



第17回  
**日本IVF学会  
学術集会**

共催:日本臨床エンブリオロジスト学会

2014年9月13日(土)~9月14日(日)

会場:大阪国際会議場

メインテーマ

***「ART beyond」***

**JSAR**  
Japan Society of Assisted Reproduction



# 学術集会抄録集

<b>理事長挨拶</b> (日本IVF学会 理事長 / 森本 義晴) .....	22
<b>学術集会長挨拶</b> (第17回 日本IVF学会 学術集会長 / 福田 愛作) .....	23
<b>Program</b> .....	24
<b>交通のご案内</b> .....	26
<b>ポスター掲載場所</b> .....	27
<b>お知らせ</b> .....	28
<b>e-Question について</b> .....	29

## 会長講演

	座長：生殖バイオロジー東京シンポジウム 代表 / 鈴木 秋悦
ART beyond .....	30
	IVF 大阪クリニック 院長 / 福田 愛作

## 生殖医学講演 I

	座長：近畿大学 生物理工学部 教授 / 細井 美彦
生殖と時間生物学 .....	31
	京都府立医科大学大学院 医学研究科統合生理学 教授 / 八木田 和弘

## 生殖医学講演 II

	座長：山下レディースクリニック 院長 / 山下 正紀
染色体の動態解析 .....	32
	IVFなんばクリニック / 中岡 義晴

## 生殖医療ブレイク・スルー

	座長：木場公園クリニック 院長 / 吉田 淳
ヒト円形精子細胞の臨床応用とその成績向上のための検討 .....	34
	セントマザー産婦人科医院 院長 / 田中 温

## エポックメイキング レクチャー

	座長：クリニックママ 院長 / 古井 憲司
光が働きかける細胞機能 -生命科学・医学とのかかわり- .....	36
	防衛医科大学校 准教授 / 櫛引 俊宏

## 日本臨床エンブリオロジスト学会セッション「卵子凍結」

座長：リプロサポートメディカルリサーチセンター 所長 / 桑山 正成  
山下レディースクリニック 胚培養室長 / 岩山 広

ウシ未成熟卵母細胞におけるガラス化保存の影響 .....	38
帯広畜産大学 原虫病研究センター 特任研究員 / 阿部 靖之	
当院における乳がん患者の卵子凍結の現状 .....	39
加藤レディースクリニック 培養室長 / 内山 一男	
凍結融解卵子を用いた TESE-ICSI の臨床成績 .....	41
京野アートクリニック / 中條 友紀子	

## リジェンド特別講演

座長：近畿大学 理事 / 入谷 明

The dawn and future of IVF .....	43
University of Hawaii Medical School, HI, USA / Ryuzo Yanagimachi	

## ART update1

座長：広島 HART クリニック 院長 / 向田 哲規

Culture media in the future .....	44
Sage IVF / Patrick Quinn, Ph.D.	

## ART update2

座長：ミオ・ファティリティ・クリニック 院長 / 見尾 保幸

Time-lapse imaging: the future has arrived .....	46
CEO iLabCoMM / Markus Montag, M.Sc., Ph.D., Prof.	

## 基調講演

座長：京都大学大学院 医学研究科婦人科学産科学 教授 / 小西 郁生

日本の生殖医療を考える .....	48
慶應義塾大学 名誉教授 / 吉村 泰典	

## 招請講演

座長：聖マリアンナ医科大学 名誉教授 / 石塚 文平

Pragmatic approach to the older patient and failed patients by ART in the U.S.A. ....	49
University of California, San Francisco, USA / Marcelle I. Cedars, M.D.	

# 学術集会抄録集

## ランチタイムセッション

	座長：関西医科大学 産科学婦人科学講座 教授 / 神崎 秀陽	
ART 時代の子宮内膜症治療 .....		51
	東京大学大学院 医学系研究科 産婦人科学講座 教授 / 大須賀 穰	

## ワークショップ「がんと生殖医療」

	座長：IVF JAPAN CEO / 森本 義晴	
Breast Cancer and ART .....		52
	University of Kansas Medical Center / S. Samuel Kim, M.D., FACOG.	
卵巣組織凍結・移植とがん・生殖医療 .....		54
	聖マリアンナ医科大学 産婦人科学 教授 / 鈴木 直	

## カレント トピックス

	座長：京都大学大学院 医学研究科人間健康科学系専攻 教授 / 菅沼 信彦	
卵子保存：過去・現在・未来 .....		56
	リプロサポートメディカル リサーチセンター 所長 / 桑山 正成	

## シンポジウム～これからの不妊治療を考える～

	座長：広島 HART クリニック 顧問 / 高橋 克彦	
	アイブイエフ詠田クリニック 院長 / 詠田 由美	
ART による不妊予防 .....		57
	日本不妊予防協会 理事長・渋谷橋レディースクリニック 院長 / 久保 春海	
卵子提供の実際と現況 .....		58
	OD-NET 卵子提供登録支援団体 理事長 / 岸本 佐智子	
提供卵子を用いた ART .....		59
	英ウィメンズクリニック 理事長 / 塩谷 雅英	

## 教育講演

	座長：京野アートクリニック 理事長 / 京野 廣一	
早発卵巣不全や不妊治療終了後のヘルスケア		
— ホルモン補充療法の重要性 — .....		60
	東京歯科大学市川総合病院 産婦人科 教授 / 高松 潔	

## 日本 IVF 学会臨床研究報告

	座長：いしかわクリニック 院長 / 石川 元春	
国内の ART におけるホルモン補充を考える .....		62
	KKR 札幌医療センター斗南病院 生殖内分泌科 指導医 / 東口 篤司	

## ポスターセッション

P-1 胚の動的解析を加味した胚の分類法と臨床妊娠率の検討	64
松田ウイメンズクリニック / 末永 めぐみ	
P-2 ガラス化加温後ヒト胚盤胞の胞胚腔のコラプスが着床率に及ぼす影響	64
山下レディースクリニック / 石山 舞	
P-3 採卵から cIVF までの時間の差が受精率および胚発生に及ぼす影響	65
浅田レディース名古屋駅前クリニック / 加藤 道高	
P-4 精巣内精子における極少精子凍結の有用性	65
岡山二人クリニック / 川上 典子	
P-5 非ヒト霊長類動物モデルを用いた子宮移植モデルの開発 ～子宮性不妊患者に対する妊娠性再建技術の可能性を探って～	66
慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 / 木須 伊織	
P-6 胚培養士による個別相談（たまご相談室）を行って	66
IVFなんばクリニック / 大住 哉子	
P-7 ヒアルロン酸含有培養液が胚に与える影響について	67
英ウイメンズクリニック / 阿部 礼奈	
P-8 精液所見と精漿総カルニチン濃度の相関についての検討	67
英ウイメンズクリニック / 魚住 卓矢	
P-9 ICSI 時の卵子形態は受精結果に影響するのか	68
浅田レディース名古屋駅前クリニック / 木田 雄大	
P-10 卵細胞膜の伸展性を考慮した脆弱な卵子に対するピエゾ ICSI の新しいアプローチ	69
山下レディースクリニック / 岩山 広	
P-11 ヒト卵母細胞の成熟過程においてミトコンドリアは アクチンフィラメントを介して局在を大きく変化させる	69
IVFなんばクリニック / 天羽 杏実	
P-12 グレード別にみた2段階胚移植の有用性	70
吉田レディースクリニック ART センター / 鈴木 麻美	
P-13 未成熟卵体外受精胚移植法における採卵決定時卵胞径と 血中エストラジオール値との関係性に対する臨床成績の検討	70
IVF大阪クリニック / 灘本 圭子	
P-14 長期治療の末に挙児を得た IV 期子宮内膜症 ART 症例：15 回の採卵手術からの考察	71
豊橋市民病院 総合生殖医療センター / 安藤 寿夫	
P-15 卵細胞質直径 130 $\mu$ m 以上の卵子は Giant oocyte なのか －細胞質直径測定と蛍光免疫染色による検討－	71
浅田レディース勝川クリニック / 小森 佑奈	
P-16 精子成熟因子としての自然免疫因子リポカリン 2	72
京都大学再生医科学研究所 附属再生実験動物施設 / 渡邊 仁美	

# 学術集会抄録集

P-17 良好胚盤胞を含む2個胚移植の影響 .....	73
浅田レディース名古屋駅前クリニック / 北坂 浩也	
P-18 カルシウムイオノファ処理による受精補助症例の出生児調査 .....	73
IVF大阪クリニック / 渡邊 千裕	
P-19 DNA メチル化修飾の違いを利用した雌雄前核の識別によるヒト異常受精卵の解析 .....	74
ミオ・ファティリティ・クリニック リプロダクティブセンター / 田中 藍	
P-20 BDI・HADS スコアと精液所見の関連 .....	74
東京慈恵会医科大学 産婦人科 / 拝野 貴之	
P-21 本抗核抗体染色型別にみた多前核胚出現頻度の検討 .....	75
IVF大阪クリニック / 大垣 彩	
P-22 ART 施設での oncofertility の現況；当院での経験から .....	75
IVF 詠田クリニック / 西村 佳与子	
P-23 超音波診断法を用いた凍結融解胚移植 (cryo - ET) 周期における子宮筋層後壁厚と妊娠転帰の検討 .....	76
IVF 詠田クリニック / 本庄 考	
P-24 ウサギ冷蔵保存卵巣から得られた卵子-顆粒膜細胞複合体の体外発育・ 成熟培養より得られた成熟卵の受精能の検討, および卵巣の組織学的解析 .....	76
近畿大学大学院生物理工学研究科 / 森 樹史	
P-25 試薬添加によるマウス初期二次卵胞における2段階培養法の改善の試み .....	77
近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻 / 印部 遼子	
P-26 連続培養系の確立～15 $\mu$ L drop での連続培養は可能なのか?～ .....	77
浅田レディース名古屋駅前クリニック / 渡邊 紘之	
P-27 採精から媒精までの時間が体外受精の臨床成績に及ぼす影響 .....	78
田園都市レディースクリニック / 工藤 祐輔	
P-28 胚発育速度に基づく新鮮胚移植の臨床成績 .....	78
ART 岡本ウーマンズクリニック / 秋吉 俊明	
P-29 完全合成ガラス化凍結保存液を用いたヒト胚盤胞の凍結保存 -ヒト血清アルブミン (HSA) は polyvinylpyrrolidone (PVP) で代替可能か? - .....	79
三宅医院 生殖医療センター / 沖津 摂	

<b>学術集会 共催・協賛企業一覧</b> .....	80
<b>日本 IVF 学会雑誌発行における投稿論文募集のお知らせ</b> .....	81
<b>日本 IVF 学会雑誌 投稿規定</b> .....	82
<b>日本 IVF 学会会則</b> .....	83
<b>日本 IVF 学会役員</b> .....	85
<b>編集委員会</b> .....	85

## ごあいさつ

皆様お待ちかねの日本 IVF 学会の季節がやって参りました。今年も、アイデアにあふれる福田愛作先生のプログラムは魅力で一杯です。特に、今年は多くのスピーカーが海外から招聘されていますので、内容の極めて濃い学術集会となるものと予想されます。じっくりと講演の1つひとつをお楽しみ頂きたいと存じます。

さて、日本 IVF 学会では、日本 IVF 学会誌（英文名 Journal of Assisted Reproduction）を刊行しております。現在我が国には、生殖医学関連分野で和文投稿のできる雑誌が少なく、この雑誌に多くの優秀論文が掲載されるようになったことは嬉しいことです。折角学会で発表をしても、これが形にならないと消えてしまって業績とは認められません。研究を文章にすることは億劫ですが、是非どしどし投稿頂きたいと存じます。

さらに、本学会は日本学術会議に登録を申請中です。日本学術会議には医学分野だけでなく何千もの学会が申請を出してきますので、現在その認定は困難なものとなっております。しかし、本学会の果たす役割の大きさを認めて頂いておりますので早晚認定が下りるものと確信しております。

体外受精が始まってもう 36 年が経過し、この技術による出生数も 600 万人を超えようとしています。ここに至って、再生医療の生殖医療への介入が目前まで来ています。具体的には、幹細胞からの配偶子作製です。ご存じの様に、動物レベルではすでに成功しています。体外受精成功と同じかまたはそれ以上のエポックメイキングな革新的変動が生殖医療に起こる日は遠くはありません。日本 IVF 学会は、わが国唯一の ART を中心とする学会として、こういった動きに即応した情報発信をする責任があると考えております。会員の皆様のより一層の学会活動をお願い申し上げます。

平成 26 年秋

日本 IVF 学会  
理事長 森本 義晴

## ごあいさつ

我が国の生殖医療の歴史を見ますと、1983年の東北大学における日本で最初の体外受精児の誕生から昨年で満30年が経過し、2014年は31年目ということになります。人生で31歳と言えば壮年期もしくは成熟期といったところでしょうか。日本のARTの実情を見てみますと、海外より進んでいる部分もあるのですが、ARTを取り巻く状況を見れば、まだまだそうは言えないようです。そこで、第17回日本IVF学会のメインテーマを“ART beyond”といたしました。我が国のARTには他の国々と違った問題点があります。第一は社会構造の変化による不妊女性患者の急速な高齢化。第二に、患者の高齢化にも関わらず、さまざまな規制により他の国々では通常の選択肢として用いられている技術を使うことが出来ない状況。第三に、生殖医療に関する法整備の遅れ、が挙げられます。以上のような状況を鑑み、現在の日本のARTが置かれた状況を直視するとともに、ARTを取り巻く環境にいかに対処すべきか、もしくは我々がいかに改善できるか、を参加者の皆様と一緒に議論したいと思います。

基調講演として、このような日本の現状に対するお考えを、小西郁生日本産科婦人科学会理事長の座長のもと、吉村泰典日本生殖医学会前理事長からお伺いすると共に、参加者を交えたディスカッションの時間を設けています。安倍首相がアベノミクスの次に掲げるのが、これからは女性の時代、ウイメノミクスと言われています。ARTでは日本の先を行く米国での実情を、本学会では初めての女性のメインゲストとなる Marcelle Cedars 教授にお話ししていただきます。その他、海外からは、今日のARTで必携の技術となりつつある Time-lapse について Markus Montag 博士、新しい培養液の概念について IVF ラボのパイオニア Patrick Quinn 博士に講演していただきます。また昨年日本でも公式に可能となりました卵子凍結について、凍結では世界の第一人者である桑山正成博士に卵子凍結の現状を示していただきます。そのほか現在日本のARTが直面している第三者を介した生殖医療、がんと生殖医療、ART終了後の高齢患者のケア、染色体に関する最新研究など多岐にわたり“ART beyond”のテーマに則したお話をさせていただく予定です。例年通り、共催の日本臨床エンブリオロジスト学会のセッションでは卵子凍結に関する技術的側面が論議されます。

また通常プログラム以外に本年はリジェンド特別講演として当学会顧問である生殖生物学のパイオニア、柳町隆造博士（ハワイ大学名誉教授）より、先生の長い研究生活における経験から我々に対する示唆に富んだ講演をいただける予定です。ご期待ください。

日本IVF学会の主役は参加者の皆さんです。多くの生殖医療に携わる方々に活発な議論に加わっていただき、日本の新しいARTの扉を開けることができると考えております。

なお、本学会と並行して同一フロアにて日本生殖看護学会が開催されております。自由に参加できるようになっておりますので、是非お顔を出していただきたいと思います。

平成26年秋

第17回 日本IVF学会  
学術集会長 福田 愛作

2014年9月13日(土)

時間	区分	テーマ
11:45~	レジストレーション	
12:55~13:00	開会の辞	
13:00~13:15	会長講演	ART beyond
13:15~13:40	生殖医学講演I	生殖と時間生物学
13:40~14:05	生殖医学講演II	染色体の動態解析
14:05~14:30	生殖医療ブレイク・スルー	ヒト円形精子細胞の臨床応用とその成績向上のための検討
14:30~14:50	コーヒーブレイク	
14:50~15:30	エポックメイキングレクチャー	光が働きかける細胞機能 -生命科学・医学とのかかわり-
15:30~17:20	日本臨床エンブリオロジスト学会セッション 「卵子凍結」	卵子凍結：過去・現在・未来
		ウシ未成熟卵母細胞におけるガラス化保存の影響
		当院における乳がん患者の卵子凍結の現状
		凍結融解卵子を用いた TESE-ICSI の臨床成績
17:20~17:50	ポスターセッション	ポスター閲覧
17:50~18:20	ポスター優秀演題発表	口頭発表(3演題)
18:20~20:20	バンケット	大阪国際会議場-イベントホール

2014年9月14日(日)

8:30~ 9:10	リジェンド特別講演	The dawn and future of IVF
9:10~ 9:40	ART update1	Culture media in the future
9:40~10:10	ART update2	Time-lapse imaging: the future has arrived
10:10~10:55	基調講演	日本の生殖医療を考える
10:55~11:10	コーヒーブレイク	
11:10~11:50	招請講演	Pragmatic approach to the older patients and failed patients by ART in the U.S.A.
11:50~12:40	ランチタイムセッション	ART時代の子宮内膜症治療
12:40~13:30	ワークショップ 「がんと生殖医療」	Breast Cancer and ART
		卵巣組織凍結・移植とがん・生殖医療
13:30~13:50	年次総会	
13:50~14:20	カレントトピックス	卵子保存：過去・現在・未来
14:20~14:40	コーヒーブレイク	
14:40~15:40	シンポジウム ～これからの不妊治療を考える～	ARTによる不妊予防
		卵子提供の実際と現況
		提供卵子を用いたART
15:40~16:05	教育講演	早発卵巣不全や不妊治療終了後のヘルスケア -ホルモン補充療法の重要性-
16:05~16:20	日本IVF学会臨床研究報告	国内のARTにおけるホルモン補充を考える
16:20~16:25	閉会の辞	
	次期学術集会長挨拶	

# 日本IVF学会 学術集会

会場:大阪国際会議場

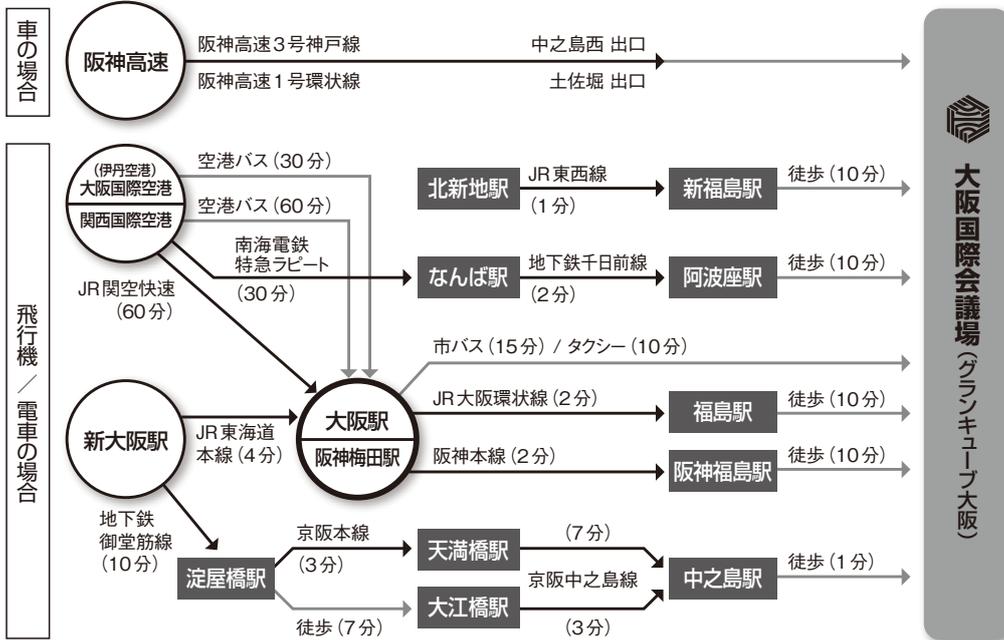
共催:日本臨床エンブリオロジスト学会

www.ivf-et.net/17/

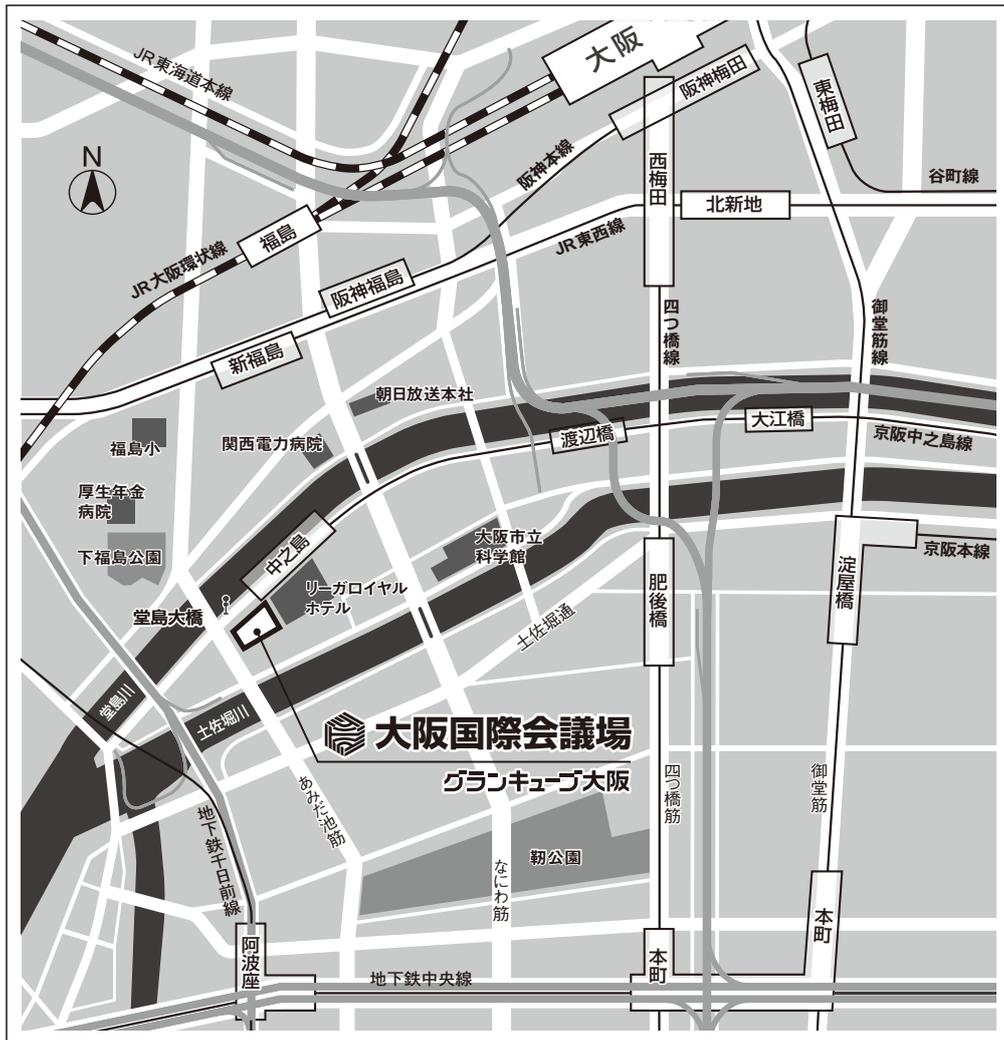
演者	座長
IVF JAPAN CEO / 森本 義晴	
IVF大阪クリニック 院長 / 福田 愛作	生殖バイオロジー東京シンポジウム 代表 / 鈴木 秋悦
京都府立医科大学大学院 医学研究科統合生理学 教授 / 八木田 和弘	近畿大学生物理工学部 教授 / 細井 美彦
IVFなんばクリニック 院長 / 中岡 義晴	山下レディースクリニック 院長 / 山下 正紀
セントマザー産婦人科医院 院長 / 田中 温	木場公園クリニック 院長 / 吉田 淳
防衛医科大学校 准教授 / 櫛引 俊宏	クリニックママ 院長 / 古井 憲司
リプロサポートメディカルリサーチセンター 所長 / 桑山 正成	リプロサポートメディカルリサーチセンター 所長 / 桑山 正成
帯広畜産大学原虫病研究センター 特任研究員 / 阿部 靖之	山下レディースクリニック 胚培養室長 / 岩山 広
加藤レディースクリニック 培養室長 / 内山 一男	
京野アートクリニック 培養部主任 / 中條 友紀子	
University of Hawaii Medical School, HI, USA / Ryuzo Yanagimachi	近畿大学 理事 / 入谷 明
Sage IVF / Patrick Quinn, Ph.D.	広島HARTクリニック 院長 / 向田 哲規
CEO iLabCoMM / Markus Montag, Ph.D.	ミオ・ファティリティ・クリニック 院長 / 見尾 保幸
慶應義塾大学 名誉教授 / 吉村 泰典	京都大学大学院医学研究科婦人科学産科学 教授 / 小西 郁生
University of California, San Francisco, USA / Marcelle I. Cedars, M.D.	聖マリアンナ医科大学 名誉教授 / 石塚 文平
東京大学大学院医学系研究科産婦人科学講座 教授 / 大須賀 穰	関西医科大学産科学婦人科学講座 教授 / 神崎 秀陽
University of Kansas Medical Center / S. Samuel Kim, M.D.	IVF JAPAN CEO / 森本 義晴
聖マリアンナ医科大学産婦人科学 教授 / 鈴木 直	
IVF JAPAN CEO / 森本 義晴	
リプロサポートメディカルリサーチセンター 所長 / 桑山 正成	京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 教授 / 菅沼 信彦
日本不妊予防協会 理事長 / 久保 春海	広島HARTクリニック 顧問 / 高橋 克彦
OD-NET卵子提供登録支援団体 理事長 / 岸本 佐智子	アイブイエフ詠田クリニック 院長 / 詠田 由美
英ウィメンズクリニック 理事長 / 塩谷 雅英	
東京歯科大学市川総合病院 産婦人科 教授 / 高松 潔	京野アートクリニック 理事長 / 京野 廣一
KKR札幌医療センター斗南病院 生殖内分泌科 指導医 / 東口 篤司	いしかわクリニック 院長 / 石川 元春
IVF大阪クリニック 院長 / 福田 愛作	
アイブイエフ詠田クリニック 院長 / 詠田 由美	

# 交通のご案内

## 会場アクセス (所要時間は乗り継ぎ時間等を含みません)

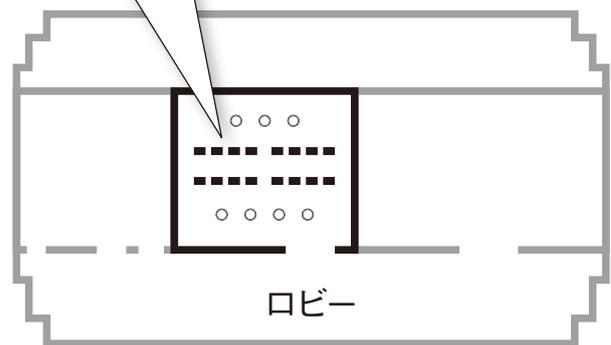
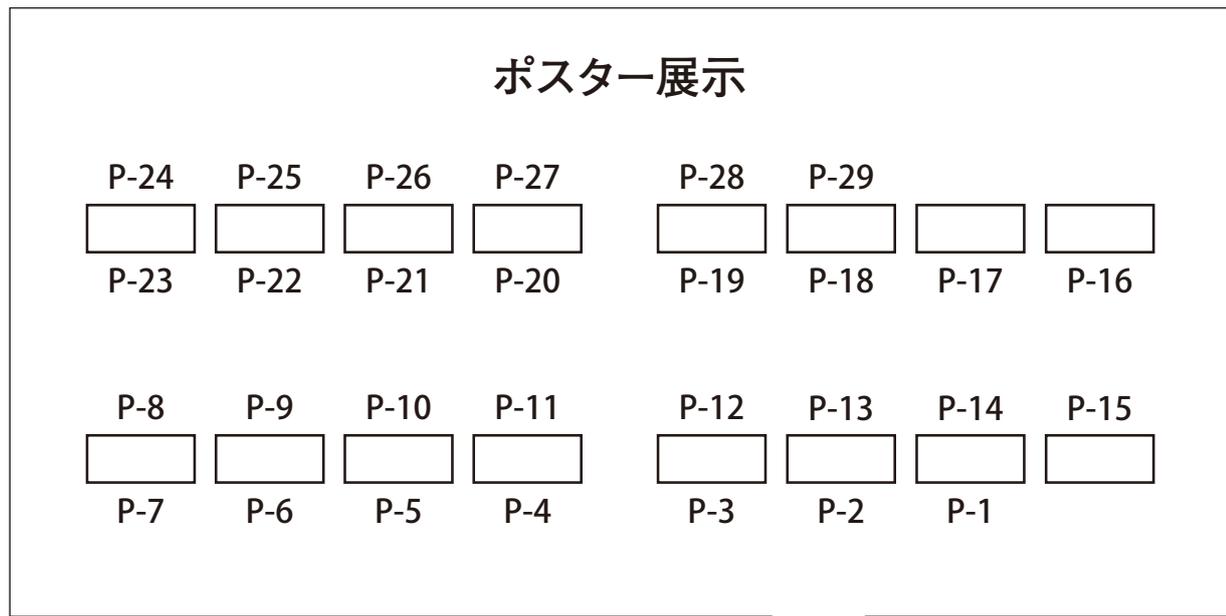


大阪国際会議場 (グランキューブ大阪)



●大阪国際会議場 〒530-0005 大阪府大阪市北区中之島5丁目3-51 Tel : 06-4803-5555

# ポスター掲載場所



大阪国際会議場（グランキューブ大阪）  
3F イベントホール

- |                             |                              |                              |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|
| P-1 未永 めぐみ 松田ウイメンズクリニック     | P-11 天羽 杏実 IVFなんばクリニック       | P-21 大垣 彩 IVF大阪クリニック         |
| P-2 石山 舞 山下レディースクリニック       | P-12 鈴木 麻美 吉田レディースクリニック      | P-22 西村 佳与子 IVF詠田クリニック       |
| P-3 加藤 道高 浅田レディース名古屋駅前クリニック | P-13 灘本 圭子 IVF大阪クリニック        | P-23 本庄 考 IVF詠田クリニック         |
| P-4 川上 典子 岡山二人クリニック         | P-14 安藤 寿夫 豊橋市民病院            | P-24 森 樹史 近畿大学               |
| P-5 木須 伊織 慶應義塾大学            | P-15 小森 佑奈 浅田レディース勝川クリニック    | P-25 印部 遼子 近畿大学              |
| P-6 大住 哉子 IVFなんばクリニック       | P-16 渡邊 仁美 京都大学再生医科学研究所      | P-26 渡邊 紘之 浅田レディース名古屋駅前クリニック |
| P-7 阿部 礼奈 英ウイメンズクリニック       | P-17 北坂 浩也 浅田レディース名古屋駅前クリニック | P-27 工藤 祐輔 田園都市レディースクリニック    |
| P-8 魚住 卓矢 英ウイメンズクリニック       | P-18 渡邊 千裕 IVF大阪クリニック        | P-28 秋吉 俊明 ART岡本ウーマンズクリニック   |
| P-9 木田 雄大 浅田レディース名古屋駅前クリニック | P-19 田中 藍 ミオ・ファティリティ・クリニック   | P-29 沖津 摂 三宅医院               |
| P-10 岩山 広 山下レディースクリニック      | P-20 拝野 貴之 東京慈恵会医科大学         |                              |

