

ISSN 0029-0629 CODEN:NFGZAD

Japanese Journal of Fertility and Sterility

日本不妊学会雑誌

Vol.48 No.1·2 April 2003

第48卷 第1·2号 平成15年4月1日

Jpn. J. Fertil. Steril. / 日不妊会誌

第48回日本不妊学会総会および学術講演会

(第2回予告)

日本不妊学会総会および学術講演会を下記の要領にて開催いたしますので、ふるってご参加頂きますようお願い申し上げます。

記

I. 期 日：

平成15年9月30日(火) 理事会, 幹事会

10月1日(水) 学術講演会(一般演題, 招請講演, 特別講演)
評議員会, 総会

2日(木) 学術講演会(シンポジウム, ワークショップ, ビデオセッション), 総懇親会

3日(金) 第21回日本受精着床学会・学術集会

※2日(木)の学術講演会と総懇親会は, 第21回日本受精着床学会・学術集会と合同で行う予定です。

II. 会 場：

品川プリンスホテル

〒108-8611 東京都港区高輪4-10-30

TEL: 03-3440-1111 URL: <http://www.princehotels.co.jp/shinagawa>

III. 学術講演会予告：

(最新情報は学会ホームページ<URL: <http://www.jsfs.or.jp>>をご参照下さい)

招請講演

1. David M. de Kretser (Monash University, Australia)
演題: The Genetics of Male Infertility: Recent Advances and Future Direction.
2. Wolf-Bernhard Schill (University of Giessen, Germany)
演題: Sperm Functions and ART.
3. Antonio Pellicer (University of Valencia, Spain)
演題: Pathophysiology of Ovarian Hyperstimulation Syndrome.

特別講演

- 森 千里 (千葉大学大学院医学研究院環境生命医学教授)
演題: 胎児の複合汚染とその対策

シンポジウム

1. 精液検査の標準化

座長：岩本 晃明（聖マリアンナ医科大学泌尿器科教授）

年森 清隆（宮崎医科大学解剖学第1教授）

2. STDと不妊症

座長：野口 昌良（愛知医科大学産婦人科教授）

塚本 泰司（札幌医科大学泌尿器科教授）

3. 反復不成功例に対する対応

座長：田中 温（セントマザー産婦人科医院院長）

加藤 修（加藤レディースクリニック院長）

4. ARTに関連した最新技術

座長：鈴森 薫（名古屋市立大学医学部産科婦人科教授）

奥山 明彦（大阪大学大学院医学系研究科器管制御外科教授）

5. 卵子・精子機能と受精現象

座長：石川 睦男（旭川医科大学産婦人科教授）

布施 秀樹（富山医科薬科大学医学部泌尿器科教授）

オルガノン・スポンサード シンポジウム

High Quality Egg & Embryo

座長：武谷 雄二（東京大学大学院医学系研究科産婦人科教授）

吉村 泰典（慶應義塾大学医学部産婦人科教授）

ビデオセッション

私の工夫：手術

座長：三浦 一陽（東邦大学医学部第1泌尿器科教授）

星合 昊（近畿大学医学部産科婦人科教授）

ワークショップ

1. EBMからみた不妊治療

座長：吉田謙一郎（獨協医科大学泌尿器科教授）

神崎 秀陽（関西医科大学産科婦人科教授）

2. 畜産領域の最先端

座長：上口勇次郎（旭川医科大学生物学教授）

横山 峯介（三菱化学生命科学研究所）

モーニングワークショップ

1. エンブリオロジスト

2. 不妊カウンセラー

第8回男性不妊症手術手技フォーラム

ART FORUM '03

IV. 一般演題募集要項：

演題応募は、インターネット受付のみとなっております。

学会ホームページ<URL: <http://www.jsfs.or.jp>>より、ご応募下さい。

練習期間：平成15年3月19日（水）～

応募期間：平成15年4月1日（火）正午～平成15年5月22日（木）正午迄

V. 参加申込方法

学会当日、会場にて受け付けます。(事前登録はありません。)

受精着床学会との合同参加費：15,000円

不妊学会のみの参加費：10,000円

受精着床学会との合同懇親会参加費：6,000円【10月2日（木）】

VI. 品川プリンスホテル宿泊案内・宿泊申込書

本号巻末に掲載しております。

平成15年4月1日

第48回日本不妊学会総会および学術講演会

会長 伊藤 晴夫

連絡先：千葉大学大学院医学研究院遺伝子機能病態学（泌尿器科）

〒260-8670 千葉市中央区亥鼻1-8-1

Tel 043-226-2134/Fax 043-226-2136

E-mail funin@urology1.m.chiba-u.ac.jp

平成 15 年度会費納入のお願い

会 員 各 位

同封いたしました郵便払込用紙にて、平成 15 年度会費 8000 円を納入いただきたくお願い申し上げます。

健全な学会運営のために、早めにお手続き賜りたく存じます。
よろしくお願い申し上げます。

注 1 会費納入の手続き不要の会員

- 名誉会員
- 寄贈会員
- 賛助会員（後日請求書送付）
- 購読会員（後日請求書送付）
- 既に平成 15 年度分を納入されている会員
- 平成 15 年 4 月 1 日以降に入会された会員

注 2 過年度会費を滞納されている会員

- 未納分と合わせてお支払いください
- 2 年以上滞納されますと除名となります

注 3 お問合せにつきましては、下記学会事務局の E-mail または FAX にてお願い致します。

以上

(社) 日 本 不 妊 学 会

〒102-0083 東京都千代田区麹町 5-2 K-WING 3 階

TEL 03-3288-7266/FAX 03-5275-1192

E-mail : info@jsfs.or.jp

平成 14 年度第 2 回通常総会議事録

日 時 平成 14 年 10 月 3 日 (木) 13:25~13:55

場 所 岐阜市：長良川国際会議場

開会当時の会員数 4,095 名 当日の出席会員数 2,108 名 (含委任状)

議事経過およびその結果

定款第 26 条に基づき、伊藤晴夫理事長が議長となり、「出席会員数は、委任状を含め 2,108 名であり、定款 28 条に定める定足数を充足し、本総会は成立した。」旨発言し、開会。議事録署名人に、田原隆三・市川智彦の 2 名を選出した後、次の議案を順次審議した。

議事

第 1 号議案：平成 15 年度事業計画および予算案について
久保庶務担当理事より平成 15 年度事業計画について説明が行われ、続いて小林会計担当理事より予算案について説明された。全会一致で承認された。

第 2 号議案：役員改選について
各支部より推薦された新役員、定款評議員、名誉会員および功労評議員について説明を行い、全会一致にて承認された。被選任者は全員その就任を承諾した。新役員は下記の通りである。

理事 伊藤晴夫 石川陸男 今井 裕 井上正樹 遠藤 克 岡村 均
大濱紘三 守殿貞夫 久保春海 武谷雄二 田中俊誠 玉舎輝彦
寺川直樹 中村幸雄 永田行博 野田洋一 三浦一陽 水谷栄彦
森澤正昭 吉村泰典

監事 佐藤和雄 田中啓幹 小林俊文

第 3 号議案：名誉会員について
今年度は関東支部より、毛利秀雄先生、平川舜先生、中国四国支部より、青野敏博先生、計 3 名の推薦があり、理事長より各々の不妊学会における業績について述べた。原案通り全会一致で承認された。

第 4 号議案：功労評議員について
今年度は各支部より功労評議員に 7 名の推薦があり、原案通り全会一致にて承認した。

第 5 号議案：平成 17 年度第 50 回日本不妊学会総会および学術講演会開催地について
平成 17 年度学術講演会および総会開催地ならびに会長は、下記の通り推薦があり、理事会および評議員会の原案通り全会一致で承認された。

平成 17 年度 担当支部 九州支部
会 長 岡村 均

開催地 熊本県

第6号議案： 平成14年度学術奨励賞について

学術奨励賞選考委員会より推薦された下記3名に平成14年度日本不妊学会学術奨励賞を授与することを全会一致にて承認した。また、学術奨励賞選考規定について一部改定する提案をし、原案通り全会一致で承認された。

武内 裕之「Transvaginal Hydrolaparoscopyによる骨盤腔内の評価—腹腔鏡所見と比較して—」

順天堂大 産 (第46巻2号13頁)

豊嶋 豊照「特発性無精子症における変異型LH-βの頻度、—正常例との比較—」 獨協医大 泌 (第46巻2号7頁)

小島 聡子「Testicular germ apoptosis in Bcl6-deficient mice」

千葉大 泌 (Development 128巻1号57頁)

第7号議案： 定款細則に各委員会について追記する件について

現在の定款細則に委員会について述べられていないため、各委員会の存在を明確にするため目的で追記することを理事会で審議した旨を報告した。全会一致で承認された。

第8号議案： 生殖医療従事者資格制度について

岡村担当理事より生殖医療従事者資格制度規約(案)、生殖医療コーディネーター制度、胚培養士認定制度についての説明が行われた。また、看護協会との協議の経過、看護協会の不妊専門看護師の制度などについて説明された。本学会として社会的にアピールをすることが最大の目的であることを強調した。また、本認定制度についての構想、現在の検討事項について説明をした。多数の検討事項があるが、提出された規約は理事会にて審議の結果承認された旨を報告し、総会において本件について諮り、全会一致で承認された。

以上をもって、すべての議事を終了し、議長は閉会を宣し散会した。

以上の議決事項を証するため、この議事録を作成し、定款第30条に基づき、議長ならびに本日の出席者代表たる2名の議事録署名人において署名押印する。

平成14年10月3日

社団法人日本不妊学会 平成14年第2回通常総会

議長 伊藤 晴 夫

議事録署名人 田原 隆 三

同 市川 智 彦

理事・監事

理事長 伊藤晴夫
副理事長 岡村 均 守殿貞夫 武谷雄二
常任理事 遠藤 克 久保春海 中村幸雄 野田洋一 吉村泰典
理 事 石川陸男 井上正樹 今井 裕 大濱紘三 田中俊誠 玉舎輝彦
寺川直樹 永田行博 三浦一陽 水谷栄彦 森澤正昭
監 事 小林俊文 佐藤和雄 田中啓幹

幹 事

浅井光興 安部裕司 安藤一道 安藤寿夫 安藤 索 石川博通
石田 肇 石塚文平 石原 理 市川智彦 井上善仁 苛原 稔
岩本晃明 遠藤俊明 岡田 弘 押尾 茂 齐藤英和 柴原浩章
生水真紀夫 末岡 浩 田中信幸 田原隆三 堤 治 藤間芳郎
永尾光一 新村末雄 福田 淳 藤原 浩 南直治郎 横山峯介

評 議 員

下記 477 名の会員の皆様に、平成 15 年 1 月 1 日より平成 16 年 12 月 31 日まで評議員を委嘱いたします。本紙面をもって委嘱状といたします。

(○印は定款評議員)

北海道支部 (40 名)

東 口 篤 司	石 島 芳 郎	伊 藤 直 樹	伊 藤 雅 夫
遠 藤 俊 明	岡 部 泰 樹	片 桐 成 二	上 口 勇 次 郎
神 谷 博 文	工 藤 正 尊	工 藤 隆 一	小 柳 知 彦
○櫻 木 範 明	佐 藤 邦 忠	澤 向 熊 直 一	千 石 田 哲 雄
高 岡 康 男	○高 橋 芳 幸	田 熊 中 昭 一	武 田 手 健 一
立 木 仁 均	立 野 裕 幸 司	野々 村 克 重	玉 手 賀 宏 賢
丹 田 美 穂	塚 本 征 一 郎	松 崎 好 政	芳 賀 名 瀬 幸 紀
藤 井 國 雅 人	藤 本 澤 清 俊	森 好 田	山 下 田 真 一 郎
三 山 本 律	宮 吉 田	吉 田	和 田

東北支部 (34 名)

市 川 文 隆	太 田 博 孝	岡 村 州 博	小 田 隆 晴
鍵 谷 昭 文	片 寄 治 男	金 杉 浩 浩	木 村 正 英 一
木 村 行 雄	○倉 智 博 久	呉 竹 昭 治	児 玉 藤 幸 弘
齊 藤 晃 明	笹 川 五 次 宏	佐々 田 比 呂 志 司	○佐 寺 藤 井 上 田
○佐 藤 英 久 子	佐 藤 和 宏 樹	鈴 木 谷 川 史 郎	村 吉 田
東 梅 久 郁 夫	永 井 沼 英 樹	中 光 吉	○村 吉 田
前 原 浩 之 弘	水 柳 田 裕 一		
矢 沢 松 宣	和 田		
吉 松	和 田		

関東支部 (154 名)

合 阪 幸 三	明 楽 重 夫	味 香 勝 也	○麻 生 武 志
○安 達 知 子	○安 池 部 本 庸	荒 井 木 重 雄	荒 石 木 延 勤
池 内 隆 夫	池 本 田 肇	石 塚 坂 惠 一	市 川 上 正 光
石 川 博 治	石 伊 藤 元 博	○石 稻 葉 文 憲 雅	井 井 下 島 橋
伊 藤 木 保 明	伊 岩 崎 村 次 亨	岩 上 大	○岩 内 大
○岩 梅 田 隆	植 太		

弘久一彦昭子宗彦兵彦雄人郎行晴男夫生一美亮樹一薰重滋雄恣寿郎

雅高喜俊直淳善正嘉幸正寬耕一俊政清捷光孝和史健英文英謙

野田山下慈島林賀藤塚野藤木下島辺端居山口原谷岡本田丸沼中田

荻小金木久黑小佐佐塩神須高竹田田津中野島平古正松箕持柳山吉

一茂進之司郎行裕豐勝裕悦吉彌悼夫治慶男人夫彦英之史敬登人哲淳

莊勝宏俊重良和啓理久忠一眞正俊泰清基兆峰

永尾山下具田寺藤部村須木賀内島中橋野田口屋井田岸崎田野田

冲押片木久久保小斎雀澤白鈴多竹田田堤土中西畑樋古正松峯目森矢吉

津夫幸夫三志昭仁茂昭章男英臣省一貴人一博正啓彦久浩樹郎之彦緑堯

惠尚久信裕武基芳芳浩和宗雅憲明耕正幸哲恒正直一宏洸

永田木村下保山藤木藤原村谷山田中村木島島嶽畑野島橋井水沢妻

冲長可河木久小杉近佐佐柴杉関高竹田田栃中西野原古牧松三村森安吉我

子男学智親二男顕樹道生浩利治樹一三彦一雄朗彦信彦夫樹彦夫忠介機

詔久英浩昭秀孝吉守真直賢隆章光末志和和英豊幹恒峯英

田倉原子下原平宮元藤関岡波下巳原江尾村澤川崎沼崎枝崎山田

岡小貝兼木楠公小坂佐始末関高竹辰田徳永新野林広星間水宮百矢横吉

夫司郎彦康悟

克啓健信長

田倉沼田

生小郡菅豊堀

夫之裕夫忠夫

中部支部 (29名)

興志一生利良
光篤俊郁正昌
井井谷西木口
浅今小小鈴野

彦博一一薰治
俊康洋昌征
奈川倉木森田
比田倉々森田
朝宇金佐鈴花

安大金澤辻藤
藤西山田井田
寿裕尚富弘公
夫之裕夫忠夫

中国四国支部 (48名)

東	敬次郎	井	川	幹	夫	池	谷	東	彦	伊	藤	武	久
伊	藤	稻	井	克	徹	苛	原	原	稔	岩	部	富	夫
上	田	上	田	克	憲	確	井	正	亞	香	川	清	征
笥	一	加	藤	裕	紘	鎌	岡	裕	晴	川	田	秀	彌
工	善	公	文	健	巳	栗	橋	久	子	己	斐	博	豐
河	尚	高	橋	太	郎	高	井	康	壽	瀧	原	敏	史
内	一	奈	賀	郎	脩	永	村	孝	敦	中	尾	皓	彦
中	克	中	原	滿	省	中	谷	長	彦	丹	羽	敬	二
秦	幹	原	田	滿	彦	深	田	雅	夫	福	井	保	介
堀	利	前	川	省	二	前	岡		正	見	尾	政	幸
宮	俊	宮	崎	久	久	森	山		均	森	岡	信	明
山	修	山	本	泰		横			好	吉	田		隆

九州支部 (49名)

○石	丸	忠	之	伊	是	名	博	之	市	丸	俊	三	井	上	善	仁
岩	坂	幸	剛	宇	津	宮	隆	史	江	上	り	か	沖	村	利	通
長	田	哲	夫	尾	上	林	敏	一	金	澤	浩	二	嘉	池	敏	治
河	野	加	郎	瓦	久	本	比	古	藏	本	武	志	小	沖	弘	幸
小	島	代	子	佐	中	中	郎	郎	鮫	島	哲	郎	角	田	久	夫
竹	内	一	浩	田	枝	村	温	温	田	中	信	幸	津	川	知	輝
堂	地	仁	勉	戸	富	後	保	保	友	成	康	平	中	原	昌	之
中	野	和	雄	○中	廉	大	一	一	中	村	雅	弘	榑	田	久	司
南	里	政	成	納	貴	志	正	正	野	崎	雅	裕	野	下	進	士
東	施	正	弘	肥	大	郎	史	史	野	野	隆	一	藤	浦	講	晃
布	尾	德	樹	堀	志		藏	藏	崎	野	英	明	松	元	慎	平
松	氣	德	勇	宮	内		郎	郎	增	崎	明		山			一
和			夫						森	崎						

平成 15 年度日本不妊学会学術奨励賞について

選考規定に準ずる論文を対象に、平成 15 年度日本不妊学会学術奨励賞の推薦を受付けます。

推薦資格は、本学会理事、評議員、大学教授、学会誌レフリーに限ります。

推薦は、次々頁の所定の書式をご利用下さい。

予備選考委員会および選考委員会で推薦された論文の中から 3 編の授賞論文を決定します。授賞論文の筆頭著者には賞状と副賞として日本オルガノンより奨励金 50 万円を各々に授与します。

ご不明な点は、学会事務局へお問い合わせください。

〔推薦書締切日〕 平成 15 年 5 月末日

〔推薦書送付先および問い合わせ先〕

社団法人日本不妊学会事務局

〒102-0083 東京都千代田区麹町 5-2 K-WING 3F

TEL : 03-3288-7266 FAX : 03-5275-1192

E-mail : info@jsfs.or.jp

日本不妊学会学術奨励賞選考規定

1. 対象論文
 - ①前年度本学会誌（不妊学会誌または Reproductive Medicine and Biology）掲載原著論文。
 - ②前年度上記以外（国内外を問わず）に掲載された原著論文。但しその内容の大部分または全てが不妊学会に発表されており、その抄録を添付する。また、学会発表と雑誌掲載の時期の前後は問わない。但し、地方部会は除く。
 - ③年齢は 45 歳以下のもの
2. 推薦方法
自薦または他薦
他薦は本学会の理事、評議員、大学教授（会員）、学会誌レフリーが推薦する。
3. 選考方法
予備選考委員会で予め推薦論文より候補論文を選考し、この候補論文の中から選考委員会が授賞論文を決定する。
 - ①予備選考委員会は学術委員長を委員長とし、編集委員会委員長、学術・編集担当幹事、代表幹事を以て構成する。
 - ②予備選考委員会で 3 部門より各々数編の授賞候補論文を選出する。
 - ③選考委員会では理事長を委員長とし、副理事長、学術・編集担当理事を以て構成し、代表幹事は選考委員会に陪席し事務事項を担当する。
 - ④専門分野に分けて審査を行う。
4. 賞
本学会より賞状を授与する。また副賞として、日本不妊学会オルガノン学術奨励賞賞状および学術奨励金 50 万円を授与する。
5. 公表
総会において授与し、総会後に発刊する号にて受賞論文および氏名を公表する。

日本不妊学会学術奨励賞推薦書

日本不妊学会理事長 殿

下記の論文を日本不妊学会学術奨励賞に推薦いたします。

(論文名)

日本不妊学会雑誌 第 47 巻__号__～__頁 (平成 14 年__月)

雑誌名__第 巻__号__～__頁 (平成__年__月)
(不妊学会以外の雑誌に掲載されている場合)

(筆頭著者名)

(筆頭著者生年月日)

____年__月__日

(推薦理由)

平成 年 月 日

推薦者所属・現職

氏名

印

会 員 各 位

『Reproductive Medicine and Biology』 投稿のお願い

本雑誌の発展のために、論文のご投稿をお願い致します。

投稿規定および投稿申込書は日本不妊学会公式ホームページよりプリントアウトができますので、そちらをご利用くださいますようお願い申し上げます。

(日本不妊学会ホームページ：<http://www.jsfs.or.jp>)

平成 15 年 3 月末日

理 事 長 伊 藤 晴 夫
編 集 委 員 長 遠 藤 克

日本不妊学会雑誌

第48巻 第1・2号

平成15年4月1日

—目 次—

原 著

- 生殖補助医療（ART）における良好胚選別を目的とした前核期評価の新基準
.....伊藤嘉奈子..... 1
- ICSIでの卵巣刺激周期から採取された未成熟卵子から得られた成熟卵の胚発生能の検討
.....西 美佐・豊北美穂・原 直範
山崎裕行・生水真紀夫・道倉康仁..... 11
- 新しく開発された培養液 HFF99 のヒト体外受精への臨床応用
.....平井香里・宇津宮隆史・荒木康久..... 17
- 採卵術における麻酔の必要性に関する検討—短時間全身麻酔の試み—
.....守田道由・詠田由美・池上芳美
古賀裕紹・渡辺久美・奥野加奈子・石田弘美..... 23
- 体外受精反復無効例に対する hatching stage 胚移植の試み
.....長木美幸・宇津宮隆史・荒木康久..... 27
- 体外受精において生じた大型1前核を持つ異常受精胚
（IPN）の胚盤胞到達率とその染色体核型について
.....佐藤晶子・大津英子
長木美幸・宇津宮隆史・荒木康久..... 33
- 不妊因子が卵管上皮細胞の培養に与える影響
.....熊迫陽子・宇津宮隆史・阿部宏之・荒木康久..... 41
- 遺伝子組換え卵胞刺激ホルモン（Org 32489）を用いた調節卵巣刺激
—日本人女性を対象とした前向きオープン多施設共同試験：
日本と外国の IVF 試験の比較
.....久保春海・竹田 省・木下勝之
本山洋明・小林真一郎・森本義晴..... 49
- 子宮頸部腺癌初期病変で円錐切除のみで follow up した3症例
—頸部腺癌でも円錐切除後妊娠が可能か—
.....吉田 耕治・倉橋 敦也・松浦 祐介・石 明寛
柏村 正道・上平 謙二・小山祐之介・吉武 英憲..... 61
- 地方部会講演抄録 69

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 48, No. 1 · 2, 2003)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Originals

- Establishment of Novel Criteria to Select of Viable Embryos Via
So-Called "Pronucleus Assessment" in ART
.....K. Ito..... 1
- Embryo Formation from Immature Oocytes Retrieved in Superovulation Cycle After
In Vitro Maturation and Fertilization by Intracytoplasmic Sperm Injection
.....M. Nishi, M. Toyokita, N. Hara
H. Yamasaki, M. Syozu & Y. Michikura..... 11
- Clinical Application of a New Medium Product of "HFF99" to Human *In Vitro* Fertilization
.....K. Hirai, T. Utsunomiya & Y. Araki..... 17
- The Necessity of General Anesthesia for Oocytes Recovery
.....M. Morita, Y. Nagata, Y. Ikegami
H. Koga, K. Watanabe, K. Okuno & H. Ishida..... 23
- The Efficiency of Hatching Stage Embryo Transfer in Multiple
Failures in *In-vitro* Fertilization and Embryo Transfer
.....M. Nagaki, T. Utsunomiya & Y. Araki..... 27
- The Rate of Blastocyst Formation and The Chromosomal Karyotype of Abnormal
Fertilized Embryos with The Bigger Single Pronucleus *in vitro* Fertilization
.....A. Sato, E. Otsu,
M. Nagaki, T. Utsunomiya & Y. Araki..... 33
- Influence of the Fallopian Epithelial Cells Growing *In Vitro* Culture by Infertile Aspects
.....Y. Kumasako, T. Utsunomiya, H. Abe & Y. Araki..... 41
- An Open Prospective Multicentre Study in Pituitary Suppressed Japanese
Women Undergoing Controlled Ovarian Hyperstimulation with
Recombinant Follicle-stimulating Hormone (Org 32489)
to Compare Japanese and European IVF Results
.....H. Kubo, S. Takeda, K. Kinoshita
H. Motoyama, S. Kobayashi & Y. Morimoto..... 49
- Follow up Study in 3 Patients with Early Cervical
Adenocarcinoma After Conization Alone
—Can They Become Pregnant After Conization? —
.....K. Yoshida, A. Kurahashi
Y. Matsuura, M. Seki, M. Kashimura,
K. Uehira, Y. Koyama & H. Yoshitake..... 61

生殖補助医療 (ART) における良好胚選別 を目的とした前核期評価の新基準

Establishment of Novel Criteria to Select of Viable Embryos Via So-Called "Pronucleus Assessment" in ART

伊 藤 嘉奈子
Kanakano ITO

東邦大学医学部第1産婦人科学教室
First Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University School of Medicine,
6-11-1 Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo 143-8541, Japan

ARTにおける移植胚の精度の高い判定基準を確立する目的で、前核期における新しい評価法を考察し検討した。

75症例78周期491個の胚の前核期評価を行った。判定基準は、両前核の大きさが[同じ(A)、異なる(B)]、両前核間距離が[密に接着(a)、辺縁のみ接着(b)、開離している(c)]、核小体の大きさ、分布、数が[同期状態(5)、同期過程にある(3)、非同期状態(1)]と評価した。

桑実胚/胞胚発育率は、(A)、(a)または(b)、そして(5)と評価された胚が有意に高かった。妊娠率は、(a)または(5)を移植胚中に含む症例において有意に高かった((a)あり83.3% vs (a)なし25.9%, $p < 0.05$, (5)あり81.5% vs (5)なし19.6%, $p < 0.05$)。次に移植胚が2個とも分割期形態不良胚(Veeck分類3~5)の症例を前核期評価で後方視的に妊娠率を再検討した。その結果、(5)を含んでいた場合が含まない場合より、また移植胚が2個とも分割期形態良好胚の症例では、(a)を含む場合が含まない場合より有意に高かった。

我々の考察した前核期胚評価法のみでも高精度な良好胚選別効果が期待できるが、さらにVeeck分類と本評価法を組み合わせることで2段階で胚選別を行うことで、従来、移植胚の選択に困難を感じた場合においても本法は有用であると思われる。

キーワード：前核期評価、核小体、妊娠率、体外受精、顕微授精

(日不妊会誌 48:1-9 2003)

緒 言

ARTにおける臨床成績向上の要点は、生存性の高い胚(以下良好胚)を正確に見分け、それを移植に用いることである。

臨床的に最も多く利用されているのは分割期初期胚における発育速度、割球形態と割球フラグメンテーション(fragmentation)の割合を指標とした胚評価法であり、現時点で妊娠率向上に一定の貢献をしている。

しかし日本産科婦人科学会による平成11年度の生殖医学登録報告¹⁾によると通常の体外受精 conventional in vitro fertilization (conv. IVF)、顕微授精 intracytoplasmic sperm injection (ICSI) による新鮮胚移植周期における妊娠率はそれぞれ21.2%、20.2%に留まっており、妊娠症例に対する流産率もconv. IVF、ICSIでそれぞれ21.2%、28.7%と自然妊娠と比較して高率である。これらの数字は、現在多くの施設で用いられている分割期における形態的胚評価法の限界であると考え

られる。

これを補うために多数胚移植(3個以上)を行い、その結果多胎妊娠が増加するという弊害が生じた。Eisnerら²⁾は3個以上受精卵を移植する方が2個以下より有意に妊娠率が高いと報告しており、多くの施設で3個以上の胚移植を行ってきた。その結果として多胎妊娠の発生率が高くなり、1990年代前半での欧米の報告^{3,7)}では、ARTによる妊娠の21.3~31.3%が多胎妊娠と報告されている。

一方1998年にGardnerら⁸⁾により順次培地(sequential media)を用いた、初期胚より胞胚までの培養法が確立され胞胚期移植が可能となった。これにより妊娠率および着床率が飛躍的に上昇したと報告されて以来、胞胚期移植法が注目されてきている^{9,10)}。この胞胚期移植の利点として、第1に胞胚を生理的適期に子宮内へ移植出来ること、第2に、培養期間の延長により発生能の低い胚が淘汰され、良好胚が自然に選別されることが挙げられる。Sandalinas¹¹⁾らは高度な染色体異常胚の多くは胞胚に到達するまでに発育が停止する可能性が高いと報告している。また胞胚期移植により移植胚数を減らすことができ、多胎妊娠の予防に有効な手段であるとの報告もある¹²⁾。しかし欠点として、体外培養時間の延長が胚の質に対して与える影響が懸念されることが挙げられる。

一方、欧米では着床前診断 preimplantation genetic diagnosis (PGD) の技術を用い、胚を生検し fluorescence in situ hybridization (FISH) 法を用いて着床前胚スクリーニング(PGS)を行い異数体の胚移植を避ける方法が効果をあげている^{13,14)}。Munneら^{15,16)}は、35歳以上のIVFを施行した患者にPGSを施行したところ、着床率は変化がなかったが流産率が低下し、出生率が増加したと報告している。しかし本邦においては、日本産科婦人科学会会告によりPGSの臨床応用が認められるのは重篤な遺伝性疾患に限られており、良好胚選別目的にこの技術を応用することは認められていない。

また近年、前核の大きさや核小体の分布により評価する前核期評価法が報告されており、ある程度の評価を受けている^{17,18)}。一方では、胞胚期移植法の高着床率が報告されている。その高着床率の要因として、主に長期培養により良好胚が自然に選別されているためと考えられる。しかし培養システムが完全でない現状においては、可能であるならば長期培養は避けたほうが望ましい。もし早い時期に胞胚期移植法と同等の良好

胚選別が可能になれば、培養期間を延長せずに高着床率が実現できると考えられる。よって本研究では早い時期に良好胚を選別するために、従来の前核期評価基準を検討し、改良を加えその有効性を検討することを目的とした。

対象と方法

2000年9月から2001年5月までに、当科において、conv.IVFまたはICSIを行った75症例78周期、491個の胚を対象とした。適応の内訳は、男性因子68症例、卵管因子7症例、治療内容の内訳は、conv.IVF9周期、ICSI69周期で、平均年齢は34.3±3.3歳であった。対象胚491個のうち419個はVeeck¹⁹⁾分類評価を行った。182個は胞胚まで培養を行い胞胚形成の有無を観察した。

卵巣刺激法は基本的にGnRH analog (Spereure, アベンチスファーマ) を long protocol で使用した。71症例74周期は安部ら²⁰⁾の採卵日固定刺激法を用い、4症例4周期はクエン酸クロミフェン(Clomid, 塩野義製薬)を使用した周期であった。採卵した卵は、Human tubal fluid (HTF; Irvine scientific) + 10% Synthetic Serum Substitute (SSS; Irvine scientific) を用い5% CO₂ in air にて4~5時間培養後、swim up 法で得られた運動良好精子10~20×10⁶/ml にて媒精を行った。また高度乏精子症性不妊およびIVFにて3回以上の受精障害症例ではICSIを行った。Wittemerら²¹⁾の報告では1,000胚の媒精とICSI施行後の前核出現時間を観察したところ両者に差を認めなかった。よって我々は、媒精またはICSI施行16~18時間後に前核期評価法を行った。胚評価後、conv-IVF症例では培養液の交換を行い胚移植まで培養した。Day2/3ETの移植胚決定はVeeck分類によって行った。なおDay4/5/6ET症例ではさらに媒精3日目にblastocyst mediumに移し、桑実胚(D4)、拡張期胞胚(D5)、ハッチド(hatched)胞胚(D6)に達した胚を移植した。

今回新しく設定した項目として、第1に胚の発育速度を反映していると思われる両前核間の距離に関して、観察時に接点が一直線に密に接着しているものと、辺縁の一点で接着しているものとを比較している点、第2に両前核の細胞周期の同期性を反映していると考え、核小体の大きさ、分布、数の同期性の評価を行った点が挙げられる。これらの基準点を組み入れた前核期評価法(図1)を示す。評価には3つのパラメータを用いた。第1に、両前核の大きさの評価を行った。両

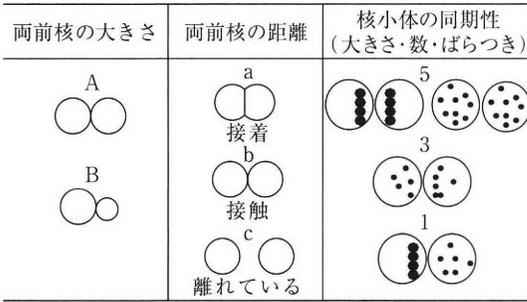


図1 前核と核小体における評価法

A：両前核の大きさが同じ，B：両前核の大きさが異なる，a：両前核が密に接着，b：両前核が一点で接着，c：両前核が開離，5：核小体の同期性あり，3：同期過程にある，1：核小体の極性がバラバラで同期性なし

前核の大きさが同じものを(A)，異なるものを(B)と評価した。第2に両前核間の距離の評価を行い，密に接着しているものを(a)，辺縁の一点で接着しているものを(b)，開離しているものを(c)と評価した。第3に核小体の評価を行い，両前核の核小体の大きさ，分布，数に同期性を認めるもの，すなわち核小体の大きさがまだ小さいが両前核に均等に分散して同期しているものと，核小体の大きさが大きくなり接点に整列している場合を(5)，同期過程にある場合を(3)，極性がばらばらで同期性を全く認めない非同期の場合を(1)と評価した。

実際の前核期胚の写真を図2に示す。[1]は両前核の大きさが同じ(A)で，両前核が一直線に密に接着(a)しており，核小体に同期性を認める(5)のでAa-5と評価した。[2]は両前核の大きさが同じ(A)で，両前核が辺縁のみで接着しており(b)，核小体に同期性

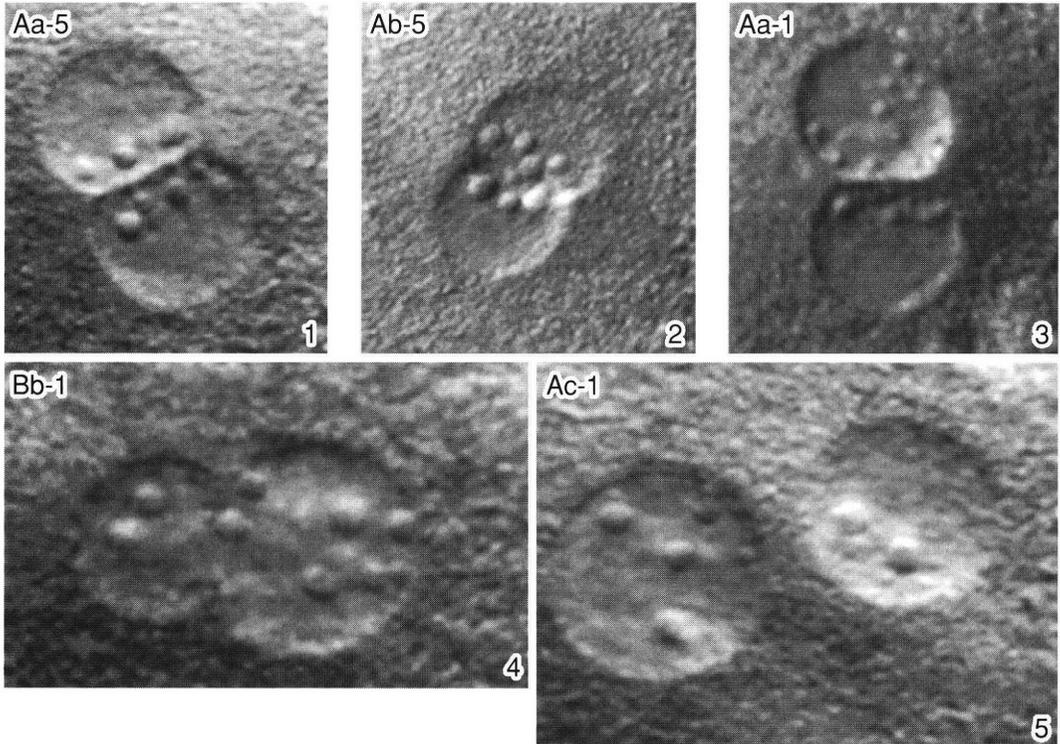


図2 前核期胚の写真

[1]：両前核が同じ大きさとで接着し核小体に同期性あり，[2]：両前核の大きさが同じで接着しており核小体に同期性あり，[3]：両前核の大きさが同じで接着しているが核小体に同期性なし，[4]：両前核の大きさが異なり接着しており核小体の同期性なし，[5]：両前核の大きさが同じで離れており核小体の同期性なし

を認める (5) ので Ab-5 と評価した。[3] は、両前核の大きさが同じ (A) で、密に接着 (a) しているが、核小体の同期性が見られない (1) ので Aa-1 と評価した。[4] は、前核の大きさが異なり (B)、辺縁のみで接着しており (b) 核小体の同期性を認められない (1) ので Bb-1 と評価した。[5] は、両前核の大きさが同じ (A) で、両前核が開離しており (c)、核小体の同期性が見られない (1) ので Ac-1 と評価した。

胚移植時、媒精または ICSI 後 2 日目 (Day 2) で 2~4 細胞期胚、3 日目 (Day 3) で 4~8 細胞期胚、4 日目 (Day 4) で桑実胚、5 日目 (Day 5) で胞胚または拡張胞胚、6 日目 (Day 6) でハッチド胞胚に達したものを正常発育胚とし、後方視的に分割期における形態良好胚 (Veeck 分類 grade 1, 2)、および胞胚への発生率、妊娠率、着床率の検討を行った。妊娠率、着床率に関しては、移植胚 2 個の症例のみについて検討した。また移植胚が形態良好胚、形態不良胚 (Veeck 分類 grade 3, 4, 5) であった症例については前核期評価パラメーター別の妊娠率、着床率、流産率を比較した。

統計学的解析は χ^2 test を用いた。p が 0.05 未満の場合に有意差あり、0.1 未満の場合に傾向あり、0.1 以上の場合に有意差なし (NS) とした。

結 果

I. 各パラメーター別の頻度

両前核の大きさでみると、(A) が 76.8% (377/491)、(B) が 23.2% (114/491) であった。両前核の距離でみると、(a) が 10.0% (49/491)、(b) が 85.7% (421/491)、(c) が 4.3% (21/491) であった。核小体の同期性でみると、(5) が 10.2% (50/491)、(3) が 35.4% (174/491)、(1) が 54.3% (267/491) であった (図 3)。

II. 分割期における形態良好胚への発育率

分割期評価が可能であった胚のうち、両前核の大きさで比較すると、(A) 44.3% (153/345)、(B) 25.7% (28/109) で (A) の方が有意に形態良好胚への発育率が高かった ($p < 0.05$)。両前核間の距離で比較すると、(a) 68.6% (24/35)、(b) 40.2% (136/338)、(c) 12.5% (2/16) で、(a) は (b)(c) に比較して有意に高く ($p < 0.05$)、(b) は (c) に比較して有意に高かった ($p < 0.05$)。核小体の同期性で比較した場合、(5) 59.0% (23/39)、(3) 53.5% (76/142)、(1) 30.3% (63/208) で (5)(3) は (1) と比較して有意に高かった ($p < 0.05$) (図 4)。

III. 桑実胚/胞胚への発育率

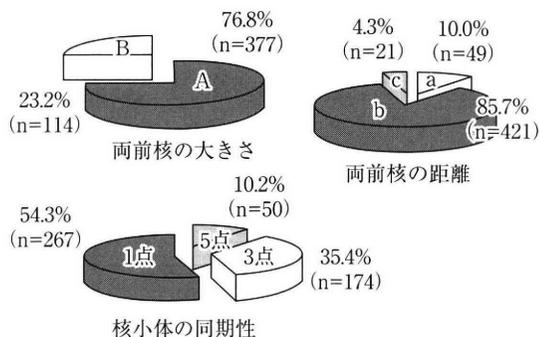


図 3 各パラメーター毎の内訳

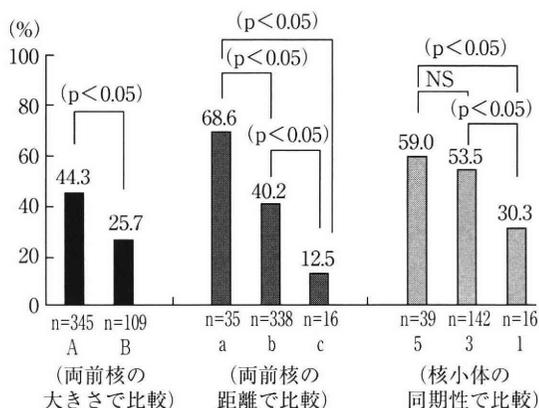


図 4 Day2/3における形態良好胚発育率

形態良好胚への発育率は、Aの方がBより有意に良好胚発育率が高かった。aはb、cに比較して有意に高かった。bはcに比較して有意に高かった。5、3は1に比較して有意に高かった。

