IMSI and Spindle Observation in Assisted Reproductive Technology

Norio MIYAKE

生殖補助医療技術（ART: Assisted Reproductive Technology）の役割と、それを支える顕微鏡技術について紹介する。不妊症のカップルにとって ART は重要な選択肢であり、日本では2022年 4 月の不妊治療保険適用の開始以降、ART による新生児の割合が増加している。

ART は、卵子や精子、受精胚を扱い妊娠を支援する医療技術であり、顕微鏡を使用する体外受精（IVF）や卵細胞質内精子注入法（顕微授精、ICSI）、卵細胞質内形態選別精子注入法（IMSI）などを含んでいる。ニコンは ART の各ステップに対応する正立顕微鏡、実体顕微鏡、倒立顕微鏡を提供しており、ART プロセスを支援している。例えば、正立顕微鏡は精子の運動性や形態の観察に適しており、実体顕微鏡は卵子や胚の立体的な観察を可能にする。一方、倒立顕微鏡は ICSI/IMSI の際に精子や卵子の詳細な観察を行い、Nikon Advanced Modulation Contrast (NAMC) や微分干渉観察によりコントラストを向上させる。また、紡錘体観察では円偏光を利用し、卵子内の紡錘体の配置を把握することで受精率を高めている。

これらの光学技術は、ART プロセスの効率化と精度向上に貢献しており、医療現場での負担軽減と治療成果の向上につながっている。ニコンはこれらの技術開発を通じて、社会的課題を解決するため取り組んでいる。

This article introduces the role of assisted reproductive technology (ART) and the microscopic techniques supporting it. ART is an important option for couples facing infertility. In Japan, since the implementation of insurance coverage for infertility treatments in April 2022, the proportion of newborns conceived through ART has been increasing. ART encompasses medical techniques that assist pregnancy by handling eggs, sperm, and embryos, including in-vitro fertilization (IVF), intracytoplasmic sperm injection (ICSI), and intracytoplasmic morphologically selected sperm injection (IMSI), which rely on microscopes for precision.

Nikon provides specialized microscopes, including upright, stereo, and inverted microscopes, tailored for each step of the ART process. Upright microscopes are ideal for analyzing sperm motility and morphology, whereas stereo microscopes enable three-dimensional observation of eggs and embryos. Inverted microscopes facilitate detailed observation during ICSI and IMSI procedures and use technologies such as Nikon advanced modulation contrast and differential interference contrast to enhance image clarity. Furthermore, spindle observation using circular polarization helps to identify spindle positioning within the eggs, which improves the success rates of fertilization.

These optical technologies increase the efficiency and accuracy of ART processes, reduce the burden on medical professionals, and improve the treatment outcomes. Nikon contributes to addressing the societal challenges through these innovations.

Key words 生殖補助医療技術、体外受精、顕微授精、IMSI、紡錘体観察
assisted reproductive technology, in-vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection, intracytoplasmic morphologically selected sperm injection, spindle observation

1 はじめに

少子化は、日本にとどまらず各国が抱える深刻な課題となっている。出生率の低下が進むことにより、労働人口の減少、社会保障制度の破綻、経済成長の停滞など、社会的、経

済的な影響をもたらす。少子化の原因としてはさまざまな要因が挙げられ、子育て費用や教育費などの経済的な負担、女性の社会進出によるライフスタイルの変化、環境や健康問題に起因する不妊症の増加などである。特に子どもを望むにもかかわらず自然妊娠が難しい不妊症のカップルにとって、

[†] 本稿でご紹介している製品は、世界各国で販売されていますが、ここでは日本の法規制に基づいた技術的な説明を行っています。なお、地域によっては製品の発売状況、主な用途が異なる場合があります。

生殖補助医療技術（ART）は重要な選択肢となる。日本では、過去40年間で合計特殊出生率が減少し続けている [1]。一方で、生殖補助医療による新生児の割合は増加している。さらに2022年4月から不妊治療が保険適用され、人工授精などの一般不妊治療、体外受精・顕微授精などの生殖補助医療の件数が今後も増加することが見込まれる。