# お知らせ

## 第17回日本IVF学会学術集会

共催：日本臨床エンブリオロジスト学会

### ●スケジュール

会期：2014年9月13日(土)～14日(日)

会場：大阪国際会議場（グランキューブ大阪）

〒530-0005 大阪府大阪市北区中之島5-3-51 TEL:06-4803-5555（代表）

## 学術集会参加者へのお知らせ

### ●参加証

参加受付時に領収証兼用の参加証を受付窓口にてお渡しいたします。会場内ではホルダーに入れて必ずご着用ください。

### ●参加費

#### 事前参加申し込み

会員	医師	22,000 円
	医師以外	12,000 円
非会員	医師	25,000 円
	医師以外	15,000 円
懇親会		3,000 円

※事前参加申し込みの締め切り 2014年8月29日(金) 16:00

#### 当日参加申し込み

会員	医師	25,000 円
	医師以外	15,000 円
非会員	医師	28,000 円
	医師以外	18,000 円
懇親会		3,500 円

### ●プログラム抄録集

学会雑誌が学術集会講演抄録集を兼ねておりますので、会員の方は当日ご持参ください。お忘れの方には、学会当日に3,000円で販売致します（数に限りがございます）。

### ●日本産科婦人科学会専門医シール・日本産婦人科医会研修シール

日本産科婦人科学会専門医10単位シール・日本産婦人科医会研修シールを交付いたします。参加証・領収証を係にご提示のうえ、参加記名帳にご記帳ください。

### ●日本生殖医学会 生殖医療専門医資格更新ポイント

参加証・領収証を係にご提示のうえ、参加記名帳にご記帳ください。旧制度5点、新制度5ポイントとなります。

# Web 質問システム e-Question について

## リアルタイム Web 質問システム

今学術集会では、携帯・スマートフォンやパソコン・iPad から特設サイトにアクセスし、講演を聞きながら演者の先生へリアルタイムで質問を投稿して頂けます。

投稿は講演中いつでも可能です。寄せられた質問の中から座長が選んだ内容がスクリーンに表示され、演者の先生にお答えいただきます。

QR コードまたはこちらの URL から今すぐアクセスが可能

<https://pro.form-mailer.jp/fms/e90a675862308>



この機会に積極的にご参加ください。



### 質問投稿手順

- 1 QR コード及び URL を入力して質問投稿フォームにアクセス。
- 2 講演名・職種を選択。質問を 200 文字以内で入力。
- 3 確認画面に進み、送信で完了。

# ART beyond



## 福田 愛作

IVF大阪クリニック 院長

### 略 歴

1978年 関西医科大学卒業  
 1980年 市立舞鶴市民病院産婦人科部長  
 1984年 京都大学大学院医学研究科(88年修了)  
 1987年 東京大学医科学研究所(免疫研究部)特別大学院生  
 1988年 京都南通信病院(現NTT京都病院)産婦人科部長  
 1989年 京都大学医学博士  
 1990年 East Tennessee State Univ. (1992年より准教授)  
 1998年 IVF大阪クリニック勤務(2003年より院長)

日本生殖医学会生殖医療専門医、関西医科大学非常勤講師、東テネシー州立大学医学部客員教授、米国バイオアナリスト協会(ABB)認定ラボディレクター (HCLD) (日本人で唯一)

1978年7月に英国でルイズ・ブラウン嬢が世界で初めてIVFにより誕生した。その誕生を牽引したのは、言わずと知れたノーベル賞(2010年)受賞者ロバート・エドワーズ博士である。しかし、この偉業はエドワーズ博士一人では到底なし得なかったことは言うまでもない。当時、エドワーズ博士は現在でいえばプログラム全体を指揮するプログラムディレクターであり、また胚培養士の役割も担っていたといえるであろう。臨床面は婦人科内視鏡の専門医であったステップトー博士が受け持っていた。それ以外に、この世界的偉業達成には看護師やコーディネーターなど多くの人々の助けを必要とした。このように生殖医療、特にIVFに代表される現代の生殖医療はチーム医療なくしては存在し得ない。私は1983年、舞鶴市民病院勤務時代に両側卵管閉塞の症例に遭遇し、その当時東北大学で日本初のIVF妊娠出産が報告されていたこともあり、本症例がIVFの最適症例と考え西日本で唯一IVFを既に開始していた徳島大学森崇英教授へ紹介した。この症例が徳島大学で2例目、日本で6例目のIVF妊娠出産成功例となった。これが私と生殖医療の出会いである。その当時の生殖医療では、IVFが不妊治療の最終手段と考えられ、不妊治療の過程でIVF治療を受けられること自体がラッキーであった。IVFを受けられればたとえ妊娠が不成立に終わろうともそれは仕方のないことで、医師や医療関係者がその後をケアするという状況にはなかった。それから30年が経過し、生殖医療の現場は30年前と比べ全くと言っていいほど様変わりしている。チーム医療としての生殖医療が定着し、医師、胚培養士、看護師、カウンセラーなどの役割分担がほぼ明確となっている。治療対象となる患者の状況もおおいに変化している。以前は30代前半が主体であり不妊原因も概ねあきらかであった。近年は、患者層が30代後半から40代前半という高年齢者が中心となり、不妊原因の大きな要因に年齢因子が加わっている。さらに、海外では早くから行われている第三者を介する生殖医療や着床前診断の本邦への波及が、不妊治療の現場を複雑な状況にしている。このよ

うなIVF治療技術に派生する様々な要因(ART beyond)が密接に関わる状況において、不妊治療に携わる臨床医はその場その場の対応に追われるのではなく、患者の年齢や病態に応じて先を見据えた対応が必要となる。近年、従来のFSHに加えAMHという新たな卵巣予備能の指標が得られ、患者の治療成功に関する予測がある程度可能となっている。特に、妊娠成立の可能性が極めて低いと考えられる、早発閉経や染色体異常症例、また高齢患者に対して、より早い時期から患者の治療意欲をそがれないよう、なおかつ教育的配慮を持って、治療不成功時の選択肢を示しながら治療を継続していく必要がある。一定の方法があるわけではないが、個々の医師がそれぞれの人生観を踏まえた診療をすることにより、たとえ不妊治療が不成功に終わっても、患者がその先の選択肢を受け入れられる状況を作り出す必要があると私は考えている。日本の置かれている現在の不妊治療の状況を検証するとともに私の行っている診療方法を紹介したい。今回の日本IVF学会が不妊専門医にとって、現在の不妊治療の現場における患者対応の参考になれば幸いである。

# 生殖と時間生物学



## 八木田 和弘

京都府立医科大学大学院  
医学研究科統合生理学 教授

### 略 歴

1995年 3月	京都府立医科大学医学部医学科卒業
4月	研修医(京都府立医科大学部附属病院) (第3内科)
1997年 4月	京都府立医科大学大学院博士課程入学(解剖学 井端泰彦教授) 同時に神戸大学に国内留学(岡村均教授)
2000年 5月	京都府立医科大学大学院医学研究科博士課程修了
6月	神戸大学医学部第2解剖学講座助手(岡村均教授)
2004年 3月	名古屋大学大学院理学研究科システム生命科学 COE 助教授
2006年 11月	大阪大学大学院医学系研究科神経細胞生物学講座准教授
2010年 9月	京都府立医科大学大学院医学研究科統合生理学教授

一生にわたって刻み続ける概日時計は、生体機能に周期性を与える内因性の自律振動体である。哺乳類の場合、睡眠覚醒、体温、血圧、心拍数、肝機能、消化管蠕動運動、内分泌、エネルギー代謝、自然分娩における出産のタイミングなど、極めて多岐にわたる生理現象の日内変動を制御している。概日リズムの中樞は視交叉上核であり、行動リズムなど全身の機能リズムを調節している。一方で、概日時計はほとんどの末梢細胞にも存在しており、細胞レベルでの概日時計が制御する細胞機能も重要であると考えられている。

全身にあり、一生にわたって刻み続ける概日時計だが、例外的に生殖細胞には存在しないことが知られている。さらに、受精卵にもリズムがなく、発生過程において形成される可能性が示唆される。我々は、マウスES細胞を用いて、概日時計の成立過程を解析した。その結果、ES細胞には概日時計の振動は見られないこと、しかし、*in vitro*でES細胞を分化させると、概日時計が次第に形成されてくることが分かった。つまり、細胞レベルの概日時計の成立に個体発生は必要ではなく、個々の細胞にもともとプログラムされたメカニズムに従って、自律的に約24時間周期の時計が形成されることを明らかにした。しかも、この概日時計の成立は、細胞分化と密接に関連しており、体細胞をリプログラミングしiPS細胞にすると、概日時計の振動がES細胞と同様に消失することを示した。

また、生殖細胞と発生過程における細胞レベルの概日時計の成立とは別に、個体レベルでの生殖の成立に概日時計が重要な役割を果たしていることも知られている。今回、生殖と概日リズムの関わりについて我々の知見を中心に紹介する。

# 染色体の動態解析



中岡 義晴<sup>1)</sup>

橋本 周<sup>1)</sup>, 中野 達也<sup>1)</sup>,  
山縣 一夫<sup>2)</sup>, 森本 義晴<sup>1)</sup>

1) IVFなんばクリニック  
2) 大阪大学

略 歴

1988年 広島大学医学部医学専門課程卒業  
1988～1989年 広島大学医学部産科婦人科学教室  
1989～1991年 広島県立安芸津病院  
1991～1994年 広島大学医学部産婦人科  
1998年 広島大学にて学位取得  
1994～2000年 尾道総合病院産婦人科  
2000～2003年 IVF大阪クリニック 副部長  
2003～2009年 IVF大阪クリニック 副院長  
2009年 6月 IVFなんばクリニック 副院長  
2013年 7月～現在 IVFなんばクリニック 院長

日本産科婦人科学会専門医, 生殖医療専門医, 臨床遺伝専門医

## はじめに

生殖補助医療の実施によりヒトの配偶子や胚の染色体分析が可能となり, 着床前診断 (PGD) の実施により臨床レベルにおいて多数の胚の染色体を詳細に解析できるようになった。その結果, 分割胚の多くにモザイクを含めた染色体異常が存在し, 発育した胚盤胞においても約半数が異常であることが分かってきた。さらに, 染色体異常は女性の年齢に伴い著明に増加する一方, 胚の形態学的にはその異常を判断できないことも明らかになってきた。

胚の異数性異常の多くが卵子や精子の配偶子の異常に起因する一方, 多核 (MNB) の存在や, 1回の分裂で1細胞が3細胞以上に異常分割する胚は染色体モザイクの原因となり胚発生を障害している。

今回, 一般臨床で用いているタイムラプスによる胚の観察, および培養器一体型共焦点顕微鏡を用いた蛍光染色後の胚の核動態を観察し, 胚形態と核動態との関連性を検討した。また, その動画を供覧していただく。

## 対象と方法

### ①タイムラプスによる観察

現在, 臨床の場で体外受精胚移植を行っている症例を対象として, Primo Vision (Vitrolife) を用いて胚の形態および胚発育を観察した。核の状態および分裂様式の観察は主として第二分割までを行い, その後の胚発生を検討した。

### ②共焦点顕微鏡を用いた核動態観察

余剰PN胚を患者の同意および倫理委員会の承認のもとに, 当研究に利用した。PN胚にmRNA (ヒストンH2Bと $\alpha$ -Tubulinをコード) を注入したのちに, 培養器一体型共焦点顕微鏡 (図1) を用いて5日間培養し, 核の動態と胚の発育を観察した<sup>1)</sup>。

また, 胚盤胞となった胚をarray comparative genomic hybridization法 (aCGH法) を用いて染色体分析した。

## 結果

### ①タイムラプスによる観察

胚197個のうち, 2細胞期でMNBを認めたものは97個 (49.2%) あり, MNBの有無による良好胚盤胞到達率はそれぞれ25.0%, 28.4%で差は認めなかった。

また, 1回の分裂で3個以上に分裂する異常分割を認めた胚は85個 (43.1%) であり, 第一分割時の異常分割は48個, 第二分割時では37個とほぼ同頻度で認められた。異常分割を生じた良好胚盤胞到達率は, 第一分割時が8.7%, 第二分割時が14.8%であり, 分割異常のない胚の40.4%と比較して有意に低値であった。

### ②共焦点顕微鏡を用いた核動態観察

Day3胚で形態良好胚 (移植可能胚) であった41個のうち, MNBを認めたものは28個 (68.3%) であり, MNBを認めない胚は13個 (31.7%) であった。異常分割を認めたものは13個 (31.7%) であり, そのすべてにMNBを認めた。1細胞が3細胞に異常分裂する時の分裂中期に, Y字型の染色体配列が認められた (図2)。

Day3時でのMNBの有無および異常分割の有無による胚盤胞到達率は, 図3に示すごとく, 異常分割

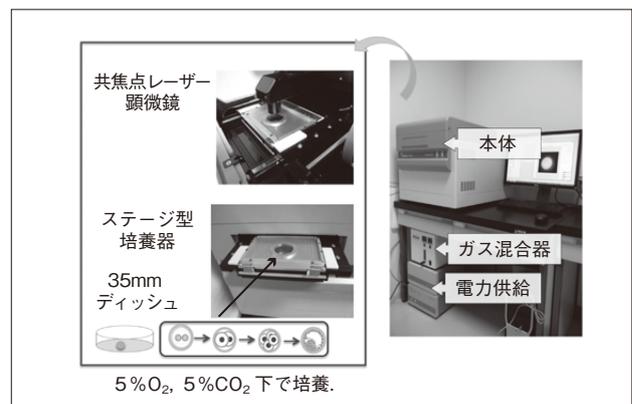


図1 培養器一体型共焦点顕微鏡 (CV1000 横河電機)

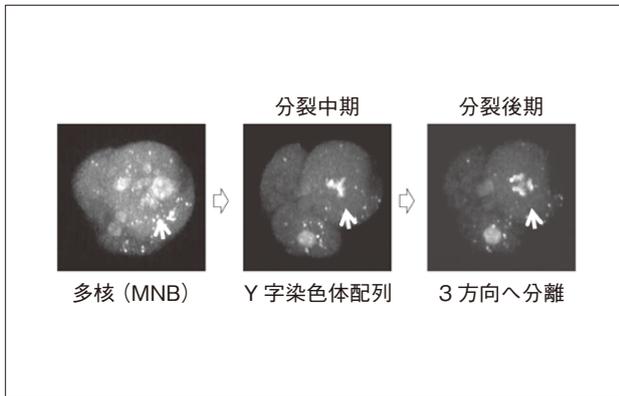


図2 異常分割の核と染色体の分裂

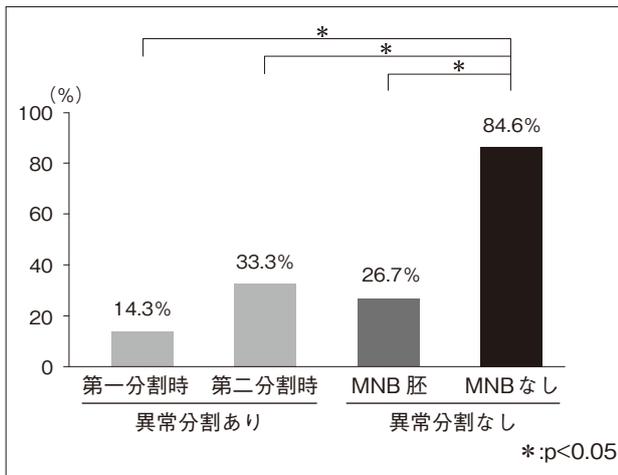


図3 異常分割，核の状態と胚盤胞到達率

が第一分割で認められた胚では14.3% (1/7)，第二分割で認められた胚では33.3% (2/6)，異常分割がなくMNBを認める胚では26.7% (4/15)であり，MNBを認めない胚の84.6% (11/13)は異常のものと比較し有意に高率であった。

染色体分析を行った11個の胚盤胞のうち，染色体異常率はMNBのない胚が14.3% (1/7)であり，MNB胚が50.0% (2/4)であった。

## まとめ

体外受精胚移植における胚培養過程で実施する光学タイムラプス観察においても，異常分割が多発していることが観察された。

胚を蛍光染色し共焦点顕微鏡にて観察することで，細胞分裂の進んだ胚においても核の状態を明瞭に観察することが可能となり，光学顕微鏡下での診断困難な4細胞期胚以降で多核が認められる場合にはその後の発生能が低下することが分かった。

ただ，MNB胚の胚盤胞における染色体分析においては，必ずしもすべてに異常が認められるわけではないことも示された。MNB胚は胚盤胞にまで発育せずに淘汰されているものがあること，全胚の細胞を用いて実施したaCGH法による染色体分析のため，モザイクを分析

できなかった可能性が考えられる。胚の異常は最終的に卵子などの配偶子形成時に生じた異常が原因となっている可能性が高いと考えられた。

## 今後

卵子の減数分裂で生じる染色体異常についての動態解析を，今後実施したいと考えている。

## 参考文献

- 1) Yamagata, K., Suetsugu, R., Wakayama, W.: Assessment of chromosomal integrity using a novel live-cell imaging technique in mouse embryos produced by intracytoplasmic sperm injection. Hum. Reprod., 24: 2490-2499, 2009.

# ヒト円形精子細胞の臨床応用とその成績向上のための検討



**田中 温**

セントマザー産婦人科医院  
院長

**略 歴**

- 1976年 順天堂大学医学部卒業
- 順天堂大学医学部産婦人科教室入局
- 1978年 順天堂大学医学部産婦人科大学院入学
- 1982年 順天堂大学医学部産婦人科大学院卒業
- 順天堂大学医学部第一病理学教室入局
- 1983年 越谷市立病院産婦人科医長
- 1990年 セントマザー産婦人科医院院長

臨床遺伝専門医, 日本生殖医学会生殖医療専門医, 日本受精着床学会副理事長,  
厚生労働科学研究(成育疾患克服等次世代育成基盤研究員), 日本臨床細胞学会細胞診専門医・  
指導医, 日本超音波医学会認定超音波専門医

**目的**

1996年 Tesarik らはヒトで初めて円形精子細胞を用いた出産例を報告した<sup>1)</sup>。その後、多くの妊娠例が世界中で報告されたが出産率は非常に低く、2000年以降はほとんど臨床に応用されなくなった。その原因は2つある。第一は、円形精子細胞の細胞識別が非常に困難であり、間違った細胞を注入している可能性が高い点である。第二は、第II成熟分裂中期で排卵した卵子はスパームファクターにより活性化され、受精に至るが、この受精現象のもととなるスパームファクターが円形精子細胞に不足しているため、発生能力が不十分となり臨床成績が低値となる点である<sup>2)</sup>。この卵子の活性化に対し、我々は従来より電気刺激を行い150名の出産例を得ている。卵子の活性化<sup>3, 4)</sup>を科学的に証明するためにCaオシレーションの発現の有無、波形分析を行い検討したので報告する。

**方法**

- (1) MD-TESEにて採取した精細管をトリプシンで融解し、ノマルスキー微分干渉装置のもとで細胞の同定を行った。円形精子細胞と最も判別不能な細胞は、精粗細胞およびリンパ球などの体細胞であり、共に5~8μmの大きさかつ円形で、N/C比が高い核が大きな細胞である。体細胞と精子細胞との大きな差は、後者は細胞質が非常に脆く、吸引ピペットの中で簡単に核と細胞質が分かれる点であり、その点より両者の鑑別は容易である。精粗細胞と円形精子細胞は、次の3点により鑑別可能である。精粗細胞は、1.一回り大きい(6~8μm)、2.核膜、核縁が明瞭であり、核縁に隣接した複数個の核小体を認める、3.しばらく放置しているとそのうちの数%は義足の発生を認める、の以上3点である。この結果は、ニグロシン染色、マウスなしでの注入後のMII期染色体検討およびFISH検査より得たものであり、両者の鑑別はほぼ完全にできると思われる<sup>5-7)</sup> (写真1)。
- (2) 電気刺激は、交流5V/cm 1,000KHz 8sec, +直流1,200V/99μsecの条件で施行した (NEPAGENE)。

顕微授精時、7~8μmのインジェクションピペットで円形精子細胞を吸い、ガラス管の中で核と細胞質を分類させ、この両者を細胞質内に注入した(写真2)。注入後は通常のICSIと同じ方法で卵を培養した。テサリック等の方法は、10μmと8μmの2種類のインジェクションピペットで卵細胞質を

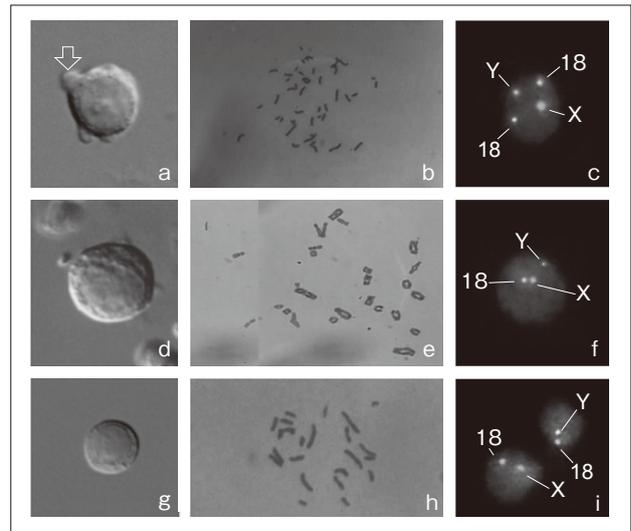


写真1 Chromosomal analysis and FISH results in interphase nuclei

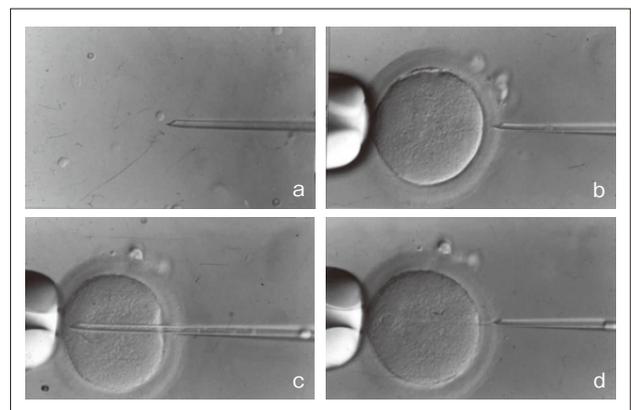


写真2 Round spermatid injection

強く吸引・注入を3回繰り返した。次に、Caオシレーションの測定方法を示す。まず、CaインジケータであるFluo-8H AM (コスモバイオ, 21091) 50  $\mu$ gにF127/DMSO20% (フナコシ, 84041) 50  $\mu$ Lを添加し、5分間温室で遮光し転倒混和後、4  $\mu$ Lを1 mL SPSに加えてタッピングした。このbufferで卵子をincubateし室温で30分浸透させた後、mediumで3回洗浄後に電気刺激や細胞質穿刺刺激を施行し観察開始した。撮影条件は、卵子はチャンパー内で37°C、5% CO<sub>2</sub>ガス下で40倍対物レンズで測定した。CCDカメラ(DP73, Olympus)で8 bit、露出時間769sec、ND Filter (OK-32ND6, Olympus)、タイムラプスは1 sec intervalとした<sup>8)</sup>。

## 結果

- (1) 円形精子細胞を用いた顕微授精の対患者当たりの妊娠率、流産率および出産率は、表1の通りであった。非閉塞性無精子症の中で精子が認められた症例は12%であったが、その大半は奇形または不動精子であった。精子細胞が認められた症例は27%、最も発育した造精子細胞が円形精子細胞であった症例は12%であった。以上の細胞学的診断法を用いることにより、正確に円形精子細胞を選定し、注入することが可能となった。
- (2) 電気刺激により正常なCaオシレーションが誘発されているかを明らかにするため、Fluo-8H AMをCaインジケータとして用い、電気刺激後のCa濃度の変化を経時的に観察した。電気刺激による活性化では、刺激後15分で1<sup>st</sup> Ca spikeが認められた。

表1 Clinical data of round spermatid injection

	Pregnancy rate (%)	Miscarriage rate (%)	Delivery rate (%)
Fresh Embryo	14.0 (179/1282) <sup>a</sup>	44.1 (79/179) <sup>b</sup>	7.8 (100/1282) <sup>c</sup>
Freezing-thawed Embryo	22.7 (74/326) <sup>a'</sup>	32.4 (24/74) <sup>b'</sup>	15.3 (50/326) <sup>c'</sup>

Fisher's exact test a-a', c-c':  $p < 0.05$  b-b':  $p > 0.05$   
(M : F = 72 : 78)

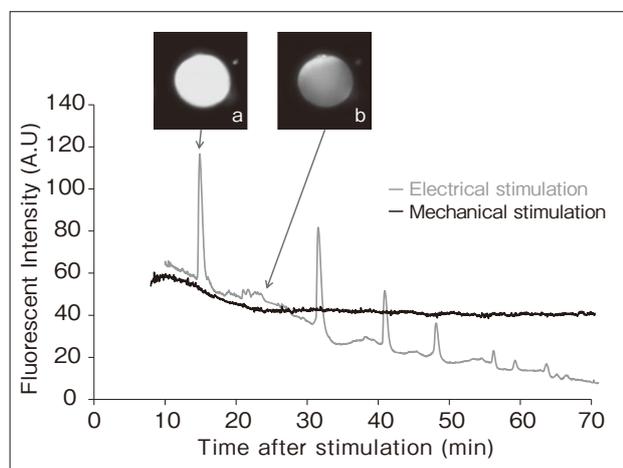


図1 Calcium oscillations after electric stimulation, cytosolic aspiration and injection

また、spikeの頻度は8分であり、IVFで認めるCaオシレーションと類似したパターンであった。また、CCDカメラの感度、励起光の開放およびCaインジケータのリークにより60分以降のオシレーションの有無およびその持続時間は不明であった(図1)。

卵細胞質の機械的注入・吸引後のCaオシレーションは刺激後15分、撮影開始直後に一過性のspikeを認めるが、その後spikeを認めることはなかったため正常なCaオシレーションは起きておらず、活性が十分に起きているとはいえない。しかし、蛍光顕微鏡下で穿刺刺激をしていないため穿刺前後のCa濃度の測定ができていないので、今後改善していく必要がある。

## 結論

卵子の活性化が卵子の臨床成績を大きく左右する重要な操作である。電気刺激によるCaオシレーションは自然の受精時と同様のパターンをとることはなかった。一方、テサリック等の報告した卵細胞質の機械的な吸引・注入による操作では、Caオシレーションが十分に発生しないことが観察され、卵子の活性化が必要であることが証明された。

以上の精子細胞の卵子活性化や正確な選別を行うことにより、現在までに150名(M : F = 72 : 78)の出生児が生まれ、この中で異常児は4例で2.7%のみであった。染色体検査は83例に行い、1例に均衡型の転座が認められたが、これは父親由来であった。流産率は41%であった。

## 参考文献

- 1) Tesarik, J., Rolet, F., Brami, C., Sedbon, E., Thorel, J., Tibi, C., et al.: Spermatid injection into human oocytes. II. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. Hum. Reprod., 11: 780-783, 1996.
- 2) The Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine, Practice Committee of Society for Assisted Reproductive Technology: Round spermatid nucleus injection (ROSNI). Fertil. Steril., 90: S199-201, 2008.
- 3) Miyazaki, S., Ito, M.: Calcium signals for egg activation in mammals. J. Pharmacol. Sci., 100: 545-552, 2006.
- 4) Miyazaki, S., Shirakawa, H., Nakada, K., Honda, Y.: Essential role of the inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor/Ca<sup>2+</sup> release channel in Ca<sup>2+</sup> waves and Ca<sup>2+</sup> oscillations at fertilization of mammalian eggs. Dev. Biol., 158: 62-78, 1993.
- 5) Tanaka, A., Nagayoshi, M., Awata, S., Mawatari, Y., Tanaka, I., Kusunoki, H.: Completion of meiosis in human primary spermatocytes through in vitro coculture with Vero cells. Fertil. Steril., 79: 795-801, 2003.
- 6) Tanaka, A., Nagayoshi, M., Awata, S., Tanaka, I., Kusunoki, H.: Differentiation of human round spermatids into motile spermatozoa through in vitro coculture with Vero cells. Reprod. Med. Biol., 8: 169-175, 2009.
- 7) Tanaka, A., Nagayoshi, M., Awata, S., Himeno, N., Tanaka, I., Kusunoki, H.: Isolated spermatogonia protrude active pseudopodia in vitro. Fertil. Steril., 90: 453-455, 2007.
- 8) Ito, M., Shikano, T., Kuroda, K., Miyazaki, S.: Relationship between nuclear sequestration of PLCzeta and termination of PLCzeta-induced Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs. Cell Calcium, 44: 400-410, 2008.