両前核の大きさで比較した場合、(A) 34.8% (47/135)、(B) 10.6% (5/47) で、(A) は (B) より有意に胞胚への発生率が高かった ($p < 0.05$)。両前核間の距離で比較した場合、(a) 47.6% (10/21)、(b) 27.0% (41/152)、(c) 11.1% (1/9) で、(a) (b) は (c) よりも有意に胞胚への発生率が高かった ($p < 0.05$)。核小体の同期性で比較した場合、(5) 68.8% (11/16)、(3) 34.5% (20/58)、(1) 19.4% (21/108) で、(5) が (3) (1) に比べて有意に胞胚への発生率が高かった ($p < 0.05$) (図 5)。

IV. 妊娠および着床率

移植胚を 2 個の症例に限定して検討した。両前核の大きさで比較した場合、移植した胚が (AA)、(AB)、(BB) の場合のそれぞれの妊娠/着床率は、(AA) 50%

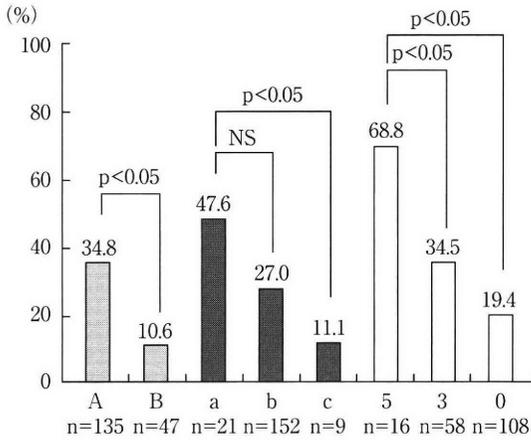


図5 各パラメーターでみた桑実胚/胞胚への発育率
両前核の大きさが同じ方が有意に桑実胚/胞胚への発育率が高かった。両前核の距離が接着している方が接してしるか離れているよりも桑実胚/胞胚への発育率が高い傾向を認めた。核小体の同期性のある方が同期しかけているまたは同期性のないものより有意に桑実胚/胞胚への発育率が高かった。

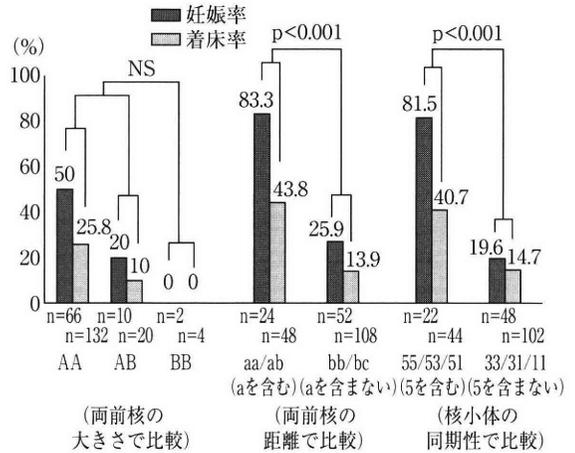


図6 妊娠/着床率

両前核の大きさによる差は見られなかった。両前核が接着 (a) を含んでいる場合の方が含んでいない場合より有意に高かった。核小体の同期性あり (5) を含んでいる場合の方が含んでいない場合の方が有意に高かった。

(33/66)/25.9% (34/132), (AB) 20% (2/10)/10% (2/20), (BB) 0% (0/2), 0% (0/4) で、両前核の大きさによる妊娠/着床率に差はみられなかった。また(A) を含んだ胚を移植した場合と含まない胚を移植した場合を比較すると、(A) を含んだ胚を移植した場合では妊娠/着床率はそれぞれ 46.1% (35/76), 23.0% (35/152), (A) を含まない胚を移植した場合では妊娠、着床率ともに 0% (0/2, 0/4) で、前核の大きさの違いにより妊娠率および着床率に有意差はみられなかった。両前核間の距離で比較すると、移植胚に (a) を含んでいる場合 (aa/ab) の妊娠/着床率はそれぞれ、83.3% (20/24) /43.8% (21/48), (a) を含んでいない移植 bb/bc の妊娠/着床率はそれぞれ、25.9% (14/54) /14.0% (15/108) で、移植胚に (a) を含んでいる場合の妊娠/着床率が (a) を含んでいない場合より有意に高かった ($p < 0.001$)。

核小体の同期性の有無により妊娠/着床率を比較すると、移植胚に (5) を含んでいた場合 (55/53/51) の妊娠/着床率はそれぞれ 81.5% (22/27)/40.7% (22/54), (5) を含んでいない場合 (33/31/11) では 19.6% (10/51)/14.7% (15/102) で、移植胚に (5) を含んでいた場合の妊娠/着床率が (5) を含んでいない場合より有意に高かった ($p < 0.001$) (図6)。

V. 移植胚が2個とも分割期における形態不良胚であった場合の各パラメーター別の妊娠率、着床率、流産率

移植胚が2個とも前核の大きさが同じであった場合 (AA) と片方が異なる大きさであった場合 (AB) で比較したところ有意差はみられなかった。同様に (a) を含んでいた場合と含んでいない場合を比較しても有意差はみられなかった。同様に (5) を含んでいた場合と含んでいない場合で比較した。(5) を含んでいた場合の妊娠/着床/流産率は、100% (5/5)/50% (5/10)/20% (1/5), (5) を含んでいない場合は 14.3% (1/7)/7.2% (1/14)/0% (0/1) で、(5) を含む移植の方が妊娠/着床率が有意に高かった ($p < 0.05$) が流産率には有意差はみられなかった (図7)。

VI. 移植した胚が2個とも分割期における形態良好胚であった場合の各パラメーター別の妊娠率、着床率、流産率

両前核の大きさで比較すると、移植した2個の形態良好胚に (A) が含まれていた場合と (A) が含まれていない場合で両者に有意差はみられなかった。両前核間の距離で比較すると、移植した2個の形態良好胚のうち (a) を含んでいた場合の妊娠/着床/流産率は、82.4% (14/17)/41.2% (14/34)/35.7% (5/14), (a) を含ん

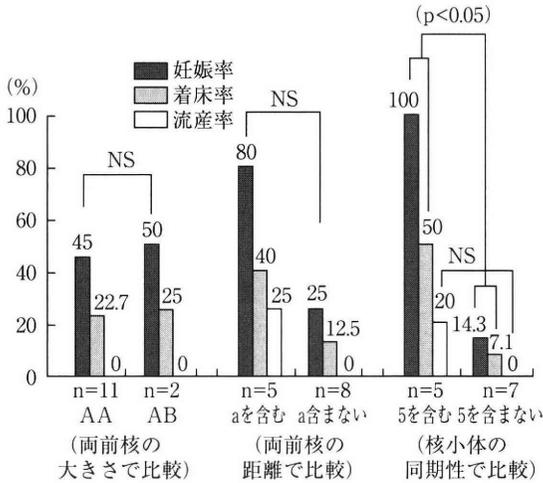


図7 Day2/3における各パラメーター別にみた形態不良胚の妊娠/着床/流産率
移植した形態不良胚を核パラメーターで比較した場合、核小体の同期性で比較した場合にのみ有意差を認めた。核小体に同期性のある形態不良胚の方が妊娠/着床率に有意差を認めた。

でない場合は23.8% (10/42)/13.1% (11/84)/30% (3/10)で、(a)を含む移植の方が妊娠/着床率が有意に高かった ($p < 0.05$) が流産率には有意差はみられなかった。核小体の同期性で比較すると、(5)を含んでいた場合と(5)を含んでいない場合では有意差はみられなかった (図8)。

考 察

良好胚を選別評価する方法として、前核期における両前核の核小体の数や大きさまたは両者の差および核小体の配列のパターンを観察する試みが報告されている。Tesarikら¹⁷⁾は核小体の形態をパターン0~5まで分類している。これによると、パターン0の場合、ほとんどの胚で着床の可能性が期待できるとし、少なくともパターン0が含まれている移植周期では50%の妊娠率であったと報告している。つまり、両前核の核小体の同期性が良好胚を選別する因子として重要であるという結果であった。その翌年Wittemerら²¹⁾によりこの分類方法を用いたprospective studyが報告された。これによると、発育停止率、良好胚発育率に関しては、パターン0が発育停止率14.1%と最も低く、良好胚発育率も68%と最も高かった。妊娠率ではパ

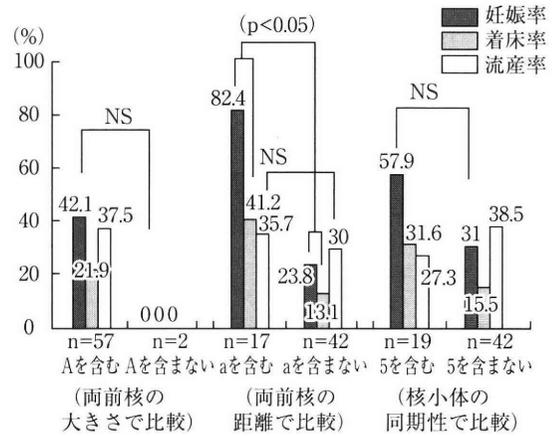


図8 Day2/3における各パラメーター別にみた形態良好胚の妊娠/着床/流産率
移植した形態良好胚を各パラメーターで比較した場合、両前核の距離で比較した場合にのみ有意差を認めた。両前核の距離が接着している(a)胚を含んだ移植の場合の方が(a)を含まない移植の場合より妊娠/着床率に有意差を認めた。

ターン0のみを移植した場合、パターン0を1個以上含んだ移植の場合、パターン0を含まない移植の場合で比較した場合、それぞれ42.2%、35.6%、19.7%で、パターン0を含んだ移植の場合の妊娠率が有意に高かったという結果であった。さらにScottら²²⁾による前核期評価法は前核の大きさ、核小体の配列状態、核小体の数により前核期評価を行った。その結果、大きさと数が同じ核小体が雌雄前核の接点に整列している胚の妊娠率が高かったと報告している。またEdwardsら²³⁾の報告では、良好胚の選択方法について前核期と胞胚期で比較検討した結果、着床率に差がないことが示されている。

本研究では、これら今まで報告されている前核の大きさや核小体の数、大きさ、極性の有無を指標とした前核期評価法を改良した新基準を設定した。すなわち、評価方法を前核の大きさ、距離、核小体の同期性の3つのポイントに分けてそれぞれを評価した。各パラメーターで分割期における形態良好胚および桑実胚/胞胚への発生率をみたところ各々のパラメーターで有意差を認め、①両前核の大きさが同じである(A)、②両前核が接着している(a)、③核小体に同期性を認める(5)という3つのポイントが分割期における形態良好胚および桑実胚/胞胚への発生率が上昇するために

必要な条件であることが示された。一方妊娠/着床率では、両前核の大きさによる有意差は得られず①両前核の距離が接着しているもの (a)、②核小体が同期しているもの (5) を移植すると妊娠/着床率が上昇することが示された。

両前核の距離に関してはさらに細かく分類し、面で接着しているもの (a) と点で接しているもの (b) とを分けて評価した。その結果、(a) を含む症例では妊娠/着床率において (a) を含んでいない症例より有意に高い結果が得られた。よって良好胚選別基準のひとつとして有効性を認めた。これは従来の報告にない新しい基準であり本評価法の特徴のひとつと考える。

臨床の現場では、Day 2~3 にすべての胚が形態不良胚であり移植胚決定に苦慮することがある。通常は移植を担当するものの主観的判断により移植胚が選択される。そこで分割期における形態不良胚において本法の評価により妊娠率、着床率、流産率に違いがあるかどうか検討したところ分割期に形態不良胚しか得られなかった症例では核小体の同期している胚を選択することにより妊娠/着床率が上昇する可能性が示された。同様に Day 2~3 に形態良好胚が多数得られ移植胚決定に迷った場合、両前核が一直線に密に接着している胚を含んでいる場合、妊娠/着床率が有意に高かった。すなわち得られた分割期胚の形態がすべて同一グレードの評価であった場合に本法は特に有用であると考えられる。

Yanagimachi ら²⁴⁾の報告によると、前核の形成は卵細胞質内の Ca^{2+} 濃度の上昇による卵活性化の有無に依存しており、卵活性化が起こった場合にのみ前核が形成される。前核形成の初期には精子核の周囲に核膜が再構築され、このほとんどが卵細胞質に由来すると考えられている。また Rayne ら²⁵⁾は、ICSI を行ったヒト胚 50 個の受精後の両前核と核小体の動きを映像を用いて経時的に調べ報告している。それによると精子が注入されたあと第 2 極体が放出され、小さな雄性前核が細胞質の中央付近に出現する。その後雌性前核が第 2 極体近傍に現れる。このときに雌雄両前核内には小さな複数の核小体が現れ始め、雌性前核は雄性前核に引きつけられ卵実質中央部に移動して接するようになる。その後、両前核の大きさが増大し、その中の核小体は両前核の接合面に向かって移動しながら融合し大きさが増大してくる。Motilik ら²⁶⁾によると、核小体とは減数分裂の際に必要な不可欠であるリボゾーム RNA (rRNA) 合成の場として重要な役割をもつといわ

れ、rRNA をコードしている遺伝子は核内部の染色体に位置する nucleolus organizing regions に存在しており、核小体はここで形成される。排卵後 rRNA 合成はいったん減少し、核小体は縮小し散在する。そして受精後、核小体内の変化に付随し rRNA 合成が再開する。核小体は rRNA の合成が進むにつれ癒合し、大きさが増していくことが証明されている。雌雄前核が形成されると新しい rRNA が合成され、核小体の大きさも増大していく。受精後、胚ゲノム (zygotic genomes) が徐々に活性化されると新しい rRNA 合成が引きつづき行われるが、ヒトではおよそ 4 細胞期の時期で最高潮に達する。このような rRNA 合成は胚の発育にとって非常に重要な役割を持っている。したがって、核小体を形態的に評価することで、機能を完全に把握することは出来ないが、少なくともこの評価によって、その胚の発育能をバイタルな状態で判定するうえで、一つの胚選別法となるのではないだろうか。この様に雌雄前核の形成と核小体の動きは独立の現象ではなく密接に関連し合っている。両前核の発育と核小体の同期性を指標とした評価法は、上述の接合子内で起きている一連の発育過程の正常性を評価していることになる。つまり雌雄前核が接着していて核小体が接点に整列している胚はこれらの複雑な過程が順調に経過した胚であり、反対に雌雄前核が離れており、核小体の同期性が見られない胚はこの過程に何らかの異常が生じた胚であることが推測される。したがってこの評価法は良好胚を選別するために有用であると思われる。

着床率を向上させるためには、生存性の高い良好胚を選別するか、生理的環境下に胚を移植することであると考えられている。Sauer ら²⁷⁾の報告によると、重症不妊患者や高齢不妊患者に対しドナー胚を移植した結果 33.3% の妊娠率が得られている。Abdalla ら²⁸⁾も 21 歳から 52 歳までの卵子提供プログラムにおける受容者 104 例にドナー卵を用いた IVF を行ったところ、受容者を 39 歳以下と 40 歳以上で比較したところ、受精率、着床率、生産率は全く同等であったと報告している。この事は着床環境が悪いと考えられている高齢婦人においても良好胚を移植すれば、若年婦人と同等の妊娠率が得られることを示している。したがって、良好胚を正確に選別し移植することができれば子宮内環境を整える事によって妊娠が成立する可能性が十分ある事が示唆される。

ART 治療における最終目標は、不妊症例の適応を正しく選択して単一胚移植を行い、単胎妊娠へと導くこ

とにある。Tiitinen ら²⁹⁾は、分割期良好胚を用いた単一胚移植により 38.6% の妊娠率が得られたと報告しており、妊娠率を低下させずに単一胚移植を行える可能性を示している。本法により妊娠率を下げることなく単一胚移植を実施する可能性が示唆された。本研究では、媒精または ICSI 16~18 時間後における両前核の大きさと距離、核小体の同期性を指標とした新しい基準で前核期評価をおこなった。この胚評価法のみでも高精度な良好胚選別効果が期待できるが、さらに Veeck 分類と本評価法を組み合わせることで 2 段階で胚選別を行うことで、従来、移植胚の選択に困難を感じた場合においても本法は有用であると思われる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました東邦大学医学部産科婦人科学第 1 講座久保春海教授、安部裕司講師に慎んで謝意を表します。また直接御指導を賜りました同講座の雀部豊助手に深謝致します。

本研究の要旨は第 53 回日本産婦人科学術講演会（平成 13 年 5 月）、および第 47 回日本不妊学会学術講演会（平成 13 年 11 月）において発表した。

文 献

- 1) 生殖・内分泌委員会報告 平成 11 年度 生殖医学登録報告 (第 11 報). (2001) 日産婦誌 53: pp 665-681
- 2) Elsner CW, Tucker MJ, Sweitzer CL, et al. (1999) Multiple pregnancy rate and embryo number transferred during *in vitro* fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 177: 350-357
- 3) Beral V, Doyle P, Tan SL, et al. (1990) Outcome of pregnancies resulting from assisted conception. *Br Med Bull* 46: 753-768
- 4) Rizk B, Doyle P, Tan SL, et al. (1991) Prenatal outcome and congenital malformation in *in-vitro* fertilization babies from the Bourn-Hallam group. *Hum Reprod* 6: 1259-1264
- 5) Wennerholm UB, Wennergren JM, Kjellmer I (1991) Pregnancy complications and short-term follow-up of infants born after *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF/ET). *Acta Obstet Gynecol Scand* 70: 565-573
- 6) Seoud M A-F, Toner JP, Kruihoff C, et al. (1992) Outcome of twim, triplet, and quadruplet *in vitro* fertilization pregnancies: the Norfolk experience. *Fertil Steril* 57: 825-834
- 7) Friedler S, Mashlach S, Laufer N (1992) Birth in Israel resulting from in-vitro fertilization/embryo transfer, 1982-1989: National Registry of the Israeli Association for Fertility Research. *Hum Reprod* 7: 1159-1163
- 8) Gardner DK, Vella P, Lane M, et al. (1998) Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduce the need for multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 69: 84-88
- 9) Cruz JR, Dukey AK, Patel J, et al. (1999) Is blastocyst transfer useful as an alternative treatment for patients with multiple *in vitro* fertilization failures? *Fertil Steril* 72: 218-220
- 10) 向田哲規, 高橋克彦, 岡 親弘 (1999) 反復 ART 不成功例に対する胞胚期移植の臨床成績. *日産婦誌* 51: 1125-1133
- 11) Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, et al. (2001) Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* 16: 1954-1958
- 12) Shulman A, Kaneti H, Ben-Nun I, et al. (1993) Relationship between embryo morphology and implantation rate after *in vitro* fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril* 69: 123-126
- 13) Benadiva CA, Kligman I, Munne S. (1996) Aneuploidy 16 in human embryos increase significantly with maternal age. *Fertil Steril* 66: 248-255
- 14) Gianaroli L, Magli MC, Munne S, et al. (1997) Will preimplantation genetic diagnosis assist patient with a poor prognosis to achieve pregnancy? *Hum Reprod* 12: 1762-1767
- 15) Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al. (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing *in vitro* fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 72: 837-844
- 16) Mune S, Magli C, Cohen J, et al. (1999) Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 14: 2191-2199
- 17) Tesarik J, Greco E (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 14: 1318-1323
- 18) Scott LA, Smith S (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 13: 1003-1013
- 19) Veeck LL (1991) Atlas of the human oocyte and early conceptus. 2. Williams & Wilkins Co, Baltimore
- 20) 安部裕司, 池永秀幸, 中野英之 (1995) ART プログラムにおける採卵日固定刺激法の効果について. *日不妊会誌* 40: 211-215
- 21) Wittemer C, Bettahar-lebugle K, Ohl J, et al.

- (2000) Zygote evaluation : an efficient tool for embryo selection. *Hum Reprod* 15 : 2591-2597
- 22) Scott LA, Alvero R, Leondires M, et al. (2000) The morphology of human pronuclear embryos is positively related to blastocyst development and implantation. *Hum Reprod* 15 : 2394-2403
- 23) Edwards RG, Beard HK (1999) Blastocyst stage transfer ; pitfalls and benefits. *Hum Reprod* 14 : 1-6
- 24) Yanagimachi R (1994) Mammalian fertilization. *The physiology of Reproduction*, 2nd ed (Knobil E, Neill JD, eds). Raven Press, New York 189-317
- 25) Rayne D, Flaherty SP, Barry SP, et al. (1997) Preliminary observations on polar body extrusion and pronuclear formation in human oocytes using time-lapse video cinematography. *Hum Reprod* 12 : 532-541
- 26) Motilik J, Kopeny V, Travnik P, et al. (1984b) RNA synthesis in pig follicular oocytes. Autoradiographic and cytochemical study. *Biol Cell* 50 : 229-236
- 27) Sauer MV, Paulson RJ, Francis MM, et al. (1995) Preimplantation adoption : establishing pregnancy using donated oocytes and spermatozoa. *Hum Repro* 10 : 1419-1422
- 28) Abdalla HI, Wren ME, Thomas A (1997) Age of the uterus does not affect pregnancy or implantation rates ; a study of egg donation in women of different ages sharing oocytes from the same donor. *Hum Reprod* 12 : 827-829
- 29) Tiitinen A, Halttunen M, Vuoristo P, et al. (2001) Elective single embryo transfer : the value of cryopreservation. *Hum Reprod* 16 : 1140-1144
(受付 : 2002 年 11 月 8 日)
(受理 : 2002 年 11 月 19 日)

Establishment of Novel Criteria for Selection of Viable Embryos Via So-Called “Pronucleus Assessment” in ART

Kanako ITO

First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine,
6-11-1 Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo 143-8541, Japan

To establish new criteria to select embryos to transfer, scoring at pronuclear stage was evaluated to distinguish viable embryos.

In the present study, we examined a total of 491 embryos obtained from 75 patients (78 cycles). The criteria for selection of embryos via “pronucleus assessment” are as follows. The size of pronuclei are [same (A) : , different (B)] , pronuclei distance [closely attached (a), attached only at the margin (b) and is apart (c)]. The size, distribution and number of nucleoli are [synchronized (5), in the proceed of synchronization (3), or not synchronized (1)].

Pregnancy rates per ET was significantly high in case of containing (a) or (5) in transferred embryo. [Cases containing (a) : 83.3% vs. those without (a) : 25.9%, $p < 0.05$, case containing (5) : 81.5% vs. those without (5) : 19.6%, $p < 0.05$].

The scoring at pronuclear stage could be high specific tool to distinguish the viable embryos.

Key words : pronucleus assessment, nucleolus (pl. nucleoli), pregnancy rate, IVF, ICSI

(Jpn J Fertil Steril 48 : 1-9 2003)

ICSIでの卵巣刺激周期から採取された未成熟卵子から 得られた成熟卵の胚発生能の検討

Embryo Formation from Immature Oocytes Retrieved in Superovulation Cycle
After *In Vitro* Maturation and Fertilization by Intracytoplasmic Sperm Injection

西 美 佐	豊 北 美 穂	原 直 範 ¹⁾
Misa NISHI	Miho TOYOKITA	Naonori HARA
山 崎 裕 行	生 水 真 紀 夫 ²⁾	道 倉 康 仁
Hiroyuki YAMASAKI	Makio SYOZU	Yasuhito MICHIKURA

永遠幸レディースクリニック

Towako Ladies' Clinic Ru130 Kojimamachi, Komatu city, Ishikawa 923-0002, Japan

Towako Ladies' Clinic, Kanazawa

¹⁾永遠幸レディースクリニック金沢

10 Ibaragicho, Kanazawa city, Ishikawa 920-0994, Japan

²⁾金沢大学産科婦人科

13-1 Takaramachi, Kanazawa city, Ishikawa 920-8640, Japan

GnRHa-hMGによる卵巣刺激周期に偶然採取された未成熟卵子の胚発生能を明らかにする目的で、体外成熟培養後にICSIを施行し、成熟率・受精率・分割率・胚盤胞発生率を検討した。対象は男性因子などの原因による不妊治療の目的で、顕微授精によるIVFを施行した57名(57周期)の患者である。GnRHa-hMG投与周期に採卵を行ったところ、385個の成熟卵子(MII期)の他に151個の未成熟卵子(GV期86個およびMI期65個)が採取された。これらの未成熟卵子を10%患者成熟卵胞液を含むTCM199液中で培養したところ、GV期卵子の69%、MI期卵子の86%が48時間以内に第1極体を放出し成熟卵子(MII期)となった。そこで、この体外成熟卵子のうち105個(GV期54個およびMI期51個)に対し夫精子を用いてICSIを行ったところ、89%が受精し、76%が分割(2細胞期)した。この受精率・分割率は、体内成熟卵子の受精率(83%)・分割率(82%)と同率であった。受精卵を6細胞期までP1 medium中で、その後7日目までG2.2 medium中で培養を続けたところ、体外成熟卵子の8%(GV期由来卵子の4%、MI期由来卵子の12%)が胚盤胞まで発育した。なお、GV期由来卵子から得られた胚盤胞は、いずれも卵丘細胞を完全に除去せずに成熟培養を行った卵子から発育したものであった。今回のIVM-ICSIの検討により、卵巣刺激周期に偶然採取される未成熟卵子からでも胚盤胞が得られることが明らかとなった。

キーワード：未成熟卵子、体外培養、卵丘細胞、胚盤胞、ICSI

(日不妊会誌 48:11-15 2003)

緒 言

近年、多嚢胞性卵巣 (Polycystic ovary, PCO) 症例

や難治性不妊症例などを対象としてヒト未成熟卵子を用いた体外成熟培養 (In Vitro Maturation, IVM) 一体外受精 (In Vitro Fertilization, IVF) の臨床応用の可

表1 IVM 卵子由来患者の年齢比

年齢	裸化 GV % (卵個数 / 人数)	非裸化 GV % (卵個数 / 人数)	裸化 MI % (卵個数 / 人数)
25 ~ 29 歳	15.8% (9 個 / 2 人)	48.3% (14 個 / 5 人)	13.8% (9 個 / 7 人)
30 ~ 34 歳	59.6% (34 個 / 15 人)	27.6% (8 個 / 5 人)	47.7% (31 個 / 17 人)
35 ~ 39 歳	24.6% (14 個 / 8 人)	17.2% (5 個 / 2 人)	36.9% (24 個 / 14 人)
40 歳以上	0%	6.9% (2 個 / 1 人)	1.5% (1 個 / 1 人)

能性が検討されている。これまでのところ、IVM-IVF による卵子の成熟率・受精率は体内成熟卵のそれに比し低く、妊娠に至る例は極めて少ない^{1,5)}。この場合のIVM-IVFの多くは、非刺激周期で体外成熟培養を前提として小卵胞より採取された未成熟卵子が用いられる。

一方、通常の *In Vitro* Fertilization Embryo Transfer (IVF-ET) では GnRHa-hMG-hCG を使用した卵巣刺激周期に採取された卵子が用いられる。卵巣刺激周期で回収される卵子の多くは成熟卵 (metaphase II, MII 期) であるが、一部に未成熟卵 (卵核胞期 (germinal vesicle, GV 期) または metaphase I 期 (MI 期)) が含まれている。当院においては、卵巣刺激を行って採取された卵子が全て未成熟であった症例が 0.4% 存在する。このような刺激周期で hCG 投与後に偶発的に採取された未成熟卵を治療に用いることができれば、患者にとって福音となる。

そこで、今回 GnRHa-hMG-hCG 周期に採取された未成熟卵の初期胚発生能について基礎的な検討を行った。未成熟卵を卵胞液添加 TCM199 medium 中で培養し、成熟後、卵細胞質内精子注入法 (Intracytoplasmic Sperm Injection, ICSI) を行って受精率・分割率・胚盤胞形成率を、体内成熟卵のそれと比較した。その結果、MI 期卵の約 12% から胚盤胞を得られたことが確認されたので報告する。

対象と方法

対象

対象は、2000 年 3 月から 2000 年 12 月までの間に当院において男性因子などによる不妊治療の目的で ICSI による IVF-ET を受けた患者のうち、未成熟卵の使用に同意した 57 名 (57 周期) である。このうち PCO と診断された患者は 12 名である。GnRHa と hMG による short protocol で卵巣刺激し、最大卵径が 18 mm に達した時点で hCG (10000IU) 投与を行い、34 時間後に 19G の採卵針を用いて採卵した。採卵によ

り得られた卵子総数は 536 個であり、この内、MII 期に達していたのは 385 個で、残りの卵子 MI 期 65 個、GV 期 86 個を今回の対象とした。また、各未成熟卵の年齢による比率を表 1 に示した。

未成熟卵の判定

採卵後、卵子を P1 medium (Irvine Scientific, USA) 中で 3 時間前培養した後、機械的処理あるいは、0.01% Hyaluronidase (Sigma, Germany) 酵素処理を行って裸化し、ノマルスキー微分干渉装置付倒立顕微鏡下に観察して成熟度を判定した。MII 期に達していない卵、すなわち卵核胞の残存するもの (GV 期; 86 個) および第 1 極体の放出のないもの (MI 期; 65 個) を未成熟卵と判定した。

また、GV 期卵 86 個のうち 29 個については、酵素処理前に明瞭な GV が観察されたため酵素による卵丘細胞の完全除去は行わず機械的処理により最低限の除去に止め、非裸化 GV 卵として成熟培養を行い、裸化処理 GV 卵の成績と比較した。

体外成熟培養

10% 成熟卵胞液、0.5 mM pyruvate, gentamicin (35 µg/ml) を添加した TCM199 medium (Sigma, Scotland) 中で未成熟卵を培養した。medium 量は 50 µl としシリコンオイル (信越化学) でカバーして、5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂ の気相下に 37°C で培養した。添加した成熟卵胞液は患者本人より採卵時に得られた成熟卵胞穿刺液 (MII 期卵が回収された卵胞穿刺液) であり、300G, 10 分間遠心し、上清を非働化 (57°C, 30 分) し濾過滅菌後に使用した⁶⁾。

卵の観察は、成熟培養開始後 24 および 48 時間で行い、第 1 極体の放出を確認した時点で成熟と判定し、採卵日に採精した夫精子を用いて ICSI を施行した。

胚盤胞培養

ICSI 施行後 P1 medium 中で 16 ないし 18 時間培養し、2 前核形成が確認された卵は、6 分割までの前期培養期間は P1 medium 中で培養、それ以降の後期培養期間は G2.2 medium (Vitrolife, Sweden) 中で培養し

た、medium は 50 μ l のマイクロドロップとし、シリコンオイルでカバーした。前核を確認した日を Day 1 として、Day 7 まで毎日一回観察をしながら培養を続けた。

結 果

1. 体外成熟培養による成熟率

IVM により、48 時間以内に MII 期まで成熟したものは、GV 期由来の 69% (59/86)、MI 期由来の 86% (56/65) であり、GV 期由来に比し MI 期卵子で成熟率が有意に高かった ($p < 0.05$)。GV 期由来の成熟率を裸化・非裸化で比較すると、それぞれ 63% (36/57)、79% (23/29) であり非裸化卵子で成熟率が高くなる傾向が見られたものの有意ではなかった ($p = 0.15$) (図 1)。

2. ICSI 後の胚発生率

II 期に成熟した卵子 115 個中 10 個は男性側要因により ICSI が出来なかったため、105 個に ICSI を施行し、その後の胚発生率を今回の対象患者より得られ

た採卵時 MII 卵子の ICSI 成績と比較した(表 2)。IVM 卵子の受精率 (2 前核が確認されたもの)、および分割率 (2 細胞期以上) はそれぞれ 89%、76% で、体内成熟卵子との間に有意差は認められなかった。これに対し、桑実胚発生率および胚盤胞発生率は、IVM 卵子でそれぞれ 17%、8% で体内成熟卵子に比較して有意に低率であった ($p < 0.001$)。

IVM 卵子の成績を GV 期由来卵子と MI 期由来卵子とに分けて検討したところ、受精率、分割率、桑実胚発生率には両群間に差はなかったが、胚盤胞発生率は GV 期由来卵子にやや低い傾向が認められた。さらに GV 期由来卵子中では、受精率、分割率には裸化処理による差がみられなかったが、桑実胚と胚盤胞には裸化処理による発生率の低下傾向が認められた。特に、裸化処理由来卵子では胚盤胞に達した卵子を認めなかった。

胚盤胞に発育した 8 個 (非裸化 GV 期由来 2 個、MI 期由来 6 個)のうち、expansion の段階に達したものは 4 個 (非裸化 GV 由来 1 個、MI 期由来 3 個)であった。このうち細胞変性や内細胞塊 (ICM) の分散などがみられない形態良好胚は MI 期由来の 1 個であった。

考 察

今回 MI 期由来卵子では、IVM-ICSI によりその 12% に、また非裸化 GV 期由来卵子ではその 10% に胚盤胞が得られたが、体内成熟卵子に比べ発生能の低下が具現された。

これにはいくつかの理由が考えられる。主因として、刺激周期で偶然採取される未成熟卵には閉鎖過程に入った卵胞に由来する卵子が多く含まれていることに

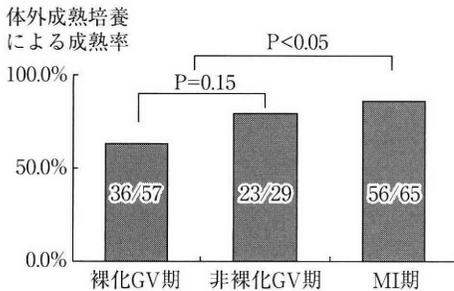


図 1 体外成熟培養による成熟率 (図中の数値は卵子数)

表 2 IVM-ICSI 後の胚発生数(率)の比較

発育段階	体内成熟卵子	体外成熟卵子 (IVM)			
		全体	裸化 GV 期	非裸化 GV 期	MI 期
ICSI 実施数	385	105	34	20	51
受精数 (%)	319 (83)	93 (89)	31 (91)	17 (85)	45 (88)
分割数 (%)	315 (82)	80 (76)	24 (71)	15 (75)	41 (80)
桑実胚数 (%)	198 (62)	18 (17)	3 (13)	5 (25)	10 (20)
胚盤胞数 (%)	115 (30)	8 (8)	0 (0)	2 (10)	6 (12)

$p < 0.001$ (Comparison between 体内成熟卵子 and 全体)
 $p < 0.001$ (Comparison between 体内成熟卵子 and 裸化 GV 期)
 $p = 0.08$ (Comparison between 裸化 GV 期 and 非裸化 GV 期)

よると考えられる。しかしながら、一部の未成熟卵子は hCG (LH サージ) に対する反応性を獲得する以前の段階にある発育卵胞から採取されたもので⁷⁾、IVM 後に胚発生能を獲得する可能性がある⁸⁾。退行性変性の有無は、卵子の形態的特徴からは判定しにくく、卵核胞消失 (GVBD) とそれに引き続く極体の放出は、卵丘細胞死のみられる閉鎖卵胞でもしばしば観察されることから、これらの形態学的変化が必ずしも卵子の正常な発育を示唆するものではない⁹⁾。従って、形態学的に成熟と判定された卵子の中には、真の成熟卵子の他に変性過程にある卵子が含まれており、見かけ上の成熟率を押し上げているものと考えられる。となれば、これら退行性卵子の結果を除外したとすれば、今回の胚盤胞発生率はそれほど低いものとは言い切れない。

また胚発生低下のその他の理由としては、核と細胞質の成熟度の解離が考えられる。すなわち、体外培養では核の成熟が進行し受精過程が進むものの、細胞質成熟が充分でないためにその後の細胞分裂・胚発生過程に支障が生じると考えられる¹⁰⁾。したがって、細胞質成熟の本質とその調節機構を解明し体外培養条件を改善することによって、胚発生率を向上させることができるのではないかと期待される。

また、IVM の培養条件でのみ考察するならば、Chambers⁶⁾ の報告に従って FSH やエストラジオールを加えず卵胞液のみを添加した体外成熟培養を用いたことにより、GV 期由来で 69%、MI 期由来で 86% が成熟に至った。

卵巣刺激周期由来 GV 期卵子の体外培養では、Janssenswillen らが Vero 細胞 (サル腎細胞) との共培養により 82% の成熟率を¹⁰⁾、Nagy らは顆粒膜細胞との共培養により 64% の成熟率を報告している¹¹⁾。われわれは特に feeder 細胞を加えず、かつ FSH やエストラジオールといった添加物を加えずに卵胞液のみを添加した TCM 199 medium での成熟培養を行ったが、GV 期由来卵子の 69% が成熟した。したがって、われわれの用いたより簡略な培養条件も、feeder 細胞を用いた場合と同程度に有効な培養条件と考えられた。また卵丘細胞を完全には除去しなかった GV 期卵子は、完全に除去した卵子に比べて胚盤胞発生率が高くなる傾向が認められたが、このことは卵丘細胞が feeder として働くことを示唆している。Hwang らも帝王切開時に得られた未成熟卵子を用いて同様の検討を行い、われわれと同様に非裸化卵子の方が体外成熟率が高いことを報告している¹¹⁾。卵丘細胞の feeder 効果は、酸化的ス

トレスからの胚の保護や、胚発生促進物質の存在や、胚発生阻害物質の除去作用などが理解されている。また近年の胚のエネルギー源の研究で知られるように、培養液中のグルコースの存在が卵子に影響したことも考えられる。すなわち、比較的高濃度のグルコースは卵細胞のミトコンドリアにおける TCA サイクルを阻害し、エネルギー産生を低下させる (crabtree effect)^{12,13)}。卵丘細胞はこのグルコースをピルビン酸 (8 細胞期までの初期胚のエネルギー源となる¹³⁾) に代謝処理することで胚発生に促進的に作用する。今回培養に用いた TCM199 のグルコース濃度は 5.6 mM (1 g/l) であり、グルコースが卵子の成熟及び、その後の発生に影響を及ぼした可能性も考えられる。今後さらに feeder 効果の検証を行い、feeder 細胞としては成熟卵胞由来の顆粒膜細胞がよいのか成熟前の卵胞由来の顆粒膜細胞がよいのか、あるいはまた卵丘細胞がよいのか、卵子に付着していない壁側の顆粒膜細胞がよいのかなどの点についても明らかにしていく必要がある。実際、今回の成績でも GV 期での卵丘細胞の存在が胚発生に促進的に働く可能性が示唆された。IVM の至適条件については今後さらに検討を重ねていく必要がある。

本研究では、卵巣刺激採卵周期に偶然採取された未成熟卵子の臨床応用についての基礎的検討を行った。MI 期由来卵子でその 12% に胚盤胞を得たことによりこれらの卵子を臨床治療に応用できる可能性が示唆された。しかし、形態的に正常な体外成熟卵子の異数体発生率が 18.3%¹¹⁾ という染色体異常の報告などもあり、これら未成熟卵子の臨床応用には、遺伝子学的面でも検討が必要と考えられる。今後、体外成熟培養条件のさらなる改善が必要であり、またこれらの IVM で得られた胚の胚盤胞以降の発生能についての検討も必要である。

文 献

- 1) Nagy ZP, Cecile J, Liu J, et al. (1996) Pregnancy and birth after intracytoplasmic sperm injection of *in vitro* matured germinal-vesicle stage oocytes: case report. *Fertil Steril* 65: 1047-1050
- 2) Liu J, Katz E, Garcia JE, et al. (1997) Successful *in vitro* maturation of human oocytes not exposed to human chorionic gonadotropin during ovulation induction, resulting in pregnancy. *Fertil Steril* 67: 566-568
- 3) Edirisinghe WR, Junk SM, Matson PL, et al. (1997) Birth from cryopreserved embryos following *in-vitro*

- maturation of oocytes and intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12 : 1056-1058
- 4) Tucker MJ, Wright G, Morton PC, et al. (1998) Birth after cryopreservation of immature oocytes with subsequent *in vitro* maturation. Fertil Steril 70 : 578-579
 - 5) Check ML, Brittingham D, Check JH, et al. (2001) Pregnancy following transfer of cryopreserved—thawed embryos that had been a result of fertilization of all *in vitro* matured metaphase or germinal stage oocytes. case report. Clin Exp Obstet Gynecol 28 : 69-70
 - 6) Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, et al. (1991) Pregnancy after *in vitro* fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture *in vitro* and their transfer in a donor oocyte program. Fertil Steril 55 : 109-113
 - 7) Salha O, Abusheikha N, Sharma V, et al. (1998) Dynamics of human follicular growth and *in-vitro* oocyte maturation. Hum Reprod Update 4 : 816-832
 - 8) Trounson A, Anderiesz C, Jones G (2001) Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. Reproduction 121 : 51-75
 - 9) Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP (1995) Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. J Reprod Fertil 103 : 293-298
 - 10) Janssenswillen C, Nagy ZP, Van Steirteghem A (1995) Maturation of human cumulus-free germinal vesicle-stage oocytes to metaphase II by coculture with monolayer Vero cells. Hum Reprod 10 : 375-378
 - 11) Hwang JL, Lin YH, Tsai YL (2000) *In vitro* maturation and fertilization of immature oocytes : a comparative study of fertilization techniques. J Assist Reprod Genet 17 : 39-43
 - 12) Gardner DK, Lane M (1998) Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. Hum Reprod 13 Suppl 3 : 148-159 ; discussion 160
 - 13) Trounson A, Gardner D (1999) Handbook of *in vitro* fertilization. Second Edition CRC Press LLC, 2000Co, Florida : 205-264
 - 14) Racowsky C, Kaufman ML (1992) Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured *in vitro* : Analysis by light microscopy. Fertil Steril 58 : 750-755

(受付 : 2002 年 5 月 1 日)

(受理 : 2002 年 11 月 18 日)

Embryo Formation from Immature Oocytes Retrieved in Superovulation Cycle after *In Vitro* Maturation and Fertilization by Intracytoplasmic Sperm Injection

Misa NISHI, Miho TOYOKITA, Naonori HARA¹⁾, Hiroyuki YAMASAKI
Makio SYOZU²⁾ and Yasuhito MICHIKURA

Towako Ladies' Clinic, Ru130 Kojimamachi, Komatu, Ishikawa 923-0002, Japan

¹⁾Towako Ladies' Clinic, Kanazawa 10 Ibaragicho, Kanazawa city, Ishikawa 920-0994, Japan

²⁾Department of Obstetrics/Gynecology, Kanazawa University,
13-1 Takaramachi, Kanazawa Ishikawa 920-8640, Japan

Developmental competency of immature oocytes, coincidentally retrieved in controlled superovulation cycles, were examined for possible future use. 151 immature oocytes (GV stage : 86, MI stage : 65), were taken from 57 consenting women. Oocytes were cultured *in vitro* in TCM199 medium containing 10% follicular fluid for 24~48h. Maturation was confirmed 69% and 86% of GV and MI oocytes. From these GV 54 and MI 51 oocytes were inseminated by intracytoplasmic sperm injection (ICSI). Blastocyst formation ratio (8%) of these oocytes were significantly lower than mature oocytes (30%). Blastocyst formation of cumulus enclosed GV and MI oocytes was the same, but higher than denuded GV oocytes ($p < 0.08$). Apparently, cumulus cells play a role on the oocytes' maturation process.