ニコンは生殖補助医療の歴史の中で常にアカデミアや医療機関と連携を図りながら医療現場に根ざした画期的な製品開発を進めてきた。最近では、生殖補助医療を支える胚培養士への負荷軽減を目指し顕微授精に特化した顕微鏡を提供している [2]。本稿では、生殖補助医療技術の概要とそれを支える顕微鏡技術を紹介する。

2 生殖補助医療技術（ART）

ARTとは、不妊症の治療や妊娠を支援するための医療技術を指し、妊娠を成立させるために人の卵子と精子、およびそれを受精させた胚を取り扱うことを含めた全ての治療あるいは方法の総称である。不妊の原因が男性側、女性側、あるいは双方にある場合でも、適切な技術を用いることで妊娠を目指す。排卵障害、卵管閉塞、子宮内膜症、精子の質の低下、免疫性不妊など幅広い原因に対応できる。顕微鏡が主要な役割を果たす体外受精（IVF）、卵細胞質内精子注入法（顕微授精、ICSI）や卵細胞質内形態選別精子注入法（IMSI）を用いれば、精子の運動性や数量が少ない場合でも妊娠の可能性を高めることができる。

ARTの主要なステップを Fig. 1 に示している。患者から採取した精子の選択から始まり、次に卵子の選択、受精、胚の育成など様々な診断や補助を経て、患者の体内に戻し、着床させるまでがARTの一連のサイクルである。

卵子の大きさは約 0.1 mm、精子は約 0.05 mm である。一般的に髪の毛一本の太さが約 0.05 mm から 0.1 mm なので、それと同程度と考えれば大きさをイメージしやすい。このARTの主要なステップでは、非常に小さな卵子や精子を扱うため、観察をサポートするツールとして顕微鏡が様々なワークフローで使用されている。

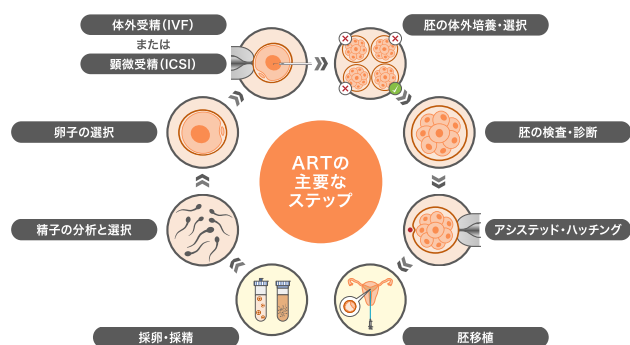


Fig. 1 ART サイクル

3 ART サイクルで利用される顕微鏡

採精、採卵から、受精、そして最終的な着床に向けた胚の選択にいたるまで、顕微鏡による観察はARTにおいて極めて重要な役割を担っている。ニコンでは、ARTの主要プロセスで利用される正立顕微鏡、実体顕微鏡、倒立顕微鏡の全てに利用可能な製品ラインナップを用意している。ここでは使用される顕微鏡の特徴とともに、付随する各ステップについて説明する。

3.1. 正立顕微鏡

ARTサイクルの“精子の分析と選択”において、精子が適切に機能しているか否かの判定のため、正立顕微鏡による位相差観察 [3] が用いられる (Fig. 2)。

位相差観察は、無色透明な観察対象に明暗のコントラストをつけて観察する手法のことである。薄い試料への検出感度が高く、精子の観察に適している。一方、厚みのある細胞に対しては、その輪郭にハロと呼ばれる現象が生じ、見えにくくなるため卵子の観察には向いてない。

精子の評価項目として、運動性、運動精子と不動精子の数量、精子濃度、形態などあり、比較的到低倍率で識別できる。異常が認められると、体外受精の成功率低下と関連するとされている。



Fig. 2 正立顕微鏡 ECLIPSE Si (左) と ECLIPSE Ci-L plus (右)

3.2. 実体顕微鏡

両眼に対応する左右独立したズーム光学系をもち、物体を左右の異なる方向から見ることにより、左右の眼で捉える像に違い（視差）が生じる。この視差を脳が処理し、物体の奥行きや立体感を認識できる。標本を加工することなく立体的に観察できるので、精密な作業に適している。このため“卵子の選択”、“胚の体外培養・選択”では実体顕微鏡が利用される (Fig. 3)。採卵後、卵子は検査され、受精に適したものが選択される。成熟した卵子は正常な胚として発育する可能性が高い。形態学的な特徴として、卵子のサイズ、極体の形態、透明帯の厚さなどが重要である。