光が働きかける細胞機能 —生命科学・医学とのかかわり—



榎引 俊宏<sup>1)</sup>

石原 美弥<sup>2)</sup>

- 1) 防衛医科大学校 准教授
- 2) 防衛医科大学校 教授

略 歴

- 2005年 3月 京都大学再生医科学研究所生体材料科学分野博士後期課程修了博士(工学)
- 2005年 4月 大阪大学21世紀COEプログラム「細胞・組織の統合制御にむけた総合拠点形成」特任研究員
- 2006年 4月 同特任助手
- 10月 大阪大学大学院工学研究科グローバル若手研究者フロンティア研究拠点特任講師
- 2008年10月 科学技術振興機構さきがけ「光の創成・操作と展開」研究者(兼任)  
Harvard Medical School 客員准教授(Department of Dermatology)  
Massachusetts General Hospital, Wellman Center for Photomedicine 客員研究員
- 2011年 4月 大阪大学臨床工学融合研究教育センター招聘准教授
- 11月 防衛医科大学校医用工学講座准教授

レーザーや光を用いた医療・生物学への応用は多岐にわたっており、生体組織・臓器の切削や蒸散だけでなく、内視鏡と組み合わせた診断装置の開発や光線力学療法(Photodynamic Therapy: PDT)が行われている。生命科学の基礎研究分野においてもレーザーや光はすでに欠かせないツールとなっており、各種測定装置だけではなく顕微鏡やイメージング分野へ幅広く応用されている。それらの中でも、私たちはレーザー光に対する生体反応に関する研究を中心に行っている。

1967年、Mesterらは生体組織へのレーザー照射による発がん性をテストするため、低エネルギーのレーザー(波長694 nmのルビーレーザー)を剃毛したマウス背部へ照射した。その結果、発がんという結果は認められなかったが、レーザー照射部位の体毛成長速度が非照射部位に比べて促進されていることを発見した<sup>1)</sup>。この現象は生体に対する初めてのレーザー作用の確認といわれ、低出力レーザー治療(Low reactive level laser therapy: LLLT)の始まりであるとされている。そもそも、光を用いた治療は古くから行われており、紫外線療法も100年以上前より行われていたが<sup>2)</sup>、光のなかでも単色性および干渉性に優れたレーザーによる生物作用は初めての報告であった。Mesterらは引き続いて1971年にLLLTの創傷治癒促進効果に関する報告を行っている<sup>3)</sup>。それ以降、多くの研究者によってLLLTに関する報告がなされ、皮膚潰瘍治療効果、細胞増殖促進、ATP産生促進、コラーゲン合成促進、炎症抑制、疼痛緩和、骨折治癒促進や局所の血流改善など広範な生物学的効果が報告されている。

一方で、Mesterらの報告から35年余りを経た2003年のJournal of Clinical Laser Medicine and Surgeryに、LLLT分野では著名なLanzafameが、“Why doesn't everyone use it?”という簡明な問いを投げかけている<sup>4)</sup>。LLLTは、これまでの多数の臨床経験により、副作用の少ない治療方法として広く普及しても問題ないようにも思えるが、Lanzafameの論文からさらに11年を経た現在もLLLTの生物作用メカニズムやレーザー照射後の

副作用について完全に明らかになっているわけではない。1971年のMesterらの最初の報告では、創傷治癒効果を得るためには照射パワー5~25mWのヘリウムネオンレーザーを1~1.5 J/cm<sup>2</sup>の照射エネルギー密度(フルエンス)で患部に照射することを提唱している<sup>3,5)</sup>。実際、そのレーザー照射条件によって多くの有効な報告が出ているが、必ずしも効果の再現性が得られていないといった報告もある。一方では、レーザー照射による単なる温度上昇による効果であるといった意見や、術者や施設により異なった結果が表れているという意見もある。LLLTは歴史ある治療方法であるが、発展がめざましい分子生物学的手法などを用いて治療メカニズムを解明し、治療効果を詳細に検証しなければならぬ新しい学際的な研究領域といえる。そのためにも、これまで積み上げられている臨床報告例を丹念に精査し、分子生物学的知見を踏まえた生物作用、細胞作用についての研究を行うことが重要であると私たちは考えている。レーザーによるLLLTが始まってすでに40年以上になる今日、毎年100件を超える臨床報告例、*in vitro*研究、多数の動物実験の結果が得られているにもかかわらず、“Why doesn't everyone use it?”なのか。総説論文でよく拝見する原因は、レーザー照射パラメータが統一されていないということであるが、レーザーが照射される側の生体(細胞)にも目を向ける必要がある。もし種々の生物学的な要因が複雑に絡み合うために適切な治療法が確立されていないとするならば、それらを網羅的に整理し、問題点を洗い出し、有効な治療法の確立に向けて研究を行わなければならない。

そこで本発表では、まずLLLTにおける治療パラメータを列挙する。続いて、生体側からみた細胞のレーザーに対する応答例を挙げる。著者らのこれまでの研究結果から、①細胞内光受容体の存在と光受容に続く生理活性変化、②レーザー照射後の細胞内シグナルカスケードの変化、③レーザー照射後の遺伝子発現調節が起ることを確認している。①から③は単独で起こっているのではなく、相互作用しながら最終的にレーザー照射後の細胞

機能変化が起きていることを中心に考察する。生命誕生当初から利用してきた光エネルギーを、これからは診断・治療に積極的に利用できる技術・方法の開発を目指している。

#### 参考文献

- 1) E. Mester, B. Szende, P. Gartner: The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*, 9: 621-626, 1968.
- 2) R. Roelandts: The history of phototherapy: something new under the sun?. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 46: 926-930, 2002.
- 3) E. Mester, T. Spiry, B. Szende, J. G. Tota: Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.*, 122: 532-535, 1971.
- 4) R. J. Lanzafame: Why doesn't everyone use it?. *J. Clin. Laser. Med. Surg.*, 21: 335-336, 2003.
- 5) E. Mester, E. Jaszszagi-Nagy: Biological effects of laser radiation. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*, 12: 377-385, 1971.

# ウシ未成熟卵母細胞におけるガラス化保存の影響



**阿部 靖之**

帯広畜産大学  
原虫病研究センター  
特任研究員

略 歴

2005年 東北大学大学院農学研究科博士課程修了(博士(農学)取得)  
2004年4月～2006年3月 日本学術振興会特別研究員(DC2)  
2006年4月～2009年3月 帯広畜産大学機関研究員  
2009年4月～2009年12月 日本学術振興会特別研究員(PD)  
2010年1月～2014年3月 山形大学大学院理工学研究科助教  
2014年4月～現在 帯広畜産大学原虫病研究センター特任研究員

著 書

冷凍空調便覧 IV巻 食品・生物編(第6版; 冷凍空調便覧改訂委員会編) 第8章3節 動物胚および卵子(哺乳類)(分担)

## はじめに

近年、卵子(卵母細胞、胚)の凍結保存(ガラス化保存)などの生殖補助技術は目覚ましい発展を遂げ、産業動物の生産に大きく貢献しているばかりでなく、その技術はヒト不妊治療にも応用され、重要性が増している。筆者らは、ウシを対象として未成熟卵母細胞(卵核胞期)のガラス化保存法を改良し高い成熟能を実現したが、受精能は低かった。このように、凍結保存した卵母細胞は品質が低下することが問題であるが、そのメカニズムは未だ不明である。そこで、より安全な卵母細胞のガラス化保存を目的として、凍結卵母細胞の特徴を解析した。

## 方法

ウシ卵巢より採取した卵丘細胞-卵母細胞複合体(COCs)をガラス化保存し、成熟培養後にミトコンドリアおよびアクチン、紡錘体の分布・形態、呼吸量を指標とした機能、遺伝子発現について解析した。

## 結果

成熟卵母細胞の活性型ミトコンドリア分布は、均一型および凝集型、減少型の3タイプに分類され(図1)、均一型は受精・発生能が最も高かったが、ガラス化卵における出現頻度が新鮮卵に比べ約半数に減少していた。酸素消費量もそれに対応するように均一型が最も高く、ガラス化卵では均一型と他の2タイプとの間で大きな差異がみられた(図2)。また、細胞分裂において重要な

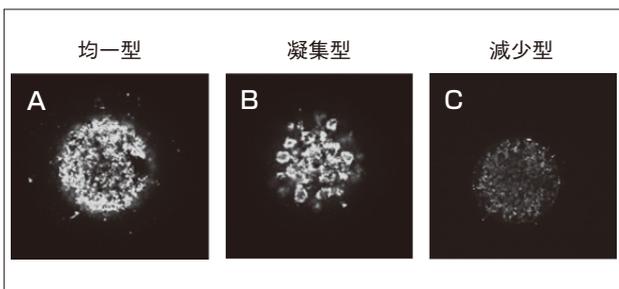


図1 成熟培養後の活性型ミトコンドリアの分布

アクチンフィラメント(細胞骨格)および紡錘体に異常が生じていたが、サイトカラシンDなどの細胞骨格安定剤でガラス化前処理することで、その異常を軽減することができた。一方で、遺伝子発現はアポトーシス抑制因子Bcl-2が新鮮卵と同程度であったにもかかわらず、アポトーシス誘導因子Baxが高く、ミトコンドリア分裂因子Drp-1が低いという違いがみられた。

## 考察

凍結処理の刺激がミトコンドリアおよび微小管に作用して局在を変化させるとともに、アポトーシスが誘導されミトコンドリアの膜透過性亢進および機能低下が起こったと考えられる。また、成熟能を有するガラス化卵であっても受精能が低い一方で、胚発生能は正常であり、卵子側の受精関連因子であるCD9遺伝子発現は新鮮卵と同程度であったことから、細胞骨格安定剤による前処理や受精法の改良によって、障害を回避できるかもしれない。

## 参考文献

- 1) Abe, Y., Hara, K., Matsumoto, H., Kobayashi, J., Sasada, H., Ekwall, H., Rodriguez-Martinez, H., Sato, E.: Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol. Reprod.*, 72: 1416-1420, 2005.

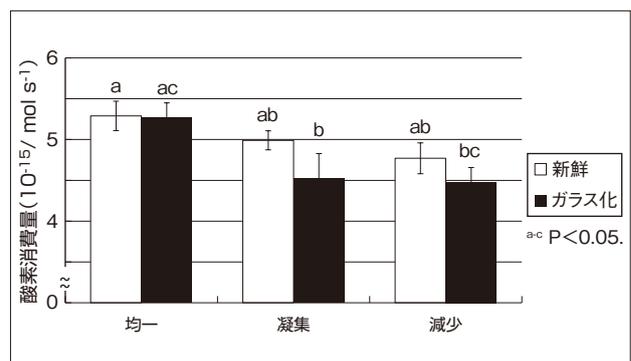


図2 活性型ミトコンドリア分布別の酸素消費量

## 当院における乳がん患者の卵子凍結の現状



### 内山 一男

高山 優子, 森 智絵美,  
 数内 晶子, 沖村 匡史,  
 加藤 恵一  
 加藤レディスクリニック

### 略 歴

1981年	宇都宮医学技術専門学校卒業
1981～1994年	獨協医科大学勤務
1993年	1級臨床病理技術士資格認定
1994～2008年	加藤レディスクリニック勤務
2008～2010年	みなとみらい夢クリニック出向
2010年～現在	加藤レディスクリニック勤務

### はじめに

近年、若年がん患者の罹患率増加、がんに対する診断および治療の進歩などにより生存率が向上している。それに伴いがん患者に対する quality of life (QOL) への配慮、特に生殖年齢患者に対する化学療法、放射線療法などでおこる妊孕性の低下、喪失が新たな問題として取り上げられている。

がん患者における妊孕性温存法の1つとして配偶子または受精卵の保存が挙げられる。既婚患者では治療前のIVFにより受精卵ないし胚として凍結保存を行い、未婚患者では精子または卵子を受精前の段階で凍結保存することで、治療後の妊孕性を温存することが可能となる。当院では2001年11月から乳がん患者を対象とした凍結保存を行っており、当院における乳がん患者の卵子または胚の凍結保存について現状を報告する。

### 乳がん患者の当院受診までの流れ

患者対応は電話での問い合わせに対し受診条件の説明から始まる。受診条件は、①43歳以下であること、②現疾患の主治医の了承が取れていること、③乳がんの治療スケジュールが決まっているか、である。これは当院での採卵をいつまでに終わらせる必要があるかを把握するためであり、②③が不十分の場合は主治医と直接相談し、当院での治療の可否を判断している。3条件を満たした患者には採卵、凍結融解方法、生存率、ICSI、受精率、分割率、妊娠率、治療費および保存費用について説明を行っている。最終的に患者から質問、不明点がないか再度確認し、後日改めて採卵するか否かの判断を書面にて行っている。

### 対象および方法

今回対象とした患者は、問い合わせの段階の266名、内訳は未婚者152名(39.1±5.1歳)、既婚者114名(38.1±4.5歳)とした。検討項目は、問い合わせから受診を行った患者数、卵子、胚の凍結保存を行った患者数および患者1人あたりの凍結保存卵子、胚数、患者の年齢分布、融解後の結果とした。

### 結果

2001年から2013年の患者問い合わせ件数の変遷で2009年から増加傾向となり、2012年は未婚55件、既婚31件、2013年は未婚25件、既婚26件であった。未婚患者は問い合わせ152件で受診89件(58.6%)、うち採卵に至ったのは74件(83.1%)であった。卵子が凍結できたのは71件(95.9%)でトータル141個の卵子(平均1.99個)が凍結された。既婚患者は問い合わせ114件で受診68件(59.6%)、うち採卵に至ったのは50件(73.5%)であった。凍結胚が確保できたのが39件(78.0%)で、トータル128個の胚(平均3.28個)が保存された。

年齢分布では未婚患者35～39歳が32件(45.1%)、40～44歳が20件(28.2%)と多かった。既婚患者は35～39歳が19件(48.7%)、30～34歳および40～44歳が7件(17.9%)と続いた。現在までの乳がん治療後の不妊治療施行状況は、未婚患者1名、既婚患者10名で、未婚1症例においては凍結融解後の卵子は生存するも受精が認められず、既婚10症例からは5名の健児が得られた。

### 結論

乳がん患者においても採卵し、卵子および胚の凍結保存が可能であった。また、ホルモン受容体陽性の患者でも自然周期での採卵が可能であった。既婚者の凍結胚移植においては健児が得られ一定の成果が得られたが、未婚乳がん患者における治療後の不妊治療施行状況については融解例数が殆ど無く、当院において明確な成果は証明できず、長期的な検討が必要であった。

当院においてがん患者以外の卵子の凍結は、採卵当日に精子の確保ができず止むを得ず行っているケースがある。その場合、次周期以降にTESEを含め精子の確保ができた患者は融解し、ICSIを行っている。2010年から2014年に実施した35症例(36.9±4.5歳)61個の結果を示すと、生存率80.3%(49/61)、正常受精率71.4%(35/49)、分割率88.6%(31/35)であった。移植はDay2分割胚2例、凍結胚盤胞移植5例で4名の健児が得られ、凍結卵子の

融解あたりの生産率は6.6% (4/61)となった。

以上のことから、エンブリオロジストから見た乳がん患者の卵子凍結として、今後の課題に挙げられるのは生存率および受精率の向上である。そのうえで、現疾患治療背景を考慮し、適正な凍結個数とは果たして何個なのか検討していく必要があると示唆された。

## 凍結融解卵子を用いたTESE-ICSIの臨床成績



## 中條 友紀子

京野 廣一  
京野アートクリニック

## 略 歴

2001年3月 宮城県総合衛生学院卒業  
臨床検査技師資格取得  
レディースクリニック京野入職  
2007年3月 京野アートクリニック開設に伴い異動  
2012年9月 京野アートクリニック高輪開設に伴い異動  
2013年9月 京野アートクリニック異動

日本卵子学会認定胚培養士，日本臨床エンブリオロジスト学会理事

## はじめに

当院では，精巣内精子回収法（以下，TESE）を実施する症例に対し，状況に応じてTESE前に卵子凍結を行っている。

卵子凍結による最初の妊娠は1986年にChen Cらにより報告され<sup>1)</sup>，その後も生殖医療における臨床的技術として多くの施設によって取り組まれ，当院でも臨床成績を報告している<sup>2)</sup>。2013年にはASRM（米国生殖医学会）より卵子凍結のガイドラインが発表され，臨床治療の技術と認められた<sup>3)</sup>。卵子凍結の技術は，化学療法や放射線療法が必要ながん患者にとって，妊孕性温存の選択肢の一つとなる（医学的適応）<sup>4,5)</sup>。また，日本国内において将来の妊娠に備え，健康未婚女性の卵子凍結が増加することが予測される（社会的適応）。

今回，TESE-ICSIにおける凍結卵子と新鮮卵子の臨床成績の比較と凍結卵子のtime-lapse観察による胚発生の動態について検討した。

## 対象と方法

臨床成績の比較については，対象を1996年4月から2013年12月までに当院で採卵およびTESEを行い，新鮮TESE精子によるICSIを行った246症例269周期とした。新鮮卵子をICSIに供した群を新鮮卵子群，凍結融解卵子をICSIに供した群を凍結卵子群とし，さらにOA群，NOA群，KS群の3群に分け，受精率，胚発生，妊娠率，流産率について検討した。

Time-Lapse cinematography (TLC) を用いた動的形態解析は，2012年9月から2013年12月までに当院で採卵を行い，TESE症例に限らず，TLC観察を行った症例について，PN出現時間 (tPNa)・消失時間 (tPNd)，2，3，4，5，8細胞までの分割完了時間 (t2，t3，t4，t5，t8)，第一分割終了から第二分割開始までの時間 (cc2)，3細胞から4細胞に到達するまでの時間 (s2) を凍結卵子と新鮮卵子について比較検討した。

統計処理は， $\chi^2$ 検定もしくはt検定を用いて行った。

## 結果

TESE後の精子回収率はOAで95.1% (174/183)，NOAは26.0% (75/288)，KSは37.0% (20/54)であった。凍結卵子群の融解後の生存率は87.2% (348/399)であった。

新鮮卵子群と凍結卵子群の各々の臨床成績を表1に示す。受精率に有意差は認められたものの，その他の項目で有意差は認められなかった。

TLC観察を行った凍結卵子と新鮮卵子の各々の時間について，胚盤胞に到達した胚の2群間の分割時間を比較検討した結果，凍結卵子群において新鮮卵子群と比較し，t4，t8，s2について有意に分割の遅延が認められた。(t4: 41.2 ± 5.2 vs. 38.9 ± 4.6, t8: 67.9 ± 12.2 vs. 59.7 ± 10.8, s2: 3.8 ± 4.5 vs. 1.8 ± 3.1: P=0.057)

## 考察

今回の結果より，受精率は，OA群において新鮮卵子群と比較し凍結卵子群で有意に低い結果 (P<0.01)であったが，NOA群とKS群では有意差は認められなかった。その後の胚発生や妊娠率，流産率は各群において有意差は認められなかった。

卵子凍結のメリットとして，TESE精子の凍結によるダメージの回避が挙げられる。NOA症例においては，回収される精子が極少数である可能性が高く，凍結によるダメージも大きいこと，また，凍結TESE精子を用いたICSIにおいて妊娠率が低いとの報告もあり<sup>6)</sup>，なるべく新鮮なTESE精子を用いることが望ましいのではないかと考える。また，TESE組織を凍結している症例では，少数の卵子しか採卵できない場合，より多くの卵子を集めてから凍結精子を融解するほうが再度のTESEを行う可能性も低くなり，患者負担も減少する可能性はある。

しかしながら，NOA症例のTESEの精子回収率はOA症例に比べて低く，TESE前の卵子凍結は患者にとって身体的，経済的，精神的負担は増大するであろう。また，胚盤胞に到達した凍結卵子は，胚盤胞に到達した新鮮卵子の胚発生と比較し，第二分割完了時間やその後の分割時間が遅延している傾向にあり，卵子凍結の影響が

表1 OA群, NOA群, KS群の臨床成績

	OA		NOA		KS	
	凍結卵子	新鮮卵子	凍結卵子	新鮮卵子	凍結卵子	新鮮卵子
周期数	25	135	26	64	10	11
卵数	211	1647	142	487	53	78
受精率 (%)	59.6 <sup>*a</sup> (118/198)	69.7 <sup>*b</sup> (906/1300)	57.0 (81/142)	58.9 (287/487)	56.6 (30/53)	66.7 (52/78)
Day3 良好胚率 (%)	37.5 (39/104)	35.8 (230/642)	35.0 (28/80)	42.2 (89/211)	58.6 (17/29)	41.2 (21/51)
胚盤胞到達率 (%)	45.9 (39/85)	50.7 (272/537)	39.3 (22/56)	56.0 (94/168)	52.4 (11/21)	65.0 (26/40)
良好胚盤胞率 (%)	20.0 (17/85)	19.2 (103/537)	16.1 (9/56)	24.4 (41/168)	18.2 (4/22)	22.5 (9/40)
妊娠率 (%) (/ET)	37.2 (16/43)	44.1 (101/229)	28.6 (10/35)	41.4 (36/87)	43.8 (7/16)	61.5 (8/13)
流産率 (%)	18.8 (3/16)	21.8 (22/101)	30.0 (3/10)	25.0 (9/36)	28.6 (2/7)	25.0 (2/8)

\*a, b: p < 0.01

推察された。そのような点については、インフォームド  
コンセントをしっかりと得たうえで進めなければならず、  
考慮が必要である。

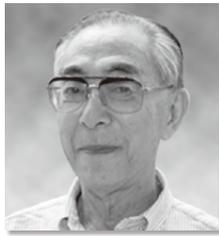
今回の検討において、凍結卵子を用いた治療により、  
22名(OA12名, NOA 6名, KS 4名)の児が出生して  
おり、出生時の異常は認められていないものの、予後調  
査についてはまだ始まったばかりである。凍結卵子を用  
いた出生児の予後調査は、大規模では行われておらず、  
長期的かつ大規模な予後調査が必要不可欠である。

卵子凍結による治療は、卵子凍結を行うメリットとデ  
メリットをよく考慮したうえで進める必要がある。

#### 参考文献

- 1) Chen, C.: Pregnancy after human oocyte cryopreservation. Lancet, 1: 884-886, 1986.
- 2) Nakajo, Y., Hattori, H., Sato, Y., Kanto, S., Araki, Y., Kyono, K.: Vitrified-Warmed and Fresh Oocytes Yield Comparable Outcomes When Fresh Testicular Sperm Is Utilized. J. Clin. Embryol., 16: 138-144, 2013.
- 3) The Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology. Mature oocyte cryopreservation: a guideline. Fertil. Steril., 99: 37-43, 2013.
- 4) Kyono, K.: Fertility Preservation. J. Mamm. Ova. Res., 30: 101-108, 2013.
- 5) Doshida, M., Nakajo, Y., Toya, M., Kyono, K.: A live birth from vitrified-warmed oocytes in a Philadelphia chromosome-positive acute lymphoid leukemia patient 5 years following allogeneic bone marrow transplantation and after a magnitude 9.0 earthquake in Japan. Reprod. Med. Biol., 12: 187-191, 2013.
- 6) Fukunaga, N., Haigo, K., Kyono, K., Araki, Y.: Efficiency of using frozen-thawed testicular sperm for multiple intracytoplasmic sperm injections. J. Assist. Reprod. Genet., 18: 634-637, 2001.

# The dawn and future of IVF



## Ryuzo Yanagimachi

University of Hawaii Medical School,  
HI, USA

### Past and present employment

1960-1964	Research scientist. Worcester Foundation for Experimental Biology, Shrewsbury, MA, USA (Mentor: Dr. M.C. Chang)
1964-1966	Lecturer (temporal), Faculty of Science, Hokkaido University, Sapporo, Japan
1966-2004	Assistant Professor, Associate Professor and Professor, Department of Anatomy and Reproductive Biology, University of Hawaii Medical School, Honolulu, HI, 96822
1999-2004	Director, Institute of Biogenesis Research, University of Hawaii Medical School, Honolulu, HI 96822
2005- present	Professor Emeritus, University of Hawaii Medical School, Honolulu, HI 96822

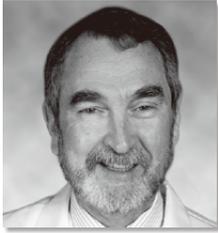
Before 1950s very little was known about mammalian fertilization. This was mainly due to the difficulty in collecting eggs from the female tract and examining them under controllable conditions. It was Thibault and his associates (1954, 1956) who first presented unequivocal evidence of successful IVF in mammals. They demonstrated the presence of spermatozoa in rabbit eggs after in vitro insemination using the spermatozoa collected from the female genital tract of mated animals. It was Chang (1952) and Austin (1952) who first reported that mammalian spermatozoa require a physiological changes - called "capacitation" within the female tract before they become fertilization-competent. These studies triggered intensive studies of mammalian fertilization. IVF is a powerful tool to study the process and mechanism of mammalian fertilization. It was also expected to enhance reproduction of laboratory and farm animals and serve as a powerful tool to overcome certain types of human infertility.

In 1960s only handful of researchers were interested and tried to fertilize human eggs in vitro. Motoyuki Hayashi (Toho University, Japan), Pierre Soupart (Vanderbilt University, USA), Howard Jones (Eastern Virginia Medical School, USA), Alex Lopata (University of Melbourne, Australia) and Robert Edwards (Cambridge University, England) were among them. All of them struggled with repeated unsuccessful attempts. They faced ethical resistance and criticism from religious people and even from some science colleagues. The birth of the first IVF baby in 1978 changed the field of human assisted reproduction. Thanks to a steady improvements of IVF-ET technologies, many infertile couples today are able to have their own children. However, 50-70% of all couples visiting infertility clinics today still remain childless.

The world we live in is by no means risk-free. This is

true for pregnancy. In humans, it is estimated that about 40% of fertilized eggs after natural conception have chromosomal aberrations. Although most of them are aborted before or during post-implantation development, few (~0.6% or higher) reach the term. About 3% of newborn infants are born with birth defects even after natural conception. The incidence seems increase with the advancement of maternal age. Recently, it has become clear that gene expression of gametes, zygotes and developing embryos is affected by the environment in which they are developing. Although it may be impossible to eliminate or prevent all genetic and non-genetic (epigenetic) errors, we should at least try to minimize them. Pregnancy through assisted reproduction can be and should be as safe as (and even safer than) natural conception.

## Culture media in the future



**Patrick Quinn,  
Ph.D.**

Sage IVF

Dr. Quinn graduated with a Bachelor of Agricultural Science degree from The University of Adelaide, Australia, in 1968 and undertook his PhD studies at The University of Sydney in Australia from 1969-72 under the supervision of Dr. Ray Wales. He obtained a postdoctoral fellowship at The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA during 1972-73, sponsored by Dr. Wes Whitten. From 1974 until 1981 he had an academic appointment at The University of Newcastle, Australia, rising to the rank of Senior Lecturer by 1980. He spent 1980 on sabbatical leave at the MRC Mammalian Development Unit in London, working with Dr. David Whittingham and Anne McLaren. In 1982 he joined the IVF program at The Queen Elizabeth Hospital, Adelaide, Australia with Dr. John Kerin and began his work with human IVF. While in this position, he developed his culture medium, HTF (Human Tubal Fluid). He went to the USA in 1986 to work with Dr. Richard Marrs and held several IVF laboratory director positions in Los Angeles until 1996. Dr. Quinn became involved in the commercial field of IVF culture media manufacture in 1996. He then held the position of Vice President of Research and Development at Sage In-Vitro Fertilization. He retired from CooperSurgical in June 2013 and retains the position as Emeritus VP of R&D and consultant to Cooper. Dr. Quinn has over 200 authored or co-authored peer reviewed papers, book chapters, abstracts and invited lectures over a career spanning more than four decades in reproductive biology.

### Historical development of culture media in human ART

The first culture media for culture of preimplantation mouse embryos were those designed by Whitten. Studies by Brinster clarified the requirement of both lactate and pyruvate and Whitten subsequently added all three energy sources, glucose, lactate and pyruvate that were able to support blastocyst development of mouse zygotes from certain strains of mice. This basic formulation is the basis for all subsequent media for preimplantation mammalian embryos and, in particular mouse and human embryos.

The development of specific media for human IVF began in the 1980s. Initially two subsets of media were used, simple media such as HTF and complex media such as Ham's F10. The simple media prevailed in use for culture of human embryos during the first 2-3 days of development because few embryo were available. However, better stimulation protocols which produced more embryos for continued culture required better culture media to support development to the blastocyst stage. In the late 1990s Gardner and Lane (5) added amino acids to a basic medium in a combination that provided good embryo development during the precompaction phase (Days 1-3) of development and the post-compaction phase (Day 3-5/6). Development of similar media by most commercial media producers has ensued. Gardner and Lane's approach of using two different media for the pre- and post-compaction phases of development have been called "back to nature". Another approach has been to use the same medium for

both the pre- and post-compaction phases of development; this approach has been called "let the embryo choose".

### Current and new media components

#### i. Inorganic Ions

All ART media contain the ions present in Krebs-Ringer bicarbonate solution. There are variations in the ratio and concentration of some of the inorganic components. When I developed HTF Medium I found that increasing  $K^+$  to lower the ratio of  $Na^+$  to  $K^+$  increased the rate of development of mouse zygotes. Another modulation of ion content in media is with  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ . In 1- and 2-cell hamster embryos there is an excessive uptake of  $Ca^{2+}$  occurring by inappropriate handling, metabolic perturbations and just by the act of collecting the embryos and placing them in culture, that reduces further development *in vitro*. The increase in intracellular  $Ca^{2+}$  is partly due to influx from the medium through calcium channels but it can be lessened by increasing  $Mg^{2+}$  concentration in the medium. This strategy has been adopted by several commercial ART media companies. For fertilization however that there is a  $Ca^{2+}$  spike in spermatozoa during the fertilization process so a lower  $Mg^{2+}$  concentration is required in fertilization medium.

Removal of phosphate and glucose from medium resulted in good human IVF outcomes. This was probably due to the excessive stimulation of glycolysis by the high levels of glucose and phosphate in control media. The addition of amino acids to media has negated this effect and most commercial ART media now contain

between 0.25 and 0.35 mEq/L of phosphate ions.

## ii. Energy substrates

This is a diverse topic that has been studied over the past 50+ years. Oocyte and early cleavage stage embryos do not utilize glucose but have low levels of oxidation of pyruvate. In later development, the utilization of glucose by glycolysis increases as does TCA cycle activity. This increases the rate of oxidative phosphorylation to provide greater amounts of ATP for biosynthesis and blastocoel cavity formation during the later stages of preimplantation development. Hence the concentration of glucose is increased in Blastocyst media. Glucose is required for sperm function in Fertilization Medium. On a practical note, care is needed with the storage of sodium pyruvate raw material. Pyruvate has limited aqueous stability converting to parapyruvate which is a metabolic inhibitor. Ethyl pyruvate and, to a lesser extent, methyl pyruvate, more stable esterified forms of pyruvate, improve mouse embryo development *in vitro*.

## iii. Amino acids

Amino acids have varied and important roles during early mammalian embryo development which range from biosynthetic precursors and energy sources to osmolytes, intracellular pH buffers, antioxidants, chelators and regulators of differentiation. Not only do amino acids alleviate stress on embryos and oocytes during culture, their presence prevents efflux of endogenous amino acids from the embryo during handling procedures such as oocyte collection, micromanipulation, cryopreservation and embryo transfer. The concentration and necessity for all amino acids during all of the preimplantation period have been debated. Gardner & Lane used non-essential amino acids during the precompaction phase whereas both non-essential and essential amino acids were present in medium for the post-compaction phase. Initially amino acids were used at the same concentration as in Eagle's medium. It is now recommended that the concentration of both non-essential and essential amino acids in media be half the concentration in Eagle's medium. The problems with ammonium accumulation in medium can be lessened by renewing the medium at least every 48 h and also substituting glutamine with the stable dipeptide, alanyl-L-glutamine or glycyl-L-glutamine which are stable at 37°C. Despite the suggestion that glycyl-glutamine may be a better source of stable glutamine for mouse embryos [45], there is a report in which human IVF was performed using KSOM<sup>AA</sup> containing either alanyl-glutamine or glycyl-glutamine and the alanyl-glutamine gave superior ART outcomes than glycyl-glutamine [46]. This illustrates the risk of extrapolating

from one species to another.