Key words : immature oocytes, *in vitro* maturation, cumulus cells, blastocyst, ICSI

(Jpn J Fertil Steril 48 : 11-15 2003)

新しく開発された培養液 HFF99 のヒト体外受精への臨床応用

Clinical Application of a New Medium Product of “HFF99” to Human *In Vitro* Fertilization

平井香里
Kaori Hirai

宇津宮隆史
Takafumi Utsunomiya

荒木康久¹⁾
Yasuhisa Araki¹⁾

セント・ルカ産婦人科 870-0947 大分市津守富岡5組

¹⁾高度生殖医療技術研究所 371-0105 群馬県勢多郡富士見村石井 909-21

St. Luke Clinic, Oita 870-0947, Japan

¹⁾The Institute for ARMT, Gunma 371-0105, Japan

体外受精胚移植 (IVF-ET) の成績向上に培養液は重要な要素の一つである。現在 IVF-ET に培養液 human tubal fluid (HTF) が広く使用されている。今回著者らは、新しく開発されたヒト卵胞液組成に近いアミノ酸を含有する培養液 human follicle fluid (HFF99) を HTF と比較した。患者群を2群に分けて前方視的無作為試験を実施した。受精率は HFF99 で 73.6%、HTF は 67.6%、妊娠率は HFF99 で 34.5%、HTF は 28.6% を示し受精率、妊娠率とも HFF99 で HTF と比べ有意差は認められないものの高値を示した。これを媒精法別でみると ICSI では培養液間で差は殆ど見られなかったが、conventional-IVF (c-IVF) 施行の受精率は HFF99 で 64.9% (96/148) に対して HTF 51.0% (73/143) であり有意 ($P < 0.05$) に HFF99 の受精率は高かった。妊娠率では有意差は認められないものの HFF99 で高い傾向を示した。症例は少ないが、子宮内膜症での HFF99 の妊娠率は 71.4% (5/7) で、HTF の妊娠率 25.0% (1/4) に比べ高値を示した。HFF99 は安定した成績が得られヒト IVF-ET の培養に有用であることが判明した。

キーワード：HFF99, HTF, 体外受精, 受精率, 妊娠率

(日不妊会誌 48: 17-22 2003)

緒言

体外受精-胚移植 (IVF-ET) において良質な胚を得ることは、本法を成功に導く重要な条件であり、培養液を含め、培養環境を検討していくことは極めて大切な研究課題の一つである。IVF-ET で最も広く使用されている培養液の一つに human tubal fluid (HTF) がある。我々は従来、この HTF を採卵から3日目 (D3) までの培養に用いてきた。今回ヒト卵胞液の成分に近似したアミノ酸を含有する培養液 human follicle fluid (HFF99) を採卵から D3 までの培養に使用し、HFF99 の臨床的有用性を HTF と比較検討した。

方法

2000年12月16日より2001年5月31日までに当院で体外受精、3日目胚移植を行った111周期を対象とした。内訳は HFF99 (扶桑薬品工業株式会社) 55周期と、HTF (Irvine Scientific 社) 56周期であり患者を無作為に2群に分けて前方視的試験を行い、受精率、分割率、妊娠率について検討した。その際、不妊因子別、および媒精法 (conventional-IVF, 顕微授精 (ICSI)-IVF) 別の比較検討も行った。また ICSI 時、卵丘細胞除去にて GV 期や MI 期の卵子であることが確認できた卵子を対象に、未成熟卵子の MII 期到達率も比較検討した。なお、それぞれの培養液には非働化した患者血清を 10% 添加した。

表 1 対象者の臨床的所見

	(2000/12/16 ~ 2001/05/31)	
	HFF99	HTF
施行周期数	55	56
平均年齢(歳)	33.5 ± 4.2	33.5 ± 4.9
平均採卵子(個)	7.0 ± 4.4	7.4 ± 4.3
平均媒精卵子(個)	5.4 ± 3.5	5.8 ± 3.7
平均 2PN 胚数(個)	4.1 ± 2.7	4.0 ± 2.7
平均移植胚数(個)	2.1 ± 0.5	1.9 ± 0.6
平均移植時内膜厚 (mm)	12.0 ± 2.5	12.0 ± 2.8
平均 ART 施行回数(回)	1.9 ± 1.6	1.9 ± 1.2

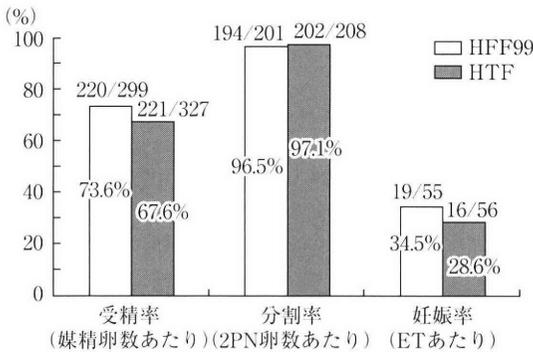


図 1 培養液間による受精率, 分割率, 妊娠率の比較

統計処理は t 検定, Welch の検定, χ^2 検定を用いた.

結 果

両群 (HFF99 と HTF) の年齢, 採卵子数, 媒精卵子数, 2PN 胚数, 移植胚数, 移植時の内膜厚, ART 施行回数に有意差は見られなかった (表 1).

両群の受精率, 分割率, 妊娠率を比較した結果, 受精率は 73.6% (220/299) 対 67.6% (221/327), 分割率は 96.5% (194/201) 対 97.1% (202/208) 及び妊娠率は 34.5% (19/55) 対 28.6% (16/56) だった. 分割率は両群の間に有意差は認められなかったが, 受精率, 妊娠率は HFF99 で有意差は認められないものの高い傾向があった (図 1).

また, 不妊因子別にみると HFF99, HTF それぞれ, 卵管因子 35.0% (7/20), 31.3% (5/16), 抗精子抗体因子 -% (0/0), 100% (1/1), 子宮内膜症 71.4% (5/7), 25.0% (1/4), 男性因子 33.3% (4/12), 25.0% (3/12), 原因不明 23.1% (3/13), 21.7% (5/23) であった (図

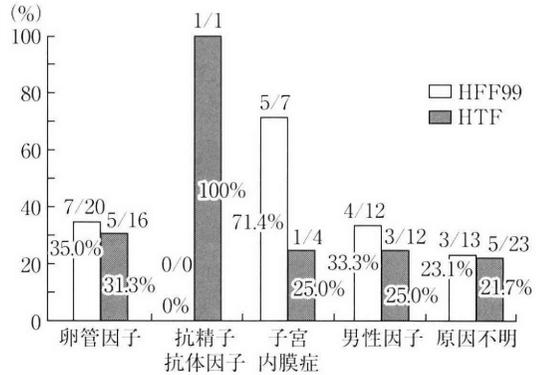


図 2 培養液間による不妊因子別にみた妊娠率

2). 対象周期数が少ない抗精子抗体因子を除くと, 両培養液においてほぼ同等な妊娠率が得られた. 周期数は少ないものの子宮内膜症では HFF99 使用で統計学的有意差は認められないものの高い妊娠率が得られる傾向を示した. 媒精方法により conventional-IVF (c-IVF) と ICSI-IVF に分けて比較した結果 c-IVF では HFF99 と HTF の受精率はそれぞれ 64.9% (96/148) と 51.0% (73/143) であり, HFF99 の受精率が高かった ($P < 0.05$). 分割率は 97.9% (93/95), 96.2% (76/79) で有意差は認められなかった. 妊娠率では 57.1% (12/21), 36.8% (7/19) で有意差はないものの HFF99 群が高くなる傾向を示した. 一方 ICSI-IVF の受精率は 82.1% (124/151) と 80.4% (148/184), 分割率は 95.3% (101/106), 97.7% (126/129), 妊娠率では 20.6% (7/34), 24.3% (9/37) で両群に有意差は認められなかった (図 3).

3 日目における胚分割の速度の観察結果は 6 分割以上到達率が HFF99 で 66.8% (123/184), HTF 55.8% (106/190) で有意に HFF99 群が高かった ($P < 0.05$). 8 分割以上到達率は各々 39.1% (72/184), 30.0% (57/190) で HFF99 において良好な成績が得られたが有意差は認められなかった (図 4).

未成熟卵子の成熟培養も行った. ICSI 時に GV 期もしくは MI 期の卵子を 24 時間, 48 時間体外成熟培養を行った. 各々の培養液で成熟率を比較した結果, 24 時間後の HFF99 群の成熟率は 73.1% (19/26) に対し HTF 群のそれは 68.4% (13/19) であり, 有意差は認められないものの HFF99 群で高い傾向を示した. 48 時間後は HFF99, 84.6% (22/26) に対し HTF, 84.2% (16/19) で有意差は認められなかった.

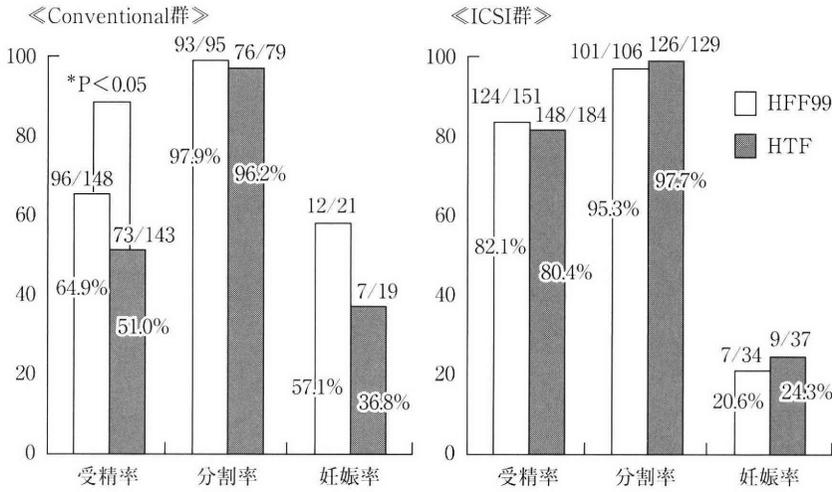


図3 培養液間でのc-IVFおよびICSIの臨床成績

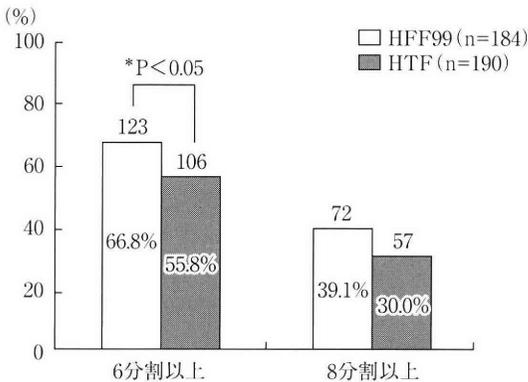


図4 D3における胚分割速度の比較

考 察

世界最初の体外受精の成功から24年が経過した。その間、妊娠率の向上を目的とし、培養液を初め、さまざまな方面から検討がなされてきた。ヒト体外受精が開始された初期の培養液はHam's F-10であり、またその後に応用できることが明らかにされたαMEMも元々胚ではなく体細胞の発育を支持できるように開発された複雑な組成の培養液で、経験的にIVF-ETに応用されてきたものである。その後Ham's F-10はヒポキサンチン¹⁾や、活性酸素の産生源になりうる2価の金属陽イオンなど受精や胚発育に有害な成分を含むことが明らかにされた²⁾。また、αMEMはアミノ酸、特にグ

ルタミンを多く含むため、保存中やインキュベーションにより分解して多量のアンモニアを産出することから胚発育や移植後の胎児への有害な作用も懸念されるため^{3,4)}、良好な成績を得るためには培養液交換など取り扱いに注意が必要である。この様に複雑な組成の培養液では胚の発育に有害な成分を含む可能性が否定できないため、初期胚の発育に最低限必要とされる栄養素のみを含んだHTFが開発され⁵⁾、比較的良好な成績が得られることからHTFは今日、生殖補助医療(ART)の領域で最も一般的に使用されている。HTFは人の卵管液の塩組成をベースに開発されたもので、組成は電解質、炭水化物(エネルギー源)のみからなる単純な培養液である(表2)。しかしヒト卵管液のカリウム濃度は7~10mMの間と報告されている⁶⁾のに対し、HTFのカリウム濃度は5mMに過ぎず、ヒト卵管内の組成を忠実に反映したものとは言えず、むしろBiggers, Whitten & Whittingham培養液(BWW)に近い組成である。最近の傾向として培養液の組成は前培養、受精、初期から胚盤胞までの段階に適した種々の連続型組織培養液が開発され容易に入手可能となってきた。今後は生体内環境や胚の代謝を考慮した培養液の改良、開発が更に進むと予想される。

受精は卵管膨大部で成立する。卵胞液内で生育した卵子は排卵され膨大部に移行する時点で卵胞液も卵子に伴って膨大部に移行していると考えられ、受精や初期発生過程で卵胞液が重要な役割を持つことが示唆される。このことは卵胞液の精子に対する作用として、

表2 HFF99 と HTF の組成比較

成分 (/L)	HFF99	HTF	成分 (/L)	HFF99	HTF
NaCl	6.190g	5.938g	Val	16.4mg	—
KCl	0.230g	0.350g	Met	2.1mg	—
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.320g	0.300g	Ile	4.5mg	—
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.215g	0.049g	Leu	7.9mg	—
KH ₂ PO ₄	0.137g	0.050g	Cys-Cys	1.4mg	—
NaHCO ₃	2.150g	2.100g	Try	7.8mg	—
Glucose	0.753g	0.050g	His · HCl · H ₂ O	16.4mg	—
Na-pyruvate	0.041g	0.036g	Arg · HCl	11.2mg	—
Na-lactate	1.849g	2.398g	Glu	26.2mg	—
硫酸ゲンタマイシン	10mg	—	Pro	11.6mg	—
ペニシリン	—	10 万単位	Gly	11.6mg	—
硫酸ストレプトマイシン	—	50mg 力価	Ala	26.6mg	—
Phe	6.9mg	—	Tau	3.9mg	—
Trp	6.7mg	—	Asp	0.8mg	—
Lys	23.8mg	—	Ser	7.8mg	—
Thr	14.8mg	—	Asn · H ₂ O	9.8mg	—

Eagle' essential amino acids : Phe, Trp, Lys, Thr, Val, Met, Ile, Leu, Cys-cys, Tyr, His, Arg

Eagle' non-essential amino acids : Glu, Pro, Gly, Ala, Tau, Asp, Ser, Asn

— : not contained

ハイパーアクチベーションを惹起する⁷⁾或いは先体反応の誘起を促進させる⁸⁾という報告や培養液中への卵胞液の添加は受精やその後の胚の発育に有効である⁹⁾とする報告からも裏付けられる。この様に受精の場で卵胞液が有効に生かされていることに着目し開発された新しい培養液 HFF99^{3,10)} と HTF の比較を行い HFF99 の有用性について検討した。HFF99 の主たる特徴は、生理的濃度のアミノ酸を含んでいることである。基礎組成は HTF と変わらないが、HTF と比較して、リン酸及びグルコース濃度がやや高く、乳酸濃度が低いという特徴を有しており、卵胞液の濃度に近似している(表2)。今回の研究で臨床的には HFF99 で受精率と妊娠率が HTF と比べやや高くなる傾向がみられた(図1)。媒精法別にみると ICSI では培養液間で差はみられなかったが、c-IVF 施行の受精率は HFF99 が HTF に比して有意に高く(P<0.05)、妊娠率も高い傾向が得られた。これは採卵から受精までの培養を、アミノ酸を含む培養液を使用したことによる結果と考えられた。これらは Yoshida (1993)¹¹⁾ がブタにおいて卵細胞内で前核形成に重要な役割を持つとされるグルタチオン合成がアミノ酸のうちのシステイン添加によって高まった結果と報告していることから推察され

る。すなわち、グルタチオンはグルタミン酸、システイン及びグリシンの3つのアミノ酸から構成されており、グルタチオンは細胞内に直接摂取、移行しないため卵細胞内で合成される必要がある。よってその前駆体である培養液中のアミノ酸を細胞内に取り込んだ結果と考えられる。ブタやハムスターにおいてアミノ酸の存在は雄性前核形成を促進するという報告もある^{12,13)}。また、タウリンはヒトやハムスター精子の運動性の維持に有効であること¹⁴⁾ またハムスターでは正常な受精にタウリンが必要であることが示唆されており¹⁵⁾、ヒトでも同様に HFF99 に含まれるタウリンが有効であった可能性も考えられる。その他初期胚発生過程におけるアミノ酸の有効性は細胞内アミノ酸プールの維持に貢献できることにあることも示唆されている¹⁶⁾。以上の点が卵胞液に近い組成の HFF99 が HTF より受精率を上昇させた原因と考えられる。一方 ICSI では両培養液間で差は見られなかった。これは採卵後 ICSI 施行前に卵丘細胞を除去するため、卵丘細胞を通じて十分のアミノ酸が細胞内に取り込めなかったためと推察される。次に移植時にあたる3日目における胚分割の速度の比較では、6分割到達率、8分割到達率は HFF99 で高いまたは高い傾向を示した。これは上述し

たことに加えて HFF99 に抗酸化作用を持つタウリン、細胞内浸透圧調節作用を持つタウリンやグリシンが存在していることも一つの原因と推察される^{17,18)}。このような初期発生過程におけるアミノ酸の有用性については、Gardner ら¹⁹⁾も報告している。当院では培養液に添加物として患者血清を使用しているが、これにアミノ酸が含まれているため、HTF にもアミノ酸は供給されている。しかしながら、その濃度は HFF99 培養液と比較して著しく低い。Nakazawa ら¹⁰⁾はアミノ酸の胚の発育に対する効果は単にその種類だけでなく、個々の濃度も大きく影響することを示し、低濃度のアミノ酸では十分な効果が得られないことを示した。また、血清中にはその他の成分も含まれるが、10%の添加では大きく培養液の組成を変化させることはないと考えられる。よって、血清を添加した系でも培養液の効果を十分評価できたものとする。また、今回の検討では妊娠率の評価に重きをおいたため、同一症例で卵を分けて検討することは行わなかったが、この評価も必要と考える。未成熟卵子の検討では HFF99 培養液を実際にマウス胚に用いた報告³⁾によると MI 期の未成熟卵子の成熟培養に用いた検討で HFF (HFF99) 培養液では HTF、 α MEM 及び Ham's F-10 と比較して良好な成熟や胚盤胞への発生が得られており、未成熟卵子を救済できる可能性が示唆され、HFF 培養液の有効性はアミノ酸を含有すること、またアミノ酸を含むが、分解物であるアンモニアをほとんど発生しない点にあると報告している³⁾。今回の研究で未成熟卵子の成熟培養の試みでも、HFF99 では早期に成熟する傾向がみられた。この点もアミノ酸の作用と推察された。今回の検討により HFF99 は臨床使用において特に c-IVF では受精率を向上させ、胚発育速度を高めて妊娠率向上に寄与する可能性があると考えられる。

以上よりヒト卵胞液成分と近似した組成を有する HFF99 は安定した臨床成績が得られることが示唆された。

文 献

- 1) Bastias MC, McGee-Belser ST, Bryan SH, et al. (1993) *In vitro* deleterious effect of hypoxanthine in Ham's Nutrient Mixture F-10 culture medium on human oocyte fertilization and early embryonic development. *Fertil Steril* 60: 876-880
- 2) Matsumoto H, Noda Y, Goto Y, et al. (1993) The Effect of Heavy Metal Ions on the *in Vitro* Development of Mouse Embryos: A comparison of the Developmental Ability between Ham's F-10 and α -MEM. *J Reprod Dev* 39: 223-228
- 3) Ohashi K, Nakazawa T, Kawamoto A, et al. (2000) Mouse oocyte maturation and blastocyst culture *in vitro* in medium adjusted to human follicular fluid composition. *J Mamm Ova Res* 17: 42-50
- 4) Lane M, Gardner DK (1994) Increase in postimplantation development of cultured mouse embryos by amino acids and induction of fetal retardation and exencephaly by ammonium ions. *J Reprod Fertil* 102: 305-312
- 5) Quinn P, Kerin JF, Warnes GM (1985) Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44: 493-498
- 6) Lipes J, Enders RG, Pragay DA, et al. (1972) The collection and analysis of human fallopian tubal fluid. *Contraception* 5: 85-103
- 7) Ohashi K, Saji F, Wakimoto A, et al. (1994) Selection of acrosome-reacted sperm with MH61-immunobeads. *J Androl* 15: 78-82
- 8) Mortimer D, and Camenzind AR. (1989) The role of follicular fluid in inducing the acrosome reaction of human spermatozoa incubated *in vitro*. *Hum Reprod* 4: 169-174
- 9) Dell'Aquila ME, Cho YS, Minoia P, et al. (1997) Effects of follicular fluid supplementation of *in-vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in-vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 12: 2766-2772
- 10) Nakazawa T, Ohashi K, Yamada M, et al. (1997) Effect of different concentrations of amino acids in human serum and follicular fluid on the development of one-cell mouse embryos *in vitro*. *J Reprod Fertil* 111: 327-332
- 11) Yoshida M. (1993) Role of Glutathione in the Maturation and Fertilization of Pig Oocytes *In Vitro*. *Mol Reprod Dev* 35: 76-81
- 12) Ka HH, Sawai K, Wang WH, et al. (1997) Amino acids in maturation medium and presence of cumulus cells at fertilization promote male pronuclear formation in porcine oocytes matured and penetrated *in vitro*. *Biol Reprod* 57: 1478-1483
- 13) Kito S, Bavister BD (1997) Male pronuclear formation and early embryonic development of hamster oocytes matured *in vitro* with gonadotrophins, amino acids and cysteamine. *J Reprod Fertil* 10: 35-46
- 14) Mrsny RJ, Waxman L, Meizel S. (1979) Taurine maintains and stimulates motility of hamster

- sperm during capacitation *in vitro*. J Exp Zool 210: 123-128
- 15) Gawtkin RB, Haidi AA. (1973) Requirements for the maturation of hamster oocytes *in vitro*. Exp Cell Res 76: 1-7
- 16) Gardner DK, Lane M (1996) Alleviation of the '2-cell block' and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and Physical parameters. Hum Reprod 11: 2703-2712
- 17) Devreker F, Van den Bergh M, Biramane J et al. (1999) Effects of taurine on human embryo development. Hum Reprod 14: 2350-2356
- 18) Dawson KM, Collins JL, Baltz JM (1998) Osmolarity-dependent glycine accumulation indicates a role for glycine as an organic osmolyte in early preimplantation mouse embryos. Biol Reprod 59: 225-232
- 19) Lane M, Gardner DK (1997) Nonessential amino acids and glutamine decrease the time of the first three cleavage divisions and increase compaction of mouse zygotes *in vitro*. J Assist Reprod Genet 14: 398-403
- (受付: 2002 年 6 月 5 日)
(受理: 2002 年 11 月 11 日)

Clinical Application of A new Medium Product of "HFF99" to Human *In Vitro* Fertilization

Kaori Hirai, Takafumi Utsunomiya and Yasuhisa Araki¹⁾

St. Luke Clinic, Oita 870-0947, Japan

¹⁾The Institute for ARMT, Gunma 371-0105, Japan

It is important to use high quality medium for successful pregnancy by *in vitro* fertilization (IVF). To improve *in vitro* culture condition, we have tried to use HFF99 medium instead of conventional HTF medium. So we compared clinical results between HFF99 (55 cycle) and conventional HTF (56 cycle) in a prospective randomized study. The fertilization rate (HFF99 and HTF) was 73.6% (220/299) and 67.6% (221/327), and the pregnancy rate were 34.5% (19/55) and 28.6% (16/56), respectively. Thus, both fertilization rate and pregnancy rate were higher in HFF99 medium group than in HTF medium group. These results suggest that amino acids in the HFF99 medium act by regulating osmotic pressure and processes of fertilization. We conclude that the HFF99 medium is clinically useful in human IVF program.

Key words : HFF99, HTF, IVF, pregnancy, fertilization

(Jpn J Fertil Steril 48: 17-22 2003)

採卵術における麻酔の必要性に関する検討

—短時間全身麻酔の試み—

The Necessity of General Anesthesia for Oocytes Recovery

守田 道由 ¹⁾	詠田 由美 ²⁾	池上 芳美 ²⁾
Michiyoshi MORITA	Yumi NAGATA	Yoshimi IKEGAMI
古賀 裕紹 ²⁾	渡辺 久美 ²⁾	奥野 加奈子 ²⁾
Hirotsugu KOGA	Kumi WATANABE	Kanako OKUNO
	石田 弘美 ²⁾	
	Hiromi ISHIDA	

¹⁾IVF 詠田クリニック 麻酔部門

Department of anesthesia, Center for Reproductive Medicine, IVF Nagata Clinic

²⁾IVF 詠田クリニック 生殖医療部門

Center for Reproductive Medicine, IVF Nagata Clinic

不妊治療採卵術に際し患者の選択によりプロポフォール、ペンタゾシン、亜酸化窒素併用による短時間全身麻酔(P法)を行い、採卵術における麻酔の必要性を検討した。1999年6月より2001年8月までに採卵術を行った182例292周期を対象とした。2000年10月までの144周期(A期間)はジアゼパム、ペンタゾシンの投与を行った(D法)。2000年11月からの148周期(B期間)は、麻酔法を患者の選択とし、P法またはD法を行った。A期間とB期間で採卵を行った38例中84.2%はP法を選択した。B期間のP法選択率は87.8%であった。対胚移植周期妊娠率はP法26.1%、D法25.7%で両法に有意差は認めなかった。採卵術に際し、患者の要望により麻酔は必要であると考えられた。

キーワード：麻酔、プロポフォール、採卵術、ART

(日不妊会誌 48:23-26 2003)

緒言

ART治療では、卵巣から体外へ卵を取り出すといった採卵術を基本とし、その採卵術は、経膈的に後膈門蓋よりダグラス窩腹膜へと穿通する手技で¹⁾、患者にとって多大なる痛みを伴うものである。

現在、本邦においては、561の施設で採卵術が行われている²⁾が、短時間、日帰りの処置であることを理由に多くは局所麻酔や鎮痛薬のみの投与で、施行されている。しかし、疼痛という側面では患者に心理的苦痛を強いていることも否定できない。近年、ART治療の患者数は増加傾向にあり¹⁾、患者の採卵時の疼痛除去に対する関心も高まっていると思われる。現在、日帰り

麻酔に関する様々な領域からの報告³⁻⁵⁾があるが、婦人科不妊治療ART領域における麻酔法の十分な検討はなされておらず、本邦においては特に全身麻酔を併用した採卵術の詳細な報告はない。

今回、われわれは、採卵術の麻酔法として、ジアゼパム、ペンタゾシン投与方法(D法)とプロポフォール、ペンタゾシン、亜酸化窒素併用法(P法)を行い、患者の選択の有無ならびに妊娠成績より採卵時の全身麻酔の必要性について検討したので報告する。

対象および方法

1999年6月より2001年8月まで当院にて、IVF-ETあるいはICSIを目的に採卵術を施行した182症例

表 1 採卵時間の比較

	D 法	P 法	全周期
採卵周期数	151	141	292
採卵数(個)	7.9 ± 5.0	6.9 ± 4.4	7.4 ± 4.8
採卵時間(分)	12.6 ± 5.9 †	10.2 ± 5.2 †	11.4 ± 5.7

† p < 0.001

292 採卵周期を対象とした。1999 年 6 月より 2000 年 10 月までの 144 採卵周期 (A 期間) は採卵術の際に D 法にて採卵術を行った。2000 年 11 月より 2001 年 8 月までの 148 採卵周期 (B 期間) は、以下のインフォームドコンセントのもと、麻酔方法を P 法または D 法とし、患者自身による選択とした。

① P 法の選択により処置中の痛みが無く、採卵時の恐怖心除去などの有用性と全身麻酔薬投与によるアレルギーなどの危険性について。

② P 法の選択により採卵術の際に、当院においては、さらに 10% の経済的負担を要すること。

③ P 法は短時間全身麻酔となるため麻酔専任医が担当すること。

麻酔は、それぞれ麻酔前投薬として、処置室入室 15 分前に硫酸アトロピン 0.5 mg を筋注し、入室後、非観血的血圧、心電図、経皮的酸素飽和度をモニターした。

D 法は、ジアゼパム 5 mg、ペンタゾシン 15 mg 静注後、採卵術を直ちに行った。P 法は、ペンタゾシン 15 mg 静注後、採卵術直前に、プロポフォール初期量 2 mg · kg⁻¹ 投与し、亜酸化窒素 4l · min⁻¹、酸素 2l · min⁻¹ を開始し、マスク換気下に採卵術を行った。術中、体動時にはプロポフォールの追加投与 1 mg · kg⁻¹ を行った。

採卵術は、経膈超音波診断装置 (SSD-1700, ALOKA, 東京) 下に 18G あるいは 16G の採卵針 (フレスポイド組織採取針, 北里サブライ, 静岡) を用いて後膈円蓋よりダグラス窩腹膜へと穿通し、それぞれ左右の卵巣内卵胞に到達、卵胞内容ならびに卵を吸引回収した。

D 法と P 法の採卵数と採卵時間について検討を行った。A 期間に採卵術施行経験があり、B 期間に再度採卵術を受けた患者について、全身麻酔の選択をした患者の割合ならびに、B 期間で全身麻酔の選択をした患者の割合について解析した。さらに、麻酔法による妊娠への影響を解析するために、D 法と P 法での対胚移植周期妊娠率の比較を行った。統計学的有意差の

表 2 採卵術における患者の麻酔選択率

	P 法選択率
A 期間～B 期間 (重複 38 症例)	84.2%
B 期間 (99 症例)	87.8%

表 3 D 法と P 法の妊娠率

	D 法	P 法
胚移植周期(例)	144	138
妊娠周期(例)	37	36
対胚移植周期妊娠率(%)	25.7	26.1

検定に χ^2 検定と t 検定で行い、P < 0.05 を有意とした。

結 果

P 法を選択した患者の採卵時間 10.2 ± 5.2 分 (2～35 分)、D 法選択患者の採卵時間は 12.6 ± 5.9 分 (2～17 分) で、P 法で若干、採卵時間が短い傾向にあったが統計学的に両法間に有意差はなかった (表 1)。

P 法におけるプロポフォール初回投与量は 107 ± 15 mg、追加投与量は 46 ± 12 mg、総投与量は 158 ± 44 mg であった。

A 期間に D 法で採卵術経験があり、B 期間で採卵を行った 38 症例中 32 例 (84.2%) は、再度採卵術の際には P 法を選択した。B 期間で P 法を選択した患者の割合は、99 症例中 87 例 (87.8%) だった (表 2)。

対胚移植周期妊娠率は、P 法では 26.1% (36 妊娠周期/138 胚移植周期)、D 法は 25.7% (37 妊娠周期/144 胚移植周期) で両法間に妊娠率に有意な差は認められなかった (表 3)。

考 察

不妊治療 ART 領域の採卵術は歴史が浅く、また、採卵術の際に麻酔科医が関与している施設もわずか 11%と極めて低い結果が得られている⁶⁾。このために麻酔法の十分な確立に至っていないかった。

ART 治療は保険の適応が得られていないため、治療は患者の自費負担にて施行される。今回の検討では、採卵術の麻酔の要不要を選択してもらった。全身麻酔の併用により当院においては経済的な負担を有しても、その選択希望が多く見られた。また、当院看護師による全身麻酔に関するアンケート⁷⁾によると、86.4%の患者が全身麻酔を希望しており、その内 75.4%の患者が「痛そうだから、痛いから。」と、その理由を答えている。全身麻酔を希望しなかった 13.6%の患者は「がまんできそう」と答えていた。また、再度全身麻酔を希望するかの問いに対して、87.9%の患者が希望していた。採卵術の際の疼痛は、患者にとっての重大な不安要素の一つであると考えられる。短時間であっても、全身麻酔という言葉に対し不安を持つ人もいるようであるが、麻酔専門医が麻酔を担当することの説明により、麻酔そのものに対する不安も軽減され、その結果として、再度の採卵術の際に P 法を選択した人が高率に認められたものと推測される。

採卵数に有意差は無く P 法において採卵時間が有意に短い結果となったのは、採卵手技が容易に行えるようになったと思われる。ART 治療の適応となる患者の一部には、その不妊因子として骨盤内癒着などによる症例もあり、採卵時の疼痛の程度も個人の性格や穿刺する卵巣の位置に強く影響されると思われる。

B 期間において D 法と P 法を選択した患者との間に採卵時間は有意な差を認めなかったことより、採卵時間の長短で麻酔の要不要が決定されるのではなく、採卵時の疼痛そのものの存在が患者への不安要素となり、疼痛を除去したいという患者自身の要望であると考えられる。採卵時間は最も短い患者で 2 分、長い場合は 35 分であるが、患者の痛みを除去したいと要望のある限りこの範囲に適応した麻酔を得られる麻酔法の確立を要すると思われる。

採卵術は日帰り処置が中心となっている。日帰り処置に対する短時間麻酔に関し他の領域からは多くの報告³⁻⁵⁾が見られるが、採卵術に関しての報告は少ない。日帰り処置に対する短時間麻酔にはプロポフォールの静脈内間歇投与に、笑気、鎮痛薬を用いた全身麻酔⁸⁾が

適しているとの報告があり、今回われわれも短時間麻酔薬としてプロポフォールを使用した。プロポフォールは、排泄が速やかで、覚醒が早く、抗不安作用、健忘作用、制吐作用があり⁹⁾、揮発性麻酔薬の使用に比べ術後の悪心嘔吐が有意に少なく¹⁰⁻¹²⁾、早い帰宅可能な状態を期待できる。また、これら麻酔薬を使用するにあたって、卵子への影響を十分に考慮する必要がある。チオペンタールとプロポフォール使用における ART 妊娠率に有意な差は無かったとの報告¹³⁻¹⁴⁾がある。また、マウスの卵に直接プロポフォールを暴露した際に、低濃度のプロポフォールでさえ卵の分裂には有害であったとの報告¹⁵⁾やプロポフォールを使用した麻酔下に得られた人卵子において、受精卵、非受精卵で卵胞液中のプロポフォール濃度に有意な差は無かったとの報告¹⁶⁾がある。現在のところプロポフォール暴露による卵への影響、特に受精や妊娠成立への影響は無いと考えられている¹⁷⁾が、流産率や児の長期的予後を含めて評価し、今後その使用方法について詳細に検討する必要があると思われる。

今回われわれは、患者による全身麻酔の選択の有無ならびに妊娠成績より採卵時の麻酔の必要性について検討した結果、ART 採卵術に際し、患者の要望による麻酔は必要であると考えられた。

本論文の要旨は第 46 回日本不妊学会 (2001 年) で報告した。

文 献

- 1) Bokhari A, Pollard BJ (1998) Anesthesia for assisted conception. *Eur J Anaesth* 15: 391-396
- 2) 総会記事. (2002) 日産婦誌 54: 1274-1409
- 3) Heath PJ, Ogg TW, Gilks WR (1990) Recovery after day-case anaesthesia. *Anesthesia* 45: 911-915
- 4) Nightingale JJ, Lewis IH (1992) Recovery from day-case anaesthesia: comparison of total i.v. anaesthesia using propofol with an inhalation technique. *Br J Anaesth* 68: 356-359
- 5) Candelaria LM, Smith RK (1995) Propofol infusion technique for outpatient general anaesthesia. *J Oral Maxillo Surg* 53: 124
- 6) 照井克生, 田谷順子, 石原理, 他 (2001) 採卵時の麻酔法と管理についての実態調査. *日不妊会誌* 46: 383
- 7) 渡辺久美, 守田道由, 奥野加奈子, 他 (2002) 体外受精の採卵術時における疼痛緩和の必要性—麻酔医による短時間全身麻酔導入の試み. *日不妊会誌* 47: 110
- 8) Lindekaer AL (1995) The influence of nitrous oxide on propofol dosage and recovery after total intrave-

- nous anesthesia for day-case surgery. *Anaesthesia* 50 : 397-399
- 9) Raftery S, Sherry E (1992) Total intravenous anaesthesia with propofol and alfentanil protects against post-operative nausea and vomiting. *Can J Anaesth* 39 : 37-40
 - 10) Nathan N, Peyclit A, Lahrimi A, et al. (1998) Comparison of sevoflurane and propofol for ambulatory anaesthesia in gynaecological surgery. *Can J Anaesth* 45 : 1148-1150
 - 11) Fredman B, Nathanson MH, Smith I, et al. (1995) Sevoflurane for outpatient anesthesia : a comparison with propofol. *Anesth Analg* 81 : 823-828
 - 12) Jellish WS, Lien CA, Fontenot HJ, et al. (1996) The comparative effects of sevoflurane versus propofol in the induction and maintenance of anesthesia in adult patients. *Anesth Analg* 82 : 479-485
 - 13) Pierce ET, Smalky M, Alper MM, et al. (1992) Comparison of pregnancy rates following gamete intra-fallpion transfer (GIFT) under general anesthesia with thiopental or propofol. *J Clin Anesth* 4 : 394-398
 - 14) Hung HW, Hung FJ, Kung FT, et al. (2000) Effect of induction anesthetic agents on outcome of assisted reproductive technology : a comparison of propofol and thiopental sodium. *Changcheng Yi Xue Za Zhi* 23 : 513-519
 - 15) Janssenswillen C, Christiaens F, Camu F, et al. (1997) The effect of propofol on parthenogenetic activation, *in vitro* fertilization and early development of mouse oocytes. *Fertil Steril* 67 : 769-774
 - 16) Imoedemhe DA, Sigue AB, Abdul Ghani I, et al. (1992) An evaluation of the effect of the anesthetic agent propofol (Diprivan) on the outcome of human *in vitro* fertilization. *J Assist Reprod Genet* 4 : 488-491
 - 17) Ben Shlomo I, Moskovich R, Golan J, et al. (2000) The effect of propofol anesthesia on oocyte fertilization and early embryo quality. *Hum Reprod* 15 : 2197-2199

(受付 : 2002 年 5 月 21 日)

(受理 : 2002 年 11 月 8 日)

The Necessity of General Anesthesia for Oocytes Recovery

Michiyoshi Morita, Yumi Nagata, Yoshimi Ikegami, Hirotsugu Koga,
Kumi Watanabe, Kanako Okuno and Hiromi Ishida

IVF Nagata Clinic, Tennjin 3-10-11 Chuo-ku Fukuoka 810-0001 Japan

The purpose of this study is to clarify the necessity of general anesthesia with propofol (P method) for oocytes recovery in gynecological field. One hundred and thirty-nine patients underwent 199 ART treatments between June 1999 and March 2001. For the 144 cycles performed between June 1999 and October 2000 (Period A), we used diazepam with pentazocine for anesthesia (D method). For the 148 cycles in the following period, from November 2000 to March 2001 (Period B), we let the patients choose between P and D methods. Thirty-second out of 38 patients (84.2%) who underwent ART treatment in both periods selected P method on the second oocytes recovery. Eighty-seven out of 99 patients (87.8%) in Period B selected P method. The pregnancy rates for P method and D method, 26.1% and 25.7%, respectively, show no significant difference. In conclusion, we think that for oocytes recovery general anesthesia is needed at patients' request.