胚の品質は一般に、定められた時点における分割数、サイズや形の規則性、多核化、液胞の存在などによって評価される。Figure 4 に正常胚と異常胚の例を示す。



Fig. 3 実体顕微鏡 SMZ1270 (左) と SMZ800N (右)

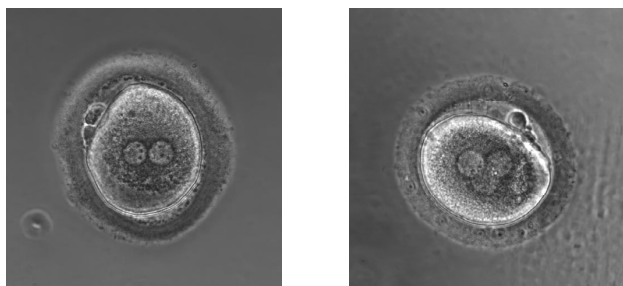


Fig. 4 多核化の例. 前核が2つの正常胚 (左), 前核が3つの異常胚 (右).

Image courtesy of Ronny Janssens, Centre for Reproductive Medicine, Brussels Free University, Belgium

3.3. 倒立顕微鏡

ART サイクルにおける受精には、“体外受精 (IVF)” と “顕微授精 (ICSI)” がある。ディッシュ容器の観察に適した倒立顕微鏡を用いて ICSI, IMSI と紡錘体観察が行われる (Fig. 5)。



Fig. 5 倒立顕微鏡 ECLIPSE Ti2-I (左) と ECLIPSE Ti2-U (右)

ICSI は、マニピュレーターとインジェクターを用いて精子を卵子の細胞質内に注入し、受精させる方法である。精子をインジェクターの先端に移動させ、ピント面で卵子への注入作業を行う。卵子の膜を穿破すると少量の細胞質が吸引されるので、精子とともに卵子へ再注入する (Fig. 6)。この際に20倍または40倍の専用対物レンズを使用して変調コントラスト [3], [4] により観察する。ニコンの場合は Nikon Advanced Modulation Contrast (NAMC) [5] により観察する。NAMC は、無色透明な細胞に陰影をつけること

により、立体感のある明暗のコントラスト像を得られる。後述する微分干渉観察に似た像質だが、プラスチックディッシュでも観察できるという利点がある。

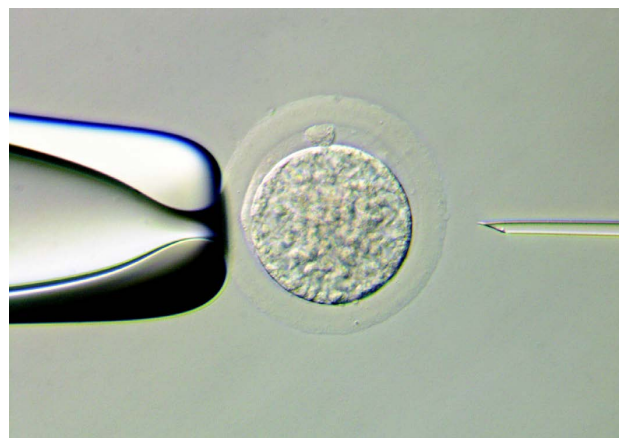


Fig. 6 ICSI におけるインジェクション

IMSI の目的は、ICSI で成功する可能性が最も高い精子を選択することである。原理的には微分干渉観察 [3], [6] と同じであり、無色透明な細胞を立体感のある像として観察する。偏光を利用しているため、プラスチックディッシュでは偏光が乱れるので観察できない。このためガラスボトムディッシュに入った精子を、高倍率で観察し、精子の核、空胞など小器官の微細な欠陥を検出・選別できる (Fig. 7)。60倍または100倍の対物レンズを使用する。