## iv. Vitamins

G2 Blastocyst medium was one of the first of the modern day media to contain vitamins based on positive results with mouse embryos. In studies of hamster embryos, only the water soluble vitamin pantothenate was found to stimulate the development of zygotes to the blastocyst stage. Cook IVF have added calcium pantothenate to both their Cleavage and Blastocyst media. Obviously this topic needs further study to determine which, if any, vitamins would help in ART media.

## v. Fatty acids, nucleic acid precursors, chelators and antioxidants

Fatty acids are beneficial for the development of mouse embryos *in vitro* but are inhibitory to fertilization. It is unknown whether nucleic acid precursors have any effect on embryo development *in vitro*. The major chelators and antioxidants that are known to function in IVF media are EDTA, pyruvate and low atmospheric O<sub>2</sub> concentration.

## vi. Proteins and growth factors

HSA is the traditional protein source used in human IVF. Supplementation with  $\alpha$  and  $\beta$  globulins improves success rates. Growth factors (GF) added to human ART media have stimulated the formation of blastocysts. So far, only one GF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) has been clinically tested and although there was some moderate increase in pregnancy rates and live births, using a mixture of GFs added to culture medium has been proposed rather than a single GF but more studies are required to determine dose and combination of GFs to use.

In addition to the composition of IVF medium, the way it is used has a major role in the success rates obtained. One needs to consider factors such as the oil overlay, gas phase, incubation chamber, embryo density, contact supplies and quality control/quality assurance practices. Emerging technology for the IVF lab are morphokinetic analysis for selection of embryos, vibration during culture and whether success rates are influenced by sequential media culture or a 1-step continuous culture medium. The bottom line is "good" medium used badly gives poor results.

References and a more detailed discussion of this topic is available in Quinn, P 2014 Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART, Cambridge University Press.

# Time-lapse imaging: the future has arrived



**Markus Montag,**  
M.Sc., Ph.D., Prof.

CEO iLabCoMM

Markus Montag obtained his PhD at the German Cancer Research Centre, Heidelberg in 1992. He then worked at NUH, Singapore with Prof SC Ng, the father of the first SUZI baby. In 1995 he became the laboratory director of the IVF Laboratory at the University of Bonn and was appointed Professor for Experimental Reproductive Medicine in 2009. In 2011 he became head of IVF Laboratory at the University of Heidelberg and founded a company, ilabcomm GmbH, for international consulting of reproductive laboratories and selected companies. Since June 2013 Markus works exclusively as CEO of ilabcomm; a major contractor of his consulting activity is FertiliTech, Denmark.

Markus has published more than 200 papers (> 130 peer reviewed) and more than 20 book chapters. He is actively involved in counselling IVF centres and educating young people worldwide and is a frequent lecturer.

Since the beginning of human IVF, embryo selection procedures are mainly based on morphological evaluation of the embryos at distinct time points during development followed by an evaluation at the time of transfer using standard microscopy. In combination with standard incubation technology, this does lead to disturbed culture conditions. In addition, only a minor part of the whole developmental process of an embryo can be assessed. These shortcomings were already known in the early days of IVF and one dream of that time was to visualize the entire development of an embryo without interruption.

It was the group of Mats Wikland from Gothenborg in Sweden, which first reported on time-lapse imaging in human IVF at the 1<sup>st</sup> Bourn Hall Meeting in 1981. However, it took more than another decade until further data were presented and the major players at that time were groups in Australia, Sweden and Japan. The solutions for time-lapse imaging were either inverted microscope equipped with an incubation hood at the microscope stage or smaller microscopes with adapted camera systems that were placed inside an incubator. Time-lapse at those times was hosted in academic research settings and far from being a technology that could be readily used in routine IVF.

The adaption of day 5 culture to blastocyst revealed the necessity to enable better embryo evaluation by qualitative as well as quantitative approaches. A major focus was towards predicting embryo implantation potential. As part of this and in search of making morphological evaluation of embryos comparable, Alpha and ESHRE produced a consensus paper recommending time-points that were considered to be crucial for embryo evaluation. However, although the consensus paper was a major step forward, it still relied on a few daily observations and did not attempt to quantify the dynamic

morphological changes over time, which is often referred to by the term morphokinetics. Routine clinical use of morphokinetic embryo analysis was until the recent introduction of commercial time-lapse based imaging systems not feasible.

The first two systems, which were introduced, followed different concepts. One was an insert for placement in a standard incubator; the other was a stand-alone, benchtop-like incubator with an integrated time-lapse system. Both systems were based on the use of Hofman modulation contrast. A third system – which was also following the concept of an insert into a standard incubator – used dark field imaging and a software detecting features of the first two cell divisions and predicting blastocyst development.

A general working principle is, that time-lapse imaging (TLI) provides automated acquisition of images for one or more embryos at pre-set time intervals. In combination with an integrated closed incubation system, it further enables the undisturbed culture of embryos. Recent publications highlight the benefit of undisturbed culture, which does result in better embryo development and higher blastocyst formation rates. The additional information gained by time-lapse allows then to de-select embryos based on criteria, which are known to have an impact on implantation. One such criterion is the fast division to the 3-cell stage after fading of the pronuclei. This so-called direct cleavage is associated with extremely low implantation rates. In view of this it is obvious, that time-lapse imaging does reveal cell cycle characteristics of developing embryos that were completely inaccessible before the era of time-lapse. By looking on the course of development rather than a certain cell stage at a distinct point in time, continuous embryo monitoring has introduced a paradigm shift in embryology. The major outcome is no longer if an

embryo has reached the blastocyst stage, but how it developed to blastocyst and if there were cell cycle characteristics that are considered as being unfavorable in the light of implantation.

Some studies have investigated the potential use of morphokinetic parameters to predicting the likelihood of an embryo for being aneuploid. Although this topic is still under debate, it seems clear that time-lapse is not a substitute for Preimplantation Genetic Screening (PGS) but that it can supplement PGS in different ways.

A hot topic in time-lapse is the use of models or algorithm that may enable to select embryos that fall within a certain scheme or pattern and can be ranked according to a morphokinetic score that may then be linked to the developmental viability of these embryos. Numerous attempts are currently undertaken in this respect and this topic will clearly dominate the coming years. However, already now time-lapse has changed the way in which embryo culture as well as evaluation and selection is performed. The ease of being always able to look on how an embryo developed and what it did at certain time-points is a relief in the sometimes hectic and time-pressed IVF routine. Being able to document continuous embryo development and showcase embryo characteristics that are suspicious or even clearly out of the normal range is a new base for education and even more for the discussion between all parties involved in an IVF treatment: the patients, the clinicians and the embryologists. Combined with the newest technologies in IT and the World Wide Web, time-lapse offers new possibilities for interaction within and between clinics and also new business approaches.

For sure time-lapse will not be a stand-alone technique in the laboratory, but it will very likely constitute the base for other technologies that give diagnostic insight into embryo physiology. The future will rely on combining the most effective means in order to get the best “picture” of the potential of an embryo. Incubation of embryos in a controlled environment and under constant assessment by time-lapse imaging will be one essential part of this.

# 日本の生殖医療を考える



## 吉村 泰典

慶應義塾大学 名誉教授

### 略 歴

1975年 慶應義塾大学医学部卒業  
1983年 米国ペンシルバニア病院research fellow  
1984年 米国ジョンズホプキンス大学instructor  
1986年 藤田保健衛生大学医学部産婦人科専任講師  
1990年 杏林大学医学部産婦人科助教授  
1995年 慶應義塾大学医学部産婦人科教授  
2014年 慶應義塾大学名誉教授  
新百合ヶ丘総合病院名誉院長

### 主な学会活動

日本産科婦人科学会理事(2007～2011年), 日本生殖医学会理事(2010年),  
日本産科婦人科内視鏡学会理事(2011年)

### 主な学会外活動

厚生科学審議会専門委員, 法制審議会委員, 内閣府総合科学技術会議専門委員, 文部科学省科学技術・学術審議会専門委員, 日本学術会議生殖補助医療の在り方検討委員会委員などを歴任  
2013年一般社団法人吉村やすのり生命いのち環境研究所 代表理事  
2013年より内閣官房参与(少子化対策・子育て支援担当)

### 受賞歴

松本賞, 日本産科婦人科学会栄誉賞, 福澤賞 受賞

地道な生物学の成果と不妊治療が合従して登場した体外受精・胚移植(IVF-ET)技術は宿志を実現した感があり、革新的な不妊症の治療法として導入され、瞬く間に全世界に普及していった。これまでに全世界で500万人以上、わが国でも27万人以上の子どもがこの生殖補助医療技術(ART)によって誕生している。エドワーズ博士はこのIVF-ETを開発し、生殖医療にブレークスルーを起こした業績により、2010年のノーベル医学・生理学賞を受賞した。生殖医療に従事するわれわれ臨床医にとって正しく宿望を遂げた受賞といえる。

近年の生殖医学の進歩にはめざましいものがあり、生殖現象の解明のみならず、ヒトの生殖現象を操作する新しい技術も開発されている。細胞生物学や生理工学の飛躍的進歩に伴って生殖医学も革命を受けつつあるといっても過言ではない。近年、がん患者に対する治療法の進歩に伴う治療成績の向上により生存率の改善がみられるようになってきており、卵子や卵巣の凍結保存による妊孕能温存技術が臨床応用されるようになっている。このような生殖医学の発展は、実は発生生物学や生殖内分泌学の進歩に負うところが大きい。

この生殖現象に深くかかわる生殖医療は、新しい生命の誕生がある点で、すでに存在する生命を対象とする他の医療と根本的に異なった特性をもっている。今世紀に入り、ますます先端生理工学技術は進歩をつづけている。とりわけ体細胞クローン技術や胚性幹細胞、iPS細胞の再生医療への応用は、今後の生殖医療の展開にブレークスルーをもたらしてくれるかもしれない。

# Pragmatic approach to the older patient and failed patients by ART in the U.S.A.



## Marcelle I. Cedars, M.D.

Professor and Vice Chair  
Department of Obstetrics, Gynecology  
and Reproductive Sciences  
Director, Division of Reproductive  
Endocrinology and Infertility  
University of California, San Francisco,  
USA

Dr. Cedars has almost 30 years of experience in ART including over 15 years directing IVF laboratories. She has a special interest in PCOS and Reproductive Aging. At UCSF, she has helped to build a partnership between the strong basic science and clinical care to accelerate the pace of learning and improve care for women.

Dr. Cedars is a Past President of the Society of Reproductive Endocrinology and Infertility, has been a member of the Executive Board of the American College of Obstetricians and Gynecologists and currently serves on the Executive Board of ASRM and as Chair of the Publications Committee. She has authored more than 150 peer-reviewed publications and is an NIH-funded researcher. She served as Chair of the FDA Panel for Obstetrical and Gynecologic Devices and is an Associate Editor for Fertility Sterility and Human Reproduction Update.

## Abstract

Age is strongest predictor of reproductive success. With increasing maternal age, monthly fertility rates decline and risk for spontaneous pregnancy loss increases. While we do not fully understand the underlying biological mechanisms, this impact is driven by the decline in oocyte numbers, and perhaps more importantly, the increase in oocyte aneuploidy. Thus, assessment of ovarian “age” and its impact on reproduction are critical as we manage patients in the clinic. This presentation will include information regarding the assessment of ovarian age, the usefulness of this information, and how this information impacts patient care. Additionally, we will discuss newer options for treating women with low ovarian reserve. We will discuss stimulation options as well as issues relating to genetic screening of embryos and the potential for oocyte “regeneration” through medical and manipulative techniques. Lastly, we will discuss 3<sup>rd</sup> party reproduction and its impact on considering family building options for couples.

## Getting Older Women Pregnant

Spontaneous conception - The earliest study to evaluate ovarian reserve markers and spontaneous conception found no additive benefit of assessing either AMH or AFC in a group of patients with unexplained infertility or mild male factor. Lowered levels of both AMH and AFC have been associated with increased time to conception in fecundibility studies. Where only a single follicle is produced monthly and thus “response” (oocyte number) does not play a role, the fertilization and implantation of a single oocyte - hence “quality” - seems to be reflected by known markers of oocyte quantity.

Intrauterine Insemination (IUI) - There have been only a few studies evaluating ovarian reserve markers in IUI cycles. While limited in number, the studies found no

additive benefit over age. It is not clear if stimulation with IUI may overcome some of the “subfertility” noted in spontaneous conception since the number of follicles produced during stimulation has been shown in all studies to correlate with successful pregnancy.

The impact of age, alone, appears to be high for IUI success perhaps more so than for other treatments. It is not clear, given the importance of oocyte number (due to high aneuploidy risk) in older women, that stimulation with gonadotropins might not have increased this low success rate. Studies to address this question have been small and increasingly, the recommendation is to move directly to IVF for older patients (although it should be remembered for many of the same reasons - decreased oocyte quantity and quality - success rates with IVF are also low in women > 42 years of age utilizing their own eggs).

Assisted Reproductive Technology (ART) - AMH and AFC serve a primary role in determining stimulation protocols. This is helpful both in terms of counseling regarding expectations for oocyte number but also ultimate pregnancy success - especially as women age and a higher percentage of retrieved oocytes are genetically compromised.

As discussed above, age impacts both quantity and quality of oocytes. And while there is intrinsic variability in the quantity of oocytes/follicles for any given age, evidence suggests age is still the strongest predictor of live birth in ART. As previously discussed, with increasing age there is an increasing percentage of genetically abnormal oocytes. Thus, it would potentially take more oocytes to “identify” one that is normal and capable of healthy development and delivery. Thus, it is not illogical to think, especially with increasing age, the number of oocytes retrievable would play a much greater role in ultimate pregnancy outcome. And, as both AMH and AFC predict oocyte number, there is an additive benefit



# ART時代の子宮内膜症治療



## 大須賀 穰

東京大学大学院医学系研究科  
産婦人科学講座 教授

### 略 歴

1985年	東京大学医学部卒業
1995年	医学博士(東京大学)
1995～1997年	米国スタンフォード大学産婦人科留学
2004年	東京大学医学部附属病院女性診療科・産科講師
2011年	東京大学大学院医学系研究科産婦人科学講座准教授
2013年	東京大学大学院医学系研究科産婦人科学講座教授

日本産科婦人科学会代議員, 日本産科婦人科内視鏡学会理事, 日本生殖医学会理事ほか多数

子宮内膜症は不妊症の主たる原因の一つである。その機序として解剖学的異常や腹腔内環境、子宮内膜の異常などが示唆されている。ARTは子宮内膜症にともなう解剖学的異常に対して非常に有効な治療法であることは間違いない。一方で、子宮内膜症の存在がARTに与える影響については種々の意見がある。メタアナリシスによるデータから子宮内膜症の存在がARTの成績を低下させるといわれてきたが、最近の報告では子宮内膜症性嚢胞の存在を除外すると卵管因子における成績と変わらないとされている。

子宮内膜症性卵巣嚢胞についてはその存在が採卵数を低下させることが報告されている。一方で、子宮内膜症性卵巣嚢胞の摘出手術を受けた卵巣では卵巣刺激の際の発育卵胞数が低下することも知られており、その取り扱いが難しい。このため、ART施行がすでに決まっている患者の場合は、そのままARTを施行するのが妥当と思われる。ただし、子宮内膜症性卵巣嚢胞は悪性化しやすいことも知られているため、悪性所見がないことをMRI、必要に応じてPETなどで確認しておく必要がある。また、ARTを繰り返している間に悪性化することもあり得るので、子宮内膜症性卵巣嚢胞がある状態でART治療を続ける場合は注意が必要である。同様に、感染症にも十分な注意を払う必要がある。採卵後に嚢胞に感染すると、腹膜炎などを発症して妊孕性そのものを失う危険性がある。

未婚の患者で若年者の場合、4～6cm以上の子宮内膜症性卵巣嚢胞については腹腔鏡下での摘出術が原則である。手術についてはできるだけ卵巣を愛護的に扱い、卵巣実質の損失を最小限にする必要がある。すなわち、子宮内膜症性卵巣嚢胞の摘出術は難度の高い手術であり、経験の乏しい術者が安易に手術を行うべきではない。また、嚢胞摘出後は高率に再発をきたすため、低用量エストロゲン・プロゲスチン製剤もしくはプロゲスチン製剤などにより長期間にわたり再発の抑制を行うことが望ましい。卵巣嚢胞が小さい場合、もしくは存在しない場合の子宮内膜症は薬物療法が選択される。

海外においては、子宮内膜症患者のARTにおいてART施行前にGnRHアナログを3～6カ月使用すると妊娠率が向上するというRCTがいくつかある。しかし、対象が本邦のARTの対象よりはるかに若年であり、一般化できるとはいえない。

最近の話題として、ART妊娠が周産期予後に影響を与える可能性があるが、なかでも、子宮内膜症はART妊娠における早産を増加させるという報告がある。また、前置胎盤や分娩後出血を増加させるという報告もされており、今後、子宮内膜症患者におけるART妊娠が増加していくと考えると、周産期予後については一層のデータの集積と検討が必要である。

ARTと子宮内膜症についての今後の展望としては、第一に、国民全体において子宮内膜症そのものを予防し、発症を減らすことが期待される。一方で、子宮内膜症がIVM、卵子凍結に与える影響などは今後の検討課題である。

## Breast Cancer and ART



**S. Samuel Kim,  
M.D., FACOG.**

Professor and Head,  
Reproductive Endocrinology  
and Infertility  
University of Kansas  
Medical Center

S. Samuel Kim, M.D., has contributed to the advances of fertility preservation as a pioneer in ovarian tissue cryopreservation and transplantation, and his seminal work has been recognized worldwide. Prof. Kim founded the International Society for Fertility Preservation and served as the 2<sup>nd</sup> President of the Society. Prof. Kim graduated from Seoul National University College of Medicine. Thereafter, he completed his resident training at the Temple University in Philadelphia and fellowship at the University of Washington in Seattle. In addition, he served as a post-doctoral research fellow at the University of Leeds in England. Prof. Kim is Professor and Head of the Division of Reproductive Endocrinology at the University of Kansas School of Medicine in Kansas City. He currently serves as an editorial board member of four reputable journals including *Fertility Sterility*.

Breast cancer is the most common cancer in women. Currently, more than 13 million cancer survivors are living in the USA. Among those, breast cancer survivors are approximately 2.6 million. New regimens and strategies for cancer therapy resulted in increased cancer survival rates, especially in breast cancer patients. As a consequence, fertility is a very important quality of life issue for cancer survivors who are in reproductive age.

Although breast cancer is treated surgically, adjuvant chemotherapy and/or hormone therapy are required after surgery in most cases. Indeed, adjuvant or neo-adjuvant chemotherapy is partially responsible for improvement in breast cancer specific survival. However, it is frequently gonadotoxic and causes loss of fertility (especially with regimens containing high dose alkylating agents). Most women in reproductive age desire to preserve fertility, but frequently they do not receive adequate information about fertility preservation. Failure to discuss fertility before cancer treatment can fuel later feelings of grief and regret. Therefore, it is important to address issues related to fertility including fertility preservation options prior to initiating gonadotoxic cancer treatment.

Fertility preservation before cancer treatment is strongly recommended and ideally, all young cancer patients in reproductive age should be offered for consultation. There are several factors to be considered before fertility preservation which include treatment regimens (type and dose of chemotherapeutic agents, number of cycles), age and ovarian reserve, how soon to start chemotherapy, prognosis of the disease, and financial issues. Of ovarian reserve markers, AMH and AFC are more reliable in women with breast cancer.

The main strategies for fertility preservation are based on assisted reproductive technologies, such as cryopreservation of embryos or oocytes. Both embryo and oocyte cryopreservation are well established

technologies, which require controlled ovarian stimulation (COS). Gonadotropin, the main agent for COS, increases the peak estradiol ( $E_2$ ) level and may accelerate the tumor growth in ER+ breast cancer. To lower the serum  $E_2$  levels, use of low dose gonadotropin in combination with tamoxifen or letrozole has been attempted with good results. When letrozole plus gonadotropin is used for COS, recurrence rates of breast cancer do not appear to increase at 2 years of follow-up. Another problem with COS in breast cancer patients is a time factor, as it can delay cancer treatment. It usually takes for approximately 2 weeks of stimulation before egg retrieval. However, it can further delay cancer treatment up to 6 weeks depending on where in the menstrual cycle the patient presents. To minimize the delay of cancer treatment, random start COS has been proposed in cancer patients as a method for urgent fertility preservation. Contrary to the conventional COS, ovarian stimulation can be started anytime of the menstrual cycle with random start COS. Indeed, scientific studies showed that multiple follicular waves exist not only in animals but also in humans. Thus, synchronization of follicular wave emergence to gonadotropin can be done even during the luteal phase.

Ovarian tissue cryopreservation is another strategy for fertility preservation, and it may be the only option for breast cancer patients who need treatment without delay (such as rapidly growing tumor) or who are unwilling to undergo ovarian stimulation. Cryopreservation of ovarian tissue has been successful, although it may need further optimization. The bigger issue with this option is how to mature primordial follicles in stored ovarian tissue when the patient is ready to have a child. At present, autotransplantation of frozen-thawed tissue is the only realistic method to restore fertility. To date, more than 30 healthy babies have been born worldwide

after transplantation of frozen-thawed ovarian tissue to the orthotopic site except one (which was heterotopic).

In summary, team work between cancer specialists and fertility specialists is imperative to provide an appropriate medical care for cancer patients who desire fertility preservation. Fertility preservation would not be possible without the emergence of various ART and cryotechnologies. For women with breast cancer, oocyte or embryo cryopreservation should be the first-line option if there is sufficient time for ovarian stimulation. However, ovarian tissue cryopreservation is recommended if cancer treatment cannot be delayed or the safety issue is a concern for women with ER+ tumor.

## 卵巢組織凍結・移植とがん・生殖医療



### 鈴木 直

聖マリアンナ医科大学  
産婦人科学 教授

#### 略 歴

1990年3月 慶應義塾大学医学部卒業  
4月 慶應義塾大学医学部産婦人科入局 研修医  
1993年4月 慶應義塾大学大学院(医学研究科外科系専攻)入学(指導:野澤志朗教授)  
1996年4月～1998年9月  
米国カリフォルニア州バーナム研究所 postdoctoral fellow  
1997年3月 慶應義塾大学大学院(医学研究科外科系専攻)博士(医学)取得  
2005年8月 聖マリアンナ医科大学産婦人科学講師  
2011年4月 聖マリアンナ医科大学産婦人科学教授  
2012年4月 聖マリアンナ医科大学産婦人科学教授(講座代表)

日本産科婦人科学会専門医, 日本がん治療認定医, 日本婦人科腫瘍学会専門医,  
日本臨床細胞学会細胞診専門医, 緩和ケアの基本教育に関する指導者(日本緩和医療学会)

若年がん患者に対する卵巢組織凍結施行に関する Donnez による初めての報告<sup>1)</sup> から16年が経過し, ホジキン病患者による初めての生児出産の報告<sup>2)</sup> から10年が経過した現在, 欧米では本技術は全ての若年女性がん患者に選択肢として提供すべき医療行為の一つと認識されている。卵巢組織の凍結保存は, 受精卵凍結や卵子凍結と比べて, ①原始卵胞の数をより多く保存できる, ②月経周期に関係なく施行(卵巢摘出)できる, ③経腔操作の難しい小児がん患者にも適応できる, または未婚女性も適応となる, ④生着卵巢組織からのエストロゲン分泌によるホルモン補充ができる, などというメリットがある。Donnez, Andersen, そして Pellicer らの3つの研究グループによると, 卵巢組織凍結・移植はこれまでに60名に施行されており, そのうち73%の患者で化学療法施行前に卵巢が摘出されている<sup>3)</sup>。卵巢組織凍結が適応された疾患は血液腫瘍疾患が35%, それ以外の悪性腫瘍疾患が45%, ターナー症候群や早発閉経の家族歴などの非悪性疾患が20%であった。なお移植後, 93%の患者で卵巢機能の回復(卵胞の発育)がみられ, 回復が確認できなかった患者の多くは組織学的検査で残存卵胞が確認できなかったと報告している<sup>3)</sup>。

現在標準的な卵巢組織凍結法は緩慢凍結法であり, 残存卵巢(同所)移植の利点を活かし半数以上は自然妊娠後に出産に至っている<sup>4)</sup>。なお, 妊娠例の多くは30歳未満であり, 卵巢組織凍結時の年齢は結果予測因子となるとしている。一方, 卵巢組織凍結法の新しい技術としてガラス化法を用いた基礎的な実験報告が2009年以降散見されている。Keros らは, ヒト卵巢組織を緩慢凍結法あるいはガラス化法で凍結した後に電子顕微鏡で形態を観察した結果, ガラス化法による凍結で間質の形態が有意に良好であったと報告している<sup>5)</sup>。本邦からは, Kagawa らがウシとヒト卵巢組織を用いてガラス化法にて卵巢組織を凍結し, 融解後の卵巢組織内の卵子のバイオアベイラビリティを検討した結果, 対照群である新鮮卵巢組織と比較して同等であったと報告し, ガラス化卵巢組織凍結用デバイスを作成している (Cryo Tissue

キット:北里バイオファルマ)<sup>6)</sup>。

一方, 我々の研究グループ(IVF なんばクリニック:森本義晴先生, 橋本周先生:近畿大学, 細井美彦先生ら)は, ガラス化法の新しいデバイスを作成し (Ova Cryo Device Type Mキット:北里バイオファルマ), 卵母細胞へのダメージを評価(電子顕微鏡)する目的で, 2種類の耐凍剤 VSEGP:35%(v/v) Ethylene glycol(EG) + 5%(w/v) PVP + 0.5 M sucrose と, VSED:20%(v/v) Ethylene glycol(EG) + 20%(v/v) DMSO + 0.5 M sucrose を用い, 5分, 10分, 20分という3種類の凍結時間で至適なガラス化の条件を比較検討した<sup>7)</sup>。その結果, VSEGPを用いた5分間の浸透時間による条件で, 組織学的に卵巢皮質内の卵胞および細胞小器官の形態をより安定させる事実を確認した<sup>13)</sup>。さらに, カニクイザルを用いてその条件で卵巢組織凍結(ガラス化)・融解移植を施行した結果, 良好な胚の獲得に成功した<sup>8)</sup>。そして, 本前臨床試験の結果<sup>14)</sup>を踏まえて, 2010年1月に聖マリアンナ医科大学倫理委員会によって承認された臨床試験「若年女性がんおよび免疫疾患患者のQOL向上を志向した卵巢組織凍結ならびに自家移植」を開始している。2012年12月には, ガラス化法による卵巢組織・融解移植による世界初の生児獲得(早発閉経患者)に成功し<sup>9)</sup>, 2014年5月現在2例の生児を得ている。緩慢凍結法は高額な機器を購入する必要があることから, ガラス化法の最大の利点は, キットさえ用いればどこでもいつでも実施可能な点にある。しかしながら, より安全性が高く至適な卵巢組織凍結法がどちらの凍結方法であるかに関して, さらなる検討が必要である。最新のがん患者における妊孕性温存の指針である米国臨床腫瘍学会2013指針では, 卵巢組織凍結は依然として実験的段階の診療であると記されている (<http://www.asco.org/quality-guidelines/fertility-preservation-patients-cancer-american-society-clinical-oncology>)。しかし, 卵巢組織凍結保存はより多くの卵子を保存できるだけでなくエストロゲン分泌によるホルモン補充ができるというメリットがあり, 妊孕性の温存だけでなく卵巢欠落症状

の改善やエストロゲン低下による心血管系障害の予防や骨密度低下を緩和することができる可能性も有している。日本産科婦人科学会は2014年5月に会告として「医学的適応による未受精卵子および卵巣組織の採取・凍結・保存に関する見解」を発表した<sup>10)</sup>。その内容の一部を以下に抜粋する。「悪性腫瘍など(以下、原疾患)に罹患した女性に対し、その原疾患治療を目的として外科的療法、化学療法、放射線療法などを行うことにより、その女性が妊娠・出産を経験する前に卵巣機能が低下し、その結果、妊孕性が失われると予測される場合、妊孕性を温存する方法として、女性本人の意思に基づき、未受精卵子を採取・凍結・保存すること(以下、本法)が考えられる。本法は、原疾患治療で発生する副作用対策の一環としての医療行為と考えられるので、治療を受ける時期に挙児希望がない場合でも、本人が希望する場合には医療行為として認める必要がある。」「なお、同じ目的で行われる卵巣組織の採取・凍結・保存については未受精卵子の場合と同じ医療行為に属するものであり、基本的に本法に含まれるものと考え、本見解を準用する。」

今後、より至適な卵巣組織凍結法が開発され、日本産科婦人科学会の会告に従って高い倫理観を持ってその技術が臨床応用され、医師のみならず患者にも本技術が浸透されることが望まれる。本講演では、卵巣組織凍結・移植に関するこれまでの流れから最近のトピックスに関して解説させていただく。

#### 参考文献

- 1) Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., et al.: Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*, 364: 1405-1410, 2004.
- 2) Donnez, J., Bassal, S.: Indications for cryopreservation of ovarian tissue. *Hum. Reprod. Update*, 4: 248-259, 1998.
- 3) Donnez, J., Dolmans, M. M., Pellicer, A., et al.: Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. *Fertil. Steril.*, 99: 1503-1513, 2013.
- 4) Donnez, J., Silber, S., Andersen, C. Y., et al.: Children born after autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue. A review of 13 live birth. *Ann. Med.*, 43: 437-450, 2011.
- 5) Keros, V., Xella, S., Hultenby, K., et al.: Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. *Hum. Reprod.*, 25: 1670-1683. 2009.
- 6) Kagawa, N., Silber, S., Kuwayama, M.: Successful vitrification of bovine and human ovarian tissue. *Reprod. Biomed. Online*, 18: 568-577, 2009.
- 7) Hashimoto, S., Suzuki, N., Yamanaka, M., et al.: Effects of vitrification solutions and equilibration times on the morphology of cynomolgus ovarian tissues vitrified ultra-rapidly by direct plunging into liquid nitrogen. *Reprod. Biomed. Online*, 21: 501-509, 2010.
- 8) Suzuki, N., Hashimoto, S., Ishizuka, B., et al.: Assessment of long-term function of heterotopic transplants of vitrified ovarian tissue in cynomolgus monkeys. *Hum. Reprod.*, 27: 2420-2429, 2012.
- 9) Kawamura, K., Suzuki, N., Hsueh, A. J., et al.: Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles

for infertility treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110: 17474-17479, 2013.