Key words : general anesthesia, propofol, oocytes recovery, ART

(Jpn J Fertil Steril 48 : 23-26 2003)

体外受精反復無効例に対する hatching stage 胚移植の試み

The Efficiency of Hatching Stage Embryo Transfer in Multiple Failures in *In-vitro* Fertilization and Embryo Transfer

長木美幸 宇津宮隆史 荒木康久¹⁾
Miyuki NAGAKI Takafumi UTSUNOMIYA Yasuhisa ARAKI¹⁾

セント・ルカ産婦人科

St. Luke Clinic, 5 Tsumori-Tomioka, Oita City, Oita 870-0947, Japan

¹⁾高度生殖医療技術研究所 (ARMT)

The Institute for ARMT, Gunma 371-0105, Japan

IVF-ET において良好な成績を得るためには最良好胚の選別が不可欠である。良好胚を胚移植するために、さまざまな培養液を用いた体外受精や胚盤胞期で胚移植する方法、前核期で良好胚になり得る胚を判定し移植する方法など多くの報告がある。以前、我々は、prospective randomized study によって3日目胚移植と胚盤胞期胚移植(5日目胚移植)の比較を試みたが、その妊娠率に差はなかった。そこで今回、前核期胚を従来どおり培養し、2日目から3日目に機械的方法により透明帯を開孔する assisted hatching (AHA) を行い、胚盤胞を更に培養し hatching stage に達したことを確認して胚移植を試みた。対象は2000年11月21日より2001年9月27日までにIVF-ET 施行回数が5回以上の妊娠困難例とした。

hatching stage での移植 (ET) は54周期であった。コントロールとして、1998年9月より2001年8月までにIVF-ET 施行回数5回以上(コントロール①群)であった周期の妊娠率を比較すると、hatching stage 胚移植群は29.6% (16/54)、コントロール①群は10.1% (29/287)であった。着床率は、hatching stage 胚移植群で16.2% (17/105)、コントロール①群で4.9% (34/694)であった。流産率はhatching stage 胚移植群は50.0% (8/16)、コントロール①群は41.4% (12/29)であった。継続妊娠率はhatching stage 胚移植群は14.8% (8/54)、コントロール①群は5.2% (15/287)であった。hatching stage 胚移植は、最良好胚の選別、子宮内膜と胚盤胞における何らかの相互作用により妊娠率を向上させていると考えられ、IVF-ET 反復無効例に有用であることが示唆された。

キーワード: ART, hatching stage 胚移植, 反復無効症例, 妊娠

(日不妊会誌 48:27-32 2003)

緒言

近年、生殖補助技術は著しく進歩し、さまざまな種類の培養液を用いて良好胚を移植するといった報告や胚盤胞まで胚を成長させて子宮内に戻す胚盤胞期胚移植についての報告がなされている。胚盤胞期胚移植は、最良好胚の選別が可能のためその着床率は高く、前核期胚移植や2細胞期胚移植より生理的であるといわれている。しかし以前、我々は、prospective randomized

study によって3日目胚移植と胚盤胞期胚移植(5日目胚移植)の比較を試みたがその妊娠結果に差はなかった¹⁾。そこで、IVF-ET 施行回数が5回以上の妊娠困難例に対し、機械的方法により初期胚の透明帯を開孔し、胚盤胞を更に培養して hatching blastocysts stage に達した事を確認した胚移植について検討したので報告する。

対象および方法

当院にて 2000 年 11 月 21 日から 2001 年 9 月 27 日までに IVF-ET 施行回数が 5 回以上となる患者 85 周期を対象とした。hatching stage 胚移植群の培養は、3 日目までは HFF99 (扶桑薬品) を使用し、3 日目以降は Blastocyst medium (Cook 社) を使用した。2 日目あるいは 3 日目で透明帯を開孔する機械的方法による assisted hatching (AHA) を行い、5 日目以降 hatching stage に達している胚がみられた時点で胚移植を行った。移植胚数は 3 個までとした。対象として、1998 年 9 月 1 日より 2001 年 8 月 1 日までに IVF-ET 施行 5 回以上で 3 日目あるいは 5 日目に胚移植を行った 298 周期 (コントロール①)、IVF-ET 施行 5 回以上で 5 日目以降の胚移植を行った 179 周期 (コントロール②)、IVF-ET 施行 5 回以上で初期胚に AHA を施行した 43 周期 (コントロール③) と hatching stage 胚移植群について着床率、妊娠率、流産率、継続妊娠率の臨床成績を比較、検討した。コントロール群の培養は、3 日目までの培養については、HFF 又は HTF (IRVIN SCIENTIFIC 社または GIBCO 社) を用いたが、すでに平井らが報告した²⁾ように妊娠率においては HFF との間に差はなかったことを確認している。3 日目以降は、Blastocyst medium (Cook 社) を使用した。

結 果

hatching stage 胚移植群およびコントロール群の背景を表 1 に示す。

周期数は hatching stage 胚移植群が 85 周期、コントロール①群が 298 周期、コントロール②群が 179 周期、コントロール③群が 43 周期であった。平均年齢は hatching stage 胚移植群が 36.0 歳、コントロール①群が 35.5 歳、コントロール②群が 35.4 歳、コントロール③群が 36.3 歳であった。IVF-ET 施行回数は hatching stage 胚移植群で 11.3 回、コントロール①群で 9.3 回、コントロール②群で 9.5 回、コントロール③群で 11.1 回とコントロール①、②群で低い傾向にあったが、コントロール群と hatching stage 胚移植群との差はなかった。平均採卵子数は hatching stage 胚移植群で 8.1 個、コントロール①群で 8.0 個、コントロール②群で 8.8 個、コントロール③群で 4.7 個とコントロール③群で低い傾向にあった。移植胚数は hatching stage 胚移植群で 1.9 個、コントロール①群で 2.4 個、コントロール②群で 2.4 個、コントロール③群で 2.2 個と hatching stage 胚移植群で低い傾向であった。

ing stage 胚移植群で低い傾向であった。

受精率は hatching stage 胚移植群で 74.0%、コントロール①群で 75.0%、コントロール②群で 74.2%、コントロール③群で 68.7% と有意差は認められなかった。5 日目における桑実胚到達率は、hatching stage 胚移植群で 36.6%、コントロール②群で 45.3% とコントロール②群で高かったが、これは IVF-ET 施行回数がコントロール②群で低くなっている為であった。5 日目における胚盤胞到達率は、hatching stage 胚移植群で 12.4%、コントロール②群で 14.4% と差はなかった。

hatching stage 胚移植群およびコントロール群の臨床成績を表 2 に示す。妊娠率は、hatching stage 胚移植群が 29.6% (16/54)、コントロール①群が 10.1% (29/287)、コントロール②群が 7.7% (13/168)、コントロール③群が 7.1% (3/42) といずれも hatching stage 胚移植群で有意に高い結果であった ($P < 0.01$)。着床率は、hatching stage 胚移植群が 16.2% (17/105)、コントロール①群が 4.9% (34/694)、コントロール②群が 3.7% (15/407)、コントロール③群が 3.3% (3/92) と 3 つのコントロール群に比べ hatching stage 胚移植群で高い結果であった。流産率は、hatching stage 胚移植群が 50.0% (8/16)、コントロール①群が 41.4% (12/29)、コントロール②群が 61.5% (8/13)、コントロール③群が 33.3% (1/3) で有意差はなかった。継続妊娠率は、hatching stage 胚移植群が 14.8% (8/54)、コントロール①群が 5.2% (15/287)、コントロール②群が 3.0% (5/168)、コントロール③群が 4.8% (2/42) と hatching stage 胚移植群で有意に高い結果であった ($P < 0.01$)。胚移植キャンセル率は、hatching stage 胚移植群で、36.5% (31/85)、コントロール①群で 5.5% (11/298)、コントロール②群で 6.1% (11/179)、コントロール③群で 2.3% (1/43) と hatching stage 胚移植群で有意に高い結果となった ($P < 0.01$)。

考 察

Milki らは胚盤胞期胚移植での妊娠率 68% と、その有効性を報告している³⁾。Gardner らは、胚盤胞期胚移植の着床率は 70%、妊娠率は 80% と非常に高い結果を報告している⁴⁾。しかし Milki, Gardner らの報告によると、この方法で治療を受けた患者は、年齢が 45 歳以下で正常な子宮を有し、10 個以上の卵胞を認める患者を対象としている。同じ施設の Marek らは、胚盤胞期胚移植の妊娠率は 57% で、患者の selection をし

表 1 脱出胚盤胞期胚の移植対象者の臨床背景

	Hatching stage ET (ART5 回以上施行例)	コントロール① (ART5 回以上施行例)	コントロール② (ART5 回以上, 胚盤胞期胚移植)	コントロール③ (ART5 回以上, AHA 施行例)
期間	2000/11/21~2001/9/27	1998/9/1~2001/8/1	1998/9/1~2001/8/1	1998/9/1~2001/8/1
治療周期数	85	298	179	43
胚移植周期数	54	287	168	42
平均年齢(歳)	36.0 ± 3.9 (26 ~ 44)	35.5 ± 4.5 (25 ~ 49)	35.4 ± 4.6 (25 ~ 49)	36.3 ± 4.6 (26 ~ 49)
平均 IVF-ET 施行回数(回)	11.3 ± 6.4 (5 ~ 34)	9.3 ± 5.1 (5 ~ 33)**	9.5 ± 5.1 (5 ~ 29)*	11.1 ± 6.6 (5 ~ 27)
平均採卵子数(個)	8.1 ± 4.7 (1 ~ 22)	8.0 ± 5.4 (1 ~ 33)	8.8 ± 5.8 (1 ~ 33)	4.7 ± 2.9 (1 ~ 13)**
媒精卵子数(個)	6.7 ± 4.1 (1 ~ 20)	6.0 ± 3.9 (1 ~ 21)	6.4 ± 4.1 (1 ~ 21)	3.9 ± 2.3 (1 ~ 10)**
移植胚数(個)	1.9 ± 0.7 (1 ~ 3)	2.4 ± 0.8 (1 ~ 3)**	2.4 ± 0.7 (1 ~ 3)**	2.2 ± 0.8 (1 ~ 3)
受精率(%)	74.0%	75.0%	74.2%	68.7%
(正常受精胚数/MII 卵子数)	(424/573)	(1343/1790)	(856/1154)	(114/166)
Day5 時桑実胚到達率(%)	36.6 (159/435)	————	45.3% (358/791)**	————
Day5 時胚盤胞到達率(%)	12.4 (54/435)	————	14.4% (114/791)	————

* P < 0.05, ** P < 0.01

ていないコントロール群の妊娠率は 46% であると報告している(1999)⁵⁾。このコントロール群が 46% の妊娠率である点を我々は非常に高いと考え、これは ART を行う前に更に厳密な患者選別が行われた結果と考える。

我々が prospective randomized study にて行った胚盤胞期胚移植と 3 日目胚移植の比較では、統計的に有意な差は得られなかった¹⁾。prospective randomized study で体外受精を施行した他の報告(Coskun et al., 2000⁶⁾)(Huisman et al., 2000⁷⁾)も我々と同様に conventional な 3 日目胚移植と胚盤胞期胚移植で差は無かったとの結果を報告している。ART において高い着床率、妊娠率を得る為には、最良好胚の選択が不可欠である。最良好胚の選択方法を述べた多くの報告がなされている⁸⁾が、初期胚の AHA 後、拡張胚盤胞観察後、hatching stage で移植した報告は見当たらない。本研究では、最良好胚選択の一つとして、胚盤胞期以降も胚を培養して、hatching stage まで達した胚に限って移植を試みたところ、ART5 回以上の反復無効症例において良好な着床率、妊娠率、継続妊娠率を得ること

ができた。しかし胚移植キャンセル率は hatching stage 胚移植群で有意に高い結果であった。これは、3 日目、5 日目には良好胚であっても hatching stage に到達できる胚が少ないためと考えられる。3 日目胚移植と 5 日目胚移植の有効性を比較した以前の我々の研究において、胚盤胞期に達した胚のうちいくつかは、その後 2,3 日培養を続けても、脱出胚盤胞に发育しなかった。また、hatching stage 胚移植群の妊娠率は、大部分が 6 日目で hatching stage に到達しており、7 日目に hatching stage に到達した胚を移植した周期での妊娠率は 1 例しかなかった。このことから胚の日齢と子宮内膜の implantation window との関係も重要であると考えられる。また Gardner による胚盤胞期胚の分類において、内細胞塊及び栄養外胚葉細胞層の細胞数が少なく、組織結合が疎であった症例の妊娠率は 1 例も得られておらず、胚の質と細胞发育速度も重要であることが示唆される。また IVF において胚の着床率を高める方法が報告されているが、その 1 つが Cohenらの AHA 法で、透明帯厚 15µm 以上のグループの着床率は、コントロールグループよりも高いと報告して

表 2 脱出胚盤胞期胚の移植による臨床成績

	Hatching stage ET (ART5 回以上施行例)	コントロール① (ART5 回以上施行例)	コントロール② (ART5 回以上、 胚盤胞期胚移植)	コントロール③ (ART5 回以上、 AHA 施行例)
妊娠率(%)	29.6%	10.1%	7.7%	7.1%
(妊娠数 / 胚移植周期)	(16/54)	(29/287)**	(13/168)**	(3/42)**
着床率(%)	16.2%	4.9%	3.7%	3.3%
(胎囊数 / 移植胚数)	(17/105)	(34/694)**	(15/407)**	(3/92)**
流産率(%)	50.0%	41.4%	61.5%	33.3%
(流産数 / 妊娠周期)	(8/16)	(12/29)	(8/13)	(1/3)
継続妊娠率(%)	14.8%	5.2%	3.0%	4.8%
(継続妊娠数 / 胚移植周期)	(8/54)	(15/287)**	(5/168)**	(2/42)
胚移植 Cancel 率(%)	36.5%	5.5%	6.1%	2.3%
(胚移植 cancel 周期 / 採卵周期)	(31/85)	(11/298)**	(11/179)**	(1/43)**

** P < 0.01

いる⁹⁾。それに対し、Lanzendorf らの prospective randomized double-blind study では、AHA は IVF に有効性は認められなかったと報告している¹⁰⁾。また Hurst らは年齢が若い症例においては、AHA は有効ではないと報告している¹¹⁾。我々も従来の IVF において AHA は有効でないという結果を得ている。しかし、今回のこの研究では、hatching をより容易に誘導する為、AHA を施行後、培養を続けて、hatching stage での胚移植を行った。また、プロナーゼは、胚のレセプターを破壊する危惧もあると言うアドバイスもあり (P. Quinn 私信)、今回はより胚にとって安全と考えられる初期胚の時期に機械的方法による我々の技術的に習熟した zona opening 法の AHA を施行した。プロナーゼやタイロードの化学処理によらず、初期胚に機械的方法による AHA で拡張期胚盤胞から更に hatching に達したことを確認してからの胚移植は本研究が初めてと考えられる。

最良好胚を選択する為の多くの報告によると、前核期^{12,13)}、分割胚期、胚盤胞期の各時期において胚の選択が可能だといわれている。しかし我々の研究結果から、最良好胚を選択するのは、分割胚、胚盤胞期胚より hatching 期の選択がより確かな方法であった。hatching stage 胚移植が高妊娠率を得ることのできる理由は 2 点あると考えられる。第 1 に、hatching stage まで胚盤胞を培養する事により、最終的な良好胚の選択が可能なる為である。Khorram らは 5 日目胚移植と 6 日目胚移植の着床率の比較した結果、胚盤胞期での 5 日目胚移植を試みたが最良好胚の選択が困難であったと報

告している¹⁴⁾。これは、我々の研究と同様に 5 日目の胚の多くは morula や early blastocyst で選択困難であった為と思われる。そこで彼らは、6 日目胚移植を試みたところ着床率が高くなり、5 日目で胚盤胞期、6 日目で hatching 期に達した胚を胚移植した周期は、IVF 成績が良好であったとしている。第 2 に、hatching stage の胚を移植する事により、子宮内膜と胚盤胞の何らかの相互作用が促されているのではないかという点である。免疫組織化学的研究において、子宮内膜上皮細胞は、インターロイキン、インテグリン、多種類のサイトカイン、pinopods などを刺激する作用があるといわれている。これらの物質は、着床に関する胚と子宮内膜の相互作用に関わっていると考えられている (Bentin-Ley ら¹⁵⁾)。Fong らは透明帯の酵素処理を行い、胚盤胞期胚移植を行った患者の着床率、妊娠率は有意に高い結果であったと報告している¹⁶⁾。この好成績について、胚盤胞と子宮内膜の細胞同士の相互作用を円滑にする結果と報告している。

IVF-ET において良好な妊娠率を得るためにさまざまな研究がなされており、今回、我々の施設で行った初期胚 AHA 後の hatching stage 胚移植は胚盤胞を更に培養することにより胚移植に選択される最良好胚の選別が厳密に行なわれることが反復無効症例に対し有効な方法だと考えられた。従来の 3 日目胚移植や胚盤胞期胚移植に比べて胚移植キャンセル率が高い点の改善や、hatching stage にいたる胚が全くない症例に対する救助法の確立などの今後課題となる問題点はあるが、総合的に hatching stage ET は、体外受精反復不成

功例に対し、有益であることが示唆された。

文 献

- 1) 宇津宮隆史 (2000) 胚盤胞移植. 臨床婦人科産科 54 卷 12 号 : pp1399-1404
- 2) 平井香里 (2001) 新しく開発された培養液 HFF99 のヒト体外受精への臨床応用. 不妊学会 (投稿中)
- 3) Milki AA, Hinckley MD, Fisch JD, et al. (2000) Comparison of blastocyst transfer with day 3 embryo transfer in similar patient populations. *Fertil Steril* 73 : 126-129
- 4) Gardner D, Phil D, Lane M, et al. (2000) Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome : towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 73 : 1155-1158
- 5) Marek D, Langley M, Gardner D, et al. (1999) Introduction of blastocyst culture and transfer for all patients in an *in vitro* fertilization program. *Fertil Steril* 73 : 126-129
- 6) Coskun S, Hollanders J, Al-Hassan S, et al. (2000) Day 5 versus day 3 embryo transfer : a controlled randomized trial. *Hum Reprod* 15 : 1947-1952
- 7) Huisman GJ, Fauser BCJM, Eijikemans MJC, et al. (2000) Implantation rates after *in vitro* fertilization and transfer of a maximum of two embryos that have undergone three to five days of culture. *Fertil Steril* 73 : 117-122
- 8) Balaban B, Urman B, Sertac A, et al. (2000) Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil. Steril.* 74 : 282-287
- 9) Cohen J, Alikani M, Trowbridge J, et al. (1992) Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 14 : 515-520
- 10) Lanzendorf SE, Nehchiri F, Mayer JF, et al. (1998) A prospective, randomized, double-blind study for the evaluation of assisted hatching in patients with advanced maternal age. *Hum Reprod* 13 : 409-413
- 11) Hurst BS, Tucker KE, Awoniyi CA, et al. (1998) Assisted hatching does not enhance IVF success in good-prognosis patients. *J Assist Reprod Genetic* 15 : 62-64
- 12) Tesarik J, Greco E (1999) The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum Reprod* 14 : 1318-1323
- 13) Scott LA, Smith S (1998) The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum Reprod* 13 : 1003-1013
- 14) Khorram O, Shapiro SS, Jones JM (2000) Transfer of nonassisted hatched and hatching human blastocysts after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 74 : 163-165
- 15) Bentin-Ley U, Sjogren A, Nilsson L, et al. (1999) Presence of uterine pinopodes at the embryo-endometrial interface during human implantation *in vitro*. *Hum Reprod* 14 : 515-520
- 16) Fong C, Bongso A, Ng S, et al. (1998) Blastocyst transfer after enzymatic treatment of the zona pellucida : improving *in-vitro* fertilization and understanding implantation. *Hum Reprod* 13 : 2926-2932

(受付 : 2001 年 12 月 3 日)

(受理 : 2002 年 11 月 12 日)

**The efficiency of hatching stage embryo transfer in multiple failures
in *in-vitro* fertilization and embryo transfer.**

Miyuki Nagaki, Takafumi Utsunomiya and Yasuhisa Araki¹⁾

St. Luke Clinic, Oita 870-0947, Japan

¹⁾The Institute for ARMT, Gunma 371-0105, Japan

To obtain a good result with *in-vitro* fertilization (IVF) and embryo transfer (ET), the most important point is the selection method of the best embryo. Using the prospective randomized study, we obtained no advantage in the blastocyst stage ET compared to the day-3 ET. Then, we tried the further culture of embryos and when the embryo was recognized at the hatching stage, the ET was performed. The patients who were selected had 5 or more failures. The total number of cycles of the hatching stage ET group (Hat-ET) was 85 compared with 298 cycles in the control group (C) who were selected had 5 or more failures with IVF-ET. A pregnancy rate of 29.6% (16/54) was obtained in Hat-ET, compared with 10.1% (29/287) in C. Implantation rate of 16.2% (17/105) was obtained in Hat-ET, compared with 4.9% (34/694) in C. The abortion rate and the ongoing pregnancy rate were 50.0% (8/16) /14.8% (8/54) in Hat-ET and 41.4% (12/29) /5.2% (15/287) in C. We suggest the further blastocyst culture into the hatching stage may aid the final selection the best embryo, help embryos that was difficult to hatch and some unknown effects on endometrium-blastocyst interactions may be induced by Hat-ET.

Key words : ART, hatching stage ET, multiple failure, pregnancy

(Jpn J Fertil Steril 48 : 27-32 2003)

体外受精において生じた大型1前核を持つ異常受精胚 (1PN)の胚盤胞到達率とその染色体核型について

The Rate of Blastocyst Formation and The Chromosomal Karyotype of Abnormal Fertilized Embryos with The Bigger Single Pronucleus *in vitro* Fertilization

佐藤 晶子 大津 英子 長木 美幸
Akiko SATO Eiko OTSU Miyuki NAGAKI
宇津宮 隆史 荒木 康久¹⁾
Takafumi UTSUNOMIYA Yasuhisa ARAKI

セント・ルカ産婦人科
St. Luke Clinic, Oita 870-0947, Japan
¹⁾高度生殖医療技術研究所
The Institute for ARMT, Gunma 371-0105, Japan

体外受精-胚移植において、受精確認時、正常受精（2前核）以外に、前核が1個（1PN）または3個（3PN）観察されることがある。このような異常受精卵である1PN胚について解析した結果、前核の直径の大きさに29μm未満（A型）と29μm以上（B型）の2種類に分けられることが判明した。1PNの出現頻度はconventional-IVF（c-IVF）で6%（53/950）、ICSIで3%（32/1094）であった。核の直径が計測可能であった1PN胚のうち、A型はc-IVFで19%（10/53）、ICSIで25%（8/32）、B型はc-IVFで49%（26/53）、ICSIで56%（18/32）であった。

総計すると、A型の出現率21%（18/85）、B型の出現率52%（44/85）であった。胚盤胞の到達率はA型で0%（0/18）、B型で14%（6/44）であった。胚盤胞に達したのはいずれもB型のc-IVFによるもので、そのうち6個の胚の染色体をFISHで解析できた。3倍体を含む1個と他5個中3個は4倍体を含むモザイクであった。これらモザイクを含む5個はすべて2倍体と考えられた。

そのうち、3症例でY染色体を確認した。

これらの結果から、29μm以上の1PN胚で胚盤胞期まで成長した胚は、核膜消失前に核融合がおり正常2倍体と同様に受精している確率が高いことが示唆された。

キーワード：1PN，異常受精，FISH，染色体，核融合

（日不妊会誌 48：33-39 2003）

緒 言

体外受精において、正常受精は媒精後16～20時間で2個の前核(PN)の出現によって決定される。しかし、時にPNが1個だけ(1PN)、または3個(3PN)以上観察される異常受精卵もみられる。このような受精卵(胚)であっても正常受精した2PN由来胚と同様な分

割をしていくことが報告されている¹⁾。

しかし、一般的に受精確認時1PNもしくは3PN以上の多前核胚は、半数体、多倍体の染色体異常胚とみなされ胚移植はおこなわれていない。

1PN胚は、単為発生か、雌雄前核の融合時間の不一致によるものか不明な点が多い²⁾。ところが、1PN胚による妊娠出産例の報告がある³⁾。さらに、Gras and

Trounson らの報告では、1PN 胚を胚盤胞まで体外培養させ、妊娠、出産させたところ²⁾。これは、1PN 胚が実際は正常な受精をして正常に発生した証拠の一つである²⁾。このことより、体外培養における 1PN 胚の性状を明らかにしておくことは 1PN 発生機序を考える上で重要な点である。

我々は、1PN 胚の核直径を測定し、その後の胚発生との相関に興味ある事実を観察した。1PN 胚の核の直径をみると 28 μ m 以上に多く分布していること、及び 1PN 胚の発生を見ると桑実胚から胚盤胞まで発生する胚の核は 29 μ m 以上であることが判明した。このことより、直径が 29 μ m 以上の大型の前核と、それ以下の 2 群に区別して胚盤胞到達率および染色体数の異なりを検討した。そして、治療別 (c-IVF, ICSI) によって生じる 1PN 胚の核直径の違いを観察することで正常受精を区別できるか否かを考察した。

方法と材料

対象は、2002 年 1 月から 8 月までのあいだに当院で体外受精により得られた 62 個の 1PN 胚で、これらの検討にはインフォームドコンセントを得て使用した。

採卵後 4~6 時間で媒精し、約 16 時間後に受精の確認をおこなった。この際、1PN と確認された胚は約 4 時間後に再度確認を行なった。再確認時に写真を撮り、PN の大きさを記録した。PN の大きさは昭和電気研究所 (SEL) の画像計測装置によって行なった。

1PN と判定した異常受精卵は、受精確認の日を Day 1 とし human follicular fluid (HFF99) 培養液 (扶桑薬品工業株式会社) で培養し、Day3 で Blastocyst Medium (COOK 社) に移し Day5 まで培養を続けた。また、1PN 胚の胚盤胞発生率を、29 μ m 未満の核径群 (A 型) と 29 μ m 以上の核径群 (B 型) と正常受精の 2PN とで比較した。

初期胚のグレードは、Bourn Hall Clinic (イギリス) の分類にしたがって行なった¹⁾。

また、胚盤胞については Gardner の分類³⁾を修飾した当院の評価法に従った。胞胚腔を確認し始めたものを初 cavi, 50% まで広がったものを後 cavi とした。これらは、桑実胚とみなしている。また、胞胚腔が胚を完全に占めるようになると early, 透明体の拡張開始を expanding, さらに拡張し透明帯が薄くなる状態を expanded とした。これらを胚盤胞と総称した。細胞発育の状態から、内細胞塊 (inner cell mass) は、密で細胞数が多いものを A、疎で細胞数が数個であるものを

B、細胞数が非常に少ないものを C とした。また、栄養外胚葉 (trophectoderm) は多くの細胞が密に存在しているものを A、少ない細胞が疎に存在しているものを B、細胞数が非常に少ないものを C とした。

Day5 まで至った胚は、ビンブラスチンを加えた Blastocyst Medium にて 4 時間培養後スライドグラス上に固定した。次に 2 \times saline-sodium-citrate (SSC) 中で 60 $^{\circ}$ C, 60 分処理した。その後 Milli-Q 超純水で洗い、10% ギムザ液で 15 分間染色。再び流水水洗し、乾燥させた。分裂中期の像は光学顕微鏡下で観察した。

FISH は、以下に示した方法でおこなった⁶⁾。プローブは、1 番染色体に特異的な CEP1 と X, Y 染色体に特異的な CEP Mixture (Vysis 社) を用いた。

初めにプローブを、70 $^{\circ}$ C, 10 分間熱変成させた。試料の固定したスライドグラスは 70% ホルムアミドを含む 2 \times SSC に 75 $^{\circ}$ C で 5 分間浸漬することで熱変成させた。その後氷冷エタノールで脱水、乾燥させ、先に熱変成させておいたプローブを試料の固定したスライドグラス上でハイブリダイズさせた状態で、37 $^{\circ}$ C 湿潤条件下で一晩インキュベートした。次に 50% ホルムアミドで洗浄し、脱水後、対比染色として 4', 6-diamino-2-phenylindol (DAPI II) (Vysis 社) を用い蛍光顕微鏡で観察した。

結 果

1PN の出現頻度は conventional-IVF (c-IVF) で 6% (53/950), ICSI で 3% (32/1094) であった。62 個の 1PN 胚のうち、A 型は c-IVF で 19% (10/53), ICSI で 25% (8/32), B 型は c-IVF で 49% (26/53), ICSI で 2% (18/32) であった。総計すると、A 型の出現率 21% (18/85), B 型の出現率 52% (44/85) であった。核の直径が計測可能であった 23 個の 1PN 胚について核の直径と出現頻度の関係を図 1 に示した。ここから、28 μ m より大きい前核の出現頻度が多い結果を得た。この内、桑実胚および胚盤胞への発生率は 29 μ m 以上の前核を有する 1PN 胚で高い傾向にあることが判明した (表 1)。1PN 胚の胚盤胞到達率を、29 μ m 未満の前核 (A 型) と 29 μ m 以上の前核 (B 型) とで比較した結果、B 型の胚盤胞到達率が 14% (6/44) であるのと対照的に A 型 1PN 胚の胚盤胞発生率は 0% (0/18) であった。対象として 2PN 胚の胚盤胞到達率を示した (表 2)。

以上の結果を c-IVF 施行胚と ICSI 施行胚に分けると、c-IVF 施行胚の胚盤胞到達率は B 型で 23% (6/26)

であった。ICSI 施行胚の胚盤胞達成率は、PN の大きさに関係なく 0%|A (0/8)・B (0/18)|であったが、桑実胚達成率は、B 型が A 型より高い傾向にあった|22% (4/18)|。胚盤胞に達した胚はすべて c-IVF 施行胚であった(表 3, 表 4)。また、Day5 において B 型の胚でのみ胚盤胞に達していた(表 5)。それに対して、A

型の 1PN 胚は Day5 において c-IVF, ICSI 施行胚とも桑実胚期以上には発生しなかった(表 6)。また、B 型 1PN 胚であっても ICSI 施行胚は桑実胚期までの発生であり、胚盤胞期の到達は認められなかった(表 7)。

6 個の胚盤胞を FISH で解析した結果を表 7 に示した。1 番染色体に特異的な CEP1 で染色体の数を、X, Y プローブで性染色体の構成を判定した。

症例 1, 及び症例 5 は観察されたすべての細胞で 2 倍体と確認された。症例 1 では XX 細胞の女性核型、症例 5) では Y 染色体を有する男性核型と考えられた。症例 3,4,6 では 4 倍体モザイクを含むものの、分裂時のエラーとみなしこれらも 2 倍体であると考えた。症例 2 は、1 倍体、3 倍体を含むモザイクであった。

考 察

1PN 胚の発生頻度は研究者により異なるが、1.6~5.9 %で平均 4.5% である³⁷⁻⁴⁹⁾。我々の結果では、c-IVF で 6%(53/950), ICSI で 3%(32/1094)の発生頻度であった。

一般には、受精したら雌雄両前核が認められ、核膜が消失して両前核の融合が起こり、染色体が混在する

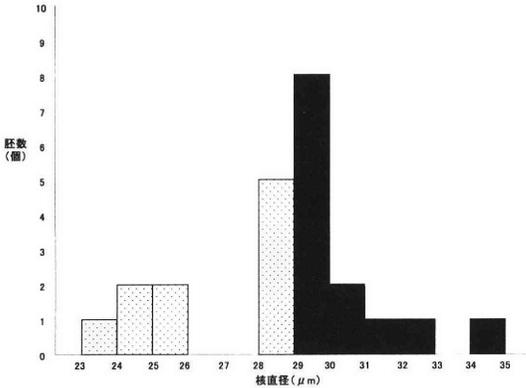


図 1 1PN 胚の核直径と検出胚数の頻度

表 1 1PN 胚の核の直径からみた Day5 での胚盤胞への発生率

核の直径(μm)	n	桑実胚発生率(%)	胚盤胞発生率(%)
23 ≤ φ ≤ 24	1	0 (0/1)	0 (0/1)
24 ≤ φ ≤ 25	2	0 (0/2)	0 (0/2)
25 ≤ φ ≤ 26	2	50 (1/2)	0 (0/2)
26 ≤ φ ≤ 27	0	0	0
27 ≤ φ ≤ 28	0	0	0
28 ≤ φ ≤ 29	5	0 (0/5)	0 (0/5)
29 ≤ φ ≤ 30	8	50 (4/8)	25 (2/8)
30 ≤ φ ≤ 31	2	0 (0/2)	0 (0/2)
31 ≤ φ ≤ 32	1	0 (0/1)	0 (0/1)
32 ≤ φ ≤ 33	1	100 (1/1)	0 (0/1)
33 ≤ φ ≤ 34	0	0	0
34 ≤ φ	1	100 (1/1)	0 (0/1)

表 2 1PN の胚盤胞到達率

調査群	n	分割胚	桑実胚	胚盤胞
A 型 1PN 群	18	18 (100%)	2 (11%)	0 (0%)
B 型 1PN 群	44	44 (100%)	33 (75%)	6 (14%)
2PN 群(対象群)	200	200 (100%)	115 (58%)	67 (34%)

表 3 1PN の胚盤胞到達率 (conventional-IVF)

調査群	n	分割胚	桑実胚	胚盤胞
A 型 1PN 群	10	10 (100%)	1 (10%)	0 (0%)
B 型 1PN 群	26	25 (96%)	15 (58%)	6 (23%)
2PN 群 (対象群)	59	59 (100%)	37 (62%)	22 (37%)

表 4 1PN の胚盤胞到達率 (ICSI)

調査群	n	分割胚	桑実胚	胚盤胞
A 型 1PN 群	8	8 (100%)	1 (12.5%)	0 (0%)
B 型 1PN 群	18	18 (100%)	4 (22%)	0 (0%)
2PN 群 (対象群)	141	141 (100%)	78 (55%)	45 (45%)

表 5 Day 5 における胚盤胞到達率 (全体)

調査群	n	桑実胚に達しない分割胚	桑実胚	胚盤胞
A 型 1PN 群	18	16 (89%)	2 (11%)	0 (0%)
B 型 1PN 群	44	11 (25%)	27 (61%)	6 (14%)
2PN 群 (対象群)	200	85 (42.5%)	48 (24%)	67 (34%)

表 6 Day 5 における胚盤胞到達率 (conventional-IVF)

調査群	n	桑実胚に達しない分割胚	桑実胚	胚盤胞
A 型 1PN 群	10	9 (90%)	1 (10%)	0 (0%)
B 型 1PN 群	26	10 (38%)	9 (35%)	6 (23%)
2PN 群 (対象群)	59	22 (37.3%)	15 (25.4%)	22 (59%)

表 7 Day 5 における胚盤胞到達率 (ICSI)

調査群	n	桑実胚に達しない分割胚	桑実胚	胚盤胞
A 型 1PN 群	8	7 (87.5%)	1 (12.5%)	0 (0%)
B 型 1PN 群	18	14 (78%)	4 (22%)	0 (0%)
2PN 群 (対象群)	141	63 (44.7%)	33 (23.4%)	45 (31.9%)

と考えられている。従って、1 前核しか存在しないことは異常である。第 2 極体が放出しないで雌性核の倍数状態で 1PN が生じていることも考えられる¹⁰⁾。Xu と Grave らによれば、ウシ卵ではしばしば雌雄前核の融合が起こり 1PN になる事を示している¹¹⁾。ヒトでは、

1PN は単為発生または他の異常の結果生じると考えられ、体外受精で得られた 1PN 胚は移植に用いられていないのが現状である。

1PN の染色体核型を調べた Plachot らによれば、46% は 1 倍体、29% は 2 倍体であり、25% はモザイク

表 8 FISH の結果

症例(大きさ)	胚の状態	倍数性*	FISH シグナル
1 (29.7 μ m)	初 cavi G3	2N \times 18	XX \times 18
2 (34.7 μ m)	初 cavi G3	2N \times 1, 1N \times 6, 3N \times 1	XY \times 2, X \times 5, XYY \times 1
3 (29.6 μ m)	初 cavi G2	2N \times 17, 4N \times 2	XY \times 17, XXYY \times 2
4 (29.0 μ m)	後 cavi G3	2N \times 60, 4N \times 10	XY \times 60, XXYY \times 10
5 (29.3 μ m)	Early G2 BA	2N \times 73	XY \times 73
6 (29.7 μ m)	Early G3 CC	2N \times 10, 4N \times 2	XX \times 10, XXXX \times 2

* CEP 1 により発色した数より判定 (数字は細胞数).

だったと報告している¹²⁾. また, Staessen らは, 1 倍体は 2% で, 2 倍体が 80.5% もあり, 7.3% は 3 倍体だったと報告しており, このような, 1PN にもかかわらず 2 倍体を示す胚は, 雌雄前核の核膜消失前に核融合が生じたと考えている¹³⁾. 我々は, 前核の確認後, さらに 4 時間後に再観察をして前核の状態を 1PN と確認していることより, 雌雄前核の時間的出現の差は否定できると考えている. 従って, 初めの前核の確認より早い時間に雌雄前核の融合が起こり, また, その融合は前核の核膜消失前に生じた為 1PN が観察されたと考えている. 今回, 我々は, 出現する 1PN の直径は 28 μ m 以上が多いこと, かつ 29 μ m 以上で胚盤胞の発生率が高まることより 29 μ m を境に A 型, B 型と区別した.

核の直径が 29 μ m 以上の B 型とした 1PN 胚からの胚盤胞発生率は, 14% (6/44) と比較的高かった (表 2, 5). このことから, 先に述べたようにこれらの胚が 1PN 胚であっても, 核融合が起こり通常の受精後の発生過程と同様に 2 倍体で発生した可能性を示すものと思われる. しかし, 29 μ m 以上の 1PN 胚でも ICSI から得られたものは胚盤胞まで発生しなかった (表 4, 7). 調べた胚数は少ないものの胚盤胞の染色体は FISH で 2 倍体もしくは 2 倍体モザイクであることが確認された. Y 染色体の存在も確認され, 2 倍体であったことより 1PN であっても正常受精していることが強く示唆される (表 8). 勿論, disomy の精子 (XY) の侵入の可能性なども否定できない. 特に乏精子症では aneuploidy の検出率が高まるとの報告も見られる¹⁵⁾. しかしその頻度からして, 異常精子によってのみ B 型 1PN 胚が生じているとは考えづらい. 一方, 29 μ m 以下の 1PN 胚は c-IVF, ICSI とともに胚盤胞には発生しなかった (表 2~7). 29 μ m 以下の A 型 1PN 胚でも分割前の

1 細胞期中期染色体を詳細に検討すれば B 型との違いが解明できる手掛かりを与えてくれると思われる. 何故, c-IVF のみから得られた 1PN 胚が胚盤胞に達するのに対し, ICSI 由来 1PN 胚が胚盤胞に発生しないのか理由は不明である. c-IVF に対し ICSI の精子選別が人為的なものに影響しているのか, あるいは ICSI 対象の精子そのものが発生に何か劣性要素を保持しているのか, あるいは卵側に要因があるのか, 今後, 症例を重ねて検討する必要がある.

文献によれば, 1PN 胚を发育させた c-IVF の 50%, ICSI の 70% に 1 倍体, 3 倍体, その他モザイクの染色体異常が存在している¹³⁾. 1PN 胚の妊娠で胎状奇胎との報告もある¹⁴⁾.

それゆえ, 今回提示した 1PN 胚由来の染色体が XY 染色体をもっている, 正常な受精なのか否か, また X が雌雄どちら由来なのか等, 複数のプローブによる染色体検査 (FISH) を重ねて慎重に検討していく必要がある.