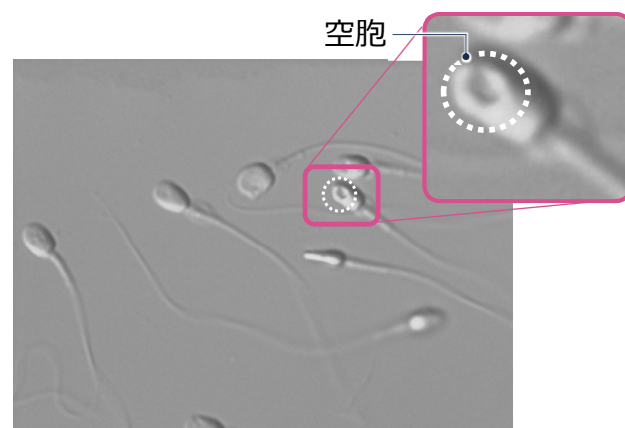


Fig. 7 IMSI 100x 対物レンズ使用時
画像ご協力：藤田医科大学

紡錘体には、細胞分裂時に染色体を正常に配置させる役割がある。よって、卵子における紡錘体の位置、形状を把握して ICSI を行ううえで紡錘体観察は重要である。紡錘体は、微小管からなる複雑な構造なため光学的な異方性を持ち、その方位に応じて屈折率が異なる複屈折がある。これは位相差観察、変調コントラスト観察、微分干渉観察ではとらえることが不可能であり、偏光観察 [6] を用いなければ見ることができない。さらに、常に存在しているわけではなく、通常、卵子の第一極体の近くに紡錘体は出現する (Fig. 8 (左))。ICSI では、紡錘体を傷つけないように、第

一極体が12時または6時の方位になるように配置し、3時の方向からインジェクションする。しかし、第一極体から離れたところに紡錘体が現れることもあり、このため紡錘体をどこにあるかを確認することが大事になってくる (Fig. 8 (右))。

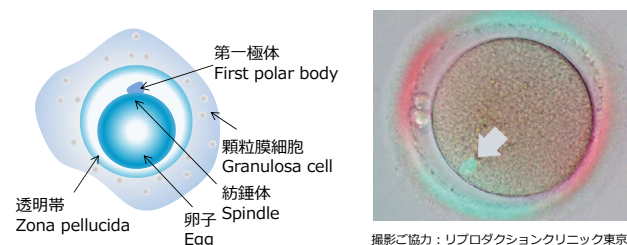


Fig. 8 紡錘体、卵子の模式図 (左)、紡錘体観察作例 (右)

Figure 9 にクリーンベンチ内でセットアップされた倒立顕微鏡の構成例を示す。顕微鏡の他にもマニピュレーター、インジェクター、温調のためのサーモプレート、胚の透明帯を薄く削るレーザーハッチング装置など様々な機器と連携している。Table 1 は、倒立顕微鏡における操作時の対物レボの対物レンズ倍率と作業をまとめた一例である。Table 1 にまとめたように多くの顕微鏡操作を行わなければならないが、卵子はインキュベーターから出るとストレスを受けるため、短時間で作業する必要がある。



Fig. 9 倒立顕微鏡のセットアップ例

Table 1 倒立顕微鏡の操作時の対物レボの対物レンズ倍率と作業例

対物レンズ倍率	作業例
4x	インジェクター、マニピュレーターのセッティング
10x	卵子の確認・選別
20x	ICSI、紡錘体観察
40x	ICSI、紡錘体観察
60x または 100x	IMSI
レーザー	胚のハッチング

4 ICSI/IMSI と紡錘体観察の光学原理

Figure 10 に示しているように手法に応じて、必要な光学素子を様々に切り替えていることがわかる。これは、コントラストよく卵子や精子を観察するために利用している光の性質が異なるからである。ここでは各手法の裏にある光学的な原理について説明する。