- 10) 日本産科婦人科学会倫理委員会：医学的適応による未受精卵子および卵巣組織の採取・凍結・保存に関する見解。 *日産婦誌*, 66, 1291-1293, 2014.

## 卵子保存：過去・現在・未来



### 桑山 正成

リプロサポートメディカル  
リサーチセンター 所長

#### 略 歴

1997年 北海道大学大学院獣医学研究科(博士号)  
1999年 加藤レディースクリニック先端生殖医学研究所代表  
2010年 リプロサポートメディカルリサーチセンター所長

J. Reproductive BioMedicine Online エディター, 明治大学, 国際医療福祉大学非常勤講師,  
先端不妊治療施設学術技術顧問(12カ国, 58施設), 公表論文数102報, 学会発表数364報

1986年, ヒト卵子保存成功例が初めて報告されたが, その後10年間余りも再現されず, 胚の凍結利用が急速に普及する中で, 卵子凍結は困難な技術とされた. 一方, 同じ1986年ガラス化保存を用いた哺乳類胚初の成功例が報告され(Rall & Fahy), その後, ガラス化溶液や冷却・加温法の改良により, ついに1998年, 最も凍結が困難とされたブタ卵子の凍結もガラス化保存の応用により可能となった(Nagashima & Kuwayama). 日本で生まれたこの急速冷却ガラス化保存法は翌年, ヒト卵子に応用されて初の臨床成功例が得られ(Kuwayama), 直ちに2000年, 再現性の高い実用的な手法(Cryotop method:Kuwayama)へ改良されて急速に世界へ広がっていった. その後, 40カ国以上で数10万例を超える膨大で良好な臨床実績により, 卵子ガラス化保存の高い臨床的有効性と安全性が証明され, 長い倫理課題の検討を重ねながら, 現在では我が国でも生殖医療の一オプションとして定着してきた. 近年, この急速冷却ガラス化保存法はさらに溶液やプロトコールが大きく改良され, 未成熟卵子から成熟卵子において, 特にデリケートながん患者や高齢患者由来の卵子においても解凍後ほぼ100%の生存率が得られる極めて有効で安全な非侵襲的ガラス化保存法(Cryotech method:Kuwayama, 2012)として完成し, 再び日本発で世界中に広まりつつある.

凍結保存とは, 生きて細胞に, 使用するまでの時間的, 距離的余裕を与えるものである. すなわち, Cryotech methodに代表される非侵襲的卵子ガラス化保存が技術的に可能になったことで, 現時点で正常な卵子を有するすべての女性の将来への妊孕性温存が現実的となった.

個人レベルでの妊孕性温存の適応例としては, がん治療など原疾患の治療により妊孕性を喪失する可能性がある女性患者, 社会的, 個人的理由により卵子老化による妊孕性を失うすべての女性や性転換, 出兵前の卵子保存がすでに実現している. 細胞レベルでは, 卵子提供プログラムでの利用が圧倒的に多く, また非刺激周期の成熟卵子のIVF治療用のストックやIVFラボを持たない地域への凍結卵子/胚輸送を含んだIVCサービスにも

応用されている.

本講演では2001年に加藤レディースクリニックで加藤修院長の英断の下で実施された, ガラス化法を用いた初めての血液がん女性の妊孕性温存症例の経過も紹介する. 名古屋日赤より依頼を受けた悪性リンパ腫の女子高生から2個の卵子を採取, ガラス化保存した. 12年後(2013年), 患者が結婚し, IVF治療を開始, 2個のガラス化卵子を解凍し, 顕微授精, 胚培養および移植を行った.

未来へ:我々は現在, すべての妊孕性温存がん患者に対してsingle port laparoscopyを用いた低侵襲的なGV卵子/片卵巣の採取, 保存を実施している. 将来の挙児への保険として充分数の卵母細胞を保存でき, 完成しつつある有効なIVMさらにoocytes growth技術と組み合わせ, さらに確実な妊孕性温存技術となっていくであろう. 未成熟卵子の保存は, さらに近い将来, ホルモン刺激を必要としないIVF治療の実現を促進するだけでなく, すでに現在, 個体の老化により発生能が低下した不育卵子の治療にも繋がるであろう.

## ARTによる不妊予防



### 久保 春海

日本不妊予防協会 理事長  
渋谷橋レディースクリニック  
院長

### 略 歴

1966年 医師免許取得以後ずっと産婦人科医

近年、我が国を含めた先進諸国では晩婚、晩産傾向による加齢不妊が急激に増加していることは周知の事実である。約20%の既婚カップルは、35歳過ぎるまで第1子を設けようとしなない。しかし、生物学的にヒトでも他の哺乳類と同様に、加齢とともに生殖能力が衰えて、次第に妊孕性を失うことは明らかであり、これにより妊娠率が低下するのは加齢に基づく生理的変化である。このような生理的変化は20代後半から30代前半頃にかけて始まるということを、ほとんどの女性は認知していない。女性は70～80万個以上の卵子を持って生まれてくるが、徐々に閉鎖卵胞となり思春期には30万個ほどになる。それ以降も、女性の生涯の間にヒト卵子は決して新生されることはないと考えられる。このため、卵子数は加齢とともに着実に減少する。また、加齢卵子は経年変化により染色体異常（異数体）の頻度が増加し、その結果、流産率が加齢とともに上昇する。20歳代までは10%以下の不妊率であるが、30歳前半で15%、30歳代後半で、約22%に妊孕能力に問題が起きてくるし、40歳以降では約30%が自然妊娠の望みが無くなると推定されている。生殖年齢の加齢速度は個人差があり、個々の女性の妊孕能力を正確に判定する基準はまだ無い。しかし、AMHや基礎レベルにおけるFSH、LH、E<sub>2</sub>を測定することにより、間接的に、加齢による卵巣予備能を判定することが可能であり、我が国では不妊治療の予後判定にも用いられており、欧米では、life-style choiceとして卵巣年齢が実年齢より高ければ卵子凍結を選択する女性もいる。また、加齢とともに増悪する子宮筋腫、子宮内膜症なども生殖能力を左右する重要な因子である。加齢による社会性不妊は近代社会における男女共同参画時代の副産物であり、リプロダクティブヘルス・ライツに関する意識改革をすることが重要である。加齢による生殖時計の老化をリセットする方法が基礎的、臨床的に研究、応用されつつあるが、抗加齢薬の臨床応用以外は、基礎的、臨床的研究段階であり、卵子若返り法などのように倫理的にモラトリアムになっている手段もある。現時点で加齢に基づく不妊予防にもっと

も現実的かつ有効な手段は、35歳までの若年夫婦による受精卵凍結保存である。我が国における女性の平均初婚年齢が28.9歳であり、結婚後35歳までに受精卵凍結保存をしておけば、10数年のスパンにわたって子育てに煩わされずに、仕事と家庭を両立させることができる。このような社会的理由による胚凍結保存（embryo self-banking; ESB）が将来の加齢不妊の予防にとって重要であり、我が国でも不妊予防法としてのARTの実施と経済的支援を認めるべきであろう。

### 参考文献

- 1) Hull, M. G., Evers, J. L.: Population study of causes, treatment, and outcome of infertility. Br. Med. J., 291: 1693-1697, 1985.
- 2) J. Menken, J. Trussell, and U. Larsen: Age and Infertility. Science, 233: 1389-1395, 1986.

# 卵子提供の実際と現況



## 岸本 佐智子

OD-NET 卵子提供登録支援団体  
理事長

### 略 歴

1993年  
2001～2003年  
2010年  
2012年

ターナー症候群患者団体(ひまわりの会)初代会長  
厚生科学審議会 生殖補助医療部会委員  
TSSJ(ターナー症候群患者団体・連合会)会長  
OD-NET(卵子提供登録支援団体)理事長

25年前、ターナー症候群の娘を出産、22年間ターナー症候群患者会のお世話をしている。ターナー女性は卵巣機能不全のため自然妊娠の確率は1～2%である。ターナー女性にとって将来の選択に悩む。子どもを産まない選択、養子を迎える選択、卵子提供によって子どもを産む選択。それ以前の問題として、妊娠できないことで恋愛さえも諦めている女性も少なくない。海外では20年以上前から実施されている卵子提供が日本においてできないのである。私はそのような女性の悩み苦しんでいる声を長年聴いてきた。11年前、厚生科学審議会生殖補助医療部会の委員として議論を重ねてきたが、未だに法整備されていないため、匿名の卵子提供は実施されていない。アメリカやタイに渡り不安な中で卵子提供をされたターナー女性もいる。1999年に日本産科婦人科学会などに「提供卵子による不妊治療促進についての要望書」を提出。2001年には「近親者からの卵子提供についての要望書」を提出。日本において卵子提供という選択ができるように活動してきた。選ばないのと選べないのとでは全く違う。多様な選択肢ができるように体制を整えてほしいと願う。このような経緯から2012年卵子提供登

録支援団体を設立、卵子を提供して下さるドナーの募集を開始した。今日まで224名のドナー希望者からの申し込みがある。すべてボランティアでの申し出である。ドナーの条件は35歳未満で既に子のいる成人女性が対象である。現在まで24名のドナー登録が完了している。レシピエントの条件は40歳未満で早発閉経やターナー症候群など卵子がない女性が対象である。現在レシピエントの募集はしていない。レシピエントとドナーの組み合わせが19組決定し、そのうち6組がご辞退されたため13組がカウンセリング等進められている。NPO法人卵子提供登録支援団体設立以降、早発閉経、ターナー症候群、がん治療後、卵巣欠損の女性達から辛く悲しい思いが届く。やるせない気持ちである。ようやく国が動きだした。レシピエントが子どもを持つ権利、生まれてくる子どもが幸せになる権利、そしてドナーの意見も反映されるような体制作りが重要。すべての人を尊重できるように、そしてすべての立場の人が幸せな人生を歩めるように社会で議論し、早急に特定生殖補助医療の法整備が確立することを心から願っている。

## ドナー希望者の背景 224名の方とは??

- ・35歳未満で、すでに子のいる成人女性…166名
- ・35歳以上(最高50歳)…20名
- ・未婚で子どもがいない…12名
- ・既婚で子どもがいない…4名
- ・海外在住の日本人(インドなど)…4名
- ・妊娠中…4名
- ・授乳中…4名
- ・夫婦で、子どもは生まないと決めている…3名
- ・子宮がない…3名
- ・卵子はあるが、妊娠できない…2名
- ・同性愛者…2名

(2013年1月15日～2014年6月10日)

図 1

## ターナー女性出産報告

自然妊娠	卵子提供による妊娠
<p>↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・出産報告6例→男児5例 性別不明1例</li> <li>・母体年齢→30歳代1例 20歳代5例</li> <li>ターナー女性の自然妊娠の 可能性は1%</li> </ul>	<p>↓</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>・提供の報告11例</li> <li>・出産報告8例→男児2例 →女児6例 (内3例は双胎)</li> <li>・提供後着床せず→2例(米1,日1)</li> <li>・妊娠中→1例(日1)</li> <li>・海外8例(米5,韓2,タイ1)</li> <li>・国内3例(姉妹間,1例は未婚妹)</li> </ul>

図 2

## 提供卵子を用いたART



### 塩谷 雅英

英ウィメンズクリニック 理事長

#### 略 歴

1985年3月 島根医科大学卒業  
6月 京都大学医学部婦人科学産科学教室入局  
1986年6月 福井赤十字病院産婦人科 医員  
1990年4月 京都大学医学部婦人科学産科学教室 医員  
1993年6月 医学博士(京都大学)  
1994年4月 神戸市立中央市民病院産婦人科 医長  
2000年3月 英ウィメンズクリニック開院 現在に至る

### はじめに

卵巣形成不全や加齢に伴う卵巣反応性低下により自己卵子での妊娠を望めなくなった患者など、妊娠するためには卵子提供を受ける以外に方法の無い患者に直面することは少なくない。卵子提供治療について、当院に通院する不妊治療中の患者にアンケート調査を行ったところ、69%の患者が我が国でも積極的に実施されるべきであると回答した。同様のアンケートを一般の妊婦にも行ったが、ほぼ同様の結果であった。このことから、不妊患者のみならず一般女性の大半が卵子提供治療を容認している実態が浮かび上がる。

### 卵子提供治療における我が国の現状

1985年、我が国では45歳以上の母親から245人の出生が報告されている。一方、2011年にはその数は843人と3倍以上となっている。45歳以上になると自己卵子での妊娠は容易ではないことを考慮すると、この増加の大部分は若年時の凍結胚を利用したものと考えられるが、卵子提供治療による出生数の増加も背景にあるものと推察される。一方、我が国では1983年に日本産科婦人科学会から出された「体外受精・胚移植」に関する見解を尊重し、第三者配偶子の使用は施行しないこととして自主規制しているため国内での治療の受け皿は限定されている。したがって卵子提供による治療を望む夫婦の多くは、治療先を求めて海外に渡航しているのが現状である。

### 日本生殖医学会の提言

2009年の日本生殖医学会倫理委員会からの提言によれば、「医学的適応の限定、十分な情報提供と同意の任意性の確保、子の出自を知る権利への配慮など厳密な条件を設定した上で提供配偶子を使用することの合理性は十分ある」「卵子提供者は匿名の第三者を優先するが本人の実姉妹や知人などからの提供も可能とする」としている。しかし、実際の実施にあたっては法律(親子法)の整備および公的機関による文書の80年間におよぶ保管を前提条件としており、これらの整備が整っていない

現状では国内で広く治療が開始される状況ではない。

### JISART 非配偶者間体外受精実施の経緯

2003年、厚生科学審議会は、医学的適応がある場合に限り匿名の第三者配偶子を用いる生殖医療を条件付きで容認すると報告した。しかし、患者は条件とされた制度整備を待つ間に年を重ね貴重な機会が失われていく状況が続いた。また、匿名かつ無償での卵子提供者を見つけることは非常に困難な状況であった。そのような中、2006年、JISART会員施設から、知人からの卵子提供のケースおよび姉妹からの卵子提供のケースの実施要請があった。JISART倫理委員会では9回におよぶ審議を重ね、2007年に2ケースの実施を承認した。実施に当たっては日本産科婦人科学会、日本学術会議、厚生労働省母子保険課に対して実施の可否の判断を仰ぐこととした。しかしその後も日本学術会議で審議されることがなく、実施を待っている患者および提供者をこれ以上待たせるわけにはいかないとの判断から、2008年、治療の実施容認に踏み切った。治療の結果、幸いこの2例とも出産に至っており、経過は順調である。その後、2008年に精子・卵子の提供による非配偶者間体外受精に関するJISARTガイドラインを策定、公表した。JISARTに所属する5施設では、このガイドラインに基づき顕名の提供卵子による生殖補助医療を実施している。現在までに44件の申請、そのうち43件が承認され、47周期の採卵、44周期の移植、41周期の妊娠、19例の出産を得ている。

### 終わりに

国内での治療の門戸が閉ざされた状況下、卵子提供を希望する多くの夫婦は海外渡航をせざるを得ない状況が続いている。これら患者の中には十分なカウンセリングを受けることなく、生まれてくる子の福祉に対する十分な配慮がなされていないケースもあることが懸念される。また、患者の高齢化に伴い、貴重な治療のタイミングを逸しているケースもある。制度整備の早急な実現が望まれる。

# 早発卵巣不全や不妊治療終了後のヘルスケア — ホルモン補充療法の重要性 —



高松 潔

東京歯科大学市川総合病院  
産婦人科 教授

略 歴

1986年

1992年

1994年

1995年

2000年

2002年

2004年～現在

2007年～現在

2008年～現在

慶應義塾大学医学部卒業

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室入局

ドイツ国ベーリングベルケ社リサーチラボラトリー留学

慶應義塾大学にて学位取得

慶應義塾大学医学部産婦人科学教室診療医長

東京女子医科大学産婦人科学教室講師

国立成育医療センター第二専門診療部婦人科医長

東京歯科大学市川総合病院産婦人科部長

東京歯科大学教授

慶應義塾大学医学部客員教授(産婦人科学) 兼任

不妊治療を終了することは患者にとって大きな決断である。しかし、実際にはタイミング法、人工授精、体外受精-胚移植 (IVF-ET) それぞれ仮に40%の妊娠率としてステップアップしたとしても、最終的に約20%は妊娠に至らないことになる。また、日本人女性の平均寿命は86.41歳と世界一の長寿を誇っており、不妊治療により挙児が得られようとともそうでなくともその後には約40年の人生があるが、その間を高いQOLを維持して、いかに華麗に生きることができるかということに思い至っている者は、患者はもちろん医療サイドにも多くはないと思われる。

不妊治療がその後の女性の心身に与える影響については2つが考えられる。1つはこれまでの治療、つまり卵巣刺激や体外受精時の採卵などが卵巣予備能や閉経年齢に影響するかどうかという問題であり、もう1つは不妊であったこと、あるいは不妊となる要因を持っていることが将来の心身に及ぼす影響である。

閉経年齢は約50%が遺伝的な因子によって規定されるともいわれているが、日本人における検討において、不妊の既往がある女性はそうでない女性と比較して閉経が早く、特に子宮内膜症による不妊の場合、閉経が早くなるオッズ比は1.33 (95%信頼区間1.05～1.68) と有意であることが報告されており (図1)<sup>1)</sup>、欧米においても同様の報告が多い。一方、原因不明の不妊は閉経年齢には関連しないという報告や、調節卵巣刺激は卵巣予備能に悪影響を与えないとの報告もある。IVFについては周期数が増えるとわずかではあるが閉経年齢に影響するという報告がある一方、3周期までは関連しない、あるいは6周期までは関連しないとも報告されている。しかし、これらの検討では採卵数などで検討しており、年齢が上昇するにつれ必要なゴナドトロピンは増えるので、年齢の因子を考慮する必要がある。また、poor responderでは閉経年齢が早いという。もちろん手術は卵巣のう腫摘出術はもちろんのこと、たとえ腹腔鏡下卵巣ドリリングにおいても卵巣予備能を低下させ、閉経を早める。一方、出産数が少ないと閉経が早いことも知ら

れており、明確に不妊治療により閉経が早くなることは示されていないものの、交絡因子を考慮すれば可能性は否定できないと考えられる。女性はエストロゲンで護られているといっても過言ではなく、早い閉経は更年期障害、心血管疾患や骨粗鬆症といった退行期疾患のみならず、皮膚や口腔など全身に影響を及ぼす。また、心理的な問題も大きいことが知られており、元々不妊患者にはうつや不安が多く、年齢とともに頻度が増加することも報告されていることから、対応は必須であると考えられる。一方、不妊外来でよく見られる多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) はメタボリック症候群との関連が知られており、閉経後には肥満や脂質プロファイルの悪化が懸念される。

これらの不妊治療終了後あるいは早発卵巣不全において起こりうる諸症状に対して最も適切な対応方法は、消退したホルモンを補う理に合った方法であるホルモン補充療法 (HRT) であることには言をまたない。HRTとは、エストロゲン欠乏に伴う諸症状や疾患の予防ないし治療を目的に考案された療法で、エストロゲン製剤を投与する治療の総称である。HRTには症状の緩和や疾患の治療を目的とするもの、あるいは無症状の閉経後女性においてエストロゲン欠落に伴う諸疾患のリスク低

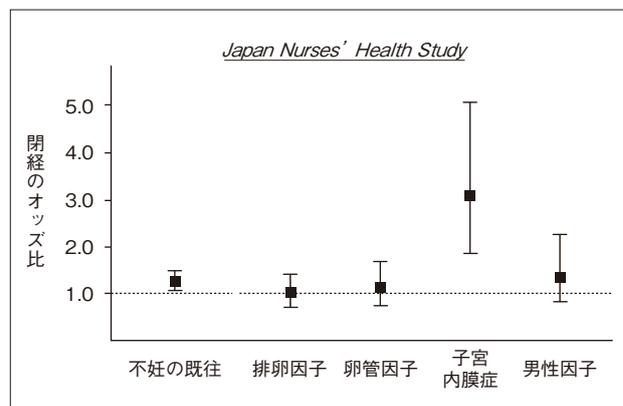


図1 不妊原因が閉経年齢に与える影響  
(参考文献1より引用)

表1 HRTのベネフィット(参考文献2より引用)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• 更年期症状緩和</li> <li>• 骨吸収抑制・骨折予防</li> <li>• 糖・脂質代謝改善</li> <li>• 血管機能改善効果</li> <li>• 血圧に対する作用</li> <li>• 中枢神経機能維持</li> <li>• 皮膚萎縮予防</li> <li>• 泌尿生殖器症状改善</li> <li>• 大腸がん(結腸がん・直腸がん)</li> <li>• 口腔における効果</li> </ul>
---

表2 HRTに予想される有害事象(参考文献2より引用)

<ul style="list-style-type: none"> <li>• 不正性器出血</li> <li>• 乳房痛</li> <li>• 片頭痛</li> <li>• 乳がん</li> <li>• 動脈硬化・冠動脈疾患</li> <li>• 脳卒中</li> <li>• 静脈血栓塞栓症</li> <li>• 子宮内膜がん</li> <li>• 卵巣がん</li> <li>• その他のがん, 腫瘍, 類腫瘍</li> </ul>
--

下やヘルスケアを目的として行うものの2つの側面がある。前者としては、更年期障害、骨粗鬆症など、後者には萎縮性陰炎、骨量減少・骨粗鬆症、脂質代謝異常、動脈硬化、皺の改善やコラーゲン維持などの皮膚領域などが挙げられる。さらに、近年では痛風やメタボリック症候群などの代謝性疾患の改善や歯周病といった口腔領域などへの有効性も注目されており、いわゆるアンチエイジングとしての効果も報告されている(表1)<sup>2)</sup>。実際、死亡率も約30%低下する。国際閉経学会(IMS)の推奨においても「HRTは症状を有する閉経後女性に対する治療の第一選択として考慮されるべきである」となっているとおり、広く閉経以降の愁訴や疾患に対する治療薬としてHRTを選択肢に加えることが勧められており、中高年女性におけるQOLの維持・向上に欠かすことのできないツールである。

しかし、副作用のない治療法はないことには言を待たない。HRTには表2に示すような有害事象も存在する。中でもエストロゲンは古くから発がんリスク、特にエストロゲンに依存する組織のがんである子宮内膜がんや乳がんの問題が取り上げられてきた諸刃の剣のような存在でもある。特に2002年、米国の大規模ランダム化比較試験(RCT)であるWomen's Health Initiative(WHI)研究におけるHRT試験において、有子宮者に対するエストロゲン+黄体ホルモンによる併用試験が乳がんリスク上昇の問題から途中中止となって以来、HRTの有害事象に対する報告が相次ぎ、逆風が吹いている状態であった。このインパクトが強烈であったためか、いまだ

に「HRT=乳がんリスク」と考えている医師もいるようであるが、その後の再解析から乳がんについては少なくとも5年未満の施行であれば安全と考えられるようになり、有効性についても再評価がなされている。5年以上の施行により上昇する乳がんリスクも肥満や飲酒などによるリスク上昇と同程度以下ということも分かってきた。また、乳がんリスクへ関連するのはエストロゲンではなく、有子宮者において併用される合成黄体ホルモンであることも明らかとなっている。現在ではHRTの適応拡大は世界的な流れである。また、2009年には日本産科婦人科学会と日本更年期医学会(現日本女性医学学会)とが共同でHRTガイドラインを策定、2012年度には改訂版も発刊されており、日本においても安全・安心かつ有効にHRTが施行できる環境にある。さらに、従来の経口剤に加えて、経皮貼付剤、経皮ゲル剤なども導入され、個々人のライフスタイルに応じた対応も可能である。日本人女性、あるいは医師の間にもホルモン剤に対するアレルギー的な感覚と誤解があるが、不妊治療を受けていた女性は比較的ホルモン剤に対して抵抗感がないことも有利な点になる。

このように不妊治療終了後の長い人生を華麗に過ごすためにHRTという方法もあるため、挙児希望が無いからといって終診にするのではなく、医師としてその患者の一生におけるヘルスケアの重要性を認識して正確な情報を提供すること、また、自院にてフォローアップするか、適切な施設へ紹介することは生殖医療に従事する者の責務であると言えよう。

参考文献

- 1) Yasui, T., Hayashi, K., Mizunuma, H., Kubota, T., Aso, T., Matsumura, Y., Lee, J. S., Suzuki, S.: Association of endometriosis-related infertility with age at menopause. *Maturitas*, 69: 279-283, 2011.
- 2) 日本産科婦人科学会・日本女性医学学会: ホルモン補充療法ガイドライン2012年度版, 日本産科婦人科学会, 2012.

# 国内のARTにおけるホルモン補充を考える



## 東口 篤司

KKR 札幌医療センター斗南病院  
生殖内分泌科 指導医

### 略 歴

1975年 札幌医科大学 卒業  
1981年 札幌医科大学大学院 卒業  
1987年 斗南病院 産婦人科  
2000年 斗南病院 生殖内分泌科

日本産科婦人科学会専門医, 日本生殖医学会生殖医療専門医, 日本産科婦人科内視鏡学会技術認定医(子宮鏡), 日本受精着床学会評議員, 日本生殖再生医学会評議員, 日本IVF学会評議員

### 受 賞

2012年度 世界体外受精会議記念賞(臨床)

PubMedによる文献検索<sup>1)</sup>やIVFに関する世界的アンケート調査のウェブサイトIVF-Worldwide.comの調査によると, 世界のARTにおいて補充されている卵胞ホルモン製剤のほぼ100%は天然型ホルモンのestradiolであり, 黄体ホルモン製剤のほぼ100%は天然型ホルモンのprogesteroneである. 一方, 2013年2月日本IVF学会が行った国内のART実施施設へのアンケート調査<sup>2)</sup>によると, 国内のARTにおいて補充されている卵胞ホルモン製剤ではconjugated estrogenが14~19%と比較的多くの施設で使用されており(図1), 黄体ホルモン製剤では合成の黄体ホルモンなどprogesterone以外の黄体ホルモンが50%以上の施設で補充されていた(図2). また, 世界では全く使用されない避妊用ピルが5~13%の施設で補充されていた.

ARTにおけるホルモン補充として, どんな卵胞ホルモン製剤, 黄体ホルモン製剤を選択すべきかを考える時, その製剤が有効でかつ安全であることが重要であることは言うまでもないが, もう一つ重要なことは, その

薬剤が添付文書でどう取り扱われているかということである. 医師が有効でかつ安全と認める薬剤が必ずしも添付文書の中で適応を認められているわけではなく, それどころか, ほとんどの卵胞, 黄体ホルモンが適応外使用である. しかし, 適応外ならどんな場合にでも使用できないかという決してそうではない. 適応外の薬剤を使用する時のルールとして, 産科診療ガイドライン産科編2014では, 1)内外の研究報告からその薬剤のその使用法が有用であり, 2)informed consentのもとに行う必要がある, との条件が述べられている.

今日まで, ARTの分野では適応外使用のホルモン製剤が法的に問題になったことはないと思われる. しかし, 他の分野では最近, 適応外とされている薬剤を処方して有害事象が発生し裁判になる事件が散見される. これらの判例はARTの分野でも適応外の薬剤で有害事象が発生した場合, 合理的な理由, 手続きがなければ, 将来何らかのかたちで問題にされる可能性があることを示している<sup>3)</sup>.