今回測定できた 1PN 胚の核の直径と出現頻度は図 1 に示したごとく 28 μ m 以上で多く, かつ 29 μ m 以上でその後の胚発生に大きな差異を見出すことができたことを詳述した. 1PN 胚の核の直径が大型のものは胚盤胞まで発生し, しかも, 染色体が正常受精と考えられる結果は明記しておく必要がある. すでに, 1PN 胚から分娩したとの報告もある³⁾. 最近, Gras と Trounson らは 1PN 胚を胚盤胞まで培養し移植後, 正常児を分娩したと報告している²⁾.

従って, これまで廃棄していた 1PN 胚でも大型の前核を持つもので胚盤胞まで発生した胚は移植可能胚である可能性があることより, 1PN の核の直径を測定しておくことは新たな胚評価法のひとつになりうると思われる.

文 献

- 1) Palermo GD, Munne S, Colombero LT, et al. (1995) Genetics of abnormal human fertilization. Hum Reprod Oct 10 Suppl 1 : 120-127
- 2) Gras L, Trounson AO (1999) Pregnancy and birth resulting from transfer of a blastocyst observed to have one Pronucleus at the time of examination for fertilization Hum Reprod 14 (7) : 1869-1871
- 3) Staessen C, Janssenswillen C, Devroey P, et al. (1993) Cytogenetic and morphological observations of single pronucleated human oocyte after *in vitro* fertilization. Hum Reprod 8 : 221-223
- 4) Brinsden PR, Rainsbury PA (1992) A Textbook of *in vitro* Fertilization and Assisted Reproduction. The Parthenon Publishing, Lancs, UK, pp188-192
- 5) Gardner DK, Lane M, Stevens J, et al. (1999) *In vitro* culture of human blastocysts. In : Jansen R, Mortimer D (eds.) ; Towards Reproductive Certainty Fertility and genetics beyond. Carnforth-Parthenon Press, pp378-388
- 6) Santiago M, Andrew L, Zev R, et al. (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. Hum Reprod 8 (12) : 2185-2191
- 7) Plachot M, Mardelbaum J, Junca AM, et al. (1989) Cytogenetic analysis and developmental capacity of normal and abnormal embryos after IVF. Hum Reprod 4 : 99-103
- 8) Balakier H, Squire J, Casper RF (1993) Characterization of abnormal one pronuclear human oocytes by morphology, Cytogenetics and *in-situ* hybridization. Hum Reprod 8 (3) : 402-408
- 9) Dozortsev D, De sutter P, Dhont M (1994) Behaviour of spermatozoa in human oocytes displaying no or one pronucleus after intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 9 : 2139-2144
- 10) Kaufman M (1983) Early mammalian development : parthenogenetic studies. In : Barlow PW, Green PB and Wylie CC (eds.) ; Development and Cell Biology Series. Cambridge University Press, Cambridge.
- 11) Xu KP, Grave T (1988) A detailede analysis of early events during *in-vitro* fertilization of bovine follicular oocytes. J Reprod Fertil 82 : 127-134
- 12) Plachot M (1991) Chromosome analysis of oocytes and embryos. In : Verlinsky Y, Kuliev A (eds.), Preimplantation Genetics. Plenum Press, New York, 3 : pp103-112
- 13) Staessen C, Van Steirteghem AC (1997) The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional *in-vitro* fertilization. Hum Reprod 12 : 321-327
- 14) Petignat P, Senn A, Hohlfeld P, et al. (2001) Molar pregnancy with a coexistent fetus after intracytoplasmic sperm injection. A case report. J. Reprod Med 46 : 270-274
- 15) Calogero AE, Palma AD, Grazioso C, et al. (2001) A neuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. Hum Reprod 16 : 1172-1179

(受付 : 2002 年 12 月 4 日)

(受理 : 2003 年 1 月 17 日)

The rate of blastocyst formation and the chromosomal karyotype of abnormal fertilized embryos with the bigger single pronucleus *in vitro* fertilization

Akiko Sato, Eiko Otsu, Miyuki Nagaki, Takafumi Utsunomiya and Yasuhisa Araki¹⁾

St. Luke Clinic, 5 Tsumori-Tomioka, Oita City, Oita 870-0947, Japan

¹⁾The Institute for ARMT, Gunma 371-0105, Japan

The aim of this study was to evaluate the fertilization with regard to embryos with bigger size single pronucleus of human zygotes *in vitro* fertilization.

When embryos were recognized 1PN 18h after conventional-IVF (c-IVF) /intracytoplasmic sperm injection (ICSI), the size of single pronucleus was measured. 1PN formation rate was 6% (53/950) by c-IVF and 3% (32/1094) by ICSI. The embryos were cultured until development at blastocyst stage and analyzed chromosome karyotype.

Embryos with 1PN were separated into two groups ; the bigger size of more than 29 μ m and the smaller size of less than it. Embryos with 1PN which had measured the pronuclear diameter, smaller size 1PN type were 19% (10/53) by c-IVF or 25% (8/32) by ICSI and Bigger type were 49% (26/53) by c-IVF or 56% (18/32) by ICSI. The total percentage of bigger size 1PN embryos produced were 52% (44/85), and 21% (18/85) were smaller size 1PN embryos. Only embryos with bigger size 1PN developed to blastocyst, the rate of formation of blastocysts was 14% (6/44). These blastocysts were evaluated by FISH and showed a diploid and/or diploid mosaic. Especially 3 out of 6 observed a Y chromosome on the metaphase karyotype in specimens.

Although this is preliminary study, it suggests that developed blastocysts from embryos with bigger size 1PN might be fertilized as well as normal 2PN.

Key words : Single pronucleus, abnormal fertilization FISH, chromosome, karyogamy

(Jpn J Fertil Steril 48 : 33-39 2003)

る²³⁾。一方、ヒトの上皮細胞では遺伝子導入法により絨毛細胞の cell line を確立したという報告⁴⁾のほかは絨毛に関する報告は少ない。

当院では、不妊を主訴に当院を訪れる患者に対し、約3分の1に腹腔鏡検査を行っている。その際、子宮内膜症や癒着の治療のほか子宮や卵管の観察も行って、卵管に関しては卵管采の大きさ、形状、卵管口偏位、疎通性、位置関係を細かく検査している。卵管采は症例によって所見にばらつきがあり、大きさ、卵管口の位置が正常であったのはそれぞれわずか15%、31%であった。さらにそれらの症例では有意に妊娠率が高いということがわかり、卵管采の形を観察することは不妊原因の調査、今後の治療方針を定めていくうえで重要であると思われた⁵⁾。しかし、卵管采の卵捕獲機構に関しては、他にも様々な因子との相互作用で行われていると考えられており、外見的な所見だけで判断することは困難である。それは、先にも述べたように卵管采の形態が良好である症例では妊娠率が有意に高い結果であったが、そのなかにも妊娠が困難な症例が存在するという事実からもうかがえる。卵管采の卵捕獲機構は卵管采の形態のみで評価するには限界があり、さらに細胞レベルでの機能も関与していると考えられる。そこで今回我々は、腹腔鏡検査施行患者に対し卵管采を少量採取し培養することを試みた。

卵管上皮細胞の回収方法について、ヒトの卵管上皮細胞の培養、あるいはそれを用いた受精卵との共培養に関する多くの報告では、子宮摘出術などにより卵管をそのまま切除し、コラゲナーゼ等を灌流させ卵管内腔より上皮細胞を分離して培養する方法が用いられている⁶⁻¹⁰⁾。今回我々は、卵胞期の不妊患者に対する腹腔鏡検査時に卵管采を少量採取し、ヒト血清のみ添加した培養液で培養を試みた。検査施行患者には様々な不妊因子や疾患があり、腹水に浸されている卵管、特に腹水に曝露されることが多い卵管采はそれぞれの症例によって環境が異なるであろうと推測される。そのことをふまえ、細胞の増殖結果と採取症例の背景についての基礎研究を行ったので報告する。

対象および方法

2001年1月から2002年1月の間に不妊を主訴に来院した患者のうち、当院において卵胞期で腹腔鏡検査を施行した不妊患者137症例を対象とした。本研究にあたり、様々な不妊背景をもつ患者よりインフォームド・コンセントを得て腹腔鏡下で卵管采の漏斗部より

組織を少量採取した。組織はPBS(-)で血球をできるだけ除去し、スパーテルと注射針を用いて細切後、 $1.0\sim 2.0\times 10^5$ 細胞をファルコン3,037ディッシュにまき、10%ヒト血清添加 α -MEMで培養を開始した。培養後3日目でメディウムを交換し、5~10日間培養を続けた。培養の状態は、培養期間が最長10日目において、ディッシュの70%以上がコンフルエントに達した場合、増殖良好と判断し、全く増殖しないかまたは70%未満の増殖で止まった場合、増殖不良と判断した。なお、培養した細胞は、走査型電子顕微鏡写真およびサイトケラチンによる免疫染色によって上皮細胞であることを同定した。当院では、腹腔鏡の際に卵管采の形態を評価している。症例によって大きさや形状は異

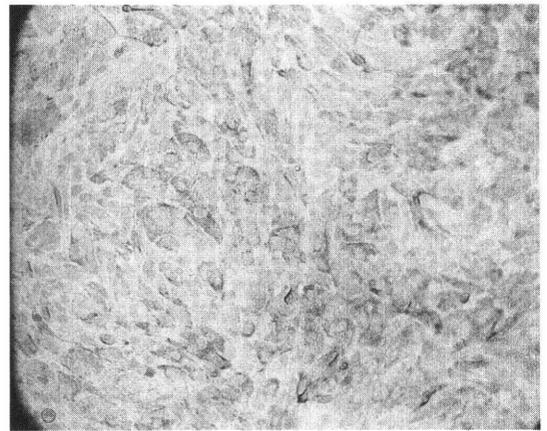


写真1 増殖が良好であったサンプルの免疫染色

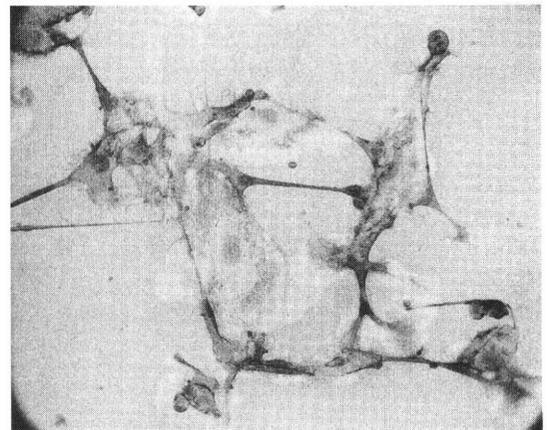


写真2 増殖が不良であったサンプルの免疫染色

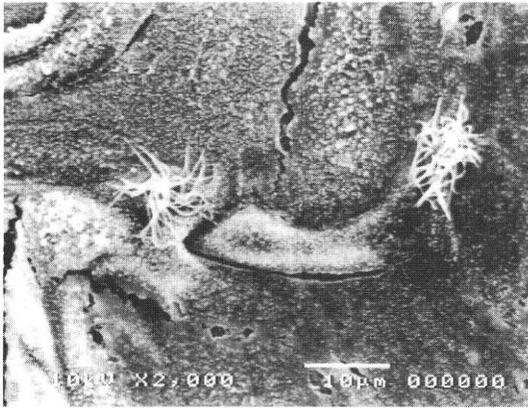


写真3 電子顕微鏡 (SEM) による繊毛観察

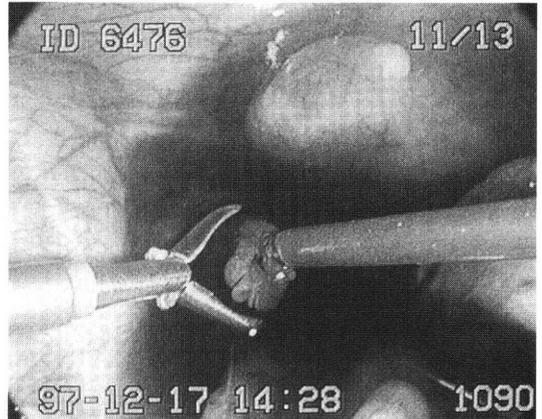


写真5 卵管采の形状が異常な (小さい) 症例



写真4 卵管采の形状が正常な症例

表1 対象および背景

N = 137

期間	2001. 1. 13 ~ 2002. 1. 18	
年齢	31.1 ± 3.6 歳 (20-40)	
卵管采の形状	良	52 例 (38.0%)
	やや良	58 例 (42.3%)
	不良	26 例 (19.0%)
	評価未定	1 例 (0.7%)
子宮内膜症合併	95 例 (69.3%)	
卵管采が小さい	102 例 (74.5%)	
クラミジア抗体	陰性	95 例 (69.3%)
	陽性	42 例 (30.7%)

なるため形状については、卵管采がシタ状に伸びているものを「良」、卵管采がピロード状に短いものを「不良」、その中間を「やや良」、の三段階に分類し、大きさについては生理食塩水に浮かせて直径 2 cm 以上を「正常」、それ以下を「小さい」、と二段階に分類した⁵⁾。

結 果

1. 培養細胞の同定

増殖が良好であったサンプル、不良であったサンプルの培養ディッシュを固定し、サイトケラチンによる免疫染色を行った結果を示した(写真1,2)。増殖良好のサンプルも増殖不良のサンプルも同様に茶色に染色され、上皮細胞であることが同定された。また、特に良好に増殖したサンプルでは、電子顕微鏡により繊毛

が観察された(写真3)。

2. 腹腔鏡による卵管の所見と培養結果

腹腔鏡による卵管の形態を写真4,5に示した。当院独自の診断基準による卵管采の形状と大きさ⁵⁾、子宮内膜症合併の有無、免疫血清検査(ELISA法)によるクラミジア抗体の有無を表1に示した。子宮内膜症合併例および卵管采が小さい症例はそれぞれ69.3%(95/137)、74.5%(102/137)と全体の約7割を占め、また卵管采の形状が良好な症例は38.0%(52/137)、やや良好な症例は42.3%(58/137)、不良であった症例は19.0%(26/137)であり、他に評価未定が0.7%(1/137)含まれていた。クラミジア抗体陽性例は30.7%(42/137)と全体の約3割を占めていた。症例全体の卵管上皮細

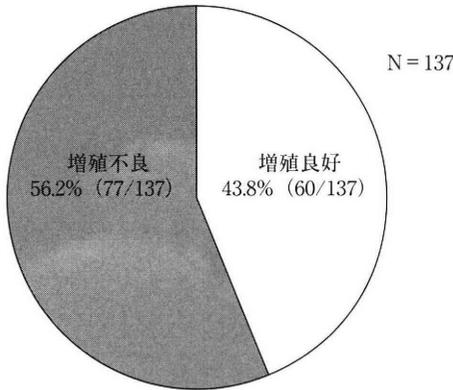


図1 卵管上皮細胞の培養結果

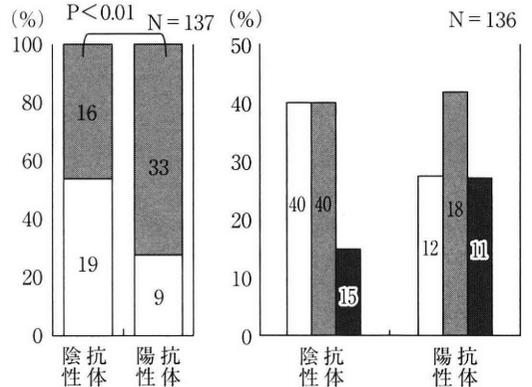


図4 クラミジア抗体と培養結果および卵管采の形状

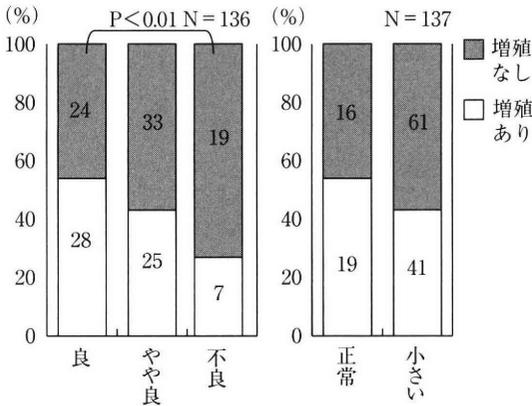


図2 腹腔鏡検査時の卵管采の所見と培養結果

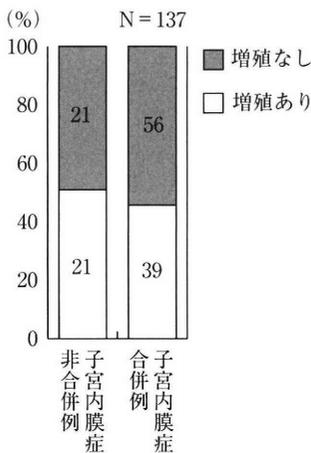


図3 子宮内膜症と培養結果

胞の培養結果を図1に示した。増殖が良好であったのは43.8% (60/137)、増殖が不良であったのは56.2% (77/137)であった。

(1) 卵管采の形状と培養結果

腹腔鏡検査の際に評価する卵管采の形状の所見と培養結果を図2に示した。左図のように、卵管采の形状が良好な症例のうち増殖が良好であったサンプルは53.8% (28/52)、やや良好の症例では43.1% (25/58)、形状が不良であった症例では26.9% (7/26)であり、形状が良好な卵管采は、不良な卵管采より有意に増殖が活発であることが明らかとなった ($P < 0.01$)。また、右図では特に卵管采が小さい症例のサンプルにおける増殖結果を示した。正常な卵管采のうち増殖が良好なサンプルは54.3% (19/35)に対し、卵管采が小さい症例のうち増殖が良好なサンプルは40.2% (41/102)と、有意差はないものの正常な大きさの卵管采で増殖が多い傾向が認められた。

(2) 子宮内膜症と培養結果

腹腔鏡検査時に子宮内膜症の所見が認められた症例の培養結果を図3に示した。子宮内膜症非合併例のうち増殖が良好なサンプルは50.0% (21/42)、子宮内膜症合併例のうち増殖が良好なサンプルは41.1% (39/95)と、有意差はないものの子宮内膜症合併例で増殖が少ない傾向が認められた。

(3) クラミジアと培養結果および卵管采の形状

免疫血清検査 (ELISA 法) によるクラミジア抗体の有無と培養結果について図4に示した。抗体陰性症例のうち、増殖が良好であったのは53.7% (51/95)に対し、抗体陽性症例では21.4% (9/42)と、クラミジア抗

体陽性症例のサンプルで有意に増殖が少ないことが明らかとなった ($P < 0.01$, 左図). また, クラミジア抗体の有無と卵管采の形状の関係を右図に示した. 抗体陰性症例のうち卵管采の形状が不良であったのは 15.8% (15/95) であったのに対し, 抗体陽性症例のうち形状が不良であったのは 26.2% (11/42) と, 有意差はないものの抗体陽性症例に卵管采の形状が不良という所見が多い傾向を示した. また一方で, 有意差は認められなかったが, 抗体陰性症例では卵管采の形状が良好であったのが 42.1% (40/95) に対し, 抗体陽性症例で形状が良好であったのは 28.6% (12/42) と, 抗体陰性症例に卵管采の形態が良好な割合が多い傾向が認められた.

考 察

これまでの卵管上皮細胞の培養に関する多くの報告が, 子宮摘出術施行患者に由来する細胞の培養であったのに対し, 今回我々が行ったのは腹腔鏡検査の際に少量の組織を採取して細胞を分離し, 培養するという方法である. 他の報告^{6,11)}とは異なり, 今回我々が用いた培養液は, 抗生物質やホルモンや EGF (epidermal growth factor) などは添加せず, 10% ヒト血清添加のみの α -MEM であった. 採取された組織を細切して細胞を回収する際, 症例によって回収した細胞数には多少の差があったので, 基準とした $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞数と著しく差がある症例については対象から除いた. それにも関わらず, 同じ条件で培養しても良好に増殖するサンプルと増殖が少ないサンプル, さらに全く増殖しないサンプルと, 増殖結果は様々であった.

表 1 に示す対象の背景から, 当院で腹腔鏡検査を受けている不妊患者の多くは卵管采の大きさや形状に問題があると思われ (約 7 割), さらに子宮内膜症も多数を占めていた (約 7 割). またクラミジア抗体保持 (約 3 割), 骨盤内癒着, 卵巣腫瘍, 卵管水腫などの疾患もみられる場合があった. さらに, 術後配偶者間人工授精 (AIH) を受け, 妊娠が認められない場合体外受精 (IVF) に移行する症例も多数存在する. このような骨盤内疾患の原因により, 培養結果に差が生じたのであろうと考えられた.

卵管采の形態について述べられた報告はこれまでにほとんどない. 腹腔鏡検査の症例を重ねるうち, 形態は非常に個人差があることがわかった. 従って当院では独自に診断基準を定め, 分類していたが, 大きさに関しては, 当院で以前検討した結果, 大きさが正常な

症例の妊娠率 (IVF を除く) が約 60% であったのに対し, 小さい症例では約 20% であり, 卵管采が小さいことによる卵子の捕獲障害が示唆される結果が得られ, 卵管采の形態が妊孕力に関わっていることが明らかとなっている⁵⁾. 本研究において, 卵管采が小さい症例は, 細胞の増殖が良好なサンプルがやや少ない結果が得られ, 形態についても同様の結果を得た. このことより, 腹腔鏡検査時に卵管采の観察から得られる知見に加え, 組織を少量採取し細胞増殖能力を調べることによって, 今日まで明らかにはされていない卵捕獲機構の解明に近づくことができると考えた.

子宮内膜症は, 当院で行っている IVF 患者の不妊因子のなかでは卵管因子の次に多い症例である. 本結果より, 子宮内膜症と卵管上皮細胞の増殖との間の関係を見ると, 合併の有無により有意差は見られなかったが, 子宮内膜症合併例では増殖が良好なサンプルがやや少ない傾向が認められた. 子宮内膜症腹水には卵捕獲抑制因子が含まれており, 卵管采繊毛と卵丘の接触が妨げられると報告されており, これらの因子が細胞増殖を妨げている可能性も考えられる¹²⁾.

クラミジア抗体の有無と培養結果については, 今回の結果から卵管采の形態が不良であると卵管上皮細胞の増殖が有意に低下することが明らかとなり, クラミジア, 卵管采, 細胞増殖の三者が関わりあっていることがうかがえた. クラミジアが卵管の形態に悪影響を及ぼし, 機能の低下をもたらすことは数年前から報告されてきた¹³⁾. また, 過去にクラミジアに感染した症例が, 治療して治った後でもなお骨盤内癒着は残っているという報告¹⁴⁾や, 抗生物質治療をしてもまだ感染が残る場合があるという報告¹⁵⁾がみられる. さらに, ウサギにクラミジア・トラコマティス臨床分離株を接種したところ, 卵管上皮細胞にクラミジア・トラコマティスが封入体をつくり, その宿主細胞を破壊するという報告もみられる¹⁶⁾. クラミジアは, 一度感染が起こるとほとんど瞬時にして卵管を経て腹腔内に入り込み¹⁶⁾, 骨盤内炎症性疾患 (PID) をひきおこし, 腹膜炎や肝周囲炎をもたらす. 腹水は, 症例の疾患の臨床的特色を顕著に現すことがある¹⁷⁾. 本研究で, クラミジア患者症例は既に治療を受けており, 治療しているため血液検査による抗体の有無で分類した. たが, 卵管上皮細胞の培養結果に有意差が認められたのは, 以前感染した際に卵管采が腹水からの曝露を受け, 抗生物質の投与により治療した現在でも卵管采は影響を受けた状態が持続していることが示唆された.

以上の結果より、卵管采の細胞が何らかの不妊原因を持っている不妊患者のものであれば卵管上皮細胞が増殖しない症例が数多くみられた。また特にクラミジア抗体陽性患者から得られた細胞は増殖が困難であり、その細胞増殖抑制が卵管采の形態悪化に関与し、卵捕獲機構障害に関連している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Abe H (1996) The mammalian oviductal epithelium : regional variations in cytological and functional aspects of the oviductal secretory cells. *Histol Histopathol* 11 (3) : 743-768
- 2) Reischl J, Prella K, Schol H, et al. (1999) Factors affecting proliferation and dedifferentiation of primary bovine oviduct epithelial cells *in vitro*. *Cell Tissue Res* 296 : 371-383
- 3) Comer MT, Leese HJ, Southgate J (1998) Induction of a differentiated ciliated cell phenotype in primary cultures of Fallopian tube epithelium. *Hum Reprod* 13 (11) : 3114-3120
- 4) Ando H, Kobayashi M, Toda S, et al. (2000) Establishment of a ciliated cell line from human Fallopian tube. *Hum Reprod* 15 (7) : 1597-1603
- 5) 宇津宮隆史 (1998) 卵管采の形状と妊娠について. *日産婦誌* 50 (7) : 396-398
- 6) Joo BS, Kim MK, Na YJ, et al. (2001) The mechanism of action of coculture on embryo development in the mouse model : direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. *Fertil Steril* 75 (1) : 193-199
- 7) Takeuchi K, Nagata Y, Sandow BA, et al. (1992) Primary culture of human fallopian tube epithelial cells and co-culture of early mouse pre-embryos. *Mol Reprod Dev* 32 (3) : 236-242
- 8) Vlad M, Walker D, Kennedy RC (1996) Nuclei number in human embryos co-cultured with human ampullary cells. *Hum Reprod* 11 (8) : 1678-1686
- 9) Hwu YM, Lee RK, Chen CP, et al. (1998) Development of hatching blastocysts from immature human oocytes following *in vitro* maturation and fertilization using a co-culture system. *Hum Reprod* 13 (7) : 1916-1921
- 10) Yao YQ, Ho PC, Yeung WS, et al. (1999) Effects of human oviductal cell coculture on various functional parameters of human spermatozoa. *Fertil Steril* 71 (2) : 232-239
- 11) Xu J, Cheung TM, Chan ST, et al. (2000) Human oviductal cells reduce the incidence of apoptosis in cocultured mouse embryos. *Fertil Steril* 74 (6) : 1215-1219
- 12) 杉並 洋 (1995) 卵管. 鈴木秋悦編, 第1版, 南山堂, 東京, pp30-37
- 13) Lucisano A, Morandotti G, Marana R, et al. (1992) Chlamydial genital infections and laparoscopic findings in infertile women. *Eur J Epidemiol* 8 (5) : 645-649
- 14) Anestad G, Lunde O, Moen M, et al. (1987) Infertility and chlamydial infection. *Fertil Steril* 48 (5) : 787-790
- 15) Patton DL, Askienazy-Elbhar M, Henry-Suchet J, et al. (1994) Detection of Chlamydia trachomatis in fallopian tube tissue in women with postinfectious tubal infertility. *Am J Obstet Gynecol* 171 (1) : 95-101
- 16) 野口昌良, 岡本俊充, 保條説彦 (1995) 卵管. 鈴木秋悦編, 第1版, 南山堂, 東京, pp61-69
- 17) Guagenti RC, Berman AL, Cohen NN (1989) Chlamydial ascites. *Dig Dis Sci* 34 (1) : 139-141

(受付 : 2002 年 4 月 10 日)

(受理 : 2003 年 1 月 28 日)

**Influence of the Fallopian Epithelial Cells Growing
In Vitro Culture by Infertile Aspects**

Yoko Kumasako, Takafumi Utsunomiya, Hiroyuki Abe¹⁾, Yasuhisa Araki²⁾

St. Luke Clinic, Oita 870-0947, Japan

¹⁾Research Institute for the Peptides, Yamagata 990-0823, Japan

²⁾The Institute for ARMT, Gunma 371-0105, Japan

The aim of this study was to evaluate the relationship between the cell growth and clinical aspects. Epithelial cells were collected from the fallopian tube of 137 infertile women by a laparoscopy. The extracted tissues were seeded in alpha-MEM media containing 10% human serum. We classified three groups from morphological aspects of fallopian tube. The groups were divided "good", "fair" and "poor" formation, and their frequency of patients was 38.0%, 42.3%, and 19.0%, respectively. Successful development of cells were shown 43.8% (60/137) of all patients from primary culture. The diagnosis included containing having antibody of Chlamydia trachomatis in 30.7% (42/137), the endometriosis in 69.3% (95/137) of the 137 patients. The having antibody of C. trachomatis patients were 24.7% (9/42) cell growing rate, whereas, it was 53.7% (51/95) from no having patients. Patients who suffered endometriosis showed rather poor cell growth than others, 28.5% (39/95) and 50.0% (21/42), respectively. It was obtained cell growing rate of "good", "fair" and "poor", 53.8% (28/52), 43.1% (25/58) and 26.9% (7/26), respectively from three classification of fallopian tube. C. trachomatis may act bad influence for fallopian epithelial function not only in vitro culture but also *in vivo*.

Key words : fallopian tube, epithelial cells, cell growth, endometriosis, Chlamydia trachomatis

(Jpn J Fertil Steril 48 : 41-47, 2003)

遺伝子組換え卵巣刺激ホルモン (Org 32489) を用いた 調節卵巣刺激—日本人女性を対象とした前向きオープン 多施設共同試験：日本と外国の IVF 試験の比較

An Open Prospective Multicentre Study in Pituitary Suppressed Japanese
Women Undergoing Controlled Ovarian Hyperstimulation with
Recombinant Follicle-stimulating Hormone (Org 32489) to
Compare Japanese and European IVF Results

久保春海 竹田 省¹⁾ 木下勝之²⁾
Harumi KUBO Satoru TAKEDA Katsuyuki KINOSHITA
本山洋明³⁾ 小林真一郎⁴⁾ 森本義晴⁵⁾
Hiroaki MOTOYAMA Shinichiro KOBAYASHI Yoshiharu MORIMOTO

東邦大学医学部第1産科婦人科学教室

First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, 6-11-1
Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo 143-8541, Japan

¹⁾埼玉医科大学総合医療センター産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School,
1981 Tsujido-machi Kamoda Kawagoe-shi, Saitama 350-8550, Japan

²⁾順天堂大学医学部附属順天堂医院産婦人科学教室

Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo University School of Medicine,
3-1-3 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

³⁾倉敷成人病センター産婦人科

Department of Obstetrics and Gynecology, Kurashiki Medical Center,
250 Bakurou-cho Kurashiki-shi, Okayama 710-8522, Japan

⁴⁾生長会府中病院不妊センター

Advanced Fertility Center, Seichokai Fuchu Hospital, Fuchu Hospital,
10-17 1-chome Higo-cho Izumi-shi, Osaka 594-0076, Japan

⁵⁾IVF 大阪クリニック

The Center for Reproductive Medicine and Infertility, IVF Osaka Clinic,
2-30 2-chome Nagata-naka Higashi-osaka-shi, Osaka 577-0013, Japan

遺伝子組換え卵巣刺激ホルモン (FSH) (Org 32489, フォリトロピンベータ) を日本人女性に用い、生殖補助医療 (ART) を施行した場合の有効性と安全性を評価するため、前向きオープン多施設共同試験を実施した。さらに、118名の白人女性により外国で実施された臨床試験結果と比較検討した。本試験では、ARTのために調節卵巣刺激 (COH) が行われた153名の日本人女性を被験者とした。ブセレリンを点鼻投与して下垂体機能を抑制させた後 (ロングプロトコール)、最初の4日間は Org 32489 を 150 IU または 225 IU 連日皮

下投与され、その後投与量は個別に調節された。有効性の主要評価項目である採卵数の平均(±標準偏差)は、本試験では12.7(±9.6)であった。外国で実施された試験においては11.7(±6.7)であり、いずれの人種においても同様の効果が示された。症例あたりの平均良好胚数(日本人3.8 vs. 白人4.5)や治療症例あたりの妊娠継続率(22.9% vs. 26.3%)などその他の評価項目においても両試験とも同様の結果が得られた。一方、本試験では、投与期間が短かく(日本人8.4日 vs. 白人9.8日)、総投与量が少なく(1,781 IU vs. 2,063 IU)、ヒト胎盤性性腺刺激ホルモン剤(hCG)投与の前日の血清FSHが高値を示した(14.5 IU/L vs. 12.3 IU/L)。この血清FSH値の差は体重で補正することにより消失し、日本人女性の体重が低かったことに起因すると考えられた。また、体重あたりの総投与量は両試験ではほぼ同じであり、投与量が個別に調節されたことで、採卵数等の効果におよぼす体重の影響は補正されたものと考えられる。なお、中等度ないし高度の卵巣過剰刺激症候群(OHSS)の発現率は日本人と白人被験者間で類似していた(2.0% vs. 3.4%)。以上、Org 32489によるART施行は日本人においても有効かつ安全であり、Org 32489に関する外国臨床試験の成績を日本人に適用可能と考えられる。本剤は、従来の尿由来のFSH製剤に代わり、ARTにおけるCOHに使用できる新しいFSH製剤となると考えられる。

キーワード: Org 32489, フォリトロピンベータ, 生殖補助医療, 体外受精, 調節卵巣刺激

(日本不妊会誌 48:49-60 2003)

緒言

閉経期婦人尿由来のFSH製剤は、排卵誘発や体外受精-胚移植(IVF-ET)に代表されるARTのための卵巣刺激剤として30年以上にわたって使用されており、その有効性および安全性は十分に確立された。しかしながら、純度がかかなり高くされてきたにもかかわらず、尿蛋白など尿由来の夾雑物を含有することや製剤の均一性に依然として限界がある。さらに、その製造が尿採取に影響されるため製剤の安定供給に問題が残る。そこで、遺伝子工学的手法を用い、ヒトFSHをコードする遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株に導入することにより、FSH製剤(Org 32489)が製造されることとなった¹⁾。このOrg 32489の純度は高く(>99%)、高い特異的FSH活性(10,000 IU/mgタンパク)を有する²⁾。天然型FSHと比較して糖鎖の組成が一部異なるものの、この差はわずかであり、電荷不均一性の程度、受容体結合親和性、*in vitro* および*in vivo*における生物活性に影響しないことが非臨床試験により示された³⁾。尿由来の製剤とは対照的に、Org 32489はロットごとの均一性が高く、黄体化ホルモン(LH)活性を示さず、ヒト尿由来の夾雑物を含まない。また、Org 32489は高い生物活性と⁴⁾、高い有効性(採卵数、妊娠率)を示すとともに投与期間が短く低い投与量から有効であることが明らかにされた⁶⁻⁸⁾。

Org 32489の凍結乾燥製剤(1.0 ml 溶解液付き)は、

排卵のない女性における排卵誘発および、IVFに際してのCOHの効能で、現在までに世界80カ国以上で承認されている。現在では、バイアル中にあらかじめ溶解した溶液として入手可能であり、注射液量が半減した(0.5 ml)ことにより皮下投与も可能となった。このバイアル製剤は、ヨーロッパ共同体やその他数カ国で既に承認されている。本試験ではこのバイアル入りの注射液剤を使用することとした。

本試験の目的は、IVFまたは卵細胞質内精子注入法(ICSI)のためにCOHが行われる日本人女性を対象に、遺伝子組換えFSH(Org 32489)の有効性と安全性を評価することにある。現在の医療実態にしたがい、被験者には性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)アゴニストを前投与して下垂体機能を抑制し、これによって早期黄体化を防止することとした。本試験のもう1つの目的は、今回得られた日本人女性におけるOrg 32489の有効性と安全性の成績と、別に外国(ヨーロッパ)で実施された外国人女性における成績との類似性を明らかにすることである。したがって、本試験の実施計画書は、外国で実施された臨床試験⁹⁾にできる限り一致させ、両試験の主要な有効性評価項目と安全性の指標を比較するとともに推計学的に検討・解析した。

材料および方法

1. 試験のデザイン

本試験はオープン多施設共同試験であり、下垂体機

表 1 本試験の実施医療機関

実施医療機関	治験責任医師	治験分担医師
東邦大学医学部付属大森病院第一産婦人科	久保 春海	安部 裕司 間崎 和夫 池永 秀幸 中野由起子 伊藤嘉奈子
埼玉医科大学総合医療センター産婦人科	竹田 省 (H13. 4. 1~) 木下 勝之 (~ H13. 3. 31)	石原 理 林 直樹 斉藤 正博 伊東 宗毅
財団法人倉敷成人病センター産婦人科	本山 洋明	なし
医療法人人生長会府中病院不妊センター	小林真一郎	加藤 浩志 半田 雅文
医療法人三慧会 IVF 大阪クリニック	森本 義晴	福田 愛作 河田 淳 岩本 英熙 中岡 義晴

能を抑制させた日本人女性において、Org 32489 による COH 後に ART を施行した。試験は、2000 年 5 月から 2001 年 2 月まで、日本の 5 医療機関 (表 1) において実施され、150 名の被験者の登録が計画された。各医療機関の治験審査委員会が試験を承認し、試験に組み入れる前に個々の被験者からインフォームド・コンセントを入手した。試験は、ヘルシンキ宣言に則り、日本の医薬品の臨床試験に関する基準に記載される規制当局の基準にしたがって実施された。また、IVF-ET の手順は日本産科婦人科学会のガイドラインに遵った。

2. 被験者の選択

被験者の選択基準は、スクリーニング時に 20 歳以上 39 歳未満；IVF または ICSI によって妊娠の可能性のある不妊夫婦の妻；24~35 日の正常な月経周期があり、変動は 24~35 日の範囲内で ± 3 日；体重が理想体重の 80~130% (Metropolitan Life Insurance Company Tables にしたがう)；文書によるインフォームド・コンセントの得られる不妊夫婦の妻とした。一方、高プロラクチン血症、多嚢胞性卵巣症候群や原発性卵巣機能障害などの内分泌異常を原因とする不妊症の徴候または既往歴があるもの；過去に 6 回以上の IVF-ET 治療、配偶子卵管内移植 (GIFT) または接合子卵管内移植 (ZIFT) が試行されたもの；GnRH アゴニストまたはゴナドトロピン製剤が使用禁忌であるもの；経腔超音波検査の妨げとなる卵巣あるいは腹腔内の異常；高血圧 (坐位での拡張期血圧 > 90 mm Hg あるいは収縮期血圧 > 150 mm Hg)；慢性心血管、肝、腎また

は肺疾患；現在または過去 (過去 12 カ月) のアルコール依存症または薬物依存症；スクリーニング前 6 カ月以内に治験薬の投与を受けたもの；治験責任医師または治験協力医師の判断で本試験の被験者として不適切とされたものは除外した。

本試験では、外国臨床試験とは異なり、男性に原因のある不妊の夫婦も含まれ、受精法として ICSI も用いられた。外国臨床試験 (1993 年から 1994 年に実施) では、当時 ICSI が確立された治療方法ではなく男性の精子異常による不妊は除外されていた。

3. 試験薬剤および試験の手順

下垂体機能を低下させるため GnRH アゴニストとしてブセレリン (スプレキユア[®], アベンティスファーマ株式会社) 1 回 150 μ g を 1 日 4 回点鼻投与した。本試験では、前周期の黄体期 (21~24 日目の間) にブセレリンの投与を開始したが、外国臨床試験では卵胞期初期に開始された。これは、最近になって、GnRH アゴニストを前周期の黄体期に開始すると卵巣嚢胞の発現リスクが低くなることが明らかにされたことによる¹⁰⁻¹²⁾。ブセレリン投与後の 14~18 日以内に下垂体機能の抑制が確認されなかった場合、ブセレリン 1 回 300 μ g を 1 日 4 回投与した。

Org 32489 (NV オルガノン, オランダ) はバイアル入りの注射液剤として提供され、0.5 ml の溶液中に 75 IU (ロット番号 CU 048) または 150 IU (ロット番号 CU 042) の FSH 活性を含有する。外国臨床試験では、当時、注射液剤が開発されていなかったため、75 IU の FSH 活性を含有する凍結乾燥製剤が提供され、これに

は1.0 mlの溶解液アンプルが付属していた。

最終的卵巣成熟のためには、5,000 IUのhCG (プレグニール[®], 日本オルガノン株式会社)が用いられた。

ブセレリンによる下垂体機能の抑制が確認されたら(血清エストラジオール(E₂)値が50 pg/ml未満), Org 32489を1~4日に150または225 IU/日の固定用量で、臍周縁を4分割した右下ないし左下へ皮下投与した。5日目から、経陰超音波スキャンあるいは血清E₂値で卵巣の発育を評価し、個別の用量調節を開始した。平均径17 mm以上の卵巣が3個以上確認された場合、hCG(10,000IU)を投与した。ただし、早期排卵の場合、15 mm以上の卵巣が13個以上認められる場合、あるいは被験者の安全性確保に問題があると判断された場合、hCGの投与は中止した。hCGの投与から30~36時間後に採卵し、IVFまたはICSIを施行し受精させた。採卵から2~5日後に3個以下の胚を子宮に戻した。黄体期管理は各施設で通常実施されている方法を用いた。