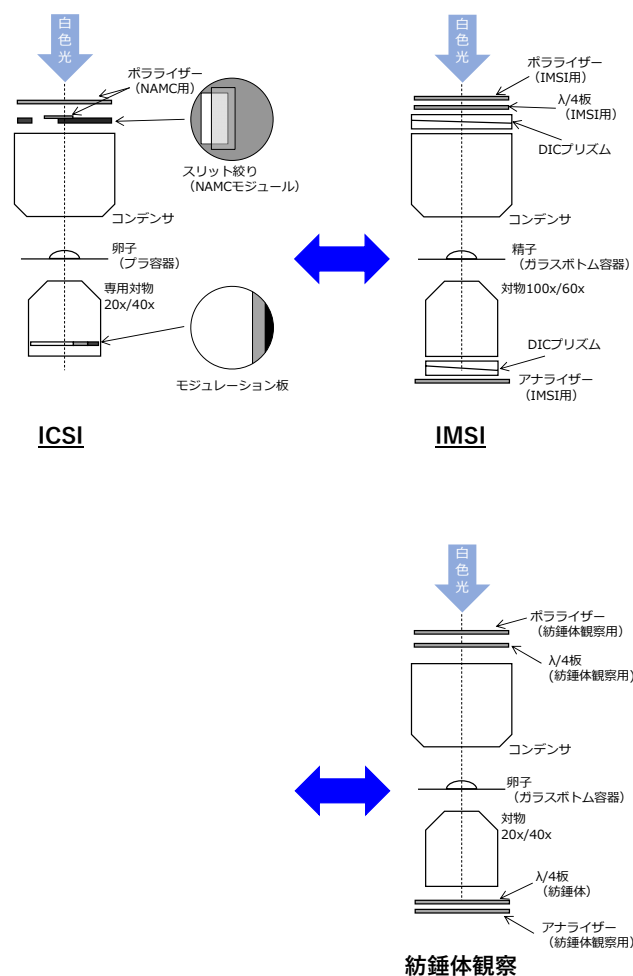


Fig. 10 各手法で必要となる光学素子の模式図

4.1. ICSI

光学的には、斜入射照明の一種である変調コントラストである (ニコンでは NAMC)。回転可能な偏光板、偏光板の付いたスリット絞り (NAMC モジュール) と内部にモジュレーション板を搭載した専用対物 (NAMC 対物) が必要な光学素子である。スリット絞りはコンデンサの前側焦点位置、モジュレーション板は専用対物の後側焦点位置 (対物瞳) に配置されている (Fig. 11 (左))。

NAMC モジュールのスリット外側の端面は、NAMC 対物のモジュレーション板の領域 a, b の境界に合うように調整する。光線が、NAMC モジュールを経て、卵子に斜めに入射後に屈折し、NAMC 対物の中のモジュレーション板における異なる透過率の領域 a, b, c を通過することにより、透過光に陰影 A, B, C が生じる (Fig. 11 (右))。ここで、モ

ジュレーション板の透過率は領域aが0%，領域cが100%，領域bはその中間である。この陰影により卵子にコントラストがついて立体感のある画像となる。NAMCモジュールを回転することで、卵子の陰影の方位を変えることができるが、モジュレーション板の方位も合わせなければならない。

コンデンサレンズの上部にある偏光板を回転させることにより、透過する光線の光量調整ができ、NAMCモジュールのスリット幅を変更できる。こうすることで卵子へ斜入射する光線の画角が変わるため、コントラストを変化させることができる。

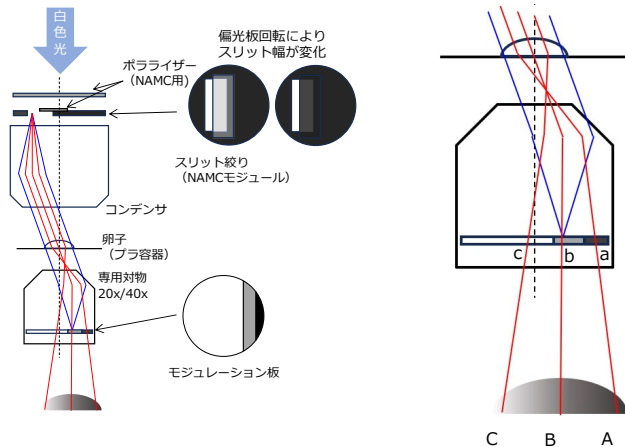


Fig. 11 NAMCの光学素子と光路 (左), コントラストのつく理由 (右)

4.2. IMSI

光学としては微分干渉観察である。光路のコンデンサ側に、ポライザー、 $\lambda/4$ 板、DICプリズム、対物側にDICプリズム、アナライザーの順に配置する。