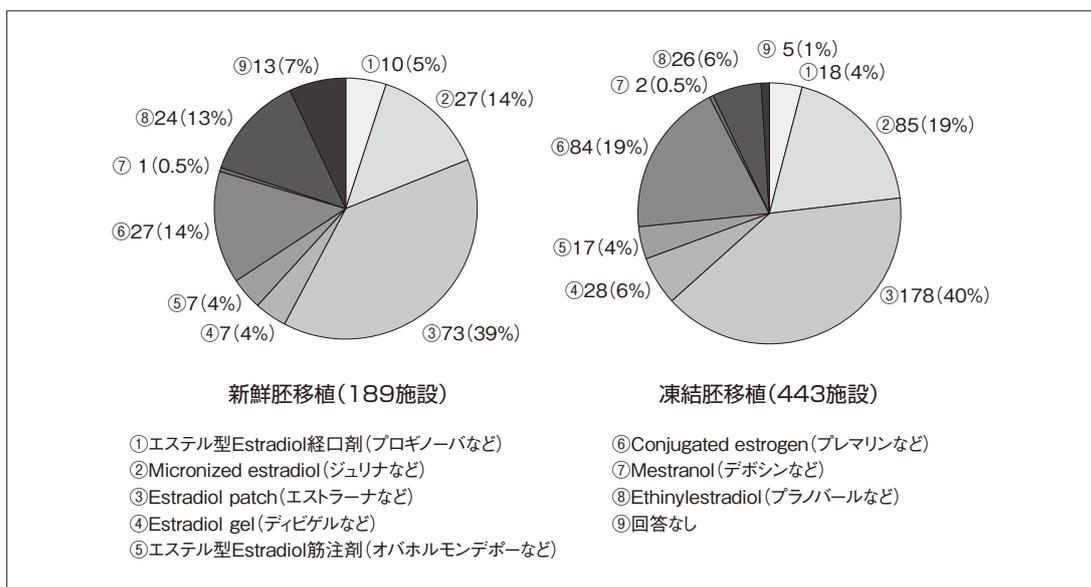


図1 国内のARTではどんな卵胞ホルモン製剤が使用されているか? (文献2より引用)

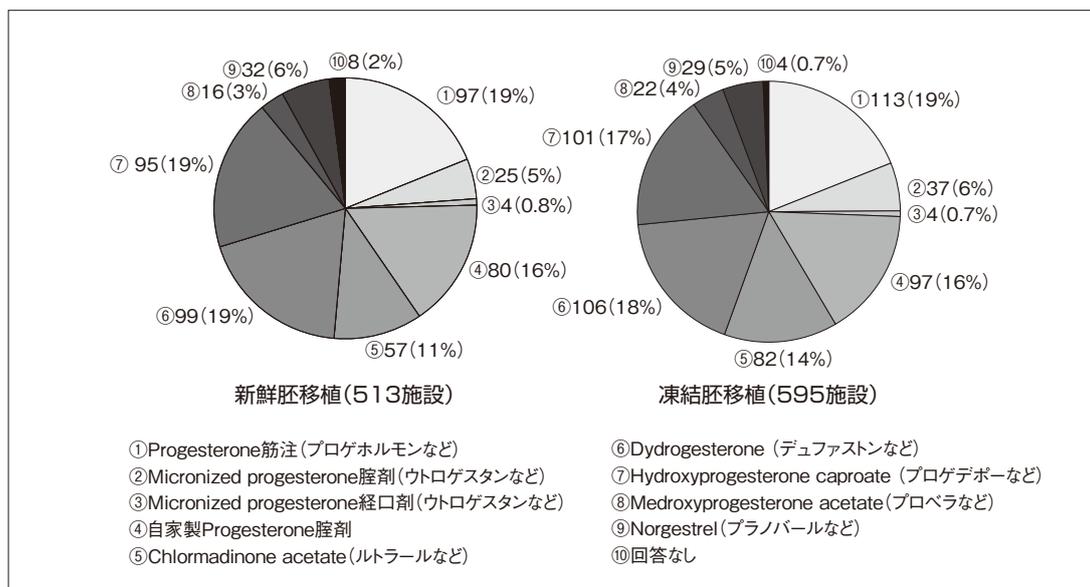


図2 国内の ART ではどんな黄体ホルモン製剤が使用されているか？ (文献2より引用)

表1 ARTで補充される卵巣ホルモン製剤, 黄体ホルモン製剤の特徴

卵巣ホルモン	投与経路	体内で作用する時の構造	妊娠中の取り扱い(添付文書)
1) エステル型 Estradiol (プロギノーバなど)	経口	Estradiol	国内にはないので添付文書がない
2) Micronized estradiol (ジュリナなど)	経口	Estradiol	禁忌
3) Estradiol patch (エストラーナなど)	経皮	Estradiol	禁忌
4) Estradiol gel (ル・エストロジェルなど)	経皮	Estradiol	禁忌
5) エステル型 Estradiol (オバホルモンデポーなど)	筋注	Estradiol	禁忌または妊娠中の取扱いの記載なし
6) Conjugated estrogen (プレマリンなど)	経口	Estrone Equilin など 10 種類以上	禁忌
7) Mestranol (デボシンなど)	経口	Ethinylestradiol	妊娠中の取扱いの記載なし

黄体ホルモン	投与経路	体内で作用する時の構造	妊娠中の取り扱い(添付文書)
1) Progesterone (プロゲホルモンなど)	筋注	Progesterone	禁忌(切迫流産に適応あり)
2) Micronized Progesterone 腔剤(ウトロゲスタンなど)	経腔	Progesterone	国内にはないので添付文書がない
3) Micronized Progesterone 経口剤(ウトロゲスタンなど)	経口	Progesterone	国内にはないので添付文書がない
4) 自家製 Progesterone	経腔	Progesterone	医薬品ではないので添付文書がない
5) Chlormadinone (ルトラルールなど)	経口	Chlormadinone	妊娠中の取扱いの記載なし
6) Dydrogesterone (デュファストンなど)	経口	Dydrogesterone	切迫流産に適応あり
7) エステル型 Hydroxyprogesterone (プロゲデポーなど)	筋注	Hydroxyprogesterone	禁忌(切迫流産に適応あり)
8) エステル型 Medroxyprogesterone (プロペラなど)	経口	Medroxyprogesterone	切迫流産に適応あり

卵巣ホルモン+黄体ホルモンの合剤	投与経路	体内で作用する時の構造	妊娠中の取り扱い(添付文書)
1) 避妊用ピル(プラノバルなど)	経口	Ethinylestradiol + Norgestrel など	禁忌

表1に示されたホルモン製剤のすべてに、有効性と安全性が検証されていることに基づくinformed consentを得ることができるだろうか？ 著者は天然型のestradiol, progesteroneのみがinformed consentの取得を可能にすると考えている。何故なら、世界でARTが始められて以来、約30年間、約500万人といわれる体外受精に補充されたホルモン剤のほぼ100%は天然型のestradiol, progesteroneであり、有効性と安全性が十分検証されているからである。

参考文献

- 1) 東口篤司: 凍結胚移植におけるホルモン補充—世界の標準—. 日IVF会誌, 16: 46-53, 2013.
- 2) 東口篤司: ARTにおけるホルモン補充の現状—日本IVF学会によるアンケート調査の結果—. 日IVF会誌, 17: 25-33, 2014.
- 3) 東口篤司: 国内のARTにおけるホルモン補充を考える. 日受精着床会誌, 31, 2014 (印刷中).

## P-1 胚の動的解析を加味した胚の分類法と臨床妊娠率の検討

末永 めぐみ, 篠原 真理子, 江口 明子, 川崎 裕美, 松下 富士代, 山口 弓穂, 伊藤 正信, 松田 和洋  
松田ウイメンズクリニック

### 【目的】

初期胚移植においては胚の形態評価を重視したVeeckの分類が主に用いられることが多いが、胚の発育動態は考慮されておらず、必ずしも着床能を正確に反映しているとはいえない。さらに、Embryo Scopeなどを用いたタイムラプス観察の導入により胚の形態評価以外にも受精から発育に関しての様々な情報を得られるようになり、Veeckの分類でのグレーディングに苦慮するケースが散見される。これまでに当院はEmbryo Scopeによる胚の動的解析により、初期胚の形態や発育速度と発育予後に関連がある事を報告してきた。そこで動的解析を加味した当院独自のグレーディングを考案し、検証した。

### 【対象および方法】

2013年1月から12月までの期間に39歳以下採卵回数3回以内の症例でSETを実施した101症例112周期を対象とし、後方視的に移植前の胚の状態について当院での胚の動的因子を加味したグレーディングを適用した場合とVeeckの分類を適用した場合とで臨床妊娠率を比較・検討した。さらに、余剰胚246個72症例78周期について当院でのDay3での胚の動的因子を加味したグレーディングを適用した場合の胚盤胞発生率および良好胚盤胞(3BB以上)獲得率についても検討を行った。

## P-2 ガラス化加温後ヒト胚盤胞の胞胚腔のコラプスが着床率に及ぼす影響

石山 舞, 岩山 広, 下田 美怜, 中谷 絢乃, 山下 正紀  
山下レディースクリニック

### 【目的】

ガラス化加温後に広範囲にアシステッドハッチングを施した胚盤胞を観察すると、順調に再拡張を続ける胚盤胞の他に、ある時点で収縮したのち再拡張を続ける胚盤胞、あるいは胞胚腔を形成するものの収縮し再拡張が起らない胚盤胞がみられる。

本研究では、ガラス化加温後の胚盤胞における回復培養中の再収縮(コラプス)と再拡張が、着床にどのように影響しているか検討した。また、コラプスおよび再拡張の動態と、ガラス化保存前後の胚盤胞のグレードとの間にどのような関係性があるのか検討した。

### 【方法】

ガラス化加温後、単一融解胚移植に用いられた680個の胚盤胞を対象とした。

回復培養0時間目(耐凍剤希釈直後)、そして、1, 2および3時間目の胚盤胞について、2次元画像上の面積をそれぞれ測定した。コラプス(Collapse: C)は、前の時間と比較して面積が相対的に小さくなった現象とし、また、再拡張(re-Expansion: E)は、回復培養0時間目と比較して、回復培養3時間目の面積が相対的に大きくなった現象とした。

3時間の回復培養において、コラプスが起らずに再拡張した胚を

なお、当院独自のグレーディングは良好胚盤胞(Day5)へ成長した胚に影響を与えた因子や胚の発育時間を当院の過去の報告より再検討し、動的解析(分割のタイミング・前核数・割球数・多核の有無・第一分割の形態・fragmentationの量等をヒエラルキーにて分類)を加味し、考案した。

### 【結果】

当院でのグレーディングではグレード1, 2, 3, 4の順に臨床妊娠率がDay2ET31.3%, 25.0%, 14.3%, 0.0%, Day3ET34.3%, 25.0%, 12.5%, 0.0%となり、有意差は認められないもののグレードの低下とともに妊娠率が低下傾向を示した。一方、Veeckの分類を適用した場合はグレード1, 2, 3, 4の順にDay2ET23.1%, 47.1%, 13.3%, 0.0%, Day3ET38.9%, 16.7%, 25.8%, 14.3%となり、グレードと臨床妊娠率にばらつきが見られた。さらに、当院でのグレーディングでの胚盤胞発生率はグレード1, 2, 3, 4の順に97.3%, 72.2%, 39.5%, 25.5%、良好胚盤胞獲得率は87.7%, 40.5%, 14.0%, 11.8%となり、発生率・獲得率ともにグレード1は他3群に対して、グレード2はグレード3および4に対し有意に高い値を示した。

### 【結論】

Day2およびDay3においてグレードの低下とともに臨床妊娠率が低下したことから、当院の胚の動的因子を加味したグレーディングはVeeckの分類と比較してより胚の着床能を反映していると思われた。さらに、余剰胚での胚盤胞発生率・良好胚獲得率においてもグレード間に有意差を認めたことから胚盤胞への発育をある程度予測できると思われた。今後は着床胚の動的因子を分析することで着床能に関わる因子をグレーディングに加味できればと考えている。

C-/E+群、コラプスを起こしたものの再拡張がみられた胚をC+/E+群、コラプスを起こし、かつ再拡張が起らなかった胚をC+/E-群とし、各群の着床率を比較した。また、ガラス化保存前後のICMとTEのグレード(ガードナー分類)の分布について各群で比較検討した。

### 【結果】

胞胚腔のコラプスと再拡張に着目した分類において、着床率はC-/E+群(46%, n=426)とC+/E+群(41%, n=221)が、C+/E-群(18%, n=33)よりも有意に高くなった( $p<0.05$ )。

ガラス化前のTEにおいてグレードCの割合は、C+/E-群(42%)がC-/E+群(14%)とC+/E+群(17%)よりも有意に高くなった( $p<0.05$ )。

加温後のTEにおいてグレードCの割合は、C+/E-群(79%)が、C-/E+群(14%)とC+/E+群(26%)よりも有意に高くなった( $p<0.05$ )。

また、コラプスの起こったC+/E+群およびC+/E-群において、ガラス化保存を介して、TEのグレードCの割合が増加した(それぞれ17%→26% および42%→79%)。

### 【考察】

ガラス化加温後の回復培養において、約4割の胚盤胞にコラプスが生じたが、コラプスを起こしても3時間目までに再拡張が認められれば着床率に影響がないことが確認された。

再拡張が認められなかった胚盤胞は、凍結時のICMとTEのグレードがCである割合が高いことから、再拡張の有無は凍結前の胚のグレードが大きく関わっていることが考えられた。

コラプスが生じた胚盤胞では、ガラス化前と比較して加温後のTEのグレードCの割合が増加していることから、ガラス化加温の作業工程を介してTEが何らかのダメージを受けていることが予測された。

## P-3 採卵からcIVFまでの時間の差が受精率および胚発生に及ぼす影響

加藤 道高, 福永 憲隆, 北坂 浩也, 吉村 友邦, 田村 総子, 長谷川 望, 中山 要, 青柳 奈央, 大野 浩史, 渡邊 紘之, 木田 雄大, 小森 佑奈, 小沼 よしみ, 下村 海咲, 加藤 大和, 金山 真己, 辻 暖永, 中野 千春, 浅野 恵美子, 香ノ木 早紀, 小島 正愛, 野老 美紀子, 服部 幸雄, 若原 靖典, 木下 孝一, 近藤 麻奈美, 薬師 義弘, 羽柴 良樹, 浅田 義正  
浅田レディース名古屋駅前クリニック 浅田レディース勝川クリニック  
浅田生殖医療研究所

### 【目的】

Conventional IVF(cIVF)の課題は正常受精率を向上させることである。現在まで当院では正常受精率を向上させるために、sperm処理後の運動精子数ではなく運動精子濃度が高いことが重要であること、sperm処理におけるswim upの妥当性などについて検討し報告してきた。当院では年間約3,000周期もの採卵を行っており、1日あたり平均11件の採卵を行っている。通常の調節卵巣刺激、簡易卵巣刺激、予想採卵数などを考慮して採卵を施行する順番を決定している。媒精は採卵を施行した症例の順番で行っているため、症例により採卵から媒精までの時間が一定にならず差が生じる。この時間差がcIVFの受精率にどのような影響を及ぼすかについて十分な情報はない。そこで、ヒト卵子の採卵からcIVFまでの時間経過が受精率および胚発生にどのような影響を及ぼすかについて今回検討を行った。

### 【材料および方法】

2013年1月～2013年12月にcIVFを施行した539症例569周期を対象とした。採卵からcIVFまでの時間を100～160分(A群), 161～220

分(B群), 221～280分(C群)および281～340分(D群)に分け、正常受精率、不受精率および異常受精率(1PN, ≥3PN)を比較した。また、各群におけるDay3良好胚形成率、Gardner分類によるBlast 3以上の胚盤胞形成率および良好胚盤胞形成率を比較検討した。

### 【結果】

正常受精率はA群61.2%(175/286), B群66.1%(925/1399), C群66.9%(604/903), D群68.5%(139/203), 不受精率はA群28.0%(80/286), B群23.9%(334/1399), C群26.8%(242/903), D群22.2%(45/203), 異常受精率(1PN)はA群4.5%(13/286), B群4.1%(57/1399), C群4.0%(36/903), D群3.9%(8/203)で有意な差はなかった。異常受精率(≥3PN)はA群14.7%(42/286), B群10.9%(152/1399), C群8.1%(73/903), D群10.3%(21/203)となりC群はA群, B群よりも有意に低い値となった( $P<0.05$ )。Day3良好胚形成率はA群45.3%(24/53), B群56.1%(115/205), C群48.3%(84/174), D群63.0%(17/27)で有意な差はなかった。また、Blast 3以上の胚盤胞形成率および良好胚盤胞形成率はA群52.8%(28/53), 49.1%(26/53), B群55.1%(113/205), 43.9%(90/205), C群52.3%(91/174), 40.8%(71/174), D群51.9%(14/27), 44.4%(12/27)で各群間に有意な差はなかった。

### 【考察】

一般的に卵子のエイジングが進むことで受精率や胚発生に負の影響を与えるといわれており、卵子のエイジングは確実に生じているということは様々な報告から明らかである。そのため、できる限り早い時間に媒精を行う必要があるのではないかと考えてきた。しかし、今回の結果より採卵からcIVFまでの時間は正常受精率や胚発生に影響を与えないことから、少なくとも今回検討した採卵からcIVFまでの時間(100～340分)であれば卵子のエイジングの影響を受けずにcIVFを施行できることが示唆された。

## P-4 精巢内精子における極少精子凍結の有用性

川上 典子, 井上 聖子, 岩澤 未来, 中戸 可奈, 中務 結貴, 新藤 知里, 斉藤 寛恵, 平田 麗, 青井 陽子, 寺田 さなえ, 吉岡 奈々子, 羽原 俊宏, 林 伸旨  
岡山二人クリニック

### 【目的】

精巢内精子回収法(TESE)により得られた精子を凍結保存する際、従来はセラムチューブあるいはストローなどを用いて処理した組織液を凍結していた。しかし、組織や液量が多いため凍結前に精子を確認していても精子数が少ない場合は融解後の精子の探索に時間がかかり、発見が困難な場合もある。そこで、凍結前に回収できた精子を極少凍結する操作手順を追加し、その有用性を検討した。

### 【方法】

2012年8月から2014年4月にTESEを施行した症例のうち、回収した組織の所見から融解後の精子探索が困難と予想された症例について従来の凍結方法と併せて新しく極少精子凍結を行った。極少精子凍結

はTESE組織の中から精子をインジェクションピペットで採取した後、Cryotopのシート上に作成した0.2M シュクロース液1μLのdropに1～5精子を入れ、液体窒素の液面から4cmの蒸気上で2分間冷却後、液体窒素内に投入した。融解は血清添加したmodified HTFの2μLのdropを3個作成しオイルカバーしたDishに、Cryotopの精子を乗せた面を下にしてdropに順に漬け、drop内の精子を探索した。

### 【結果】

対象期間にTESEを施行し精子が回収できた26症例のうち、10症例において極少精子凍結を実施した。この極少精子凍結を融解して4症例のICSIに用いたが、融解後の精子回収率は86.5%(32/37)、探索時間は1本あたり3～20分程度であった。新鮮胚移植を1症例に施行したが妊娠は確認できず、その後の融解胚移植により胎嚢が確認できた症例は2症例であった。

### 【考察】

極少精子凍結は、操作方法が簡便であり良好な回収率が得られた。従来の凍結方法では探索に数時間を要することもあったが、探索範囲が2μLのdrop 3個に限定されているため短時間に確認できた。妊娠例も出ていることから極少精子凍結による精子への影響は少ないと思われるが、今後、症例数を増やし検討が必要である。以上から、極少精子凍結は融解後の探索時間を短縮させるために有用と考えられる。

## P-5 非ヒト霊長類動物モデルを用いた子宮移植モデルの開発 ～子宮性不妊患者に対する妊孕性 再建技術の可能性を探る～

木須 伊織<sup>1)</sup>, 三原 誠<sup>2)</sup>, 原 尚子<sup>3)</sup>, 飯田 拓也<sup>3)</sup>,  
梅根 紀代子<sup>1)</sup>, 安達 将隆<sup>1)</sup>, 阪埜 浩司<sup>1)</sup>, 菅沼 信彦<sup>4)</sup>,  
青木 大輔<sup>1)</sup>

- 1) 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室  
2) 済生会川口病院血管外科  
3) 東京大学医学部形成外科・美容外科  
4) 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻

### 【目的】

近年、子宮性不妊女性に対する挙児の解決策として子宮移植が1つの選択肢として考えられ、様々な動物モデルでの基礎研究だけでなく、ヒトへの臨床応用も報告されている。ヒトへの臨床応用には様々な課題が挙げられるが、技術面においては、解剖生理学的にヒトに類似している霊長類動物での検証が必要である。今回我々は、カニクイザルを用いて子宮移植モデルの作製に試みたので報告する。

### 【方法】

動物実験施設の倫理委員会承認のもと、カニクイザル(3～4kg)を用いて、6件(自家移植3件、同種移植3件)の子宮移植手術を施行した。これまでの探索的子宮移植手術の経験や結果を踏まえ、全例に手術前に自己血貯血を行い、術中に返血した。カニクイザルの臍横部から恥骨部まで皮膚縦切開を行い、血管柄付きの子宮を摘出し、体外

で4℃に冷却しながら灌流液で摘出子宮を灌流させた。その摘出子宮を自家移植では同所性に戻し、同種移植では他個体に移植した。腔吻合後、血管柄付きの摘出子宮を顕微鏡下で血管吻合を行い、同種移植では術後に免疫抑制剤の投与を行った。術後の子宮機能評価および拒絶反応の評価のために、月経の確認、経腹超音波断層法、子宮頸部生検を定期的に施行した。

### 【結果】

自家移植1件、同種移植1件において、術中管理や薬剤誤投薬が原因ですべての個体が術中死した。生存した自家移植2匹において、術後両者に月経を認め、そのうち1匹においては、術後116日目に自然妊娠を確認し、満期に帝王切開により児を娩出した。生存した同種移植2匹においては、術後の免疫抑制剤(タクロリムス)の内服コンプライアンスの低下により、術後11日目に血中濃度が低下し、両者に子宮頸部組織生検で拒絶反応が見られた。1匹は術後23日目には拒絶反応は消失し、術後3カ月後に一時的に月経が回復した。他方はエコーで子宮動脈血流が次第に観察されなくなり、術後3カ月の開腹所見で索状の萎縮子宮を認めた。手術所要時間は自家移植で平均12時間23分、同種移植で平均12時間48分であった。

### 【考察】

我々はカニクイザルを用いて子宮自家移植後の出産例および子宮同種移植後の月経回復例を経験した。ヒトへの臨床応用の可能性を探るためには、非ヒト霊長類動物におけるさらなるデータの蓄積や術式の確立が求められる。しかしながら、カニクイザルを用いた子宮移植モデルの開発はヒトと比して体格が小さいため、手術手技が極めて難しいこと、周術期管理および免疫抑制剤血中濃度コントロールが十分に行えないこと、生殖補助医療技術が確立されていないことから、ある程度の限界があり、子宮移植モデル作製にはさらなる検討が必要であると考えられた。

## P-6 胚培養士による個別相談(たまご相談室)を行って

大住 哉子, 佐藤 学, 中岡 義晴, 森本 義晴  
IVFなんばクリニック

### 【目的】

当院では、体外受精を実施した患者、もしくはこれから体外受精を行う患者に対して胚培養士から卵子、精子、胚に関する説明を直接受けることができるたまご相談室を週一回(二枠)、無料で実施している。この相談室を通して、相談を希望する患者の背景や患者からの質問内容、またアンケートにより相談室の満足度を調査した。

### 【対象・方法】

2012年1月から2014年3月までにたまご相談室を訪れた患者113人(135回)を対象とした。たまご相談室予約時、患者に質問用紙を配布し、相談日前日までに質問事項を記入し提出していただくようお願いした。相談可能な胚培養士は日本卵子学会認定生殖補助医療胚培養士資格取得者で、相談時間は30分間とした。相談室終了後、アンケートに協力いただき、回収率は94.1%であった。

### 【結果】

たまご相談室の予約占有率は60.3%で、この期間中に複数回利用し

た人は16.8%であった。たまご相談室を利用した患者平均年齢は38.5歳(27～49歳)で、年齢別の割合は、30歳未満4.4%、30～39歳50.4%、40歳以上45.2%であった。これは当院での2013年胚移植実施者平均年齢の38.2歳、年齢別の割合30歳未満3.3%、30～39歳54.7%、40歳以上41.6%とほぼ同等であった。相談室利用時点での当院での採卵実施平均回数は3.4回(0～15回)で、64.4%が採卵3回目までに相談室へ入室していた。また、胚移植平均回数は1.8回(0～9回)であり、今後胚移植を行う予定の胚移植0回目の患者が一番多く28.9%で、74.8%が胚移植2回目までに入室していた。多かった質問内容は、順に1.卵子、2.胚のグレード、3.凍結胚(移植)、4.今後の治療へのアドバイス、5.胚盤胞(移植)、6.高齢、7.精子について、であった。アンケート調査より、95.3%が培養士の説明は分かりやすかったと回答し、92.9%が培養士の説明は納得できたと回答していた。再度利用したいと回答したのは86.6%であった。

### 【考察】

事前に配布する質問用紙により、相談担当胚培養士は患者の体外受精における興味の対象や不安要素を十分把握でき、必要に応じてデータを収集し、適切な回答をスムーズに行うことができた。90%以上の患者が培養士の説明が分かりやすく、納得できたと回答していることよりたまご相談室は診察での医師の説明を補足し、患者の不安や疑問を取り除くための情報提供の場として有益であり、今後も継続して続けていく必要はあると考えられる。そのために胚培養士は、常に患者に最新の情報提供ができるよう、体外受精におけるデータの収集、分析のほか知識向上のために学会参加や勉強会の開催が不可欠である。

## P-7 ヒアルロン酸含有培養液が胚に与える影響について

阿部 礼奈, 緒方 洋美, 岩崎 利郎, 角本 知世, 十倉 陽子, 山田 聡, 緒方 誠司, 水澤 友利, 岡本 恵理, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英  
英ウィメンズクリニック

### 【目的】

培養液にヒアルロン酸を添加することで、妊娠成績が向上したことが報告されている(Bontekoe *et al.*, 2010)。そこで、今回我々は、ヒアルロン酸を含む培養液と、ヒアルロン酸を含まない培養液の胚培養の成績と妊娠成績について検討したので報告する。

### 【方法】

2013年6月～10月に採卵を行い本検討に同意が得られた全胚凍結症例、50症例を対象とした。採卵時に得られた卵を、採卵後0～1, 1～6日目までOrigio社Universal IVFとLife Global社global medium (1% HSA)を用いて培養した群(以下非含有群)と採卵後0～1, 1～2, 2～6日目までOrigio社Sequential Fert(0.5% HSA)とSequential Cleav(ヒアルロン酸および0.5% HSA)およびSequential Blast(ヒアルロン酸および0.5% HSA)を用いて培養した群(以下含有群)の2群に分けて検討を行った。

検討項目は、受精率、分割率、分割期良好胚率、胚盤胞発生率、

良好胚盤胞率とした。さらに、凍結融解胚移植を施行した49周期において心拍陽性率を検討した。

### 【結果】

受精率、分割率、分割期良好胚率、胚盤胞発生率、良好胚盤胞率において両群に有意な差は認めなかった。心拍陽性率では有意差はないものの、含有群において高くなる傾向を認めた。

ヒアルロン酸	非含有群	含有群
受精率(%)	75.9 (245/323)	73.0 (222/304)
分割率(%)	88.6 (217/245)	87.4 (194/222)
分割期良好胚率*1(%)	53.9 (117/217)	49.5 (96/194)
胚盤胞発生率(%)【Day5】	53.0 (115/217)	51.5 (100/194)
良好胚盤胞率*2(%)	49.6 (57/115)	51.0 (51/100)
心拍陽性率(%)	33.3 (8/24)	58.3 (14/24)

\*1 良好胚【Veeck分類：採卵後2日目にて4細胞グレード1, 2および5細胞以上のグレード1～3】

\*2 良好胚【Gardner分類グレード3BB以上】

### 【考察】

本検討では、検討したすべての項目において有意差は認めなかったが、ヒアルロン酸含有培養液を用いて培養した胚は、非含有培養液と比較し心拍陽性率が高い傾向にあった。この結果から、ヒアルロン酸含有培養液にて胚を培養することで、胚のqualityが高まる可能性や胚の着床能を向上させる可能性が示唆された。

## P-8 精液所見と精漿総カルニチン濃度の相関についての検討

魚住 卓矢<sup>1)</sup>, 王堂 哲<sup>2)</sup>, 緒方 洋美<sup>1)</sup>, 岩崎 利郎<sup>1)</sup>, 松本 由紀子<sup>1)</sup>, 苔口 昭次<sup>1)</sup>, 高津 寛<sup>2)</sup>, 山口 耕平<sup>1)</sup>, 石川 智基<sup>1)</sup>, 塩谷 雅英<sup>1)</sup>

1) 英ウィメンズクリニック  
2) 株式会社AAプロジェクト

### 【目的】

精漿中のカルニチン濃度は、精子濃度および精子運動率と正の相関をもつことが諸外国から報告されている(Sheikh *et al.* 2007)。しかし、日本人男性における精漿カルニチン濃度と精液所見との関連を示し検討した報告は少ない。そこで、今回我々は、精漿総カルニチン濃度の測定を行い、精子濃度および運動率との相関性を検討したので報告する。

### 【方法】

2013年5月～7月までに男性不妊外来を受診した患者のうち検査に同意を得た69例を対象とした。これら69例をWHOラボマニュアル第4版を基準に、A群(n=25);正常精液, B群(n=17);乏精子症(精子濃度が $20 \times 10^6$ /mL未満), C群(n=3);精子無力症(前進運動精子が50%未満), D群(n=16);乏精子かつ精子無力症(B群且つC群), E群(n=9);無精子症(精液中に精子を認めない)の5群に分けて検討した。精漿は、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて凍結保存し検査に供した。精漿総カルニチン濃度は、アシルカルニチンエステラーゼによってアシルカルニチンを遊離体に誘導した後、酸化還元酵素系反応を用いた吸光度によって測定した。

### 【結果】

総カルニチン濃度(平均値 $\pm$ SD)は、A群 $574.8 \pm 276.4 \mu\text{M}$ , B群 $326.1 \pm 176.4 \mu\text{M}$ , C群 $498.4 \pm 279.7 \mu\text{M}$ , D群 $398.7 \pm 224.6 \mu\text{M}$ , E群 $286.0 \pm 149.6 \mu\text{M}$ となり、A群と比較し、B群, D群, およびE群で有意に少なくなった。

また、総カルニチン濃度は、精子濃度および運動精子濃度との間に正の相関( $R=0.443$ と $R=0.424$ )を認めた。一方、運動率は総カルニチン濃度との間に相関関係は認めなかった。

### 【考察】

精液所見正常精液と比較し乏精子症, 乏精子・精子無力症および無精子症患者の精液では、精漿カルニチン濃度が低下することが示唆された。また、精漿カルニチン濃度と精子濃度および運動精子濃度との間には正の相関が存在することが示唆された。今後は、カルニチンをサプリメントとして摂取することで精液所見の改善が見られるかどうか検討していく予定である。

表1 精液所見別にみた総カルニチン濃度

	平均総カルニチン濃度 $\pm$ SD ( $\mu\text{M}$ )
A 正常精液 (n=25)	$574.8 \pm 276.4^a$
B 乏精子症 (n=17)	$326.1 \pm 176.4^b$
C 精子無力症 (n=3)	$498.4 \pm 279.7$
D 乏精子症・精子無力症 (n=16)	$398.7 \pm 224.6^c$
E 無精子症 (n=9)	$286.0 \pm 149.6^d$

(a, b  $p < 0.005$ ) (a, c  $p < 0.05$ ) (a, d  $p < 0.001$ )

## P-9 ICSI 時の卵子形態は受精結果に影響するのか

木田 雄大, 福永 憲隆, 北坂 浩也, 吉村 友邦, 田村 総子, 長谷川 望, 加藤 道高, 中山 要, 青柳 奈央, 大野 浩史, 渡邊 紘之, 小森 佑奈, 小沼 よしみ, 下村 海咲, 辻 暖永, 加藤 大和, 金山 真己, 浅野 恵美子, 香ノ木 早紀, 小島 正愛, 野老 美紀子, 服部 幸雄, 若原 靖典, 木下 孝一, 近藤 麻奈美, 葉師 義弘, 羽柴 良樹, 浅田 義正

浅田レディース名古屋駅前クリニック 浅田レディース勝川クリニック  
浅田生殖医療研究所

### 【目的】

現在のARTにおいて、ICSIは無くしてはならない技術であるが、ICSIはあくまで受精を補助する技術であるため、その後の受精や発生は卵子の質に大きく左右されると考えられる。しかしながら、ICSIを施行する卵子すべてが同様の形態であるわけではなく、様々な形態異常が観察されICSI後の発生に懸念を抱く症例がみられる。当院では特徴的な形態異常についてICSI時のコメントとして残している。そこで、今回我々はICSI時の卵子形態は受精結果に影響するのか解析を行った。

### 【材料および方法】

対象は2013年1月～12月にICSIを施行した1,578症例2,780周期14,239個とし、ICSI時の卵子形態と受精結果についての相関を調べた。受精結果は2PN群, 1PN群, NF群, >2PN群, 分割群, Degeneration(Deg)

群に分けた。今回解析の対象とした形態異常はCentrally Located Cytoplasmic Granularity (CLCG), Smooth Endoplasmic Reticulum Clusters (sERC), 小胞 (vesicle), 膜弱い, 黒い, 細胞質粗雑, いびつ, zona関連, PB関連, PVS広い, PVS内夾雑物ありの11項目とした。