4. 評価

スクリーニング時に生年月日、既往歴・合併症、月経歴、前治療歴および妊娠分娩歴の調査と、産婦人科学検査、バイタル・サイン、臨床検査および内分泌学検査、経陰超音波断層検査を実施した。超音波断層検査および内分泌学検査は、Org 32489の初回投与前と投与期間中は2日または3日おきに、hCG投与日または採卵日、ET施行の日と施行から1週後(内分泌学検査)、ET施行から6~8週後(超音波断層法による臨床妊娠の確認)およびET施行から12~18週後(超音波断層法による妊娠継続の確認)に実施した。Org 32489投与前と投与後に採取した血液をNVオルガノンに送付し、抗FSHおよび抗CHO抗体を測定した⁸⁾。下垂体機能抑制を確認するため、ブセレリン投与直前と投与開始14~18日後に血清E₂濃度を測定した。ブセレリン投与開始から14~18日後に低ゴナドトロピン状態にいたらなかった場合、引き続き週に1回血清E₂濃度を測定した。

5. 試験の評価項目

主要評価項目は採卵数(総数と成熟卵の数)とした。副次評価項目はOrg 32489の投与期間と総投与量、hCGの投与日における卵巣の数とサイズ分布、hCG投与直前のE₂、LH、FSHおよびプロゲステロンの血清濃度、良好胚の数、着床率(=胚移植数に対する胎嚢数(%))、ET施行から12~18週後の妊娠継続率と流産率である。

安全性は、重篤な有害事象数、OHSSの発生率および抗FSH抗体、抗CHO抗体の発現等で評価した。

6. 統計解析

有効性と安全性データについて要約統計量を示した。本試験の成績と外国臨床試験成績との比較には、Org 32489が皮下投与された被験者の結果のみを用いた。比較のため表と図には両試験の結果を示した。

すべての結果はIntent-To-Treat (ITT) データ・セットを基本とし、少なくとも1回、Org 32489が投与されたすべての被験者 (AST; All-Subjects-Treated)をITTとした。外国臨床試験との比較においてもITTデータ・セットを用いた。有効性評価項目について統計学的に比較した。外国臨床試験の結果と本試験の結果の差は、連続データについては2つの母集団の平均の差、またカテゴリカルデータについては割合の差のそれぞれ95%信頼区間(CI)とそのp値を算出して解析した。

すべての解析はSASバージョン6.12を用いて実施した。

結 果

1. 症例の内訳と特性

症例の内訳を表2に示した。本試験では、153名の被験者にOrg 32489が皮下投与された。外国臨床試験の被験者は118名であった。これらのITTデータ・セットを統計解析に用いた。本試験における投与開始後の中止理由は、卵巣反応性が不十分(n=2)、卵の質不良(n=1)、胚の質不良(n=7)、過剰刺激の危険(n=7)またはOHSS発現であった(n=2)。本試験の中止率は12.4%、外国臨床試験においては10.2%であった。

表3に症例の特性を示した。日本人の被験者と外国人の被験者間で年齢分布や月経周期は類似していた。しかしながら、体重とBMIは日本人が低値であり、不妊の原因に両被験者間に差が認められた。不妊原因の差は、本試験では不妊の男性因子を含めたが、外国臨床試験では除外されたことによる。

2. 投与期間および投与量

hCG投与に到らなかった4名を除き149名の被験者で採卵され、このうち115名がOrg 32489を225 IU/日で開始、34名が150 IU/日で開始であった。同様に外国臨床試験では、112名のうち225 IU/日で開始した被験者は58名であった。Org 32489の総投与量は日本人被験者のほうが低かったが、平均1日投与量は外国臨床試験のそれと類似していた(表4)。外国臨床試験と

表 2 症例の内訳

治療状況	本試験		外国臨床試験	
	n	%	n	%
組み入れ症例	158	—	132	—
プセレリン投与症例	156	—	123	—
Org 32489 投与症例	153	100	118	100
hCG 投与症例	149	97.4	112	94.9
採卵実施症例	149	97.4	112	94.9
受精実施症例	148	96.7	112	94.9
胚移植実施症例	134	87.6	106	89.8

表 3 症例の特性

	本試験 (n = 153)	外国臨床試験 (n = 118)
年齢 (歳)	32.0 ± 3.5	32.5 ± 3.6
身長 (cm)	158.3 ± 5.0	164.4 ± 6.7
体重 (kg)	51.4 ± 5.6	62.0 ± 8.2
BMI (kg/m ²)	20.5 ± 2.0	23.0 ± 2.8
月経周期 (日)	29.1 ± 2.0	28.2 ± 1.5
不妊期間 (年)	3.9 ± 2.9	6.3 ± 3.2
原発性不妊の被験者 (%)	57.5	41.4
続発性不妊の被験者 (%)	42.5	58.5
不妊の原因 (%)		
卵管異常	24.8	69.5
子宮内膜症	7.8	8.5
卵管異常及び子宮内膜症	2.0	4.2
男性因子	43.2	0
その他	1.3	2.5
原因不明	20.9	15.3

比較して本試験の平均投与期間は有意に短かった (表 4)。

3. 卵胞の発育とホルモン値

卵胞 (径 10 mm 以上) の総数は、本試験よりも外国臨床試験で若干多かったが (表 4)、卵胞のサイズの分布は両試験で類似していた (図 1)。

Org 32489 投与終了時の E₂, LH およびプロゲステロンの血清濃度は類似していたが、FSH 値は外国人被験者に比して日本人被験者で若干高かった (表 4)。体重で補正すると血清 FSH 値に差は認められなかった (図 2)。

4. 臨床結果

本試験と外国臨床試験で観察された有効性評価項目を表 4 に示した。主要評価項目である採卵数は本試験

と外国臨床試験で同程度であり、いずれの試験でも採取された卵の 85% が成熟していた。両試験の母集団の差 (本試験では男性不妊症を含めたが、外国臨床試験では除外した) が試験の結果に影響を及ぼしていた可能性が否定できないため、採卵数に関しては、男性不妊症例を除外した場合についても解析した (図 3)。この部分集団 (n = 81) では、採卵数が 12.2 個であり、これは男性不妊症例を含む集団での採卵数 (12.7 個) とほぼ同数であり、外国臨床試験で得られた結果とも類似していた (95%CI = -2.732 ~ 1.712; P = 0.6512)。

本試験における採卵数、良好胚数および妊娠継続率は、外国臨床試験結果と統計学的に有意な差はなかった (表 4)。本試験では、平均 2.1 個の胚が移植された一方で、外国臨床試験では 2.5 個の胚が移植された。本試

表 4 本試験と外国臨床試験での Org 32489 の効果の比較

	本試験 mean ± SD	外国臨床試験 mean ± SD	差の 95% 信頼区間*	p 値
1 日平均投与量 (IU)	212.0	210.4	n.a.	
Org 32489 の総投与量 (IU)	1,781 ± 562	2,063 ± 668	131.4 to 431.8	< 0.001
投与期間 (日)	8.4 ± 1.6	9.8 ± 1.7	1.04 to 1.87	< 0.001
径 10 mm 以上の卵胞数 (個)	10.5 ± 5.4	12.8 ± 7.3	0.80 to 3.90	0.003
hCG 投与直前のホルモン値				
E ₂ (pmol/L)	7,651 ± 5,396	7,109 ± 5,143	- 1,845 to 760.1	NS
LH (IU/L)	1.7 ± 1.0	1.5 ± 1.1	- 0.439 to 0.075	NS
FSH (IU/L)	14.5 ± 5.0	12.3 ± 5.1	- 3.51 to - 0.97	< 0.001
P (nmol/L)	4.2 ± 2.0	3.6 ± 7.4	- 1.84 to 0.66	NS
採卵数 (個)	12.7 ± 9.6	11.7 ± 6.7	- 3.1 to 1.1	NS
成熟卵数 (個)	10.8 ± 8.4	10.0 ± 6.8	n.a.	
総胚数 (個)	7.7 ± 5.9	7.3 ± 4.8	n.a.	
良好胚数 (個)	3.8 ± 3.9	4.5 ± 3.8	- 0.21 to 1.71	NS
治験薬投与例あたりの流産率 (%)	8.5	3.4	- 0.106 to 0.004	NS
臨床妊娠あたりの流産率 (%)	16.7	11.4	n.a.	
治験薬投与例あたりの妊娠継続率 (%)	22.9	26.3	- 0.070 to 0.138	NS
胚移植実施例あたりの妊娠継続率 (%)	26.1	29.2	n.a.	

95% 信頼区間は外国臨床試験結果から本試験結果を引いて算出した。

n.a.: not available

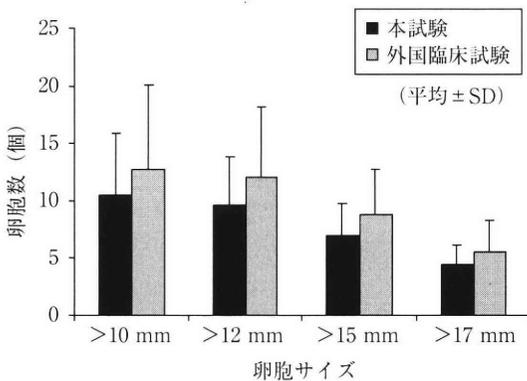


図 1 本試験 (n=149) と外国臨床試験 (n=112) での hCG 投与日の卵胞数とサイズ

験の着床率は、19.8% (7.1~24.2%) であった。外国臨床試験に比して流産率は若干高く妊娠継続率は若干低かったが、これらの差は統計学的に有意ではなかった (表 4)。

5. 追加解析

FSH 投与に対する卵巣の反応性 (採卵数) に及ぼす種々の要因の影響について層別解析を行い検討した。

その結果を図 4 に示した。採卵数は年齢層別に類似しており、いずれも加齢に伴い低下した。最も年齢の低い層 (20~24 歳) では被験者数が少なく比較が困難であった (本試験 n=4, 外国臨床試験 n=1)。体重と採卵数との間には本試験と外国臨床試験のいずれにおいても相関は認められず、また、70 kg を超える層では日本人被験者は 2 名しかおらず比較は難しかった。Org 32489 の平均 1 日投与量による層別解析では、1 日投与量が高い症例で採卵数が少ないことが本試験と外国臨床試験のいずれにおいても示された。1 日投与量が低、中および高に層別した場合、被験者数の割合 (%) は日本人女性でそれぞれ 36%, 48%, 15%, 外国人女性でそれぞれ 39%, 46%, 15% と両人種間でほとんど差がないことが示された。総投与量については、平均 1 日用量と同様の傾向がみられ、採卵数の少ない症例と多い症例の層別の分布は本試験と外国臨床試験のいずれにおいても同様であることが明らかとなった。

図 5 に示されるように、被験者あたりの採卵数の分布も日本人と外国人被験者間で差がなく、大半において 5~14 個が採取された。

表 3 および 4 に示されるように、日本人女性の体重が軽く血清 FSH 濃度が高かった。薬物動態および薬力

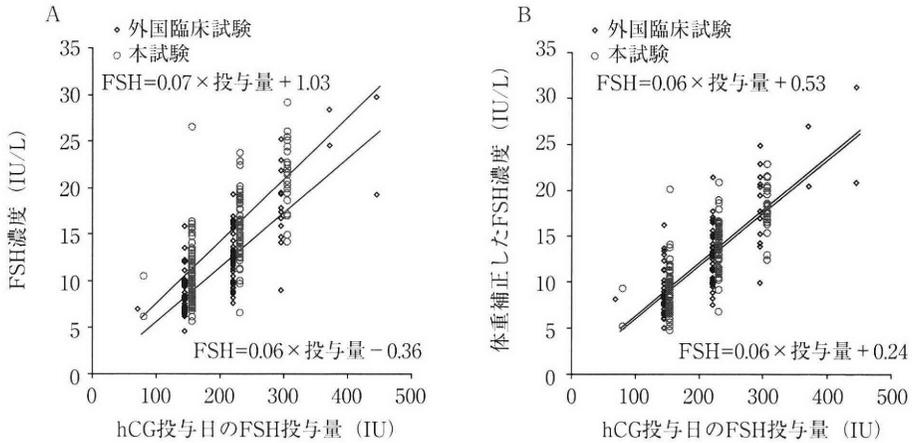


図2 本試験と外国臨床試験でのhCG投与日の血清FSH濃度
 A. 血清FSH濃度(体重補正なし)
 B. 体重補正した血清FSH濃度

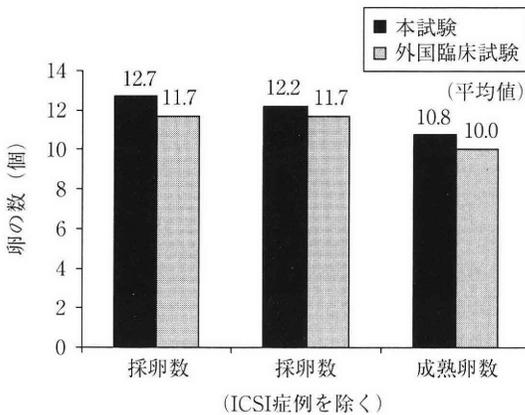


図3 本試験 (n=149 または ICSI を除いた場合 n=81) と外国臨床試験 (n=112) での採卵実施症例あたりの採卵数

を経験したが、すべて回復した。外国臨床試験では6名(5.1%)の被験者に重篤な有害事象が認められた。本試験で、Org 32489に関連する有害事象のうち最も多く報告されたのはOHSSであり、重度(n=1)、中等度(n=2)または軽度(n=6)と分類された。これらのOHSS症例のうち4例が重篤な有害事象として報告された。OHSS(重度と中等度)の2例は、投与中止となった。その他の有害事象のうち、薬剤に関連するものとして腹痛(n=6)、腹部膨満(n=4)、腹水(n=4)などが認められ、いずれも軽度に分類された。本試験におけるOHSS症例は軽度のものが多く、中等度や重度OHSSの例は少なかったが、この発現率は外国臨床試験での発現率と同程度であった(図7)。

抗FSH抗体および抗CHO抗体はいずれの被験者でも検出されなかった。また、臨床検査値およびバイタルサインの変動は軽度で臨床的に問題とならなかった。

考 察

本試験は日本人女性を対象にした遺伝子組換えFSH(Org 32489)を用いた最初のIVFでの臨床試験であり、本剤がARTにおいて有効かつ安全な治療薬であるのみならず、採卵数や妊娠継続率は、Org 32489を用いた他の臨床試験の成績^{8,9)}やその他の性腺刺激ホルモン剤^{8,13,14)}で既に報告されているものと同程度であることが明らかとなった。安全性の主要な指標であ

学的効果に及ぼす体重の影響が、個別の用量設定によって、補正されるかどうかを検討するため、2つの集団において体重あたりの初期投与量と総投与量を比較した。体重あたりの初期投与量は日本人で高く、体重あたりの総投与量は日本人と外国人とのいずれにおいてもほぼ同様となった(図6)。また、OHSSの発現率と投与量との関連性は認められなかった(図6)。

6. 安全性

本試験では10名の被験者(6.5%)が重篤な有害事象

る OHSS は、1973 年に WHO によって標準化された診断基準に準じて判定されたが、その発現率は COH におけるこれまでの報告と比較すると^{8,15)}、同程度かあるいは低い発現率であった。

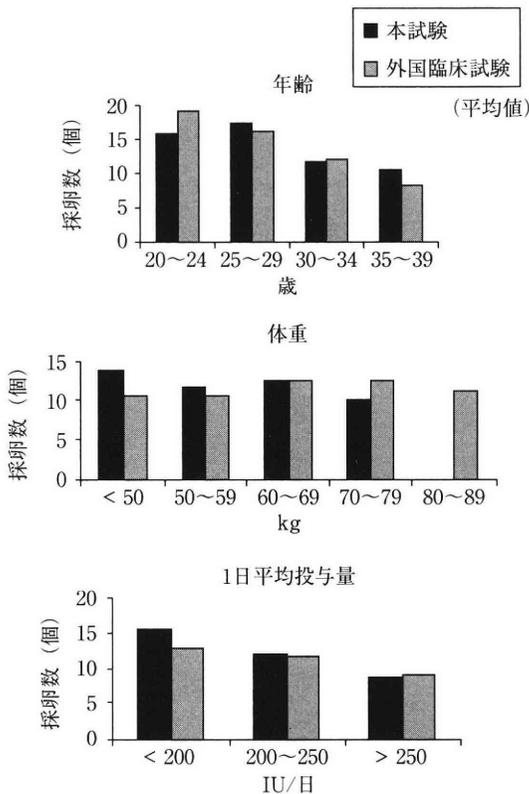


図4 年齢、体重および1日平均投与量別の採卵数

また、本試験は、Org 32489 皮下投与の臨床上の有効性を日本人女性および外国人女性で統計学的に比較した最初の試験でもある。外国人女性から得られた Org 32489 の有効性と安全性に関する成績を日本人に外挿できるかどうかを検討することも今回の目的のひとつである。本試験で比較対象となっている外国臨床試験は 1993~1994 年に実施され、1 群に Org 32489 が皮下投与され、別の群には筋肉内に投与されたものであった⁹⁾。両試験の実施計画書には表 5 に示すとおり、GnRH アゴニストの投与開始時期、不妊原因、ICSI の採否、黄体期管理の方法等においていくらかの不一致はある。しかしながら、以下に示すとおり臨床結果に影響を及ぼさなかったと考えられた。まず、両試験ともロングプロトコルを採用したが、GnRH アゴニストの投与開始時期の違いは、ロングプロトコルにおいては採卵数に影響を及ぼさないことが報告されている¹¹⁾。両試験ともにダウンレギュレーションの基準が同一（血清中 E_2 値が 50 pg/mL 未満）であり、この基準を確認したのち FSH 製剤の投与が開始されたことから、主要評価項目である採卵数には影響を及ぼしていないと考えられた。また、採卵数は男性不妊を除外した解析とそれを含めた解析とでほぼ同数であった。さらに、本試験では媒精技術を用いる IVF に加えて受精の方法として ICSI も認めたが、妊娠率は ICSI と IVF ではほぼ同じであることが報告されており¹⁶⁾、採卵数は本試験において ICSI 例を除外して集計した場合でもほぼ同じであり、ICSI を含めることが主要評価項目に影響を及ぼすことはなかった (図 3) し、その他の成績にも影響はなかった。また、黄体期

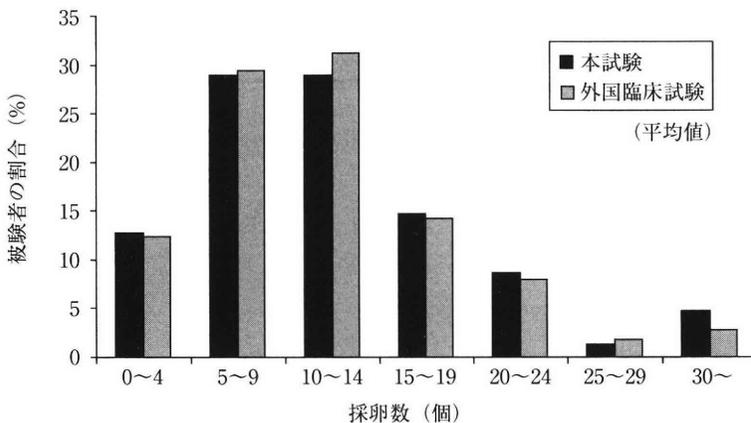


図5 採卵数別の被験者の割合

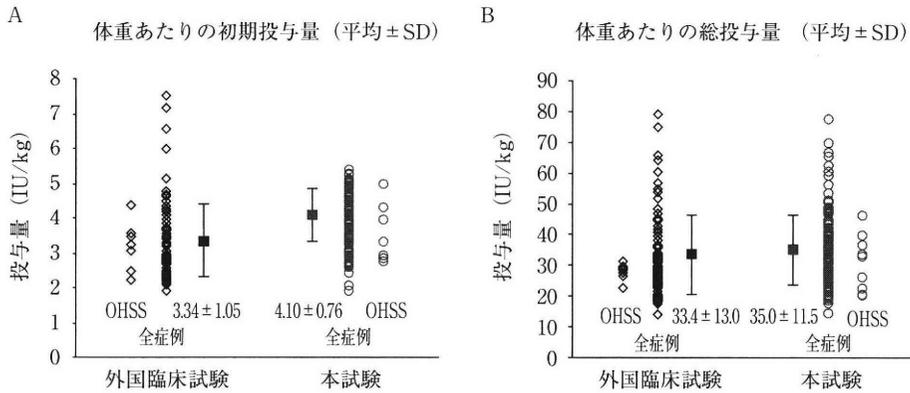


図 6 本試験と外国臨床試験での体重あたりの初期投与量及び総投与量の分布と OHSS 発現症例

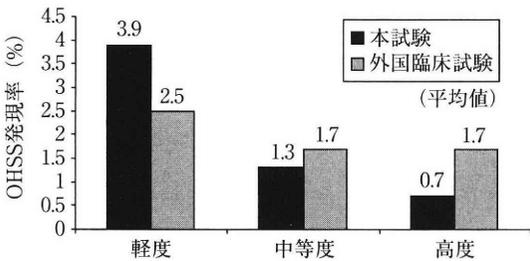


図 7 本試験 (n=153) と外国臨床試験 (n=118) での OHSS 発現率

績との比較可能性にこうした差異が影響するものではないと考えられた。

一方、本試験では、外国臨床試験と異なり、Org32489 の総投与量が少なく投与期間が短かく、また血清 FSH 値が高かった。これらの差は、日本人女性の平均体重が低かったことに起因するものと考えられた。その理由としては、次のことがあげられる。両試験間でみられた血清 FSH 値の差は体重で補正すると消失することが明らかになった。また、ゴナドトロピン欠乏症の被験者における単回投与および反復投与による薬物動態データの解析から、血清 FSH 値の推移にみられた人種間の差は血清 FSH 値を体重で補正することによりほとんど認められなくなることが明らかにされており、Org 32489 の薬物動態特性が外国人女性と日本人女性で同じであることがすでに示されている²³⁾。一方、卵胞発育の FSH 閾値は個体ごとに異なることが知られており¹⁷⁻¹⁹⁾、個別に投与量を調節する必要性が指摘されている。本試験と外国臨床試験では、実際に個別に投与量を調節することが行われたが、このことに

管理の方法は採卵数の評価に影響しないと考えられる。さらに、両試験とも 1 日 150 IU または 225 IU で投与を開始し、5 日目以降は個別に用量調節を行ったが、本試験で 225 IU/日 で投与を開始した被験者の割合が多かったが臨床結果に影響を及ぼさなかった。その他、2 試験の実施時期の差異および実施した地域の文化的な差異があるとしても、本試験成績と外国臨床試験成

表 5 本試験と外国臨床試験の実施計画書の相違点

項目	本試験	外国臨床試験
GnRH アゴニストの投与開始時期	前周期の黄体期中期	卵胞期初期
治験薬 (Org 32489) の剤型	注射液剤	凍結乾燥製剤
不妊原因	男性因子を含む	男性因子は含まない
ART の手法	ICSI を採用	ICSI は含まない
黄体期管理	施設の方法に委ねた	標準的な方法を例示

より人種間で認められた体重差に起因する有効性への影響に対する補正が行われたと考えられる。このことは、追加解析により、体重あたりの総投与量の分布が両人種でほぼ同じであったことに示され、目的とする有効性(径 17 mm 以上の卵胞が 3 個以上)を得るために必要な FSH の量が、日本人女性でも外国人女性でも体重あたりではほぼ同じであると考えられた。さらに、人種内での個体差の分布も両人種で類似していることが示された。

両人種間のもう 1 つの差は、Org 32489 投与終了時に、本試験で観察された卵胞数が少なかった点である。しかしながら、サイズ別の卵胞数の分布や、hCG 投与日に測定された血清 E₂ 濃度、採卵数には両試験で差異はなかった。

Org 32489 を皮下投与した際の臨床効果は、日本人と外国人被験者の双方で実質的に同じであった。すなわち、被験者あたりの採卵数(主要評価項目)、被験者あたりの良好胚数および妊娠継続率は両人種間で差がなかった。追加解析では、両被験者集団で種々の要因が卵巣の反応性(採卵数)に及ぼす影響を検討した。その結果、日本人と外国人被験者のいずれにおいても加齢に伴って反応性が低下することが示されたが、体重や初期投与量による有意な影響はなかった。高用量が必要であった被験者における同様の反応性の低下が示され、良好反応者と不良反応者の存在が示された。

最も重大な安全性上の問題となる OHSS の発現に日本人と外国人との間で差は認められなかった。両試験でともに WHO によって標準化された診断基準に準じて評価されたため、判定基準に実質的な差はないと考えられ、さらに、Org 32489 の初期投与量および総投与量と OHSS の発現との関連性が全くなかったため、OHSS の出現には Org 32489 の投与量だけではなく、おそらく別の要因が関連すると考えられる。

尿由来の FSH については、世界中で同様の投与方法が用いられてきた。遺伝子組換え FSH と尿由来の FSH の構造と薬物動態が極めて類似していることから考えれば^{3,20,21)}、Org 32489 の使用においても、米国やヨーロッパの投与方法を日本人にも応用できると考えられる。また、Org 32489 は線形の薬物動態を示すこと²²⁾、卵胞刺激に閾値があるため平坦な作用-濃度曲線を呈すること¹⁷⁻¹⁹⁾、広い治療域(1日あたり 150~600 IU)を有することから、本剤の薬物動態/薬力学的プロファイルは民族的要因の影響を受けにくいということが考えられる。さらに、本試験結果は、日本人女

性において Org 32489 を投与するに際して、海外における投与方法の適用は安全かつ有効であるということを示すものである。体重の差により観察された差異は、個別に投与量を調整することによって補正された。

要約すると、Org 32489 は日本人においても外国人と同様に有効であり、同等の効果が得られた。Org 32489 に関する外国臨床試験成績を日本人集団へ外挿することは可能と考えられる。日本に Org 32489 注射液剤が導入されると、高い純度、ロット間の均一性、皮下投与の利便性などから、従来の尿由来の FSH 製剤に代わる新しい FSH 製剤として生殖補助医療において COH に広範に用いられることとなると考えられる。

文 献

- 1) Olijve W, De Boer W, Mulders JW, et al. (1996) Molecular biology and biochemistry of human recombinant follicle stimulating hormone (Puregon[®]). *Mol Hum Reprod* 2: 371-382
- 2) Hard K, Mekking A, Damm JB, et al. (1990) Isolation and structure determination of the intact sialylated N-linked carbohydrate chains of recombinant human follitropin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 193: 263-271
- 3) De Leeuw R, Mulders J, Voortman G, et al. (1996) Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon[®]). *Mol Hum Reprod* 2: 361-369
- 4) Matikainen T, De Leeuw R, Mannaerts B, et al. (1994) Circulating bioactive and immunoreactive recombinant human follicle stimulating hormone (Org 32489) after administration to gonadotropin-deficient subjects. *Fertil Steril* 61: 62-69
- 5) Lambert A, Rodgers M, Mitchell R, et al. (1995) In vitro biopotency and glycoform distribution of recombinant human follicle stimulating hormone (Org 32489), Metrodin and Metrodin-HP. *Hum Reprod* 10: 1928-1935
- 6) Hoomans EH, Andersen AN, Loft A, et al. (1999) A prospective, randomized clinical trial comparing 150 IU recombinant follicle stimulating hormone (Puregon[®]) and 225 IU highly purified urinary follicle stimulating hormone (Metrodin-HP[®]) in a fixed-dose regimen in women undergoing ovarian stimulation. *Hum Reprod* 14: 2442-2447
- 7) Out HJ, Driessen SG, Mannaerts BM, et al. (1997) Recombinant follicle-stimulating hormone (follitropin beta, Puregon) yields higher pregnancy rates in *in vitro* fertilization than urinary gonadotropins. *Fertil Steril* 68: 138-142

- 8) Out HJ, Mannaerts BM, Driessen SG, et al.(1995) A prospective, randomized, assessor-blind, multi-centre study comparing recombinant and urinary follicle stimulating hormone (Puregon versus Metrodin) in *in-vitro* fertilization. Hum Reprod 10 : 2534-2540
- 9) Out HJ, Reimitz PE, Bennink HJ.(1997) A prospective, randomized study to assess the tolerance and efficacy of intramuscular and subcutaneous administration of recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon). Fertil Steril 67 : 278-283
- 10) Jenkins JM, Davies DW, Anthony F, et al.(1992) The detrimental influence of functional ovarian cysts during *in-vitro* fertilization cycles. Hum Reprod 7 : 776-780
- 11) Ron-El R, Herman A, Golan A, et al.(1990) The comparison of early follicular and midluteal administration of long-acting gonadotropin-releasing hormone agonist. Fertil Steril 54 : 233-237
- 12) Pellicer A, Simon C, Miro F, et al.(1989) Ovarian response and outcome of *in-vitro* fertilization in patients treated with gonadotrophin-releasing hormone analogues in different phases of the menstrual cycle. Hum Reprod 4 : 285-289
- 13) Out HJ, Mannaerts BM, Driessen SG, et al.(1996) Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH ; Puregon) in assisted reproduction : more oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. Hum Reprod Update 2 : 162-171
- 14) Hedon B, Out HJ, Hugues JN, et al. (1995) Efficacy and safety of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon[®]) in infertile women pituitary-suppressed with triptorelin undergoing *in-vitro* fertilization : a prospective, randomized, assessor-blind, multicentre trial. Hum Reprod 10 : 3102-3106.
- 15) Navot D, Relou A, Birkenfeld A, et al.(1988) Risk factors and prognostic variables in the ovarian hyperstimulation syndrome. Am J Obstet Gynecol 159 : 210-215
- 16) Palermo GD, Neri QV, Hariprashad JJ, et al. (2000) ICSI and its outcome. Semin Reprod Med 18 : 161-169
- 17) Scheele F, Schoemaker J.(1996) The role of follicle-stimulating hormone in the selection of follicles in human ovaries : a survey of the literature and a proposed model. Gynecol Endocrinol 10 : 55-66
- 18) Schipper I, de Jong FH, Fauser BC. (1998) Lack of correlation between maximum early follicular phase serum follicle stimulating hormone concentrations and menstrual cycle characteristics in women under the age of 35 years. Hum Reprod 13 : 1442-1448
- 19) Schipper I, Hop WC, Fauser BC. (1998) The follicle-stimulating hormone (FSH) threshold/window concept examined by different interventions with exogenous FSH during the follicular phase of the normal menstrual cycle : duration, rather than magnitude, of FSH increase affects follicle development. J Clin Endocrinol Metab 83 : 1292-1298.
- 20) Mannaerts BM, Rombout F, Out HJ, et al.(1996) Clinical profiling of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH ; Puregon) : relationship between serum FSH and efficacy. Hum Reprod Update 2 : 153-161.
- 21) Le Cottonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, et al. (1994) Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH). I. Comparative pharmacokinetics with urinary human FSH. Fertil Steril 61 : 669-678
- 22) Voortman G, Mannaerts BM, Huisman JA. (2000) A dose proportionality study of subcutaneously and intramuscularly administered recombinant human follicle-stimulating hormone (Follistim/Puregon) in healthy female volunteers. Fertil Steril 73 : 1187-1193
- 23) 日本オルガノン社社内資料

(受付 : 2002年10月28日)

(受理 : 2003年2月14日)

An Open Prospective Multicentre Study in Pituitary-Suppressed Japanese Women Undergoing Controlled Ovarian Hyperstimulation with Recombinant Follicle-stimulating Hormone (Org 32489) to Compare Japanese and European IVF Results

Harumi Kubo, Satoru Takeda¹⁾, Katsuyuki Kinoshita²⁾, Hiroaki Motoyama³⁾, Shinichiro Kobayashi⁴⁾, Yoshiharu Morimoto⁵⁾

First Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University School of Medicine, 6-11-1 Ohmorinishi, Ohta-ku, Tokyo 143-8541, Japan

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Saitama Medical Center, Saitama Medical School, 1981 Tsujido-machi Kamoda Kawagoe-shi, Saitama 350-8550, Japan

²⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo University School of Medicine, 3-1-3 Hongo Bunkyo-ku, Tokyo 113-8431, Japan

³⁾Department of Obstetrics and Gynecology, Kurashiki Medical Center, 250 Bakurou-cho Kurashiki-shi, Okayama 710-8522, Japan

⁴⁾Advanced Fertility Center, Seichokai Fuchu Hospital, Fuchu Hospital, 10-17 1-chome Higo-cho Izumi-shi, Osaka 594-0076, Japan

⁵⁾The Center for Reproductive Medicine and Infertility, IVF Osaka Clinic, 2-30 2-chome Nagata-naka Higashi-osaka-shi, Osaka 577-0013, Japan

Objectives : The efficacy and safety of recombinant FSH (Org 32489, follitropin- β) was assessed in pituitary-suppressed Japanese women undergoing assisted reproductive technology (ART), to compare the efficacy and safety of Org 32489 in Japanese women with those of Caucasian women.

Design : Open, multicentre, prospective trial similar to a previous European trial of Org 32489.

Subjects : 153 Japanese women to be compared with 118 Caucasian women undergoing Controlled Ovarian Hyperstimulation (COH) for ART.

Treatment : Daily subcutaneous administration of 150 IU or 225 IU Org 32489 for the first 4 days, after which the daily dose was adjusted individually. For pituitary downregulation subjects were pre-treated with daily intranasal buserelin (long protocol).

Results and discussion : Statistical analysis of the main efficacy parameter, the total mean (\pm SD) number of oocytes retrieved, showed similar effects in both races : 12.7 (\pm 9.6) oocytes in Japanese subjects versus 11.7 (\pm 6.7) oocytes in Caucasian subjects. Other clinical outcome variables were also comparable : e. g. mean number of good quality embryos per subject (3.8 versus 4.5) and ongoing pregnancy rate per attempt (22.9 versus 26.3%). Main differences observed in this study versus the European study were : a shorter treatment duration (8.4 versus 9.8 days), lower total Org 32489 dose (1781 versus 2063 IU) and higher serum FSH levels at the day of hCG (14.5 versus 12.3 IU/L). However, the total dose per kg body was similar in both populations. And also the difference in serum FSH levels completely disappeared after normalization for body weight. Therefore, these differences could be attributed to the lower body weight in Japanese subjects. The influence of body-weight on clinical outcome such as number of oocytes retrieved appeared to be completely corrected by individual dose-titration. The incidence of moderate or severe OHSS indicated similarity between Japanese and Caucasian subjects (2.0 versus 3.4%).

Conclusion : Since recombinant FSH (Org 32489) was equally efficacious and safe in Japanese as in Caucasian IVF patients, the outcome of foreign clinical data on Org 32489 to the Japanese population is applicable. Recombinant FSH (Org 32489 solution) is a new treatment option for Japanese women undergoing COH for ART with several advantages over conventional urinary gonadotrophin preparations.

Key words : Org 32489, follitropin-beta, assisted reproductive technology, *in-vitro* fertilization, controlled ovarian hyperstimulation

表 1 子宮頸部腺癌初期病変で円錐切除のみで follow up した 3 症例

	症例 1	症例 2	症例 3
年齢 (歳)	36	34	28
初診時主訴	性交後出血	不正性器出血(中間期)	続発無月経(半年続く)と月経不順
月経歴	初経以来順, 25 日型	初経以来順, 28 日型	不順~無月経(無・希発排卵?)
妊娠・出産歴	G4P1(但し前の夫との間)	G2P2	G0P0
細胞診	Severe Dysplasia	Severe Dysplasia	atypical endocervical glandular cell
コルポスコピ	W	MPW	NCF
生検	CIS	SCC	hyperplasmic columnar epithelial cell
円錐切除の病理診断	AIS*+Dysplasia	SCC(microinvasive)+AIS	microinvasive adenoca. (CC Ia)
円錐切除断端	陰性	陰性	陰性
円錐切除後の妊娠	(+) 4 回自然妊娠	(-)	(+) Clomphene+hMG+hCG 妊娠
同流産・出産	3,632g 男児, その後 1 回流産, 3,426g の女児, その後 2 回目の流産.	(-)	2,506g 女児.

* adenocarcinoma *in situ*

内癌の場合の保存手術はほぼ認められているが、子宮頸部微小浸潤癌の場合、保存的治療の可否はまだまだ議論の多いところである。更に腺癌の場合は、扁平上皮癌とは異なり進行過程が不明なため保存的な治療が可能かどうかについては現在も定説がない。

今回、我々は子宮頸部腺癌初期病変で円錐切除のみで follow up した 3 症例の円錐切除後 (CKC: cold knife conization) の妊孕性を検討したので報告する。更に過去の文献や、産科医大産婦人科で円錐切除・子宮温存した 40 歳以下の症例についてその後の妊娠率等を検討し、頸部腺癌初期病変でも円錐切除後妊娠が可能かどうかについて文献的に考察したので合わせて報告する。

症例報告

表は不正出血や月経不順で産科医大 (症例 1, 2) および愛和病院産婦人科 (症例 3) を受診し子宮頸部擦過細胞診で atypical cell が検出され、円錐切除 (CKC) により上皮内腺癌が adenocarcinoma が認められたが子宮を温存した 3 症例を示す。

症例 1 M.K.: 36 歳: 初診時 G-4, P-1

12月7日、2カ月程続く性交後出血を主訴に近産婦人科を受診し、頸管ポリープを指摘された。摘出ポリープには腫瘍病変は検出されなかったが子宮

頸部の擦過細胞診で PAP Class IV (初期浸潤癌疑い)であったため、12月24日に産科医大産婦人科を紹介受診した。再検査では細胞診 PAP Class IIIb (severe dysplasia), Colposcopy と生検では CIS の診断であった。

2月25日産科医科大学産婦人科に入院、3月3日に子宮頸部円錐切除術 (CKC) が行われた。14分割した円錐切除切片の #7, 10, 11 が AIS, #6 が Dysplasia で margin は negative なので円錐切除が治療的と考えられた。約4カ月後の7月1日に再来、再婚直後であったが既に妊娠していた。1998年2月17日に、3,632gの男児を分娩。更に2年後、1999年2月14日には、円錐切除後2回目の妊娠7~8週で自然流産。その後7月2日からの月経を最後に、3回目の妊娠をし、4月21日に3,426gの女児を分娩した。更にその後円錐切除から5年後の2002年2月14日にやはり妊娠7週間前後で自然流産した。

症例 2 R.T.: 35 歳: 初診時 G-2, P-1

9月1日外陰搔痒を主訴に近産婦人科を受診、Candida 陰炎と診断されたが同時に行った子宮頸部擦過細胞診で PAP IIIb, 9月30日産科医大産婦人科を紹介受診し、細胞診 PAP III, Colposcopy および生検で高度異型性と診断された。11月1日子宮頸部円錐切除 (CKC) して SCC (microinvasive) + AIS と病

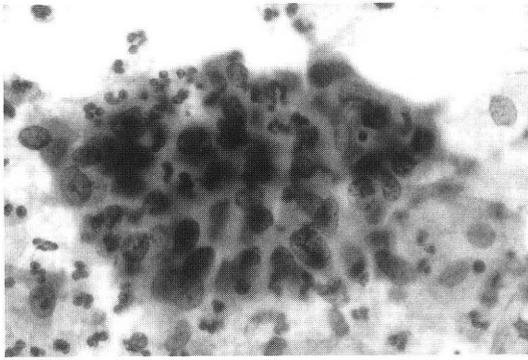


図1 症例3の子宮頸部細胞診 (Papanicolaou 染色、 $\times 200$)
核腫大し核小体の目立つ atypical endocervical cell が見られ, glandular dysplasia か子宮頸部上皮内腺癌が疑われる細胞診所見.

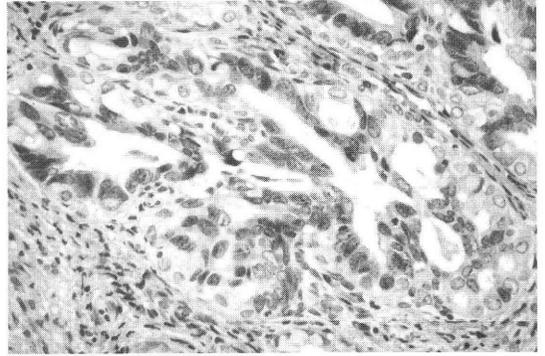


図2 円錐切除標本組織像 (H.E. $\times 100$)
子宮頸部円錐切除標本の組織像, 微小浸潤腺癌, 異型を伴う子宮頸管腺の一部が管腔形成性芽出を伴っている. 中等度分化 (G2) 型と思われる.

理診断された. margin は negative なので円錐切除が治療的と考えられた. 以後, 挙児希望はあるが3年間妊娠には至っていない.

症例3 Y.K.: 30歳: 初診時 G-0, P-0

10月7日, 1年来の月経不順を主訴に愛和病院を受診, 排卵障害の診断で Clomiphene を処方されていた. 初診時の子宮頸部擦過細胞診で atypical endocervical glandular cell が認められ近医 (B 病院) を紹介された. 細胞診所見は, 核腫大し核小体の目立つ atypical endocervical cell が見られ子宮頸部腺癌が疑診された (図1).