調整手順として、まずポライザー、アナライザーのみ光路に入れ、それぞれの透過軸が直交したクロスニコルの状態にする。その後、コンデンサレンズと対物レンズに対応したDICプリズムを光路に入れる (Fig. 12 (左))。DICプリズムは、コンデンサの前側焦点位置、対物レンズの後側焦点位置 (対物瞳) に設置される。ニコンではポライザーと $\lambda/4$ 板は一体となっており、ポライザーの透過軸と $\lambda/4$ 板の進相軸の方位はクロスニコル時に一致している。ポライザーを回転すると、後述する理由によりコントラスト調整できる。

直線偏光が、コンデンサ側のDICプリズムに入射すると、偏光方向が直交し、かつ光軸に垂直に横ずれした2本の直線偏光になる (Fig. 12 (左))。2本の光線の横ずれをシヤ量と呼び、対物レンズの分解能より小さくなるよう設計されている。Figure 12 (右上) は、精子を透過後の2本に分離した光線の波面である。コンデンサ側に $\lambda/4$ 板があるため2本の光線にリタデーション Δ_0 がついている。Figure 12 (右下) は、対物側のDICプリズムを経て再び2本の光線

が統合された波面を示している。精子の表面形状に応じたリタデーション Δ_1 、 Δ_2 が生じていることがわかる。シヤ量と精子表面の傾きから精子の各部位のリタデーション Δ_1 、 Δ_2 が決定され、それぞれのリタデーションに相当する色の变化である干渉色に変換される。これにより精子に陰影が付きコントラストを得られる。バックグラウンドは $\lambda/4$ 板のリタデーション Δ_0 の干渉色と同じ灰色である。ポライザーを回転させることにより、リタデーション Δ_0 を微調できるため、コントラストを変化させられる。

DICプリズムへの光線入射時に、偏光を維持しなければならないため、プラスチック容器では観察できない。また、シヤ量が生じる方向にしかコントラストを検出できない。

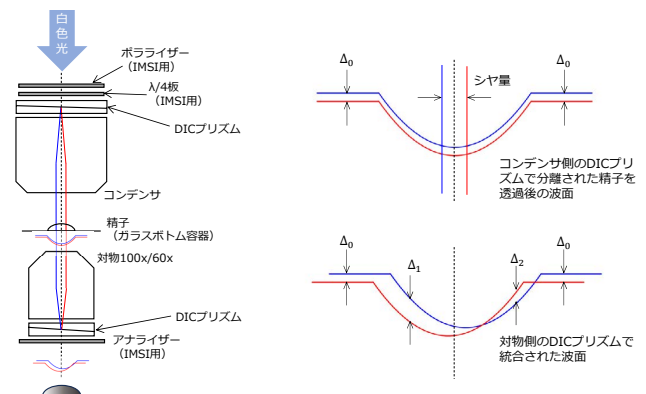


Fig. 12 DICの光学素子と光路 (左), コントラストのつく理由 (右)

4.3. 紡錘体観察

光学としては偏光観察であり、ニコンでは円偏光を採用している。光学的な異方性のある紡錘体に対して、色味をつけて可視化している。

偏光板、 $\lambda/4$ 板が一体となった光学素子をコンデンサ側、対物側に配置する。偏光板の透過軸、 $\lambda/4$ 板の進相軸の成す角は45度になっており、卵子に対して円偏光を入射する。卵子を透過後に、対物側の $\lambda/4$ 板、偏光板によって、円偏光を直線偏光に戻している。このとき、偏光板の透過軸と直線偏光は直交している (Fig. 13 (左))。

直線偏光でも紡錘体を見ることはできるが、円偏光による照明には、紡錘体をカラー化 (赤や青) できるメリットがある。赤や青に色づく理由は、 $\lambda/4$ 板が白色光の全ての波長域において完全に成り立っていないためである。一般的に、 $\lambda/4$ 板は基準波長 (ここでは緑色) においてリタデーションが波長の1/4となるが、基準波長からずれた赤、青の波長においては、リタデーションが波長の1/4からずれている。このため、赤、青の波長においては、コンデンサ側の $\lambda/4$ 板を透過後に楕円偏光となり、さらに対物側の $\lambda/4$ 板を経ても完全な直線偏光にならない。よって、最後の偏光板に対して楕円偏光で入射することになり、この際に赤、青の光が残存する (Fig. 13 (右))。また、コンデンサ側の光学素子の回転により、楕円偏光の長軸、短軸が入れ替わ