### 【結果と考察】

2013年度における当院のICSI成績は2PN:81.3%, 1PN:2.6%, NF:5.6%, >2PN:4.1%, 分割:0.3%, Deg:6.2%であり、全体の46.9%に形態異常が見られた。また、形態異常の有無で受精結果を比較すると、形態異常が無い群の2PN率が有意に高かった(74.1% vs 87.7%  $P<0.05$ )。このことから、卵子の形態異常は受精結果に影響を及ぼすことが示された。各受精結果におけるICSI時の形態異常を有する割合を解析した結果、2PN:42.7%, 1PN:62.4%, NF:54.7%, >2PN:64.5%, 分割:93.0%, Deg:74.5%であった。このことから、特に分割やDegとなる卵子にはICSI時に何らかの形態異常が見られるものが多いことが示された。また、各卵子形態の受精成績を解析した結果、vesicleや膜弱い、細胞質粗雑、いびつ、PB関連、夾雑物ありの2PN率が70%未満と低率であることが分かった(図1)。特に膜弱いにおける2PN率は44.9%と低く、41.7%と高い割合でDegとなることが示された。一方で、CLCGやsERC、黒い、zona関連は2PN率にはあまり影響しないことが示された。各受精結果における各卵子形態の頻度を解析した結果、分割になる胚には形態異常であるsERCや細胞質粗雑、PB関連、PVS広いの頻度が高いことが示された(図2)。また、sERCの分割率は1.5%と高くないが、分割におけるsERCの頻度が高いことから、分割となる要因であることが推察される。今回は受精結果のみの解析であったため、今後年齢や卵巣刺激との形態異常の関連を調べる必要がある。

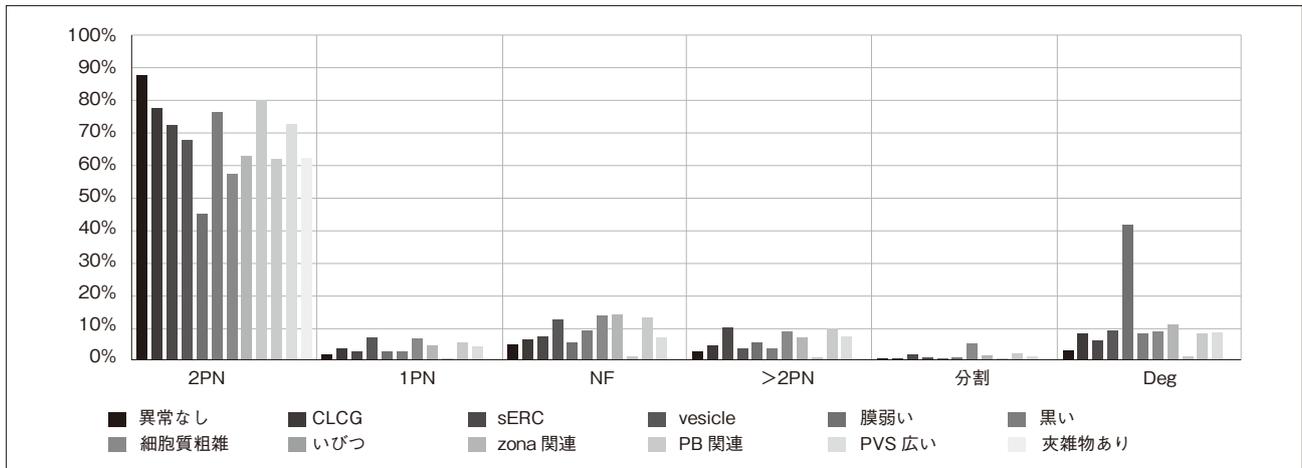


図1 各卵子形態の受精成績

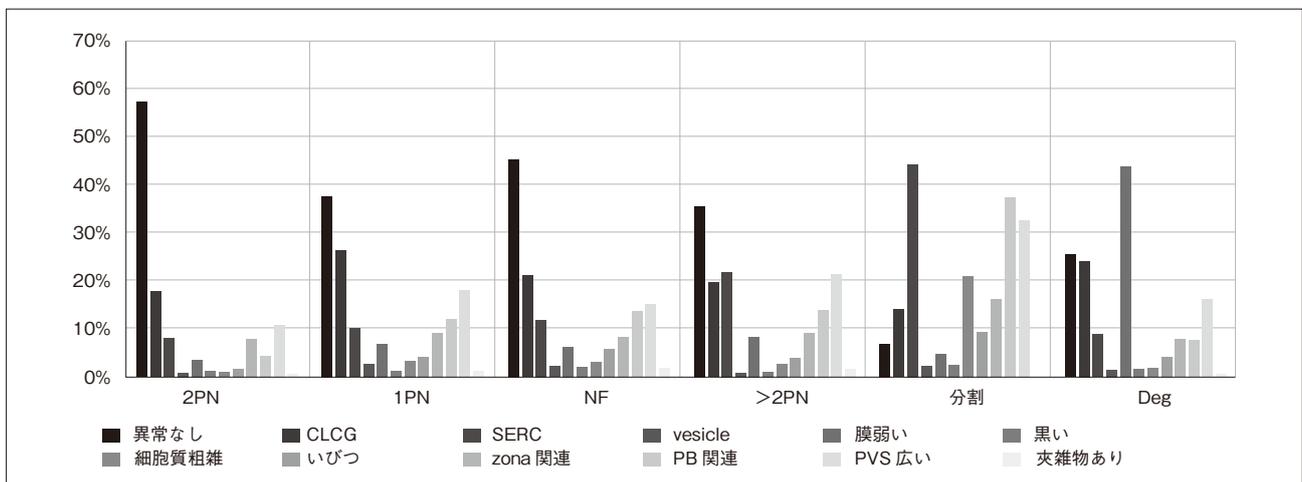


図2 各受精結果における各卵子形態の頻度

## P-10 卵細胞膜の伸展性を考慮した脆弱な卵子に対するピエゾ ICSI の新しいアプローチ

岩山 広, 石山 舞, 下田 美怜, 中谷 綾乃, 山下 正紀  
山下レディースクリニック

### 【目的】

卵細胞膜の伸展性はピエゾ ICSI 後の卵子生存性に影響を及ぼす要因の1つであり、高い膜伸展度の観察された卵子はほぼ100%の生存率を示す。その膜伸展性は、卵成熟とともに変化する細胞骨格のアクチンが関係していることが予測される。また、アクチンは動的であり、その重合-脱重合あるいは分布には局所性があることがわかっている。

本研究では、アクチンの重合-脱重合が卵細胞膜の伸展性に及ぼす影響と、同一卵子内の異なる場所における膜伸展度の局在性を調べた。そして、卵細胞膜の脆弱な卵子に対して、得られた知見に基づく新しいピエゾ ICSI を施行し、卵子生存率および正常受精率を検討した。

### 【方法】

本研究における廃棄 MII 卵子の使用および臨床でのピエゾ ICSI の適用は、患者同意のもとに行われた。膜伸展度は、卵細胞膜の伸展長(穿刺部位から穿刺点まで)の卵子直径に対する割合として定義された。

検討1: アクチンの重合-脱重合と膜伸展度との関係は、サイトカラシンB(重合阻害)あるいはジャスプラキノライド(脱重合阻害)の処理前後で、同一卵子内の同一部位を穿刺し膜伸展度を比較することで評価した。

検討2: 膜伸展度の局在性は、同一卵子内の異なる部位を穿刺し、それらの膜伸展度について相関解析を行い評価した。

検討3: 臨床において、膜伸展度が75%未満(Low stretchiness)でピエ

ゾパルスの適用前に穿刺された卵子において、そのまま1回目の穿刺で精子を注入した(Single injection)卵子をLow/Single群、それに対して、1回目の穿刺で精子を注入せずに再穿刺を試みて卵細胞膜の十分に伸展した部位から精子を注入した(Re-injection)卵子をLow/Re群とした。また、膜伸展度が75%以上(High stretchiness)ありピエゾパルスにより穿刺され、1回目の穿刺で精子を注入した卵子をHigh/Single群とした。上記3群間の、卵子生存率および正常受精率を比較検討した。

### 【結果】

検討1: 膜伸展度は、サイトカラシンB処理により有意に増加し(51→100%,  $p < 0.01$ )、ジャスプラキノライド処理により有意に低下した(48→13%,  $p < 0.01$ )。

検討2: 同一卵子内の異なる部位における膜伸展度には、有意な相関関係( $r = 0.20$ ,  $p = 0.11$ )は認められなかった。

検討3: 臨床において、Low/Re群の卵子生存率および正常受精率(94および83%)は、Low/Single群(59および46%)よりも有意( $p < 0.01$ )に高くなった。

### 【考察】

人為的に起こしたアクチンの重合-脱重合に膜伸展度が依存的であったことから、卵子表層のアクチンの動態が、卵細胞膜の伸展性を決定づける要因の1つであることが確認された。また、注目すべきこととして、卵細胞膜の伸展性は1個の卵子としての性質ではなく局所的なものであり、同一卵子内の異なる部位では膜伸展度が異なることが明らかになった。

このような卵細胞膜の性質を考慮し、卵細胞膜が脆弱な卵子においては、低伸展を示した部位からの精子注入を避け、高伸展部位より再度精子注入を試みることで、ピエゾ ICSI 後の卵子生存率および正常受精率は大幅に改善されることが示された。

## P-11 ヒト卵母細胞の成熟過程においてミトコンドリアはアクチンフィラメントを介して局在を大きく変化させる

天羽 杏実, 橋本 周, 山中 昌哉, 矢持 隆之, 後藤 大也, 井上 正康, 中岡 義晴, 森本 義晴  
IVFなんぼクリニック

### 【目的】

雌性生殖細胞である卵母細胞は受精可能な成熟卵子まで細胞周期を進める。その過程でミトコンドリア(Mt)局在変化が観察される。Hela細胞では細胞骨格を介してMtが移動する。しかし、卵母細胞でのMt分布変化が細胞骨格を介しているかは不明である。本研究ではヒト卵母細胞が成熟卵子にまで進行する間のMt動態を明らかにし、アクチンとの関連性を調べた。

### 【対象と方法】

インフォームドコンセントの後、ICSI時に未成熟であった卵母細胞162個を使用した。Mt動態: 卵母細胞23個をMitoTracker Orange染色後15分間隔で40時間撮影し、経時的なMtの局在変化像を得た。その際、卵母細胞の赤道面面積におけるMt占有面積割合をGVBD前後120分で計測した。透過型電子顕微鏡(TEM)を用いてGV: 14個、GVBD-Telophase I(TI): 15個、第二減数分裂中期(MII): 6個のMt分布様式を観察した。細胞骨格との関連性: 104個(GV: 47個、GVBD-TI: 51個、MII: 6個)で免疫蛍光染色を行い、Mtと微小管、Mtとアクチンの局在を観察した。卵母細胞でのMt分布様式とクラス

ター形成も観察した。Mtとアクチンの関連性: マウス卵母細胞でMt動態にアクチンが関与している可能性が示された。そこで、本研究では0.1 $\mu$ g/mLのサイトカラシンB(CB)を添加してライブイメージングを行い、Mt占有割合変化を算出した。

### 【結果】

Mt動態: GVBD前120分(76.3%)からGVBD後120分で急激にMt占有面積が増加した(89.3%,  $p < 0.01$ )。また、TEMの観察結果より、80%(11/14)のGV期卵母細胞で細胞膜下にMtが存在しなかったが、GVBD以降では細胞質内に均一に分布していた(100%: 21/21)。細胞骨格との関連性: 細胞周期の進行に伴い微小管の局在様式が変化した。一方でアクチンは細胞周期に関わらず、細胞膜近傍に局在していた。ヒト卵母細胞では細胞骨格とMtとの共局在は認められなかった。免疫染色でもライブイメージングと同様に、GV期で細胞膜下のMtが少ない領域をもつが(83%: 39/47)、GVBD-TIやMIIではこの領域はなくなった(GVBD-TI: 16%(8/51), MII: 0%(0/6))。また、GV期ではMtのクラスター形成が観察されたが(58%: 28/48)、GVBD後MII期へと細胞周期が進むにつれ、少なくなった(GVBD-TI: 25%(13/51), MII: 17%(1/6))。Mtとアクチンの関連性: CB添加区では、GVBD前120分(67.2%)からGVBD後120分にかけてMt占有面積の増加は認められなかった(62.0%)。

### 【考察】

GVBD前の卵母細胞では、細胞膜下にMtのない領域が存在し、細胞質中にMtはクラスター構造を形成していた。GVBDに伴い、Mtが細胞膜下に急激に移動し、クラスター化が解消された。一方、アクチンの重合を阻害することにより、GVBD後のMt占有面積の増加が見られなかったことから、卵母細胞の成熟におけるMt分布への関与が示唆された。

## P-12 グレード別にみた2段階胚移植の有用性

鈴木 麻美, 菊地 裕幸, 山田 健市, 岩佐 由紀, 菅野 弘基, 佐藤 那美, 馬場 由佳, 三嶋 玲美, 村川 晴生, 片桐 未希子, 吉田 仁秋

吉田レディースクリニック ARTセンター

### 【目的】

近年、多胎妊娠防止や良好胚選択のため単一胚盤胞移植が行われ、高い妊娠率が得られるとの報告がある。しかし、高齢や複数回単一胚盤胞移植を行っても妊娠に至らない反復不成功例患者は、採卵数や良好胚数が少ない場合も多く、その後の治療に苦慮することも多い。また、胚盤胞2個移植の妊娠率は単一胚盤胞移植に比べ若干の上昇は見られるが、多胎率増加は回避できず、周産期リスクは高くなる。そこで、単一胚盤胞移植の次策として2段階胚移植の有用性をグレード別に比較検討した。

### 【方法】

2012年1月～2014年3月にBlasto3以上の凍結融解胚移植を行った35歳以上または移植回数3回目以上の症例を対象とした。胚盤胞1個移植：417症例583周期(A群)、胚盤胞2個移植：58症例69周期(B群)、Day3分割胚と胚盤胞の2段階胚移植：84症例105周期(C群)において、胚盤胞のグレード別[Gardner分類：Blasto3BB以上、3BB未満]、C群についてはさらに分割胚のグレード別[C-g：良好胚(good)、C-p：不良胚(poor)]に分類し臨床成績を比較検討した。なお、良好胚は6細胞期胚以上かつVeeco分類G2以上とした。

### 【結果】

患者平均年齢は、A群37.5歳、B群37.4歳、C群38.8歳で、C群がA、B群に比べ有意に高かった(P<0.05)。平均移植回数はA群2.4回、B

群4.5回、C群3.8回で、A群がB、C群に比べ有意に少なかった(P<0.05)。A群、B群、C群それぞれの妊娠率は38.6%、47.8%、25.7%で、C群はA、B群に比べ有意に低かった(P<0.05)。流産率は21.8%、30.3%、48.1%で、C群がA群に比べ有意に高かった(P<0.005)。多胎率は1.8%、30.3%、3.7%で、B群がA、C群に比べ有意に高かった(P<0.01)。グレード別では、3BB以上のA群、B群、C-g群、C-p群それぞれの妊娠率は44.2%、52.7%、41.2%、25.6%で、C-p群がA、B群に比べ有意に低かった(P<0.05)。流産率は21.4%、20.7%、85.7%、27.3%で、C-g群がA、B、C-p群に比べ有意に高かった(P<0.05)。多胎率は1.6%、27.6%、0%、0%で、B群がA群に比べ有意に高かった(P<0.005)。3BB未満のA群、B群、C-g群、C-p群それぞれの妊娠率は22.1%、28.6%、30.8%、15.6%で有意差は認められなかった。流産率は24.2%、100%、25.0%、60.0%で、B群がA、C-g群に比べ有意に高かった(P<0.05)。多胎率は3.0%、50.0%、25.0%、0%で、B群がA群に比べ有意に高かった(P<0.005)。

### 【考察】

2段階胚移植の妊娠率は、胚盤胞1個移植、胚盤胞2個移植に比べ低く、流産率は高くなっていった。また、多胎率は胚盤胞2個移植が胚盤胞1個移植、2段階胚移植に比べ高くなっていった。グレード別に比較すると、胚盤胞3BB以上の妊娠率は、Day3良好胚を用いた2段階胚移植の場合、胚盤胞2個移植と同等の成績が得られている。しかし、Day3不良胚を用いた2段階胚移植の場合、妊娠率が低く、これは対象症例の平均年齢が高いことが影響している可能性がある。流産率は、Day3良好胚を用いた2段階胚移植で高く、これは妊娠例の平均年齢が比較的高いのも要因の一つと考えられる。また、胚盤胞3BB未満の妊娠率でも、Day3良好胚を用いた2段階胚移植の場合、胚盤胞2個移植と同等の成績が得られていた。これらの結果より、Day3良好胚と組み合わせることで胚盤胞グレードに関わらず胚盤胞2個移植と同等の妊娠率が得られることから、単一胚盤胞移植の次策としてDay3良好胚を用いた2段階胚移植を選択してもよいのではないかと考える。今後はより症例数を増やし検討していきたい。

### 【対象と方法】

2007年1月から2013年8月の期間にIVM-IVFを施行した39歳以下142症例250周期を対象とした。採卵は最大卵胞径が8mm以上に達した時点で決定した。同日にhCGを10,000単位もしくはGnRHアゴニストを投与し、36時間後に採卵およびE<sub>2</sub>値の測定を行った。また、採卵決定時の子宮内膜厚が8mm以上で新鮮胚移植とし、8mm未満の場合は凍結胚移植として前核期にて全胚凍結とした。胚移植は3日目にassisted hatchingを施行後に行った。採卵決定時の最も大きい卵胞と次に大きい卵胞の直径の平均値を算出し8mm以上11mm未満をA群、11mm以上13mm未満をB群に分けた。さらにA群では採卵当日に測定したE<sub>2</sub>値が75pg/mL未満をa群、75pg/mL以上140pg/mL未満をb群、140pg/mL以上をc群とし、B群ではE<sub>2</sub>値が90pg/mL未満をd群、90pg/mL以上200pg/mL未満をe群、200pg/mL以上をf群とし、各群における採卵数、成熟率、受精率、新鮮胚移植においては着床率、胚移植キャンセル率についてそれぞれ比較検討した。

### 【結果】

採卵数はA-a群8.7±5.7個・A-c群8.7±6.2個に比べA-b群13.2±9.9個(p<0.05)、着床率はB-d群0%・B-f5.6%に比べB-e群44.4%(p<0.01)、ETキャンセル率はA-b群10.5%に比べA-a群38.7%・A-c群47.1%(p<0.05)、B-d群13.0%に比べB-f群47.1%(p<0.01)が有意に高い結果となった。その他の指標には有意な差は認められなかった。

### 【考察】

IVM-IVFにおける採卵時の最適な卵胞径とE<sub>2</sub>値の関係は、卵胞径が8～11mmであればE<sub>2</sub>値が75～140pg/mL、11～13mmであれば90～200pg/mLでIVM-IVF ETを行えば卵胞発育の有効な指標となり、高い臨床成績が得られることが示唆された。

## P-13 未成熟卵体外受精胚移植法における採卵決定時卵胞径と血中エストラジオール値との関係性に対する臨床成績の検討

灘本 圭子<sup>1)</sup>, 今田 絢子<sup>1)</sup>, 中野 真夕<sup>1)</sup>, 尾形 龍哉<sup>1)</sup>, 福田 愛作<sup>1)</sup>, 森本 義晴<sup>2)</sup>

1) IVF大阪クリニック

2) IVFなんばクリニック

### 【目的】

当院では、ARTの選択肢の一つとして未熟卵体外受精胚移植法(IVM-IVF)の臨床応用に取り組んでいる。この方法では基本的に卵巣刺激を必要としないため、多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)の患者における卵巣過剰刺激症候群の回避に有効であり、治療費や来院回数の中でもストレス低減につながるメリットがある。また我々は、PCOS患者以外の難治性不妊に対しても新たな選択肢としてIVM-IVFを行っている。しかし、その妊娠率は刺激周期体外受精胚移植法と比べ低率であり、今後のさらなる改善が必要であると考えられる。

血中エストラジオール値(E<sub>2</sub>値)は卵胞発育の重要な指標であり、体外受精においては採卵決定などの有力な情報となっているが、卵胞径との関係性を指標とした報告はされていない。このため、卵胞発育における卵胞径とE<sub>2</sub>値の関係が、IVM-IVFにおける臨床成績に及ぼす影響について検討したので報告する。

## P-14 長期治療の末に挙児を得た IV 期子宮内膜症 ART 症例：15 回の採卵手術からの考察

安藤 寿夫<sup>1)</sup>, 池田 芳紀<sup>2)</sup>, 鈴木 範子<sup>1)</sup>, 高柳 武志<sup>1)</sup>, 皆元 裕子<sup>1)</sup>, 松尾 聖子<sup>2)</sup>, 甲木 聡<sup>2)</sup>, 矢吹 淳司<sup>2)</sup>, 北見 和久<sup>2)</sup>, 伴野 千尋<sup>2)</sup>, 山口 恭平<sup>2)</sup>, 吉田 光紗<sup>2)</sup>, 廣渡 芙紀<sup>2)</sup>, 松川 哲<sup>2)</sup>, 矢野 有貴<sup>2)</sup>, 小林 浩治<sup>2)</sup>, 梅村 康太<sup>2)</sup>, 岡田 真由美<sup>2)</sup>, 河井 通泰<sup>2)</sup>

1) 豊橋市民病院 総合生殖医療センター  
2) 豊橋市民病院 産婦人科

### 【目的】

当院ではセンターで実施した70%以上の子宮内膜症手術症例で挙児を得ており、そのほとんどが手術後1年以内の妊娠成立であるが、中には術後長期の治療期間を必要とする症例も散見される。今回の報告では、術後2年を経て妊娠成立に至った難治症例のART成績を報告し、若干の考察を行った。

### 【症例】

初診時37歳、未経妊で2年以上の不妊歴と3回のAIHの経験を有し、rASRM分類IV期と診断した両側卵巣子宮内膜症の手術後に1回のAIHを経て2年間に15回の採卵手術を実施した。妊娠成立は15回目の採卵手術後のみで、その後順調に経過し満期産帝王切開にて健児を得た。帝王切開時の子宮内膜症進行期はII期だった。この患者の調節卵巣刺激法としては、FSH/hMG単独強刺激あるいは弱刺激、種々のdoseでの

アロマターゼ阻害剤単独あるいはFSH/hMG併用など、多様なプロトコルで臨み、周期によってはGnRHアンタゴニストをこれらに追加した。刺激が強ければ採卵数は微増したが卵巣は常に低反応であり、変性卵を含めれば毎回卵子を得たものの、MII卵数は3個が2周期、2個が4周期、1個が6周期、0個が3周期だった。媒精法については、2回目の採卵後にIVFにて受精卵が得られなかったこともあり、その後ICSIで実施されてきた。しかし、15回目の採卵手術で得られた1個の卵子に対してIVFを実施した後、健児を得るに至った。この周期ではlate start HMG法にて4日間のみ刺激を行い、最後の2日間のFSH/hMGは本症例では未経験の600 IU/日となった。15回の採卵手術では、累計20個のMII卵に対して、16個の受精卵(うち1個は3PN)が得られ、タイムラプス観察を経て胚移植に至ったのは6個/6回で、いずれも分割胚期または桑実胚期移植だった。

### 【考察】

本症例では、もともと卵巣予備能が低く子宮内膜症の卵子への影響が術前の段階で既に無視できないほど存在したと推察される。このため正常卵巣組織の温存に十分配慮して手術しても、多様な調節卵巣刺激に対して常に低反応であった。それでも最終的に挙児を得たのは、累計での採卵数等で考えれば一般的な患者の何回分の採卵周期に相当するかというような視点からのコメントや、タイムラプス動画などのエンブリオロジーも含めて的確に情報提供を行い、次回のトライアルにつなげていった粘り強さだと考える。ただし、ICSIにより高い受精率を維持することができ治療継続意思を安定して得られた良い面はあるものの、受精はしても一度も良好な最終結果が得られなかったことは課題である。結果論ではあるが、アップデートな医学情報をもう少し早くから前面に出してIVFをより多く実施していれば、より少ない採卵手術回数で挙児を得ていたかもしれない。

## P-15 卵細胞質直径130 $\mu$ m以上の卵子はGiant oocyteなのか 一細胞質直径測定と蛍光免疫染色による検討一

小森 佑奈, 福永 憲隆, 北坂 浩也, 小沼 よしみ, 野老 美紀子, 吉村 友邦, 田村 総子, 長谷川 望, 加藤 道高, 中山 要, 青柳 奈央, 大野 浩史, 渡邊 紘之, 木田 雄大, 下村 海咲, 辻 暖永, 加藤 大和, 金山 真己, 中野 千春, 服部 幸雄, 若原 靖典, 近藤 麻奈美, 木下 孝一, 薬師 義弘, 羽柴 良樹, 浅田 義正

浅田レディース勝川クリニック 浅田レディース名古屋駅前クリニック  
浅田生殖医療研究所

### 【目的】

ヒト卵子は直径が120 $\mu$ m前後、その細胞質直径は100 $\mu$ m前後とされるが(Combelles *et al.*, 2002), 100 $\mu$ m以上の巨大卵子(以下giant oocyte: GO)が確認されることがある。GOは通常の2倍以上染色体を有するためMII・MI期では複数の紡錘体が、germinal vesicle (GV)期では複数のGVが確認され、染色体数異常の原因となり当院では原則的に媒精を行わない。しかし、GOを選別する卵細胞質直径の基準は存在しない。そこでGOは通常MII期卵子(100 $\mu$ m)の約1.3倍であるという報告(Balakier *et al.*, 2002)より、本検討では130 $\mu$ m以上をGOの暫定的な基準とした。そして、この基準がGOの判断基準として有用であるか検討を行った。

### 【対象および方法】

当院で2014年1月～5月中に調節卵巣刺激により採卵を行った患者1,320名1,447周期で採取された卵子9,974個を対象とし、明視野下で通常のMII期卵子より大きい卵子を選別し、細胞質直径測定を行い130 $\mu$ m以上の卵子を解析対象とした。解析方法はサイズ測定(細胞質直径・透明

帯を含めた全体の直径)および蛍光免疫染色を行った。蛍光免疫染色は130 $\mu$ m以上の卵子と比較対象群(cIVF施工後受精であったMII期卵子n=4)に対して行った。免疫染色抗体には雌性染色体を認識するAnti-dimethyl-Histone H3Lys9 (Millipore), および紡錘体を認識するMonoclonal Anti- $\alpha$ -Tubulin antibody produced in mouse (SIGMA)を使用した。また、核染色にはDAPIを使用した。染色結果を紡錘体およびGV数より3群、A群(紡錘体またはGV数:2)、B群(紡錘体数またはGV数:1)、C群(紡錘体数またはGV数:0)に分類した。さらに、紡錘体赤道面の長さを画像解析ソフトで測定し、紡錘体数および赤道面長を対象群と比較した。

### 【結果】

検討期間中、総採卵数中の卵細胞質直径130 $\mu$ m以上卵子の出現頻度は0.25% (25/9974)であった。直径の測定結果は、細胞質が134.0～155.8 $\mu$ m(平均値143.0 $\mu$ m)、透明帯を含む合計の長さが143.2～293.5 $\mu$ m(平均値205.25 $\mu$ m)であった。GOとして選別した25個中、媒精していない状態で研究解析した9個はMII期6個、MI期2個、GV期1個であり、免疫染色結果からA群5/9 (MII;n=3, MI;n=1GV;n=1)、B群2/9 (MII;n=2)、C群2/9 (MII;n=1, MI;n=1)に分類した。紡錘体の赤道面長はA群が7.58～12.12 $\mu$ m(平均9.85 $\mu$ m)、B群が2個とも15.15 $\mu$ mであり、B群の赤道面長は対象群(平均10.23 $\mu$ m)に対し約1.48倍であった。

### 【考察】

本検討よりMII, MI, GVの各期で細胞質直径130 $\mu$ m以上の卵子が確認された。そのうち、A群は紡錘体およびGVが2個確認されたためGOであると考えられた。一方、GOの紡錘体は通常の2倍以上相同染色体を有するという報告(Rosenbuch *et al.*, 2002)より、紡錘体数は1個だがサイズが対象群の約1.5倍であったB群は染色体数異常の影響を受けたため紡錘体が巨大化した可能性が推察された。よって、本検討の基準を満たす卵子の半数以上はGOである可能性が示唆された。しかし、紡錘体が確認されない群はGOであるか判断できず「130 $\mu$ m以上」をGOの判断基準として断定できなかった。

## P-16 精子成熟因子としての自然免疫因子リポカリン2

渡邊 仁美, 近藤 玄

京都大学再生医科学研究所 附属再生実験動物施設

### 【目的】

哺乳類動物の精子は、段階的な成熟過程を経て完全な受精能を獲得するが、雌生殖路内での詳細な分子メカニズムはわかっていない。我々は今回、雌生殖路内で精子成熟を誘導する因子としてリポカリン2 (Lipocalin2: Lcn2) を見出したので報告する。

### 【材料および方法】

1) EGFP-GPI トランスジェニック雄マウスとLcn2ノックアウト雌マウスおよびLcn2ワイルド雌マウスを交配し、卵管内における精子成

熟誘導を確認した。

2) LCN2タンパク質を用いてIVFを行い、受精率の検定をした。

3) LCN2タンパク質を用いて精子の体外培養を行い、精子成熟誘導を確認した。

### 【結果】

野生型マウスの卵管に遊走した精子では、細胞膜ラフトの再構成やGPIアンカー型タンパク質の遊離が起こるが、Lcn2ノックアウトマウスではその変化が顕著に減少していた。

LCN2は細胞膜を構成する主要リン脂質の一つであるフォスファチジルエタノールアミン(PE)と直接結合するとほぼ同時にラフトの再構成を誘導した。またこの反応がPKA活性に依存しているが、PI3-K, Raf-MAPK, チロシンリン酸化には依存していないことがわかった。