コルポスコピ所見は7° 方向に極く薄い白色上皮らしき部分のみも正常所見と判定された. 同部を含む3カ所の Punch Biopsy では多数の異型腺上皮の細胞集塊を認め腺癌の疑いと診断された. その後, 約5カ月患者が来院せず, 3月22日再来時の子宮頸部細胞診の再検査では glandular dysplasia or adenocarcinoma *in situ* (AIS) が疑われたため子宮頸部円錐切除術を行うことが決定した. 術前の腫瘍マーカーは CEA < 0.5 ng/ml, CA125 < 6 U/ml, SCC < 0.8 ng/ml と全て正常であった.

5月18日 cervical cold knife conization と ECC (頸管内膜搔爬) を施行, 切除標本より Carcinoma colli Ia と診断された (図2). 子宮全摘出術 (TAH) を勧めたが患者夫婦は結婚して間がなく挙児希望が強く, 再発のリスクを了解の上, このまま不妊治療を優先して経過観察することとなった.

症例3の不妊治療経過

9月18日に愛和病院不妊外来を挙児希望で受診した. 頸管粘液 0.2 ml ハイエストロテック・スライド* (持田) による尿中総エストロゲンは 20 ng/ml 以下, シュアーステップ LH* (日研化学) による尿 LH 定性検査は陰性. 9月25日の診察で子宮内膜は 13 mm, 左卵巣に 12.4 \times 6.8 mm の黄体様のものが認められたが, 血中プロゲステロンが 0.4 ng/ml で排卵していなかったことが後日判明した. 10月2日 Duphaston* (5 mg) 2錠を5日間で内服後消退出血が起きているので第1度の無月経であったことがわかる.

10月14日 Clomiphene (50 mg) 3錠を5日間で内服させた (再発の危険性を考慮して hMG の量を下げ, Clomiphene を極量以上処方). 10月16日 (Day8) の所見は子宮内膜 10 mm, 卵胞は 11 mm, 9.5 mm, 9 mm, 11 mm, 10 mm \times 2 の6個, 尿のハイエストロテック・スライド*値は $20 \leq E < 40$ ng/ml であった. HMG 日研* を 100 IU 筋肉注射施行 (1回目). 10月18日: HMG 日研* 100 IU 筋肉注射 (2回目). 10月20日 (Day 12) の超音波所見は子宮内膜 15 mm, 卵胞は左: 20, 18, 18 mm, 右: 21, 19, 15 mm. 尿中エストロゲンは 80 ng/ml 以上, シュアーステップ LH* では LH は陰性であった. hCG 5,000 IU 筋肉注射. 注射より 36 時間後の Coitus を指導した. 10月23日の超音波で子宮内膜 16 mm, 腹水が少量ダグラス窩に貯留, 右卵巣は 4.4 cm \times 3.8 cm, 左卵巣: 3.5 \times 3.0 cm で軽度の卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) 前状態と判断した. Duphaston* (5 mg) を 1日 10 mg 7日間で内服させた. 10月30日 (Day22)

の超音波で卵巣の大きさは右：6.7 cm，左：8.13 cm，腹水も増量していた。排卵から 10 日目では OHSS は増強し下腹部痛が認められたが Proge-Depot[®]（持田）を 125 mg 筋肉注射した。2000 年 11 月 6 日の尿中 hCG 定性検査は陽性で妊娠と診断された。排卵後 16 日目では卵巣は左 4×5 cm，右 6.5×4.5 cm。11 月 13 日には胎嚢 (GS) を子宮内に確認，妊娠 5 週 2 日の診断。11 月 20 日には胎児心拍 (FHB) が確認できた。12 月 4 日，CRL は 1.6 cm，妊娠 8 週 2 日。12 月 19 日，妊娠 10 週，CRL：3.4 cm。6 月 15 日から 30 日までは切迫早産で入院した以外は妊娠経過に異常なく，7 月 4 日（妊娠 38 週 1 日）2,504 g の女児を吸引分娩。APGAR スコアは 1 分 8 点，5 分後 9 点であった。第 2 子希望もあり子宮摘出はしていない。（2003 年 1 月 4 日までの follow up で再発はない。）

考 察

1952 年に Helper らが子宮頸部の preinvasive な腺癌病変の概念を最初に記述した¹⁾。

AIS は現在子宮頸部腺癌の前駆的な病変と考えられている²⁻⁴⁾。子宮頸部の扁平上皮内癌と違って，子宮頸部の AIS はその発見，診断，その後の管理法は未確定で議論が分かれている。診断においては腺細胞の異型成がコルボスコピで異型性を示さないことから発見が困難であるが，AIS の約半数が扁平上皮系の上皮内腫瘍を合併しているため，殆どが扁平上皮系の病変から続発的に発見されている。管理法としても，子宮頸部の AIS は歴史的には子宮全摘術が現在まで行われてきた。しかしながら，この上皮内の病変は将来の妊孕性の保持を希望する生殖年齢の婦人に発生することが多いので子宮全摘は受け入れられる option ではない事が多い。このために，臨床家は妊孕性を保持する管理法（円錐切除）か，AIS の根本治療（子宮全摘術）かのジレンマにしばしば陥る。1997 年以降の論文では円錐切除による保存的な治療で経過を見る方針が一般的になりつつあるが（表 2），これを支持する研究は現在までのところ少ない。そして子宮温存後の安全性について，長期的な予後は，いまだに確定的に安全と言う証拠はないのが実情である⁵⁻⁸⁾。

結論的には，子宮頸部腺癌初期病変（上皮内腺癌と微小浸潤癌）でも，40 歳以下で挙児希望が強く，円錐切除の Margin が陰性で円錐切除が治療的と考えられ，患者が再発の危険性を理解し，精密に follow up を受けられる場合には，子宮を温存し，妊孕性を保持

することが可能と思われる。以下にその根拠について文献的に考察する。

早期の子宮頸部浸潤腺癌の治療は現在まで Radical な外科手術か放射線照射のみであったが，最近ではこのような早期の子宮頸部腺癌にはより侵襲度の小さい治療を模索するようになった⁹⁻¹¹⁾。これは子宮頸部の扁平上皮癌での妊孕性保存手術の経験¹²⁾の延長である。ところで 1947 年に子宮頸部の microinvasive な癌の概念を最初に紹介したのは Mestwerdt¹³⁾である。この後も多くの臨床家は，子宮頸部の微小浸潤扁平上皮癌にのみ microinvasion という言葉を適用し，腺上皮原発では適用されないと考えていた。即ち早期子宮頸部腺癌は，あいまいで controversial なものとしか理解されていなかったのである。

1997 年の FIGO 定義では，Stage IA1 は癌組織が扁平上皮癌であろうが腺癌であろうが，基底膜からの invasion が 3 mm 以内で，外側性の広がり方が 7 mm 以内とされた。この定義以来，頸部の AIS や微小浸潤癌の妊孕性を保持する手術後のデータが少しずつ出てくるようになった（表 3）。Stage IA1 ではリンパ系への浸潤や子宮傍結合織への浸潤は稀なので，Schorge らは最近の文献で，5 人の子宮頸部腺癌 Stage IA1 で円錐切除のみで経過をみた場合の予後を報告している¹⁰⁾が経過中に妊娠例はない。しかし彼らのあとの追試報告はここ 2 年ほどは McHale らの報告以外はまだない¹⁴⁾。McHale らは挙児希望の強い 4 人（平均年齢 30.75 歳）の子宮頸部腺癌 Stage IA1 を円錐切除のみで follow up して 3 人が妊娠・出産したと言う。また 20 人（平均年齢 31.65 歳）の AIS の患者でも円錐切除のみで経過を観察し，その後の妊娠についての記載はないが円錐切除断端の病変が陰性だった症例の再発はなかったと言う。表 2, 3 に過去の子宮頸部の AIS および Microinvasive adenocarcinoma の円錐切除後の治療方針についての論文を 18 編ほどまとめた。1996 年までの論文では AIS でも円錐切除した後の残存子宮に病変が残る確率が高いので子宮温存には否定的な論文が多い。しかし 1997 年以降 2002 年までの論文では，円錐切除の Margin が陰性なら，精密に follow up すれば子宮温存して妊孕性を保持可能という論文が多くなっていることが分かる。しかし表 3 の Lee, KR 等の論文によれば¹⁵⁾多くの子宮頸部腺癌は AIS から 5 年ほど経過してから起きるとされているので，最新の AIS 文献の Data は経過観察期間がまだ不足しているとも言える。わが国でも，子宮頸部扁平上皮癌も含めて子宮頸部の

子宮頸部 AIS および microinvasive adenocarcinoma で子宮を保存的に取り扱った場合の過去の報告

表 2 AIS

過去の報告	報告年	症例数	結論
Lea, JS 他	2002 ¹⁹⁾	123	円錐切除時の ECC は残存 AIS の予測に有効(挙児希望がある場合)
Kennedy, AW 他	2002 ²⁰⁾	52	CKC が子宮温存の場合は Better. しかし Margin が Negative でも 10% に AIS の再発.
McHale, MT 他	2001 ¹⁴⁾	42	AIS で円錐切除 Margin が Negative なら患者の再発の教育と説明後子宮温存可能.
Ostor, AG 他	2000 ²¹⁾	100	CKC のみで Margin が Negative ならば AIS は子宮温存後 Follow-up 可能.
Schorge, JO 他	2000 ¹⁰⁾	5	挙児希望が強ければ患者の同意の上で子宮温存可能.
Shin, CH 他	2000 ²²⁾	132	子宮頸部 AIS で Negative Margin で若い婦人なら Cone Biopsy Alone で治療可能
Denehy, TR 他	1997 ²³⁾	42	ECC と Cone Margin で AIS が Negative なら子宮は保存可能.
Kaku, T 他	1997 ²⁴⁾	30	頸部 Early Adenocarcinoma は Stromal Invasion の深さが再発・リンパ節転移と関係大.
Widrich, T 他	1996 ²⁵⁾	46	CKC の方が LLETZ よりも良い. (Large Loop Excising of the Transformation Zone)
Muntz, HG 他	1996 ²⁶⁾	78	Negative Margin で TAH した例の 17%(8%) に AIS の残存. (12 編の論文の Review)
Wolf, JK 他	1996 ⁵⁾	61	Cone Margin が陽性・陰性に拘わらず、子宮内に残存病変が多い.
Poynor, EA 他	1995 ²⁷⁾	28	摘出子宮では Negative Margin で 40% に AIS 残存, Positive Margin で 50% に AIS 残存.
Im, DD 他	1995 ⁷⁾	18	Negative Margin も残存 AIS の確率が高い.
Muntz, HG 他	1992 ²⁸⁾	40	円錐切除で AIS の Margin 陰性なら子宮温存可能(挙児希望が強いなら).

表 3 microinvasive

過去の報告	報告年	症例数	結論
McHale, MT 他	2001 ¹⁴⁾	20	Stage IA1 でも AIS と同様の治療方針で可. (FIGO Stage IA1)
Ostor, AG.	2000 ²⁹⁾	436	436 例中円錐切除のみで経過をみたのは 21 例のみで、再発はなかった.
Lee, KR 他	2000 ¹⁵⁾	40	多くの子宮頸部腺癌は AIS から 5 年ほど経過してなるものが多いと思われる.
Schorge, JO 他	1999 ⁹⁾	21	Stage IA1 は子宮頸部限局なので円錐切除か TAH が治療的になる. (FIGO Stage IA1)

早期癌で挙児希望があれば子宮を温存する方向性は最近、確立しつつあると思われる¹⁶⁾。しかし一般的には子宮頸部腺癌はまだ扁平上皮癌に比べて予後は悪く¹⁴⁾¹⁶⁾わが国でも、子宮温存後の妊娠例の報告は極めて少ない。従って今回、我々の 3 例の子宮頸部腺癌(AIS 2 例、頸部腺癌 Ia 1 例)で円錐切除後に 2 例が妊娠・出産し、経過観察期間中の再発もないという報告は価値が高いものと思われる。円錐切除後の妊娠については、永吉らが¹⁷⁾38 例の初期子宮頸部扁平上皮癌を円錐切除か子宮頸部切斷術のみで follow up した後の妊娠について報告している。38 例中 20 例に挙児希望があり 8 例 (40%) 妊娠し 4 例が分娩、1 例は 29 週で妊娠継続

中、と報告している。

今回の症例報告時に簡単にまとめた、産業医大・及び関連病院の円錐切除のみで観察し挙児希望があったと思われる 41 例 (平均年齢 31.7 歳, 最高 40 歳, 最低 23 歳) では 27.5% が妊娠していた。1985~1986 年の 1 年間の産業医大産婦人科不妊外来¹⁸⁾における不妊患者の妊娠率の 22% よりは高かったが統計的有意差はなかった。これは 41 例が単に円錐切除をただけで、手術後の頸管因子は別にして、特に元々の不妊症例は少なかったことが原因と思われる。しかしながら妊娠 11 例中に、自然流産 2 例, 人工流産 1 例, 早産 1 例があり Schirodakar 手術を受けた例が 4 例あった。妊娠 11

例中に子宮内人工授精 (AIH) によるものが 1 例含まれ、AIH を 3 回まで施行した症例が 41 例中に別に 2 例あるがそれらは妊娠には至っていない、症例数不足で、円錐切除手術自体が不妊の頸管因子や妊娠中の流産の増悪因子になっていたかどうかは検討できなかったが、これらについては更なる検討が必要であろう。円錐切除のみで follow up 中の非妊娠例中に 2 例の再発 (1 例は Dysplasia, もう 1 例は PAP Class IIIb) が認められたが死亡例はなかった。

まとめ

1 子宮頸部腺癌初期病変 (AIS 2 例, 頸部腺癌 Ia 1 例) を円錐切除 (CKC) のみで follow up した 3 症例について報告した。3 例中、元来正常性周期だった 2 例中 1 例は円錐切除術後自然に妊娠した。残る 1 例は無排卵・無月経であったが、Clomiphene + hMG + hCG 排卵誘発後妊娠・出産した。3 例とも円錐切除後 5 年, 3 年, 2 年の経過中に再発は認められていない。

2 1985 年から 2000 年までの 16 年間に産業医科大学産婦人科および関連病院で子宮頸部初期病変を円錐切除された症例 124 例中、挙児希望があり円錐切除のみで follow up された 41 例中 11 例 (27%) が妊娠した。円錐切除後の妊娠 11 例中に子宮内人工受精によるものが 1 例あったが、全体の妊娠率 27% は、円錐切除のみでの経過観察開始時 1 年 (1985~1986 年) の産業医科大学の全不妊症患者の妊娠率 22% よりも高かった。

3 結論的には、子宮頸部腺癌初期病変 (上皮内腺癌と微小浸潤癌) でも、40 歳以下で挙児希望が強く、円錐切除の Margin が陰性で円錐切除が治療的と考えられ、患者が再発の危険性を理解し、精密に follow up を受けられる場合には、子宮を温存し、妊孕性を保持することが可能と思われる。今後症例を重ねて検討する必要がある。

文 献

- 1) Helper TK, Dockerty MB, Randall LM (1952) Primary adenocarcinoma of the cervix. *Am J Obstet Gynecol* 63: 800-808
- 2) Betsill WL, Clark AH (1986) Early endocervical glandular neoplasia I. Histomorphology and Cytomorphology. *Acta Cytol* 30: 115-126
- 3) Christopherson WM, Nealon N, Gray LA (1979) Noninvasive precursor lesions of adenocarcinoma and mixed-adenosquamous carcinoma of the cervix uteri. *Cancer* 44: 975-983

- 4) Kashimura M, Shinohara M, Oikawa K, et al. (1990) An adenocarcinoma *in situ* of the uterine cervix that developed into invasive adenocarcinoma after 5 years. *Gynecol Oncol* 36: 128-133
- 5) Wolf JK, Levenbeck C, Malpia A, et al. (1996) Adenocarcinoma *in situ* of the cervix: significance of cone biopsy margins. *Obstet Gynecol* 88: 82-86
- 6) Hopkins MP, Roberts JA, Schmidt RW (1988) Cervical adenocarcinoma *in situ*. *Obstet Gynecol* 71: 842-844
- 7) Im DD, Duska LR, Rosenshein NB. (1995) Adequacy of conization margins in adenocarcinoma *in situ* of the cervix as a predictor of residual disease. *Gynecol Oncol* 59: 179-182
- 8) Widrich T, Kennedy AW, Myers TM, et al. (1996) Adenocarcinoma *in situ* of the uterine cervix. Management and outcome. *Gynecol Oncol* 61: 304-308
- 9) Schorge JO, Lee KR, Flynn CE, et al. (1999) Stage IA 1 cervical adenocarcinoma. Definition and treatment. *Obstet Gynecol* 93: 219-222
- 10) Schorge JO, Lee KR, Sheets EE, (2000) Prospective management of Stage IA 1 cervical adenocarcinoma by conization alone to preserve fertility; a preliminary report. *Gynecol Oncol* 78: 217-220
- 11) 柏村 正道, 松浦 祐介 (1999) 子宮頸癌治療における Minimally Invasive Surgery. *癌の臨床* 45 (5): 413-418
- 12) Morris M, Mitchell MF, Silva EG, et al. (1993) Cervical conization as definitive therapy for early invasive squamous carcinoma of the cervix. *Gynecol Oncol* 51: 193-196
- 13) Mestwerdt G (1947) Die fruhdiagnose des kolumkarzinoms. *Zentralbl Gynakol* 69: 198-202
- 14) McHale TM, Le TD, Burger et al. (2001) Fertility sparing treatment for *in situ* and early invasive adenocarcinoma of the cervix. *Obstet Gynecol* 98: 726-731
- 15) Lee KR, Flynn CE (2000) Early invasive adenocarcinoma of the cervix. *Cancer* 89 (5): 1048-1055
- 16) 松浦祐介, 柏村正道 (1997) 【婦人科癌治療の最前線】【子宮頸癌治療の最前線】早期子宮頸癌の保存的治療. *癌の臨床* 43 (11): 1205-1211
- 17) 永吉裕三子, 新田 愼, 小山秀樹, 他 (1999) 妊孕性温存治療を行った子宮頸癌症例の予後ならびに妊娠・分娩に関する検討. *日産婦九州連合地方部会雑誌* 43: 53-59
- 18) 吉田耕治, 平野隆博, 大塚治夫, 他 (1986) 不妊外来における診療統計, および不妊患者に対する心理検査とアンケート. *産業医科大学雑誌* 8 (3): 381-390
- 19) Lea JS, Shin CH, Sheets EE, et al. (2002) Endocervical curettage at conization to predict residual cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* 87 (1): 129-132
- 20) Kennedy AW, Biscotti CV (2002) Further study of the management of cervical adenocarcinoma *in situ*. *Gynecol Oncol* 86 (3): 361-364
- 21) Ostor AG, Duncan A, Quinn M, et al. (2000) Adenocar-

- cinoma *in situ* of the uterine cervix : an experience with 100 cases. *Gynecol Oncol* 79 (2) : 207-210
- 22) Shin CH, Schorge JO, Lee KR, et al. (2000) Conservative management of adenocarcinoma *in situ* of the cervix. *Gynecol Oncol* 79 (1) : 6-10
- 23) Denehy TR, Gregori CA, Breen JL (1997) Endocervical curettage, cone margins, and residual adenocarcinoma *in situ* of the cervix. *Obstet Gynecol* 90(1) : 1-6
- 24) Kaku T, Kamura T, Sakai K, et al. (1997) Early adenocarcinoma of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 65 (2) : 281-5
- 25) Widrich T, Kennedy AW, Myers TM, et al. (1996) Adenocarcinoma *in situ* of the uterine cervix : management and outcome. *Gynecol Oncol* 61 (3) : 304-308
- 26) Muntz HG. (1996) Can cervical adenocarcinoma *in situ* be safely managed by conization alone? *Gynecol Oncol* 61 (3) : 301-303
- 27) Poynor EA, Barakat RR, Hoskins WJ (1995) Management and follow-up of patients with adenocarcinoma *in situ* of the uterine cervix. *Gynecol Oncol* 57 : 158-164
- 28) Muntz HG, Bell DA, Lage JM, et al. (1992) : Adenocarcinoma *in situ* of the uterine cervix. *Obstet Gynecol* 80 (6) : 935-939
- 29) Ostor AG (2000) Early invasive adenocarcinoma of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 19 (1) : 29-38 Review

(受付 : 2002 年 10 月 8 日)

(受理 : 2003 年 2 月 28 日)

Follow up Study in 3 Patients with Early Cervical Adenocarcinoma After Conization Alone —Can They Become Pregnant After Conization ?—

Kohji Yoshida, Atsuya Kurahashi, Yusuke Matsuura, Meikan Seki, Masamichi Kashimura,
Kenji Uehira¹⁾, Yunosuke Koyama¹⁾ and Hidenori Yoshitake¹⁾

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Occupational and
Environmental Health, School of Medicine, Kitakyushu 807-8555, Japan

¹⁾Department of Obstetrics and Gynecology, AIWA Maternity Hospital and
KOGA Central Hospital, Koga-City, Fukuoka 811-3101, Japan

Three patients with early stage cervical adenocarcinoma (2 AIS and one Stage Ia cervical adenocarcinoma) were observed after conization (CKC).

Of the three patients, two had normal menstrual cycles, while the other was anovulatory and amenorrheic.

One of the patients with normal menstrual cycles became pregnant spontaneously after conization. The anovulatory patient also became pregnant after induction of ovulation with Clomiphene + hMG + hCG.

She delivered a healthy baby. No recurrence was observed after 5, 3, and 2 years from their times of conizations, respectively.

At our Department and at our affiliated hospital, forty-one of the 124 cases with conization, still had a desire to have a baby after conization. Of these 41 patients, including the previous 3 patients, 11 (27%) became pregnant. Amongst the 11 pregnancies, 2 resulted in early miscarriages, another resulted in a D & C procedure and one resulted in a premature delivery at 35 weeks. Four patients had cervical cerclage operations during pregnancy.

In non-pregnant patients, 2 had recurrences of dysplasia and PAP Class IIIb, however, none of the patients died. One case became pregnant by intra-uterine insemination.

The pregnancy rate of 27% was slightly higher than that observed among infertile patients in the year of 1985 (22%), but there was no statistical significance (χ -square test) between them. In conclusion, although statistically there would be a risk, the patients with early stage cervical adenocarcinoma could become pregnant and deliver a baby after therapeutic cervical conization.

Key words : cervical adenocarcinoma, conization, fertility sparing, induction of ovulation

(Jpn J Fertil Steril 48 : 61-67 2003)

地方部会講演抄録

第 39 回 日本不妊学会中国四国地方部会

日時：平成 14 年 8 月 31 日（土）

場所：ビッグハート出雲（出雲市）

特別講演

クローン技術の有効利用

—家畜の改良から希少種、絶滅種の恢復、遺伝子工
学から医療まで—

○入谷 明（近畿大生物理工）

体細胞核移植による大型哺乳動物におけるクローン生産技術は、将来はかり知れないような効果的な利用の可能性を秘めているが、一番のネックは、いまだ生産効率の低いことである。はじめに、この技術の発展の歴史的背景について概要を述べ、つぎに体細胞クローン動物の生産効率がかなり改善されることを条件にして有効利用の可能な項目について述べる。(1) クローン技術発展の歴史的背景 約 22 年前、Willadsen は、ヒツジの 2 細胞期胚の割球分離により双子生産、以後 1 卵生 3~5 つ子のヒツジやウシの生産に成功している。ついで 1986 年には、より実用的な目的で筆者らの研究室で、ウシの胚盤胞期胚の微量金属刃による 2 分断による双子生産に成功し、比較的広く実施された。ついで 1989 年には、Smith & Wilmut によりヒツジの 16 細胞期胚の割球の核移植による産子の生産により所謂、受精卵クローンの基礎ができた。以後、世界各国のうち、とくに我が国で活発にこの技術の実用化が進み、現在までに約 600 頭が生産された。1996 年 Wilmut らによる体細胞クローンヒツジ、ドリーの生産に続いてアメリカ、日本で相次いで体細胞クローンウシの誕生、さらにマウス、ヤギ、ブタ、最近ではクローンネコやクローンウサギの生産も報告されている。(2) 体細胞クローン技術の有効利用 1) 家畜の改良増殖への応用 アメリカでは特に泌乳量の優れた (20,000Kg/年) 40 頭ものいわゆるスーパーカウ群がクローニングにより作られ、乳汁生産が始まろうとしている。また、鹿児島県でも肉牛のクローン 4 頭について、肉質の相似性や肉質の伝達などの検討がなされている。大分県では、遺伝形質の極めて優れた種雄牛の老齢化に伴って 2 頭の後継コピー牛が生産され、すで

に、その精液で人工授精され、妊娠出産している。2) 希少動物の増数や絶滅種の復活 例えばイリオモテヤマネコのように頭数が激減している種での体細胞クローン技術を利用した増数が期待される。また、鳥類でのクローニングが可能になれば、ヤンバルクイナのコピーも見ることができよう。しかし、少数の基本動物から増数すると遺伝子に多様性がなく、自然に返してもその後の自然繁殖は期待できない。また、マンモスのような絶滅種の復活については、その種の体細胞核の DNA の保存状態が鍵になる。また DNA がよく保存されていたとして、現在の核移植技術では核を受け入れる卵細胞質が必要である。近縁種の卵細胞を使った例として、野生牛ガウルの細胞核を家畜ウシの卵細胞に移植して子を産出した報告がある。3) 中、大型動物での遺伝子組み換えへの応用 ウシ等の大型家畜で慣行の前核注入法で遺伝子組み換え動物を作ろうとすると 1 頭生産するのに数千万円もかかる。体細胞クローン技術を使った場合の例では、目的遺伝子をマーカーと共に移植用体細胞培養液に添加して、遺伝子の組み込まれた細胞のみを選んで核移植すれば、産子はすべて組み換え動物になっており、クローニングの生産効率の低さを差し引いても、経費は従来の前核注入法にくらべて 50% も軽減できる。4) 再生医療への応用 マウスに始まって、霊長類やヒトの胚性幹細胞 (ES 細胞) 株の樹立が進展し、その全能性を利用した種々の細胞、組織さらに将来的には、器官まで誘導し、移植医療への利用が期待されている。さらに臓器移植免疫上の難題である拒絶反応の克服手段として、患者自身の体細胞核移植由来の ES 細胞から本人の細胞や組織を再生するなどの利用方向が示されている。

シンポジウム

S1. 精漿および頸管粘液中のサイトカインプロフィールと炎症所見

○前川正彦、山本哲史、中島文子

苛原 稔（徳島大産婦）

鎌田正晴（健康保険鳴門病院産婦）

【目的】精漿および頸管粘液中には種々のサイトカインが存在しており、その生理的・病因的意義が検討されているが、個々の症例のサイトカインプロフィール

を見た報告は少ない。本研究では顆粒球エラスターゼ (elastase) を炎症の指標として、精漿あるいは頸管粘液中サイトカインプロファイルについて検討を加えた。【方法】同意を得た不妊カップルのうち男性 90 名からの精液は、一般検査後、遠心・分離した。また排卵期の女性 35 名から採取した頸管粘液はリン酸緩衝液で 10 倍に希釈した。サンプル中の IL-1 α 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ 、G-CSF、M-CSF および elastase は ELISA 法で測定した。【成績】①精漿を精液所見で分類すると、膿精液症群 (elastase \geq 1,000 ng/ml) の IL-8、TNF- α 、IL-1 α および G-CSF は正常群に比べてそれぞれ有意に増加していたが、elastase と最も強い正の相関関係を示したのは IL-8 であった ($r = 0.614, p < 0.0001$)。②精漿中の IL-8 と IL-1 α および G-CSF との間にはそれぞれ正の相関が認められたが、これらは精子パラメーターに影響を与えなかった。③頸管粘液中の elastase は M-CSF ($r = 0.752, p < 0.0001$) を最も強い正の相関関係を認めたが、IL-8 は相関関係を認めず、G-CSF とは負の相関関係を認めた。【結論】精漿および頸管粘液中で検出されたサイトカインのうち精漿では IL-8 が、頸管粘液中では M-CSF が炎症所見の指標として有用であった。

S2. 子宮内膜症細胞における TNF α の IL-8 産生調節機序

○坂本靖子, 堀江さや子, 井庭裕美子

谷口文紀, 吉田壮一, 岩部富夫

原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

【目的】子宮内膜症患者腹水中には高濃度の TNF α と IL-8 が存在すること、TNF α は IL-8 産生を誘導して子宮内膜症細胞の増殖を促進することを報告した。TNF α の作用は、転写因子 NF- κ B の活性化を介することが知られている。本研究では、子宮内膜症細胞における TNF α による IL-8 産生誘導への NF- κ B の関与について検討した。【方法】患者 14 例の同意のもと、手術時に採取した卵巣チョコレート嚢胞壁から内膜症間質細胞を分離培養した。TNF α (0.1 ng/ml) の存在下に IL-8 の遺伝子と蛋白発現を Northern blotting と ELISA で検討した。リン酸化 I κ B (p-I κ B) 発現および NF- κ B 活性をそれぞれ Western blotting と EMSA で検索した。NF- κ B inhibitor である TPCK の IL-8 発現に及ぼす影響についても検討した。【成績】TNF α 添加は、IL-8 遺伝子発現と蛋白産生を誘導した。TNF α 添加により p-I κ B が誘導され、NF- κ B が活性化され

た。TPCK は TNF α による IL-8 遺伝子および蛋白発現を抑制した。【結論】子宮内膜症間質細胞において、TNF α は NF- κ B を活性化して IL-8 産生を促すことが明らかとなった。

S3. 子宮内膜症の病態と診断に関わる免疫担当細胞表面抗原の解析

○泉谷知明, 楠目智章, 前田長正

深谷孝夫

(高知医大産婦)

【目的】内膜症婦人の末梢血・腹腔内の免疫担当細胞の表面抗原発現を測定し、内膜症診断に寄与する項目を解析した。【方法】腹腔鏡下手術を施行した内膜症 70 例、非内膜症 80 例を対象とした。同意のもとに得た末梢血と腹水を用いて、T 細胞 (CD3, CD4, CD8), B 細胞 (CD19), NK 細胞 (CD16, CD57), 抑制性 NK receptor (KIR2DL1, KIR2DL2, CD94), macrophage 機能分子 (HLA-DR, ICAM-1, CD14, CD69) の発現を flow cytometry で測定した。以上の結果について、①重回帰分析、②決定木 (data mining) を用いて内膜症診断に寄与する項目を解析した。【成績】重回帰分析では、末梢血中の「KIR2DL1+NK」($p = .03$) と、「HLA-DR 発現比」(腹腔内 macrophage の HLA-DR 発現量を末梢血のそれと除した値) ($p = .0003$) が内膜症診断に適合した。決定木でも同じ項目が抽出され、KIR2DL1+NK が 8.3% 以上の場合 85.2%, KIR2DL1+NK が 8.3% 未満の場合には、HLA-DR 発現比が 0.8 以下のとき 72.3% で内膜症と診断可能であった。【結語】内膜症の病態に KIR2DL1+NK の増加 (NK 細胞障害低下) と、HLA-DR 発現比の低下 (macrophage の抗原呈示能低下) が深く関わっていることが示され、この項目による内膜症診断は臨床的に有用と考えられた。

S4. ヒト子宮内膜におけるプロスタグランジン合成系に対するホルモンおよび type I interferon の影響

○尾崎智哉, 高橋健太郎, 栗岡裕子

宮崎康二

(鳥根医大産婦)

反芻動物では interferon (IFN)-tau が胚より産生され、子宮内膜における prostaglandin (PG) 産生を調整し、受精卵の着床を促進するとされている。ヒト子宮内膜における PG 合成系、性ステロイドホルモン、IFN との関連については不明な点が多い。今回、ヒト子宮内膜における IFN receptor の動態、PG 合成系の性ステロイドホルモンに対する変化および IFN の影響に

ついて検討を行った。〈方法〉1) 子宮内膜病変以外の婦人科的適応により子宮全摘術を施行された、正常月経周期を有する非妊娠患者 37 名より採取した子宮内膜を対象とし、type I IFN receptor (IFNAR) m-RNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて、組織局在は免疫組織化学染色により検討した。また、oxytocin (Oxy) 刺激時活性化される MAP kinase の動態をゲル内リン酸化法にて検討した。2) ヒト子宮内膜腺細胞のモデルとして、Ishikawa cell を用い、IFNAR、PGF synthase (PGFS) および cyclooxygenase-2 (COX2) の m-RNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて、蛋白発現を Western blot 法にて検討した。〈結果〉1) IFNAR 発現は免疫組織学的検討では主に腺上皮細胞で発現が認められ、増殖期に弱く、分泌前期から中期にかけて増強していた。また、子宮内膜 MAP kinase は分泌中期から後期にかけてその活性が増加していた。2) Ishikawa cell には IFNAR、PGFS、COX2 の発現が認められ、IFNAR は progesterone 添加で発現が増強した。また、PGFS、COX2 の発現は Oxy 添加で増強したが、この発現の増強は IFN α の添加により抑制された。〈結論〉ヒト子宮内膜において、Oxy は局所における PG 産生を促進し、IFN はこの Oxy による PG 合成促進作用を調整する事により、着床機構に関与している可能性が示された。

一般演題

1. 胸・腹水濾過濃縮液再静注法が奏効した重症卵巣過剰刺激症候群の 1 症例

○栗岡裕子，高橋健太郎，尾崎智哉

上田敏子，宮崎康二 (島根医大産婦)

症例は 31 歳，26 歳時より甲状腺機能低下症，27 歳時に左チョコレート嚢腫のため，嚢腫摘出術の既往を有する原発性不妊症患者。精子無力症のため体外受精・胚移植を施行した。初回はロングプロトコル法で月経 3～5 日目までフェルティノーム P 300IU，月経 6～9 日目までヒュメゴン 150IU を投与した。hCG 投与直前 E₂ は 1389pg/ml で平均径 12 mm 以上の卵胞数は 9 個であった。8 個の卵を回収，5 個の受精卵を得て 3 個胚移植した。黄体維持はプロゲステロン 50 mg 隔日投与で行ったが，胚移植後 4 日目に卵巣腫大(右 6.5 cm，左 6.0 cm) と血液濃縮を認めたため入院。輸液，安静療法のみで軽快した。この周期で妊娠には至らなかったため，2 回目の治療もロングプロトコル法で月経 7～9 日目までフェルティノーム P を 225IU に減量し，

月経 10 日～14 日目までヒュメゴン 150IU を投与した。hCG 投与 2 日前 E₂ は 1011pg/ml で平均径 12 mm 以上の卵胞数は 9 個であった。13 個の卵を回収 5 個の受精卵を得て，3 個胚移植した。黄体維持としてプロゲステロン 50 mg 隔日投与を 3 回，hCG 1000IU を 1 回行ったところ，卵巣腫大(右 6.5 cm，左 9.0 cm) と血液濃縮，著明な腹水を認め，胚移植後 8 日目から入院加療とした。アルブミン補給，低容量ドーパミン，アスピリン療法を行ったが胸水を認め呼吸困難の症状が悪化したため，胚移植後 14 日目に胸腹水濾過濃縮再静注法を施行した。腹水 2600 ml，胸水 1300 ml を吸引し 800 ml に濃縮し再静注を施行した。その後妊娠が判明。卵巣腫大は続いたが全身状態の改善が認められ退院し，現在妊娠 9 カ月で経過順調である。本症例は胸水貯留が主症状となった稀な症例であるが，胸・腹水濾過濃縮液再静注法が奏効し OHSS の早急な改善が可能であった。

2. マウス受精卵の活性化および前核形成における Cdc25C の関与

○森出直子，桑原 章，田中 優

堤ゆかり，檜尾健二，苛原 稔

(徳島大産婦)

山野修司

(徳島大保健学)

(目的) マウス卵の受精過程では M-phase promoting factor (MPF) 活性ならびに mitogen-activated protein (MAP) kinase 活性が低下する。本実験では，MPF 活性をコントロールする Cdc25C がマウスの受精過程に関与しているか否か検討した。(方法)(1) 6～9 週齢の雌マウスから採取した成熟卵を，10 週齢の雄マウスより採取した精子で媒精し，TYH 培養液中で培養した。①媒精 1, 2, 3, 4, 5, および 7 時間後に各々受精卵 10 個を用い，MPF 活性，MAP kinase 活性を測定した。②媒精 3, 5, および 7 時間後に各々受精卵 100 個を用い，Cdc25C のリン酸化をウエスタンブロットにて検討した。(2)(1) と同様にして体外受精を行い，媒精後オカダ酸を添加した TYH 中で培養し，MPF 活性，MAP kinase 活性および Cdc25C のリン酸化を検討した。(成績)(1) マウス受精卵の前核の形成はオカダ酸の添加により有意に抑制された(p<0.001)。(2) マウス受精卵は媒精後 3 時間で MPF 活性が，媒精後 4 時間で MAP kinase 活性が低下するが，オカダ酸添加培養液中では MPF 活性，MAP kinase 活性の低下は軽度だった。(3) オカダ酸の添加により Cdc25C の脱リン酸

化は阻止された。(結果) マウスの受精には Cdc25C が関与する。

3. 妊娠中に Gn-RH agonist を使用した症例の検討 (IVF long protocol に於いて)

○小林正幸, 伊藤 淳, 平林 啓

平川 修, 伊東武久 (徳山中央病院産婦)

要旨: 現在 IVF-ET に於ける卵巣刺激法は Gn-RH agonist を用いた long protocol で行われることが一般的である。しかし Gn-RH agonist 使用開始時に妊娠の否定をすることは困難であり, 妊娠成立時に Gn-RH agonist を使用してしまうことがある。今回我々はそのような症例を 3 例経験したので, その予後について検討し, 妊娠維持機構について考察した。症例は 28 歳, 36 歳, 41 歳の 3 人の体外受精予定の患者であり, いずれも黄体期中期より Gn-RH agonist を使用した。妊娠が判明するまで Gn-RH agonist を使用し, 妊娠判明時の週数は 5w4d, 5w5d, 4w4d であった。妊娠判明時より Gn-RH agonist 中止しホルモン補充, hCG 投与を行った。その結果すべての症例で妊娠継続可能であり, 2 例は正常経産分娩し, 1 例は妊娠経過中である。児に奇形などは認めていない。妊娠判明時の LH は低値であった。排卵後に脳下垂体が抑制されている状態ならば黄体機能不全を来たし着床障害の原因となりうると思われるが, 妊娠成立し胎児側より hCG が産生させるとそれにより黄体機能は賦活され妊娠は維持されると考えられる。long protocol では投与当初は flare up の作用があるため, この時期の投与は流産の原因とはならないのではないかと推測した。

4. ガラス化保存法を用いた臨床成績

○坂井和貴, 浜野見浩, 中沢留美

中川育子, 松山毅彦

(香川・厚仁病院産婦)

桑山正成, 加藤 修

(加藤レディスクリニック)

(目的) 近年, ガラス化法による胚の凍結保存法の臨床成績が報告されている。当院においても cryotop (北里サプライ) を用いた MVC 法にて胚のガラス化保存の臨床応用を開始したのでその有用性について検討した。(方法) 2001 年 8 月~2002 年 4 月の IVF 周期 (ICSI を含む) で患者同意のもとに患者由来の前核期胚, 分割期胚および胚盤胞を MVC 法にてガラス化保存し, 融解胚はホルモン補充法にて胚移植を行った。胚を 10~

15 分平衡後ガラス化液へ投入し, cryotop 先端に最小量のガラス化液とともに載せ直接液体窒素中に投入することで凍結した。平衡液には, 7.5%EG+7.5% DMSO, ガラス化液には 15%EG+15%DMSO+0.5M ショ糖を含む TCM199 を用いた。融解及び希釈にはそれぞれ 1M, 0.5M ショ糖添加 TCM199 を用い, 希釈後 2 回の洗浄を行った。融解後の培養は Quinn's Advantage medium を用いた。(結果) 融解後の生存率は 98.6% (68/69), 分割率は 93.5% (58/62) であった。移植周期数に対する妊娠率は 45.8% (11/24) であった。(結論) ガラス化凍結保存法を用いて融解後, 高い生存率や分割率, 良好な妊娠率を得ることができた。さらに本法はプログラムフリーザーなどの大きな初期投資が必要なく, 従来の方法に比べ簡便で処理時間が短いことから高い臨床的有用性が示された。

5. 多嚢胞性卵巣症候群に対する腹腔鏡下多嚢胞卵巣焼灼術の検討

○吉野直樹, 松岡さおり, 有行泰秀

森山政司, 長谷川明広, 岩成 治

(鳥根県立中央病院産婦)