るため、対物側の偏光板を透過する赤、青の光線の強度も変化し、色味を変えることができる。

円偏光の利用により紡錘体を赤または青色として観察できるため、XY 平面において卵子を回転させても探しやすい。これが直線偏光であれば卵子の回転に応じて、紡錘体が白、黒あるいは見えなくなるため、探すのに時間がかかり、さらには見落とす恐れがある。

偏光板、 $\lambda/4$ 板の光学素子の間では偏光を維持しなければならないので、プラスチック容器の場合は観察できない。

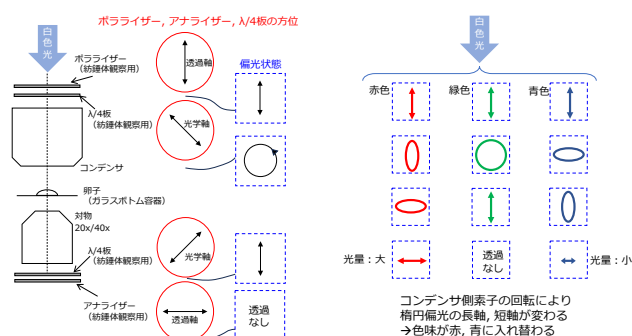


Fig. 13 紡錘体観察の光学素子と光路 (左), 赤・青の色味がつく理由 (右)

ここまで説明してきた各手法の像の特徴、分解能、コントラスト、容器について Table 2 にまとめる。

Table 2 ICSI/IMSI と紡錘体観察の光学的な特徴

	ICSI	IMSI	紡錘体観察
顕鏡法	変調コントラスト (NAMC)	微分干渉	偏光
像の特徴	陰影がつき立体感がある。陰影の方位を変更できる。	陰影がつき立体感がある。	複屈折を可視化する。
分解能	高い (スリット絞りのため微分干渉より低い)	高い	高い
コントラスト	高い	高い	高い (複屈折)
コントラスト調整	可 (偏光板の回転)	可 (偏光板の回転)	不可
適したサンプル	精子、卵子、胚	精子	卵子
容器	ガラス/プラスチック	ガラス (プラスチック不可)	ガラス (プラスチック不可)

5 まとめ

少子化が進む日本では、生殖補助医療技術 (ART) が重要な役割を果たしている。ART は、卵子と精子を扱い妊娠を支援する医療技術であり、体外受精 (IVF) や顕微授精 (ICSI) などさまざまなプロセスを含んでいる。ART サイクルの中で必須となる正立顕微鏡、実体顕微鏡、倒立顕微鏡と関連する光学技術を紹介した。特に、倒立顕微鏡での精密な操作を必要とする ICSI/IMSI では、変調コントラスト (NAMC) や微分干渉観察などの光学技術を活用している。また、紡錘体観察では円偏光を利用して卵子の中における紡錘体の配置を把握し、インジェクション時に避けることにより受精率の向上につながっている。今後も医療分野における技術革新を進め、社会問題である少子化の解決に寄与するための新たなソリューションを提供し続けたい。

引用文献

- [1] 厚生労働省, “令和 4 年 (2022) 人口動態統計 (確定数) の概況,” 2022. [オンライン]. Available: <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai22/dl/kekka.pdf>
- [2] 株式会社ニコン, “ECLIPSE Ti2-I 製品ページ,” [オンライン]. Available: https://www.microscope.healthcare.nikon.com/ja_JP/products/inverted-microscopes/eclipse-ti2-i
- [3] S. Bradbury and P. Evennett, *Contrast Techniques in Light Microscopy*, Oxford: Oxford University Press, 1996.
- [4] R. Hoffman and L. Gross, “Modulation Contrast Microscope,” *Applied Optics*, vol. 14, no. 5, pp. 1169–1176, 1975.
- [5] 松為久美子, “顕微授精用変調コントラスト顕微鏡および変調コントラスト顕微鏡,” 日本特許番号: 5338677.
- [6] P. C. Robinson and S. Bradbury, *Qualitative Polarized Light Microscopy*, Oxford: Oxford University Press, 1992.

三宅 範夫 Norio MIYAKE
光学本部 第一設計部
1st Designing Department
Optical Engineering



三宅 範夫
Norio MIYAKE