PCOS (多嚢胞性卵巣症候群) の診断基準は, I. 臨床症状: ①. 月経異常 (無月経, 希発月経, 無排卵周期症など), 2. 男性化 (多毛, にきび, 低音声, 陰核肥大), 3. 肥満, 4. 不妊, II. 内分泌検査所見: ①. LH の基礎分泌値高値, FSH は正常範囲, 2. LHRH 負荷試験に対する, LH は過剰反応, FSH はほぼ正常範囲, 3. エストロン/エストラジオール比の高値, 4. 血中テストステロンまたはアンドロステンジオンの高値, III. 卵巣所見: ①. 超音波断層検査で多数の卵胞の嚢胞状変化が認められる, 2. 内診または超音波断層検査で卵巣の腫大が認められる, 3. 開腹または腹腔鏡で卵巣の白膜肥厚や表面隆起が認められる, 4. 組織検査で内夾膜細胞層の肥厚・増殖, および間質細胞の増生が認められる」と決められている。この診断基準に当てはまり, 1997 年 4 月から 2002 年 2 月までに鳥根県立中央病院産婦人科にて腹腔鏡下多嚢胞卵巣焼灼術を施行した PCOS 12 例を研究対象とした。原発性不妊症 10 例, 続発性不妊症 2 名である。腹腔鏡下多嚢胞卵巣焼灼術前の治療では, フェルチノーム+hCG 療法, hMG+hCG 療法にて 4 例の卵巣過剰刺激症候群 (Ht>45) を認めた。腹腔鏡下多嚢胞卵巣焼灼術では, 腹腔鏡下にモノポーラーの電気メスを用いて, 約 40W にて焼灼した。片側卵巣について 70~80 カ所焼灼した。生食にて

腹腔内を洗浄し、出血のないことを確認してからインターシードを使用し手術を終了とした。観察期間の十分な 12 症例中 11 例で妊娠し、残り 1 例でも単一卵胞の排卵が認められた。妊娠症例ではいずれも単胎妊娠であり、現時点で新生児、超音波上の胎児に異常は認められていない。PCOS (多嚢胞性卵巣症候群) に対して、腹腔鏡下多嚢胞卵巣焼灼術は有効な治療法となりうると考えられた。

6. IVF-ET 後に子宮内外同時妊娠を来し腹腔鏡下手術が奏功した 1 例

○吉本 勲, 横田美幸, 片山博子
渡部弘志, 草薙康城, 越智 博
伊藤昌春 (愛媛大産婦)

【緒言】子宮内外同時妊娠の自然発生率は、従来 0.003% と報告されていたが、生殖補助技術の導入により発生率が上昇することが指摘されている。今回、IVF-ET 後に子宮内と右卵管膨大部に子宮内外同時妊娠を来したが、腹腔鏡下卵管切除術後に子宮内妊娠は継続し、妊娠 37 週で正期産児を得た症例を経験したので報告する。【症例】32 歳、主婦、2 回経妊 1 回経産。卵管性不妊のため、平成 9 年より IVF-ET 開始。平成 9 年 12 月 25 日、妊娠 5 週にて稽留流産。平成 10 年 12 月 29 日、妊娠 39 週 5 日、2952 g、男児を経産分娩。弛緩出血、胎盤遺残のため分娩時出血量 1100 g と増加、濃厚赤血球 2 単位輸血した。平成 13 年 1 月 17 日、胚移植後妊娠し、2 月 5 日子宮内に胎嚢を確認した。2 月 6 日下腹部痛、性器出血あり当科受診。超音波断層法で両側付属器腫大を認め、子宮外妊娠を疑い入院。腹腔鏡下手術を施行した。右卵管妊娠、左卵管留血腫と診断、両側卵管切除術を施行、手術時間 140 分、腹腔内出血量 500 ml であった。術後、子宮内妊娠は継続し、妊娠 37 週 2 日、選択的帝王切開術で 2992 g、女児を分娩した。【結語】IVF-ET 後に子宮内と右卵管膨大部に子宮内外同時妊娠を来した症例を経験した。従来は開腹し卵管切除術が一般的な治療であったが、腹腔鏡で確定診断後、卵管切除術を施行、子宮内妊娠は継続可能で正期産児を得ることができた。

7. 原因不明不妊症における腹腔鏡手術の治療効果の臨床的検討

○田中 優, 桑原 章, 堤ゆかり
檜尾健二, 松崎利也, 前川正彦
安井敏之, 山野修司, 苛原 稔

(徳島大産婦)

【目的】過排卵誘発治療を行っても妊娠が成立しない原因不明不妊症例に対する診断的腹腔鏡手術の術中所見と術後の臨床結果を検討した。【方法】当科で過去 3 年間に初期治療で妊娠が成立しないため診断的腹腔鏡手術を施行した原因不明不妊 50 症例 (年齢 31.5 ± 3.7 歳 (平均 \pm 標準偏差), 平均不妊期間 32.8 ± 20.2 月) を対象とした。すべての症例は当院初診後、子宮卵管造影、精液検査、月経周期に応じた内分泌検査を含む初期スクリーニングにて軽度の卵管通過性異常以外には異常が認められず FSH 製剤による過排卵誘発 (11.2 ± 6.3 周期) を行ったものの妊娠が成立しないため腹腔鏡検査の適応となった。腹腔鏡手術中には大量通水装置を用いて生理食塩水による大量通水と十分な腹腔内洗浄を施行した。術中に異常が認められた症例には腹腔鏡下に癒着を剝離し卵管通過性を確認した。なお、腹腔鏡にて異常が検出されなかった症例を含む全例に術後に過排卵誘発治療を行いその後の臨床経過を検討した。【結果】腹腔鏡にて異常を認めなかった症例は 37 症例 (術後脱落例 6) で、術後 17 例 (54.8%) で妊娠が成立した。術後 3 周期以内に妊娠が成立した症例は 10 例 (32.3%) であった。術後 10 周期を越えて妊娠に至った症例は認めなかった。一方、異常が認められた症例は 13 例 (術後脱落例 1) で、術後の妊娠は 3 例 (1 周期目 2 例, 5 周期目 1 例) に成立した。【結論】術前に過排卵誘発治療では妊娠が成立せず腹腔鏡にて原因が発見できない原因不明不妊症においても手術後 10 周期以内に約半数で妊娠が期待できる。また、術中に異常を認めた症例では妊娠率は 25% に止まり、その多くは術後早期に妊娠していた。

8. 汎下垂体機能低下症を呈し、術後自然排卵周期を回復した Rathke cleft cyst の 1 例

○野中貴代, 香月孝史, 原 鐵見
豊福 彩, 大濱紘三
(広島大大学院医歯薬学総合研究科産婦)
有田和徳, 伊藤陽子

(広島大大学院医歯薬学総合研究科脳神経外)

(症例) 患者は 24 歳女性。初経 14 歳。平成 10 年 (20 歳) に突然、無月経となったため近医を受診し、卵巣機能不全の診断で Kaufmann 療法を受けていた。12 年 4 月他院を受診し、第 2 度無月経で、LH、FSH と TSH の基礎値は低下し、LH-RH test は低反応のため下垂体機能低下症を疑われ当科紹介となった。既往歴、

家族歴に特記なし。(検査結果) LH 0.8mIU/ml, FSH 6.6mIU/ml, TSH 0.69mIU/ml, PRL 7.7mIU/ml, E₂ 16pg/ml, LH-RH test では 30 分, 60 分値とも LH<5 mIU/ml, GRF test でも反応性は不良であった。染色体は正常核型 (46, XX) であった。(経過) 頭部 MRI 施行したところ下垂体柄基部に約 6 mm の Rathke cleft cyst (RCC) を認めた。12 年 11 月経鼻的嚢胞内容除去術を施行し, 組織検査にて RCC であることを確認した。術後 LH, FSH の基礎値は正常となり, LH-RH test の反応性も回復したが PCO pattern であった。当初は, クロミットで排卵誘発を行っていたが, 術後 1 年経過した頃より自然排卵を認めるようになり, 現在に至っている。(結論) Rathke cleft cyst のため汎下垂体機能低下症を呈した患者に経鼻的嚢胞内容除去術施行し, 術後, 自然排卵に至るまで回復した 1 症例を経験した。

9. PCOS 患者における HOMA 指数によるインスリン抵抗性の検討

○尾形理江, 松崎利也, 田中 優
三浦尚子, 清川麻知子, 上村浩一
桑原 章, 安井敏之, 苛原 稔

(徳島大産婦)

【目的】多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) の病因としてインスリン抵抗性の関与が注目されており, その評価は病態の解明と共に生活習慣病の予防にも重要である。臨床の場で簡易に行える HOMA 指数の有用性を検討した。【方法】対象は PCOS 群 (n=12, BMI=22.8), および Control 群 (一般不妊患者: n=10, BMI=22.4) で, 正常血糖クランプ法による糖注入率 (GIR) と HOMA 指数でインスリン抵抗性を評価し二法を比較した。また, insulinogenic index からインスリン分泌能を推定した。【結果】GIR と HOMA 指数の相関は PCOS 患者では, $R = -0.74, p < 0.05$, Control 群で $R = -0.91, p < 0.01$ といずれも高い相関を認めた。GIR または HOMA 指数の BMI を共変数とした ANCOVA 分析では, いずれも PCOS 群では Control 群に対して有意にインスリン抵抗性が高かった ($p < 0.05$)。insulinogenic index は両群とも BMI に相関せず, PCOS 群が 1.4 ± 0.4 , Control 群が 1.2 ± 0.6 で, 両群間に有意差はなかった。【結論】月経異常や不妊を主訴として婦人科を受診する PCOS 患者ではインスリン分泌能が保たれているため, HOMA 指数によりインスリン抵抗性を推定することができると思われる。

10. 不育症症例における妊娠初期の子宮動脈血流抵抗値と治療による変化

○佐々木愛子, 中塚幹也, 羽原俊宏
松尾 環, 小西秀樹, 鎌田泰彦
野口聡一, 工藤尚文

(岡山大学院医歯学総合研究科産科・婦人科)

目的: 子宮内循環は妊娠の継続に重要であると考えられ, 子宮血流の不育症への関与を検討した。対象・方法: 妊娠 4~5 週に経陰超音波検査で週数相当の所見を確認でき, 同意の得られた 83 症例 (流産 2 回以下の control 群 55 症例, 流・死産 3 回以上の不育症群 28 例) を対象とした。経陰超音波下に子宮動脈血流抵抗 (Pulsatility Index: PI 値) を測定し, 両側の平均値を算出した。また, 妊娠の継続できた抗リン脂質抗体陽性症例における低用量アスピリンやヘパリン療法施行中の子宮動脈血管抵抗の変化を検討した。成績: 子宮動脈 PI 値は control 群では 2.13 ± 0.58 (mean \pm S.D.), 不育症群では 2.83 ± 0.76 であり, 不育症群において有意に高値であった ($p < 0.0002$)。APTT 延長, 抗核抗体陽性, 抗リン脂質抗体陽性の症例ではそれぞれ正常値の症例に比較して子宮動脈 PI 値が有意に高値であった。抗リン脂質抗体症候群症例では妊娠経過中, 子宮動脈血管抵抗の高値持続や, 低下後の再上昇が見られたが, 低用量アスピリンやヘパリンの使用により低下傾向が見られた。結論: 習慣性流産・不育症症例の中に, 血流抵抗が高く子宮循環の不良である一群があり, この機序には自己免疫的な血管障害が関与していると考えられた。低用量アスピリンやヘパリンの使用により子宮動脈血流は改善する可能性が示唆された。

11. 子宮内膜症婦人腹腔 macrophage の活性化に関する検討

—特に macrophage 機能関連分子の発現について—

○楠目智章, 泉谷知明, 前田長正
深谷孝夫 (高知医大産婦)

【目的】内膜症婦人の腹腔 macrophage (M ϕ) の活性化については, 一定の見解は得られていない。今回, M ϕ 機能関連分子発現を測定し, 内膜症婦人の M ϕ の活性化について検討した。【方法】腹腔鏡下に診断した内膜症 45 例, 非内膜症 42 例を対象とした。同意のもとに得た末梢血と腹水を用い, Flow cytometry にて末梢血単球と腹腔 M ϕ 上の機能関連分子である human leu-

kocyte antigen (HLA)-DR, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, および CD14 の分子発現を測定した。また腹腔 M ϕ 上の分子発現を末梢血単球のそれで除し M ϕ 活性比とした。発現量・M ϕ 活性比・各分子発現の相関を両群間で比較した。【成績】末梢血単球では、3 分子の発現は両群間で有意差を認めなかった。しかし、腹腔 M ϕ 上の 3 分子の発現量・M ϕ 活性比は、内膜症群で有意に低下していた。内膜症群では 3 分子間全てに有意の正相関を認めたが、非内膜症群では ICAM-1 と HLA-DR との間のみ正相関を認めた。

【結論】内膜症群の腹腔 M ϕ 上の 3 分子の協調は、腹腔内における免疫応答を示唆している。しかし、その発現量・活性比が有意に低いことから、腹腔 M ϕ は活性化が低く抗原提示能・貪食能・signal 伝達能が不十分な免疫寛容の状態にあると考えられ、この機能低下が内膜症の病態に関与していることが示唆された。

12. ヒト卵巣細胞および顆粒膜細胞腫由来細胞株における Interleukin-8 (IL-8) の発現誘導

○藤井亜希子, 出浦伊万里, 山内延広

吉田壮一, 谷口文紀, 岩部富夫

原田 省, 寺川直樹 (鳥取大産婦)

〔目的〕IL-8 のヒト卵巣における発現とその発現調節を知ること。〔方法〕患者の同意を得て、体外受精時に卵液と黄体化顆粒膜細胞 (GLC) を、手術時に莢膜細胞と卵巣間質細胞を採取し、九州大学第三内科より供与された KGN 細胞とともに実験に供した。卵液中の IL-8 と IL-1 β 濃度を ELISA で測定した。各細胞における IL-8 とその受容体遺伝子発現を RT-PCR で検索した。GLC と KGN 細胞に性ホルモンやサイトカインを添加して培養上清の IL-8 を ELISA で測定した。IL-8 による間質細胞の細胞増殖能を MTT assay にて評価した。KGN 細胞における I κ B のリン酸化を Western blot 法で、NF- κ B 活性阻害剤 (APDC) が IL-8 産生に及ぼす影響を Northern blot 法で検索した。〔成績〕卵液中の IL-8 濃度と IL-1 β 濃度の間に正の相関を認め、両者は卵液量とも相関した。IL-8 遺伝子はすべての細胞で、IL-8 受容体遺伝子は間質細胞において発現した。IL-1 β の添加は GLC および KGN 細胞の IL-8 産生を濃度依存性に増加させた。IL-8 の添加は間質細胞の増殖を有意に促進した。KGN 細胞において IL-1 β 添加でリン酸化 I κ B の発現が誘導され、APDC の併用添加は IL-1 β による IL-8 産生促進作用を部分的に阻害した。〔結論〕顆粒膜細胞における IL-8 の発現

は、IL-1 β による NF- κ B の活性化によって増加することが示された。排卵期の卵巣に発現する IL-8 は、ケモカイン作用に加えて間質細胞の増殖を促進することで卵胞発育に関与することが示唆された。

13. 女性内性器免疫システムに対するプロスタグランジン E₂ の作用

—サイトカイン産生に及ぼす影響—

○中島文子, 山本哲史, 前川正彦

苛原 稔

(徳島大産婦)

鎌田正晴

(健康保険鳴門病院産婦)

〔目的〕性交後の頸管粘液中の白血球増加は生理的反応であり、余剰精子の除去に関与している。我々はこれまで精漿が好中球の遊走・活性化作用を持つ IL-8, G-CSF の産生を促進することを報告してきた。今回、精漿中の免疫抑制物質としてよく知られているプロスタグランジン E₂ (PGE₂) に注目し、サイトカイン産生能に及ぼす影響について検討した。〔方法〕①同意を得た健常男性 5 例、女性 5 例からのヘパリン加全血 100 μ l と RPMI 1640 900 μ l を混和した (全血希釈液)。これに PGE₂ (最終濃度: 0, 10⁶, 10⁷, 10⁸, 10⁹, 10¹⁰ M) を加えて 37 $^{\circ}$ C で 24 時間培養した。②全血希釈液を LPS (1 μ g/ml) あるいは PHA (10 μ g/ml) で刺激し、さらに各濃度の PGE₂ を加えて培養した。③培養上清中のサイトカイン (IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ , TNF- α , G-CSF) を ELISA 法で測定した。〔成績〕① LPS 刺激下で PGE₂ を添加すると IL-8, IL-10 および G-CSF 産生がさらに有意に増加したが、IL-1 α , IL-6, TNF- α 産生は有意に抑制された。② PHA 刺激下では PGE₂ の添加によって IL-8 は産生が増加したが、IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α 産生が有意に抑制された。〔結論〕PGE₂ には精漿で得られた結果と同様に IL-10, IL-8, G-CSF の産生を刺激する作用を認めた。このことから PGE₂ は精漿のもつ免疫抑制作用だけでなく、性交後の白血球増加反応に拘わる系についても中心的な役割を果たしていると考えられる。

14. 射精後血尿の 1 例

○安本博見, 松原昭郎, 碓井 亜

(広島大大学院医歯薬総合研究科腎泌尿器科)

射精後血尿を主訴とし、内視鏡的治療によって軽快した症例を報告する。【症例】21 歳男性、主訴は射精後血尿。(現病歴) 16 歳頃から年に 2, 3 回無症状性肉眼的血尿を来し精密検査を受けたが原因不明であった。

21歳から射精後に血尿を認め、2001年6月当科を初診した。(理学的所見)腹部理学的所見では左精索静脈瘤 Grade 1を認めた。(検査所見)経直腸の超音波検査、腹部CT、骨盤部MRIのいずれにも異常所見なし。射精後の血尿出現時に施行した尿道膀胱鏡検査で精阜の遠位側、外括約筋部に暗赤色の隆起性病変からの出血を確認した。内腸骨動脈造影では恥骨結合下縁に動脈相後期から実質相にかけて pooling を認め、血管性病変の可能性が示唆された。(治療)後部尿道の血管腫と診断し、小児用切除鏡にて電気凝固を行った。(病理組織検査)尿道移行上皮下に拡張した血管の増殖を認め、海綿状血管腫と診断した。(術後経過)血尿は消失し、1カ月後の尿道膀胱鏡検査では白色の癒痕を認めるのみであった。術後12カ月の時点で再発を認めていない。【考察】後部尿道に発生する血管腫はきわめてまれとされる。治療に際して、再発が危惧される一方、根治性の追求による尿失禁、射精障害といった合併症を避けねばならない。本症例は特記すべき合併症なく、良好な経過であった。【結語】射精後血尿を来した尿道血管腫の1例について報告した。

15. 経皮的精巣内精子採取による TESE-ICSI の治療成績

○今井 伸, 滋野和志, 井川幹夫

(鳥根医大泌尿器)

尾崎智哉, 高橋健太郎, 栗岡裕子

宮崎康二 (鳥根医大産婦)

<目的>近年、無精子症患者に対し、精巣より精子を採取し、顕微授精を行うことにより妊娠することが可能となってきている。精巣内精子回収法 (TESE) として、陰囊に切開を加え精巣組織を採取する方法 (open 法) が普及しているが、生検針を用いたより低侵襲である経皮的採取法の有用性も報告されている。今回、経皮的に採取した精巣内精子を用いた TESE-ICSI の治療成績についてまとめた。<対象と方法>対象は閉塞性無精子症患者 4 例で、計 9 周期の TESE-ICSI を施行した。TESE は採卵と同日に行い、局所麻酔下に 18 gauge core biopsy needle を装着したばね作動式自動生検装置 (Bard Magnum) を用いて 1~3 回精巣組織を採取した。<結果>全例とも採取組織内に運動精子が認められ、血腫や感染などの合併症は 1 例も認めなかった。疼痛はほとんどなく鎮痛剤の併用は不要であった。受精率は平均 69.0% で open 法と比較し有意差は認められなかった。2 例に妊娠が認められ、採卵あ

たりの妊娠率は 22.2% であった。<結論>core biopsy needle を使用した TESE は、低侵襲で手技も容易で反復施行も可能であり、有効な方法であると考えられた。

16. 無精子症患者の臨床的検討

○井口裕樹, 永井 敦, 紙谷章弘

公文裕巳

(岡山大学院医歯学総合研究科泌尿器病態学)

1991年4月より2002年3月までの間に、当院男性不妊外来を受診した患者のうち、無精子症と診断された105例の患者を対象に臨床的検討を行った。無精子症の診断は当院外来での精液検査の結果で行い、詳細な問診、精巣を中心とした理学的所見、各種ホルモン検査を行った。性染色体検査、さらに1997年以後の症例では DAZ 遺伝子欠損の有無の確認を行った。必要な場合には精巣生検を行った。105例のうち、67例が特発性無精子症と考えられ、染色体に異常を認めたものは16例 (47XXY 13例, 46XX 1例, その他の転座 2例) であった。DAZ 遺伝子は 22例で測定し、2例で欠損、1例で転座を認めた。治療は他院への AID 紹介 27例 (妊娠確認 1例), TESE-ICSI 4例 (妊娠確認 1例), 無治療あるいは治療方針未確定が 36例であった。37例が閉塞性無精子症と考えられ、原因を特定しうるものは 15例 (精管結紮術後 6例, そけいヘルニア術後 4例, 精巣上体炎 2例, 先天性精管欠損 1例, ミュラー管嚢胞 1例, 巨大結腸術後 1例) であった。治療は 30例に行い、精管吻合 12例 (術後 8例に精子出現, 妊娠確認 2例), 精管精巣上体管吻合 8例 (術後 2例に精子出現, 妊娠確認 2例), MESA-ICSI 5例 (妊娠確認 1例), TESE-ICSI 4例, 射精管開放術 1例であった。105例のうち AID 以外で妊娠が確認されたのは合計 6例であった。

第 123 回 日本不妊学会関西地方部会

日時：平成 14 年 11 月 30 日 (土) 13:30~

場所：神戸大学医学部「神緑会館」(神戸市)

I-1. Klinefelter syndrome 患者における TESE について

○岡田 弘, 石川智基, 合田上政

土橋正樹, 原 勲, 藤澤正人

守殿貞夫

(神戸大学院器官治療・腎泌尿器)

28 例の Klinefelter syndrome 患者に関して TESE の成績を、1999 年以前の multiple testicular biopsy による conventional TESE 8 例と 1999 年以降の手術用顕微鏡を用いた microdissection TESE 20 例に分けて比較検討した。conventional TESE では 8 例中 1 例で精子が回収された。microdissection TESE では 20 例中 12 例で精子が回収された。microdissection TESE 症例に関して、術前の血中 FSH, LH, T 値、精巣容積、年齢と精子回収の可否を検討すると、年齢が 36 歳未満であること・T 値が 1.2 mg/ml 以上であることが、精子回収成功に対する規定因子であった。

I-2. ハムスター顕微授精胚への抗酸化剤の効果

○川澄みゆり, 加藤博己, 松本和也
佐伯和弘, 細井美彦, 入谷 明

(近畿大大学院生物理工学)

【目的】ハムスターの卵子は、白色光や空気中の酸素の曝露により発生が停止することが知られている。そこで、本実験では、遮光による影響と酸化毒性を緩和する抗酸化剤 (β -mercaptoethanol, (β -ME)) が、ハムスター卵子の ICSI 後の胚発生を改善するかどうかを検討した。【方法】雌ゴールデンハムスターに PMSG 35 IU, hCG 35IU を腹腔内に投与して過剰排卵を誘起し、排卵卵子を採取した。精子は雄ハムスターの精巣上体尾部より採取した。精子注入の際、数回の Piezo Pulse で精子頭部と尾部を分離し、頭部のみを注入した。ICSI 胚は 24 時間まで 5%FBS, 5mM Taurine, 25 μ M EDTA を添加した TCM199 で 24 時間培養した (5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂, 38°C)。実験 1 では遮光の有無で実験区を分け、それぞれの発生率を調べた。なお、遮光区は採卵, ICSI, 共に暗室で赤色光下で行なった。また実験 2 では遮光しない場合の抗酸化剤添加の有無により、発生率を調べた。実験 3 では、遮光した場合、抗酸化剤の ICSI 時における培地への添加の有無、培養時の培地への添加の有無により、発生率を調べた。【結果】実験 1, 遮光しなかった場合の卵割率は 0%, 遮光した場合の卵割率は 58% と大きな差が見られた。実験 2, 遮光しなかった場合の卵割率は、 β -ME を添加した区で 15%, 添加しなかった区で 3% と僅かに差が見られた。実験 3, 遮光した場合の β -ME の有無による卵割率は、実験区 1 で 68%, 実験区 2 で 71%, 実験区 3 で 75%, 実験区 4 で 57% と、4 つの実験区で差が見られなかった。【結論】遮光により、ICSI 後のハムスター胚発生が大きく改善されたことから、ハムスターの卵子は

光感受性が高いと考えられる。また、本実験で使用した抗酸化剤 (β -ME) の酸化毒性に対する効果は、少なくとも第一卵割までは見られなかった。今後、他の抗酸化剤の効果について検討するとともに、第一卵割だけではなく、その後の発生段階における抗酸化剤の影響も検討していきたい。

I-3. 卵胞液中 inhibin 濃度と、卵成熟、受精能および卵胞液中ステロイドホルモン濃度との関係

○望月 恵, 大森伸哉, 丸尾 猛

(神戸大大学院成育医学・女性医学)

山辺晋吾 (国立神戸病院産婦)

益子和久 (益子産婦)

【目的】inhibin B は卵胞期前期に発育卵胞で産生され、inhibin A は卵胞期後期に主席卵胞で産生される。しかし、inhibin の卵巣での役割は未だ十分に明らかにされていない。そこで我々は卵胞局所での inhibin の役割を明らかにすることを目的として、卵胞液中 inhibin 濃度と卵の成熟度、受精能および卵胞液中ステロイドホルモン濃度との関係につき検討した。【方法】long protocol 法で卵巣刺激を行った卵管不妊 IVF 患者 11 例を対象とし、採卵時の卵胞液を患者の同意を得て採取した。卵胞液中 inhibin A, inhibin B 濃度は sandwich ELISA 法で、卵胞液中 estradiol, progesterone, testosterone 値は RIA 法で測定した。【成績】採取した卵の成熟度が低い卵胞液中 inhibin A 濃度 (25.1 ± 6.4 ng/ml) (mean \pm SD) と成熟卵であった卵胞液中 inhibin A 濃度 (27.8 ± 7.2) の間には有意の差を認めず、また、採取した卵が受精した卵胞液中 inhibin A 濃度 (27.8 ± 7.4) と受精しなかった卵の卵胞液中 inhibin A 濃度 (25.4 ± 6.7) の間にも差を認めなかった。一方、採取した卵の成熟度が低い卵胞液中 inhibin B 濃度 (108.0 ± 23.4 ng/ml) は、成熟卵であった卵胞液中 inhibin B 濃度 (72.6 ± 20.1) に比べ有意に高く ($p < 0.001$)、また、受精しなかった卵の卵胞液中 inhibin B 濃度 (101.6 ± 29.5) は受精した卵の卵胞液中 inhibin B 濃度 (25.4 ± 6.7) に比べ有意に高かった ($p < 0.001$)。卵胞液中 inhibin A 濃度と卵胞液量は有意な相関を示さなかったが、卵胞液中 inhibin B 濃度は卵胞液量と負の相関を示した。また、卵胞液中 inhibin A 濃度は卵胞液中 progesterone 濃度と正の相関を示したが、卵胞液中 inhibin B 濃度と卵胞液中ステロイドホルモン濃度との間には相関を認めなかった。【結論】inhibin A は顆

粒膜細胞の黄体化を反映し、採卵時の卵成熟、受精能に影響を示さなかった。一方、inhibin B は成熟度の低い卵の卵胞液中で高濃度に認められ、卵の成熟を抑制する働きがある可能性が示唆された。

II-1. 新しい顕微授精のシステム（コンピューター制御のマニピュレーター+ピエゾ+レーザー）の使用経験

○木下慶子，徐 東舜

（徐クリニック不妊センター）

【目的】現在の顕微授精の主流ともいえる ICSI の臨床成績は、施行者の技術に大きく左右されがちである。そこで我々はマイクロマニピュレーションの操作技術の熟練を問わずとも安定した成績を取めることを目的とし、コンピューター制御の自動化マイクロマニピュレーター、ピエゾ、レーザーを組み合わせた New System ICSI を開発、施行したので報告する。【方法】自動化マイクロマニピュレーターシステムによりニードル、Plate 移動はマウス操作で実施した。またコンピューターに定点を 4 カ所まで記憶させ、Dish 内 Drop 間の移動を瞬時に行なった。精子は 1.48 μ m の赤外線ダイオードレーザー (0.5mJ) を使用して動きを一時的に停止させ、続いて再度レーザーを低エネルギー (0.25mJ) で精子尾部に照射、もしくはピエゾをあてることで精子不動化を行なった。精子注入時はピエゾシステムを使用し、穿刺時の卵細胞膜吸引作業をせずに行なった。【結果】実施約 1 カ月半の間で実施数 10 に対し、患者平均年齢 35.0 歳、平均採卵数 6 個、採卵あたりの分割率 65.6%、平均移植数 2.7 個、妊娠数 40% (4/10) という結果を取めた。【考察】New System ICSI 施行により 1. コンピューター制御のマニピュレーター使用により、瞬時にニードルや Drop 間の移動することが可能となり、その結果 ICSI 所要時間の短縮が可能となった。2. レーザー及びピエゾを利用することで技術習得に時間を要することなく精子不動化を行なうことが可能となった。3. ピエゾシステムの使用により精子注入時の卵へのダメージが軽減された。【結論】これらのシステムを使用することにより、ICSI 施行者の技術に大きく左右されることなく、安定した臨床成績を取めることが可能と考えられる。

II-2. 当科における不育症に対するヘパリン・アスピリン療法の治療成績

○藤原睦子，後藤 栄，竹林浩一

廣瀬雅哉，野田洋一

（滋賀医大産婦）

抗リン脂質抗体症候群と診断された不育症患者の治療には、従来ステロイドと低用量アスピリンとの併用療法が行われていたが、近年ヘパリンと低用量アスピリンの併用療法が主要な治療となってきた。当科でも 2000 年より抗リン脂質抗体症候群合併不育症に対する治療法として、ヘパリン・アスピリン療法を第一選択としている。抗リン脂質抗体症候群の診断方法としては、まずループスアンチコアグラントと抗カルジオリピン- β 2GPI を測定し、陰性例にはさらに他の抗リン脂質抗体 (抗カルジオリピン IgM, A, 抗フォスファチジルイノシトール抗体, 抗フォスファチジルセリン抗体, 抗フォスファチジルエタノールアミン抗体) の測定を行う。反復して陽性を示すものを抗リン脂質抗体症候群としている。ヘパリン・アスピリン療法は、黄体期よりアスピリン 81 mg/日の内服を開始し、妊娠が確認された時点より入院管理とし、ヘパリン 5000IU/日の持続点滴をおこない、胎児心拍が確認できヘパリン自己注射が可能となった段階で外来通院としている。妊娠 35 週にアスピリンを中止し、分娩時までヘパリン皮下注を続行している。以上の方法を 11 症例 12 周期に施行し 9 例が生児を獲得された。ヘパリン・アスピリン療法の有用性を文献の考察をふまえ検討し報告する。

II-3. 当院におけるレーザーアシステッドハッチングの経験

○大谷徹郎，大谷典子，大谷恭一郎

（大谷産婦）

体外受精の成功には受精卵と子宮内膜との間の複雑な相互作用が重要な役割を果たしていることは論を待たない。受精卵が着床できない原因は複数あると考えられるが、そのすべてが明確になっているわけではない。そうした中で受精卵の Hatching が着床の成立に必須であることは自明である。体外受精に際して胚移植した卵が Hatching しないことは、妊娠不成立の原因の一つであろうと考えられる。Cohen らは 1992 年に透明帯が 15 μ 以上ある受精卵の透明帯を acid tyrode により菲薄化させることにより着床率が向上することを報告致しており、この方法は Assisted Hatching と名付けられた。Assisted Hatching を行うことにより、自力では Hatching できない受精卵が Hatching できるようになるだけでなく、受精卵が早く Hatching する

ので子宮内膜と受精卵の接触を早めることが出来ることも、Assisted Hatching により着床率が向上する理由ではないかと考えられる。卵と内膜の接触が早くなれば implantation window が閉じる前に着床できる確率が高くなると考えられる。Assisted Hatching の方法には Acid tyrode を使う方法以外にも機械的に透明帯を切開する PZD、ピエゾ法や胚全体をプロナーゼにつける方法、レーザーを使う方法などが考案されてきた。当院でもこれまでに Acid tyrode 法やピエゾ法を試みたが、良好な結果を得ることが出来なかった。今回、われわれは受精卵に一切機械的に接触せず、効率的、正確かつ安全に透明帯を菲薄化することができる半導体 Laser による Assisted Hatching を導入し、IVF/ICSI の成績におよぼす影響を検討した。その結果、Laser Assisted Hatching を導入する前の 2001 年 8 月から 2002 年 2 月までの 7 カ月の妊娠率が胚移植周期あたり 46% (31/67) であったのに対し、導入後 7 カ月の妊娠率は 58% (60/103) となり、Laser Assisted Hatching が IVF/ICSI の成績に好影響をおよぼす可能性が示唆された。

特別講演

「子宮内膜症の病態と治療」

○石川睦男 (旭川医大産婦)

〔初めに〕女性の QOL を障害する子宮内膜症は性成熟期によくみられる疾患で、近年増加が指摘されている。しかし、その発生原因ならびに病態については依然不明な点が多い。最近、動物実験などでダイオキシン類

が子宮内膜症の発生に関与しているとの報告が見られる。今回、厚生科学研究により「ダイオキシン類の汚染状況および子宮内膜症等健康に関する研究」を行ったので、その内容を報告する。さらに、日本産科婦人科学会生殖内分泌委員会の子宮内膜症小委員会の臨床成績の一部も報告する。〔成績〕1. 子宮内膜症とダイオキシン濃度：従来、生体内ダイオキシン量測定は検体量も要し、費用も嵩み限定された症例のみの分析しかなされず、矛盾した結果が混乱を招いている現状であった。今回、ダイオキシンと AHR の結合を利用した bioassay 法の CALUX 法を用いて測定した。腹腔鏡で子宮内膜症性病変を確認した群と病変を有しない群において、皮下脂肪のダイオキシン濃度に差を認めなかった。2. ダイオキシン類代謝酵素の遺伝子多型：ダイオキシン代謝酵素、CYP1A1 遺伝子多型を子宮内膜症群と対照群で解析した。その結果、CYP 誘導性の高い遺伝子型が子宮内膜症群により対照群に頻度が高かった。3. 子宮内膜症の臨床成績：腹腔鏡又は開腹により子宮内膜症が確認された 526 例中、腹腔鏡のみ観察例が 51 例、治療が施行されたものが 475 例あった。その中で薬物療法が行われたものは各々 21 例、243 例であった。今回、これらの症例に対し、レトロスペクティブに分析した。(1) 月経痛は重回帰分析で腹膜深部病変と r. AFS スコアの合計と正の相関があった。(2) 妊娠の予後は嚢腫摘出と付属器摘出は負の相関となった。(3) カプランマイヤー解析による累積妊娠率は、薬物療法を施行しない方が良く、薬物療法は妊娠率を有意に低下させた。(4) 月経痛の再発を薬物療法は有意に減少させた。

編 集 後 記

中東や北朝鮮をめぐる国際情勢は緊迫しているものの、会員の皆様におかれましては期待と希望に満ちた2003年をお迎えのことと存じます。本和文誌はいよいよ本年を持ちまして、リプロダクションに関する和文掲載を中心とした半世紀にわたる役割を閉じます。引き続き来年以降は、会員の皆様に役立つ会報誌に移行致しますので、どうかご期待下さい。

創刊以来これまで多くの先生方に支えられ、またわが国における不妊症学の発展に本誌が大きく寄与してまいりましたことは、改めて言うまでもございません。

代わりまして先生方の優れたご業績を、国内にとどめず国際的に認知していただくため、日本受精着床学会や日本アンドロロジー学会とも協調し、すでに Reproductive Medicine and Biology (RMB) 誌が誕生致しました。各学会々員の皆様のご支援をもちまして投稿状況も順調で、また最近では海外の先生方によるご投稿も増えてまいりました。これはわが国の生殖医療の水準が、言葉のハンディを乗り越え、十分に国際的に通用することを象徴するものでございます。

RMB 誌はいよいよ来年、impact factor を取得する構想がございます。つきましては会員の皆様方に、これからも益々のご投稿をお願い致しますとともに、RMB 誌に掲載されました論文を、是非とも国際誌にご引用していただきますよう、よろしくお申し上げます。

なお英文ペーパー作成に関するご相談も可能な範囲内で承りますので、ご意見・ご要望とともに、どうか遠慮なく編集委員会までご連絡下さい。

(編集委員 柴原浩章)

編 集 委 員

	遠 藤 克 (委員長)	
安 部 裕 司	石 川 博 通	押 尾 茂
紫 原 浩 章	田 原 隆 三	玉 舎 輝 彦
永 尾 光 一	新 村 末 雄	藤 原 浩
三 浦 一 陽	横 山 峯 介	

Editorial Board

Tuyoshi ENDO (Editor-in-Chief)

Yuji ABE	Hiromichi ISHIKAWA	Shigeru OSHIO
Hiroaki SHIBAHARA	Ryuzo TAHARA	Teruhiko TAMAYA
Koichi NAGAO	Sueo NIIMURA	Hiroshi FUJIWARA
Kazukiyo MIURA	Minesuke YOKOYAMA	

日本不妊学会雑誌 第48巻第1・2号 編集発行所 社団法人 日本不妊学会

〒102-0083
東京都千代田区麹町5-2 K-WING 3F
(株)MAコンベンションコンサルティング内
TEL: 03-3288-7266
FAX: 03-5275-1192
E-mail: info@jsfs.or.jp
郵便振替 00170-3-93207

印刷・製本 株式会社 杏林舎
〒114-0024
東京都北区西ヶ原3-46-10
TEL: 03-3910-4311
FAX: 03-3949-0230
E-mail: info@kyorin.co.jp

2003年3月25日印刷

2003年4月1日発行

第 48 回日本不妊学会総会および学術講演会
第 21 回日本受精着床学会・学術集会

2003 年 9 月 30 日 (火)～10 月 3 日 (金)

宿泊申込書(申込締切日：2003 年 8 月 31 日)

今回は品川プリンスホテルのみの宿泊受付とさせていただきます。

✕ 品川プリンスホテル宿泊料金 ✕

申込 番号			朝食なし室料 (税込)	朝食つき室料 (税込)
①	本館	シングル	¥10,290	¥11,550
②	別館	シングル	¥12,810	¥13,755
③		ツイン (2名利用)	¥15,225	¥17,640
④	新館	ツイン (1名利用)	¥15,225	¥16,380
⑤		ツイン (2名利用)	¥19,320	¥21,735
⑥	エグゼクティブタワー	ダブル (1名利用)	¥16,275	¥17,850
⑦		ダブル (2名利用)	¥20,790	¥23,100

申込書 FAX 送付先：

宿泊担当事務局：

(株) MA コンベンションコンサルティング内

〒102-0083 東京都千代田区麹町 5-2 K-WING3F

TEL：03-5275-1191 / FAX：03-5275-1192

E-mail：info@macc.jp

フリガナ		フリガナ	
申込者名		ご所属名	
フリガナ			
住所	〒		
電話：	FAX：	申込日：	月 日

宿泊者名(フリガナ)	同室者名(フリガナ)	申込 番号	到着日～ 出発日 (泊数)	金額
			__月__日～ __月__日 (__泊)	¥ _____ × _____ 泊 = ¥ _____
			__月__日～ __月__日 (__泊)	¥ _____ × _____ 泊 = ¥ _____
			__月__日～ __月__日 (__泊)	¥ _____ × _____ 泊 = ¥ _____
合計金額				¥ _____

上記金額を銀行振り込みにて支払います。

銀行振込 __月__日 __銀行__支店より __名義で
振込みました(振込みます)。

振込先：東京三菱銀行 麹町支店 (普) 1294150

口座名義：第 48 回日本不妊学会・第 21 回日本受精着床学会

注) 振込み手数料はお客様負担となります。予めご了承ください。申込書の控えはお持ち下さい。

訂 正

本誌掲載論文「生殖補助医療（ART）における良好胚選別を目的とした前核期評価の新基準」伊藤嘉奈子（東邦大学産婦人科学教室）につきまして下記の通り訂正がございましたので、ご訂正下さいますようお願い申し上げます。

訂正箇所：対象と方法 2行目

「当科において、con.IVF または ICSI を行った 75 症例 78 周期，491 個の胚を対象とした。」



「当科において常法どおり con.IVF または ICSI を行った症例中，十分なインフォームドコンセントを行い，同意が得られた 75 症例 78 周期を対象とし，後方視的に前核期評価を行った。」