### 【考察】

これらの結果より、哺乳類動物にはアルブミンを介する精子成熟メカニズムに加えて、もう一つの精子成熟経路が存在することを示した。

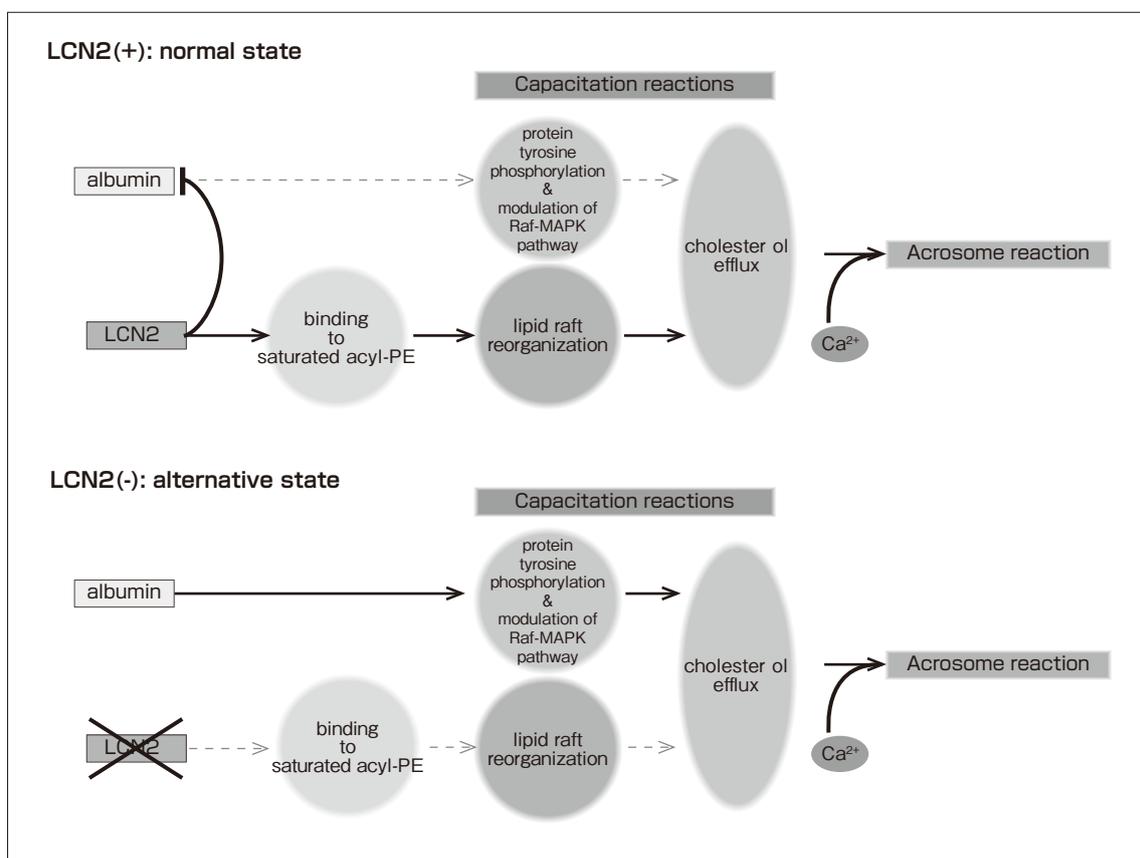


図1

## P-17 良好胚盤胞を含む2個胚移植の影響

北坂 浩也, 福永 憲隆, 吉村 友邦, 田村 総子, 長谷川 望, 中山 要, 加藤 道高, 青柳 奈央, 大野 浩史, 渡邊 紘之, 木田 雄大, 小森 佑奈, 小沼 よしみ, 下村 海咲, 辻 暖永, 加藤 大和, 金山 真己, 浅野 恵美子, 香ノ木 早紀, 小島 正愛, 野老 美紀子, 服部 幸雄, 若原 靖典, 木下 孝一, 近藤 麻奈美, 薬師 義弘, 羽柴 良樹, 浅田 義正

浅田レディース名古屋駅前クリニック 浅田レディース勝川クリニック  
浅田生殖医療研究所

### 【目的】

ARTにおいて多胎妊娠は深刻な問題の一つであり、母児への医学的なリスク上昇や周産期医療への負担増加など様々な問題点が指摘され、学会からのガイドラインや施設側の努力により移植胚数は制限されてきている。ARTで多胎を防ぐには移植胚数を1個にするのが最も有効な手段であるが、高年齢患者、反復不成功症例や患者の強い希望などにより2個胚移植をしているのが現状である。そこで、本検討では多胎率の減少を目的とし、学会ガイドラインに従った良好胚盤胞を1個以上含む胚盤胞2個胚移植の妥当性について、後方視的に検討した。

### 【方法】

2010年1月～2013年6月までに胚盤胞を2個胚移植した40歳未満かつ移植回数2回以上の230症例283周期を対象(DET)とし、同期間における胚盤胞を1個移植した40歳未満かつ移植回数2回以上の2,506症例4,023周期をcontrol区とした(SET)。移植胚評価についてはGardner分類を使用し、当院独自の評価方法により、グレードをGood(G), Fair(F), Poor(P)に評価した。DETについてはそれぞれのグレードの組み合わせ毎の(3種類)妊娠率、多胎率、流産率および妊娠継続率について比較検討した。Good(G)を良好胚盤胞と定義し、胎嚢数が

2個以上確認できた症例を多胎妊娠とした。また、今回は日本生殖医学会ガイドラインに明記されている良好胚盤胞移植基準を遵守した。

### 【結果】

移植胚数決定の基準となる患者年齢についてはSETとDETに差はなく、移植回数については、DETがSETに比較し有意に高い値となった。良好胚盤胞1個を含む2個胚移植または良好胚盤胞のみでの2個胚移植は、良好胚盤胞1個胚移植と比較し、多胎率は有意に高い値であり、妊娠率、妊娠継続率には差はなかった(表1)。

表1 SETとDETにおける臨床成績

	SET			DET			P 値
	G	F	P	G/G	G/F	G/P	
年齢	34.6 ± 3.7			35.0 ± 3.2			n.s.
移植回数	3.7 ± 3.7 <sup>b</sup>			6.5 ± 3.1 <sup>a</sup>			<0.05
胚評価	G	F	P	G/G	G/F	G/P	-
移植周期数	3405	598	20	191	72	4	-
妊娠率	48.8 <sup>a</sup>	22.1 <sup>b</sup>	0	55.5 <sup>a</sup>	48.6 <sup>a</sup>	0	<0.05
多胎率	1.4 <sup>a</sup>	0.8 <sup>b</sup>	0	45.3 <sup>a</sup>	34.3 <sup>a</sup>	0	<0.05
流産率	23.5	32.6	0	22.6	22.9	0	n.s.
妊娠継続率	36.7 <sup>a</sup>	13.0 <sup>b</sup>	0	42.9 <sup>a</sup>	37.5 <sup>a</sup>	0	<0.05

同一項目異符号間に有意差あり

### 【考察】

結果より、学会ガイドラインで許容される良好胚盤胞を1個以上含む胚盤胞2個胚移植は妥当ではなく、年齢や移植回数のみでの胚盤胞の2個胚移植決定についても妥当ではないことが示唆された。以上より、妊娠率、妊娠継続率を維持し、多胎率を減少させるには患者背景に関わらず良好胚盤胞は原則1個移植とするのが望ましいと思われる。胚盤胞の2個胚移植の基準については今後の検討課題であり、ガイドラインの見直しが望まれる。また、胚盤胞における2個胚移植の現状は患者希望が多数を占めており、本検討のようなevidence based medicineを用い治療方針を提示し、互いに納得した治療を実施していくことが、今後のARTの質の向上に繋がるとと思われる。

至った11例13児を対象とした。この出生児に対しては胎週数、性別、出産時の身長、体重および先天異常の有無を調査した。なお、体重および身長については胎週数別に厚生労働省の平成22年度乳幼児身体発育調査と比較した。

### 【結果】

平均胎日数は男児268±10日、女児274±0日で、出生時の平均身長は男児47.24±1.84cm、女児48.0±3.54cm、平均体重は男児2,709±401g、女児3,068±81gであった。なお、出生時の身長および体重は、男児1名を除いて、平成22年度乳幼児身体発育調査のパーセントイル曲線内に収まっていた。性別の割合は男児84.6% (11児)、女児15.4% (2児)と男児出生の割合が高かった。先天異常については1児にダウン症を認めた。

### 【考察】

今回の検討の範囲では、出生時の体重や身長にカルシウムイオノファ処理の影響は認められなかった。これまでの報告では、卵の人為的活性化を実施した症例の出生時に男児が多いという報告はない。我々の検討では極端に男児の割合が多かったが、症例数が少ないため、この偏りがカルシウムイオノファ処理の影響なのかまでは結論付けることができなかった。ダウン症の発生についても同様である。今後、予後調査を続け、特に性比および奇形発生について注意深く見守っていきたい。

## P-18 カルシウムイオノファ処理による受精補助症例の出生児調査

渡邊 千裕<sup>1)</sup>, 水野 里志<sup>1)</sup>, 大垣 彩<sup>1)</sup>, 古武 由美<sup>1)</sup>, 藤岡 聡子<sup>1)</sup>, 森 梨沙<sup>1)</sup>, 井田 守<sup>1)</sup>, 福田 愛作<sup>1)</sup>, 森本 義晴<sup>2)</sup>

1) IVF大阪クリニック  
2) IVFなんばクリニック

### 【目的】

顕微授精後の受精障害症例に対し電気刺激、カルシウムイオノファやストロンチウム処理などの卵子活性化処理法による受精補助が行われることがある。しかし、これらの方法に対して児の予後を含めた安全性に関する報告は少ない。当院でも受精障害症例に対し、カルシウムイオノファ処理を施行している。今回、カルシウムイオノファ処理を施行した症例の児に対し出生児調査を行ったので報告する。

### 【対象および方法】

当院で2004年4月から2014年1月の間に体外受精を実施し、受精障害と判断された症例に対し、カルシウムイオノファ処理を施行し妊娠に

## P-19 DNAメチル化修飾の違いを利用した雌雄前核の識別によるヒト異常受精卵の解析

田中 藍, 甲斐 義輝, 岩田 京子, 湯本 啓太郎, 杉嶋 美奈子, 溝口 千鶴, 古山 紗也子, 的場 由佳, 山内 至朗, 岡田 直緒, 松田 有貴, 井庭 裕美子, 見尾 保幸

ミオ・ファティリティ・クリニック リプロダクティブセンター

### 【目的】

異常受精卵の発生機序を明らかにするため、前核期において、雄性ゲノムの5-メチルシトシン(5mC)が5-ヒドロキシメチルシトシン(5hmC)に変換されるメカニズムを利用し、ヒト胚の雌雄前核の識別および解析を行った。

### 【方法】

本研究に同意が得られ、凍結保存継続意思がなく、今後治療予定のない正常受精卵(2PN; n=3)と、異常受精卵(1PN; n=7, 3PN; n=21)を融解後、前核期において抗5mC抗体および抗5hmC抗体を用いた免疫蛍光染色に供した。

### 【結果】

2PN胚において、5mCと5hmCのシグナルがそれぞれ1個検出され、前核期における雌雄前核の識別が可能であることが示された。1PN胚の解析では、4個において単一前核内に5mCおよび5hmCの両方のシグナルが検出された。また、前核内に5mCシグナルのみ、前核外に5hmCシグナルが認められ、雄性前核の核膜形成不全と考えられる胚が1個、前核内に5mCシグナルのみであり、単為発生と考えられる胚が2個確認された。3PN胚の解析では、5mCシグナル1個と5hmCシグナル2個が認められ、多精子受精と考えられる胚19個と、5mCシグナル2個と5hmCシグナル1個が認められ、第2極体放出不全と考えられる胚2個が確認できた。

### 【考察】

本研究から、ヒト胚における雌雄前核の識別法が確立され、異常受精卵の発生機序の解析が可能となった。1PN胚の50%以上において、核膜内に雌雄両ゲノムが認められ、これらは、雌雄ゲノムが融合し、1個の前核が形成されたと考えられた。これは、これまでの我々のTLC解析で確認している雌雄前核形成以降の前核融合による1PN胚が認められていない事実とは異なる新たな1PN胚発生機序であると考えられる。

## P-20 BDI・HADSスコアと精液所見の関連

石澤 亜希, 上條 真紀子, 拝野 貴之, 大野田 晋, 鴨下 桂子, 加藤 淳子, 山本 瑠伊, 杉本 公平, 岡本 愛光

東京慈恵会医科大学 産婦人科

### 【目的】

一般不妊治療において夫の精液所見は特に重要である。現在、不安・抑うつ状態の評価としてBeck Depression Inventory (BDI) スコアおよびHospital Anxiety and Depression Scale (HADS) スコアは医療界において広く汎用されている。今回我々は、夫の精液所見と精神状態スケール評価との間に関連があるようであれば、特に一般不妊治療においては夫側へのなんらかの介入サポートが必要になるのではないかと考えた。

### 【方法】

2014年4月～6月の間に当院不妊治療外来へ一般不妊治療を目的とし

て通院する患者のうち、不妊原因を男性因子とするものを除き、かつ夫からの了解が得られた30人(平均36.7歳)より精液採取当日の夫BDI・HADSスコアリングアンケートを回収した。得られた精液の調整前後の精子数および同運動率との関連を単回帰分析により検討した。

### 【結果】

夫BDI平均値:  $4.67 \pm 4.68$  (S.E.), 夫HADS平均値:  $4.18 \pm 2.36$ , 処理前精液(精子数:  $62.5 \pm 47.2 \times 10^6$ /mL, 運動率:  $64.6 \pm 43.5\%$ ), 処理後精液(精子数:  $61.8 \pm 43.5 \times 10^6$ /mL, 運動率:  $79.6 \pm 18.0\%$ )であった。BDI値, HADS値それぞれについて精液所見各変数との相関を見ると、BDI値と処理前精子数間( $r = -0.234$ ), HADS値と処理前精子数( $r = -0.279$ )・処理後運動率( $r = -0.217$ )間に弱い負の相関を認めた。

### 【考察】

今回の我々の調査結果は一般不妊治療において夫の不安・抑うつ状態と精液所見との間に強い関連性はないというものであった。しかし、症例の積み重ねにより、一定の傾向が認められるかどうかを注視していき、夫への心理的サポートを視野に入れた診療体制を整えていきたい。

## P-21 本抗核抗体染色型別にみた多前核胚出現頻度の検討

大垣彰<sup>1)</sup>, 水野里志<sup>1)</sup>, 渡邊千裕<sup>1)</sup>, 中野真夕<sup>1)</sup>, 松本寛史<sup>1)</sup>, 藤岡聡子<sup>1)</sup>, 森梨沙<sup>1)</sup>, 井田守<sup>1)</sup>, 福田愛作<sup>1)</sup>, 森本義晴<sup>2)</sup>

1) IVF大阪クリニック  
2) IVFなんばクリニック

### 【目的】

抗核抗体(antinuclear antibody; ANA)は真核細胞の核成分を認識する自己抗体の総称であり, 自己免疫疾患などの医療分野において汎用されている検査対象である。近年, ANA 散在斑紋型患者での体外受精における卵成熟の異常や多前核受精卵の発生頻度の増加が報告されているが, その他の染色型や抗体価の影響についての報告はない。そこで今回, ANA 染色型の相違および抗体価が卵成熟と多前核受精に及ぼす影響を検討した。

### 【方法と対象】

- 平成24年1月から平成25年12月に一般体外受精または顕微授精を実施した症例のうち, ANA 検査を実施した131症例264周期および425症例1,221周期を対象とした。ANA 陰性症例を対照区としANA 染色型(均等型, 斑紋型, 核小体型, 散在斑紋型)と受精方法別に成熟率, 多前核胚出現率を後方視的に比較した。
- 多前核受精率が25%以上の症例を多前核受精多発症例と定義し,

高頻度で多前核受精が出現した散在斑紋型(7症例18周期)を対象として, 抗体価と多前核受精多発症例の発生頻度の関係を解析した。

### 【結果】

- 卵成熟率は受精方法にかかわらずANA 染色型による差は認めなかった。多前核胚出現率は一般体外受精では対象区9.0%(72/798), 均等型11.7%(33/282), 斑紋型11.7%(58/495), 核小体型7.4%(8/108), 散在斑紋型50.0%(27/54), 顕微授精では対象区4.6%(137/2974), 均等型4.0%(27/683), 斑紋型4.3%(66/1542), 核小体型4.9%(5/102), 散在斑紋型51.6%(16/31)で受精方法にかかわらず散在斑紋型が有意に高率であった。
- 散在斑紋型抗体価別の多前核受精多発症例の発生頻度は, 抗体価80倍100%(2/2), 160倍100%(3/3), 320倍0%(0/1), 640倍0%(0/1), 1,280倍90.9%(10/11)であった。

### 【まとめ】

本検討では, これまでの報告とは異なりANA 散在斑紋型の卵成熟への影響は確認できなかったが, 多前核胚出現率に関しては有意に高いという結果であった。また, 他の染色型の卵成熟や多前核受精への影響は認められなかった。散在斑紋型の抗原はセントロメアであり, 染色体分離に関わる部分に対する自己抗体であることから, 前核形成過程の段階で何らかの影響を与えている可能性が考えられる。しかしながら, 抗体価と多前核胚出現率に明らかな相関は認められず, 多前核胚とならない症例もあることから, さらなる解析が必要である。現在, このような抗体陽性患者での正常胚獲得に向けた取り組みを行っている。

## P-22 ART 施設での oncofertility の現況; 当院での経験から

西村佳与子, 本庄考, 日高直美, 古賀真菜美, 小原由香子, 得能典子, 秋吉弘美, 谷口加奈子, 愛甲恵利子, 村上真央, 木下茜, 早田瞳, 竹原侑希, 内村慶子, 国武克子, 泊博幸, 詠田由美

IVF 詠田クリニック

### 【目的】

近年, 悪性腫瘍に対する治療法の進歩は目覚ましく, 患者の予後は著しく向上したが, 一方で, その治療により卵巣機能障害をきたし, 不妊に至ることも少なくない。そこで, 悪性腫瘍治療後の妊孕性低下を考慮し, 卵子や胚凍結を希望する者が増えている。今回, 我々は当院でARTを施行した7例の悪性血液疾患患者について, 原疾患治療時期とART 施行時期に関して検討したので, 悪性血液疾患1例の症例報告とともにここに報告する。

### 【症例】

検討した7例の内訳は, ホジキンリンパ腫2例, 悪性リンパ腫2例, 急

性白血病1例, 再生不良性貧血1例, POEMS 症候群1例で, 平均年齢は25.3歳(17歳~32歳)であった。3例は化学療法施行後で, 全7例が当院での採卵術後に化学療法, 放射線療法・造血幹細胞移植, 免疫抑制剤療法を予定していた。

### 【結果】

化学療法後の3例は2カ月~8カ月の化学療法後来院, 当院初診日より6~26日目に採卵を行った。3例とも低刺激法を行い, 1個~7個の卵を採取, すべて卵子凍結を行った。全例採卵後7日以内に化学療法を再開, 現在も卵子は凍結中である。化学療法前の4例は原疾患診断後, その治療開始前に当院を紹介受診となった。Antagonist法2例, short法2例で, 当院初診日より2~23日目に採卵を行った。2個, 1個, 22個, 24個の卵を採取, 2例は卵子凍結1個, 1例は胚凍結12個/卵子凍結6個, 1例は胚凍結18個であった。全例とも採卵後7日~30日以内に化学療法を開始, 1例を除き現在も凍結中である。

### 【結語】

悪性血液疾患症例のART 施行では, 患者の全身状態について主治医と密接な連携を取り, その後の治療開始時期を遅らせることなく, 採卵時期を考慮したプロトコールが必要と思われる。

## P-23 超音波診断法を用いた凍結融解胚移植 (cryo-ET) 周期における子宮筋層後壁厚と妊娠転帰の検討

本庄 考, 日高 直美, 西村 佳与子, 古賀 真菜美, 小原 由香子, 得能 典子, 秋吉 弘美, 谷口 加奈子, 愛甲 恵利子, 村上 真央, 木下 茜, 早田 瞳, 竹原 侑希, 内村 慶子, 国武 克子, 泊 博幸, 詠田 由美

IVF 詠田クリニック

### 【目的】

子宮腺筋症は晩婚化、不妊女性の高齢化により遭遇する機会の増加した疾患である。今回超音波検査での子宮筋層厚測定評価法を用いて cryo-ET 周期での、子宮筋層後壁厚と妊娠転帰の検討を行ったので報告する。

### 【対象と方法】

2010年1月より2012年12月までに、cryo-ETを施行した312周期中、臨床的妊娠に至った150周期を対象とした。胚凍結はvitrification法にてDay2で施行し、融解後Day3での分割期胚、1個のみのETを施行した。子宮内膜作製法は全例ホルモン補充周期とした。胚移植決定時の経膈USTにて内子宮口から子宮底部まで子宮内膜を描出し、子宮体

部後壁筋層の最大径を測定し子宮筋層後壁厚とした。子宮筋層後壁厚分布で中央値は15.0mm、25%タイル値は11.9mm、75%タイル値は19.2mmであった。そこで、子宮筋層後壁厚にて12mm未満(A群)12周期、12~18mm(B群)106周期および19mm以上(C群)32周期の3群に分類し、それぞれの流産率、早産率、子宮外妊娠率、満期産率、出生体重などを検討した。なお、今回の検討にあたり37歳以上、筋腫合併例は対象より除外した。

### 【結果】

A群、B群、C群の流産率はそれぞれ41.7% (5/12)、31.1% (33/106)、31.3% (10/32) でA群に多い傾向にあり、早産率は0.0% (0/12)、4.7% (5/106)、9.4% (3/32) とC群において多い傾向にあった。A群、B群、C群の満期産率と子宮外妊娠率は50.0% (6/12)、63.2% (67/106)、53.1% (17/32)、および8.3% (1/12)、0.9% (1/106)、6.3% (2/32) とA群で子宮外妊娠率が高い傾向にあった。満期産例の出生体重はA群2847.1±378.7g、B群3127.1±329.3g、C群3070.0±310.2gとB群と比較しA群で有意に低い結果となった。

### 【考察】

B群と比較し、子宮筋層後壁厚の薄いA群では流産率、子宮外妊娠率が高い傾向にあり、子宮筋層後壁厚の肥厚したC群では早産率、子宮外妊娠率が高い傾向が認められた。また、出生体重の検討では満期産において、A群がB群に比べ有意に低い結果となった。以上より胚移植時の超音波診断法を用いた子宮筋層後壁厚の測定は妊娠転帰を推測する上で、簡便で有用と推測されるものの今後のさらなる検討が必要である。

## P-24 ウサギ冷蔵保存卵巣から得られた卵子-顆粒膜細胞複合体の体外発育・成熟培養より得られた成熟卵の受精能の検討、および卵巣の組織学的解析

森 樹史<sup>1)</sup>, 長谷 英里<sup>2)</sup>, 杉本 浩伸<sup>2)</sup>, 寺村 岳士<sup>3)</sup>, 竹原 俊幸<sup>3)</sup>, 岸上 哲士<sup>2)</sup>, 松本 和也<sup>2)</sup>, 福田 寛二<sup>3)</sup>, 細井 美彦<sup>2)</sup>

1) 近畿大学大学院生物理工学研究所

2) 近畿大学生物理工学部

3) 近畿大学医学部高度先端総合医療センター

### 【目的】

哺乳類の卵巣には未成熟な卵母細胞が数多く含まれている。しかし、排卵に至る卵母細胞はごくわずかであり、多くは未発育な卵胞内に減数分裂を停止した状態で存在している。家畜の繁殖・遺伝資源の保存、ヒト不妊治療への応用などを目的としてこれらの未成熟な卵母細胞を体外発育培養 (*in vitro* Growth: IVG) および体外成熟培養 (*in vitro* Maturation: IVM) を行い、減数分裂再開能や受精後の胚発生能を有する卵子の作出が試みられている。

しかしながら、採取した卵巣から卵母細胞を単離し体外培養を実施するまでにかかる時間は環境や時間、温度など様々な要因によって常に一定ではなく、卵巣内の卵母細胞の質や生存性を保つことができる保存条件は未だにわからないことが多いのが現状である。そこで本実験ではウサギをモデル動物とし、37℃、15℃~25℃ (室温)、4℃の条件下で卵巣保存を行い、保存した卵巣から単離した卵母細胞を用いて、MII期卵子への成熟率を評価対象とし、最適な保存条件の検討を行った。その後、最適温度での受精能力を調べ、卵巣内の未成熟卵母細胞を用いて減数分裂再開能や胚発生能を有する卵子の作出を試みた。

また、卵巣の保存条件の違いが卵巣組織においてどのような影響を与

えているのか検討するために、保存温度の違いが卵巣組織 (卵母細胞および顆粒膜細胞) の構造に対してどのような影響を及ぼすのか検討した。

### 【材料および方法】

本実験では、過剰排卵処理を行った雌のニュージーランドホワイト種から卵巣を採取した。回収した卵巣は単純な組成であるPBS(-) 内で37℃、15℃~25℃、4℃の条件下で保存した。その後、保存した卵巣から300~399μmの卵胞を単離し、卵子-顆粒膜細胞複合体を回収後、IVGおよびIVMを行った。また、それぞれの温度で6時間、12時間、24時間卵巣保存を行い、卵巣保存における最適な温度検討を行った。さらに最適温度で保存した卵巣から採取して発育・成熟させた卵子を用いてICSIを行い受精能力の検討を行った。

次に各温度・時間による卵巣保存後の組織学的解析を行うために切片作製後ヘマトキシリン染色を行いそれぞれの条件下での組織学的差異の検討を行った。さらに細胞傷害性検出を計るためにLDHの計測を行い、各条件下でのLDH活性の比較を行った。

### 【結果および考察】

本研究の結果、卵巣を保存する温度の上昇および保存時間の経過に伴い、IVG-IVM卵のMII期卵への発生率は有意に低下することが明らかとなった。これらの低下は、組織学的解析により卵巣構造の崩壊および細胞死を生じていることが示された。また、卵巣保存溶液中において細胞障害を示す乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性が上昇していることが明らかとなった。しかしながら、4℃の条件下で卵巣を保存した場合、24時間の保存期間を介してもIVG-IVMを経てMII期卵の獲得が認められ、その効率は新鮮卵巣と比較して有意な差は認められず卵巣組織においても大きな影響は見られなかった。

以上の結果から、保存による卵巣内細胞の死滅や障害を防ぐためには、ウサギ卵巣の保存温度は4℃が最適であり、また、保存期間を経ても新鮮な卵巣と同様に減数分裂再開能や胚発生能を有する卵子を作出することが可能であることが明らかとなった。卵巣組織の長期保存が可能となることは、培養開始時間にとらわれずに安定的に卵巣から発生能を有する卵母細胞の獲得が可能となると考えられる。

## P-25 試薬添加によるマウス初期二次卵胞における2段階培養法の改善の試み

印部 遼子<sup>1)</sup>, 森 樹史<sup>1)</sup>, 長谷川 昭子<sup>3)</sup>, 柴原 浩章<sup>3)</sup>, 寺村 岳士<sup>4)</sup>, 竹原 俊幸<sup>4)</sup>, 岸上 哲士<sup>2)</sup>, 松本 和也<sup>2)</sup>, 福田 寛二<sup>4)</sup>, 細井 美彦<sup>2)</sup>

- 1) 近畿大学大学院生物理工学研究科生物工学専攻
- 2) 近畿大学生物理工学部遺伝子工学科
- 3) 兵庫医科大学産科婦人科学講座
- 4) 近畿大学医学部高度先端総合医療センター

### 【目的】

哺乳動物の卵巣内には未成熟な原始卵胞が数多く存在している。これらを体外培養して成熟した卵母細胞を効率的に得ることが可能となれば、卵巣過剰刺激症候群のリスク回避や体外受精—胚移植が事前処理無しで任意のタイミングで行える等、ヒト生殖医療分野への応用が期待されている。実際に、マウス卵巣において初期二次卵胞の体外培養により受精能を持つ卵母細胞の獲得が可能となることが報告されている。しかしながら、未だに体外培養を介して正常な卵母細胞を獲得できる効率は低く、さらなる培養系の改善が必要とされている。特に、体外培養では生体内と異なり、過剰な酸化濃度がストレスの原因となって発生が阻

害されることが知られている。そこで、本研究ではマウスを実験モデルとし、ストレスの緩和を中心とした培養環境を作り出すことで効率よく正常な卵母細胞が体外で得られないか検討を行った。

### 【材料および方法】

本研究では、7日齢のBDF1系統雌マウスの卵巣から採取した初期二次卵胞を用いて2段階の培養を行い、卵胞培養の実験モデルとした。まず、1段階目の培養では、コラーゲンゲルで9日間の包埋培養を行い、その後2段階目の培養として、コラーゲンコートディッシュ上で8日間培養を行った。ここまでの培養過程を体外発育期間とし、本研究ではこの体外発育期間において、酸化ストレスを緩和するためにシステインの誘導体であるN-acetylcysteine(NAC)を含む培養液中で培養を行った。以上の条件で発育した卵胞を用いて体外成熟培養を行った。評価は主に、非添加区をコントロールとし、成熟卵子の数や形態的変化の観察により行った。

### 【結果および考察】

NACの培地への添加により、わずかではあるが成熟率を改善することができた。NACの添加濃度は実験結果より、10 $\mu$ Mが最も適していることが明らかとなった。この成熟率の改善は、NACの添加により誘導されたシステインがグルタチオンの代謝量を増加させ、その抗酸化作用により酸化ストレスから卵胞を保護したためと考えられる。以上のことから、2段階発育培養において培地へのNACの添加は有効であるということを明らかにした。

## P-26 連続培養系の確立 ~15 $\mu$ L dropでの連続培養は可能なのか?~

渡邊 紘之, 福永 憲隆, 中山 要, 下村 海咲, 辻 暖永, 北坂 浩也, 吉村 友邦, 田村 総子, 長谷川 望, 加藤 道高, 青柳 奈央, 大野 浩史, 木田 雄大, 小森 佑奈, 小沼 よしみ, 加藤 大和, 金山 真己, 中野 千春, 浅野 恵美子, 香ノ木 早紀, 小島 正愛, 野老 美紀子, 服部 幸雄, 若原 靖典, 近藤 麻奈美, 木下 孝一, 薬師 義弘, 羽柴 良樹, 浅田 義正

浅田レディース名古屋駅前クリニック 浅田レディース勝川クリニック  
浅田生殖医療研究所

### 【目的】

胚培養において、いかに低酸素環境を維持して培養を行うかということが非常に重要である。当院では以前、1well 30 $\mu$ Lの培養液量でEmbryo Scope (ES, Unisence)による無培養液交換培養(連続培養)を行い、Day3, 5で移しかえ、観察を行う通常の培養方法と比較して、胚盤胞発生率および良好胚盤胞率が有意に高くなるという結果が得られた。しかし、ES 1台で同時に培養できる症例は6症例のみであり、全症例に対して胚盤胞までの連続培養を行うことは不可能である。そこで、当検討ではESを使用しない連続培養系の確立を目指し、当院で培養に使用している15 $\mu$ Lのdropによる連続培養が可能かどうかを確認することを目的として、検討を行った。

### 【対象および方法】

検討には融解後の観察に同意を得た、研究利用胚として凍結保存し

てある前核期胚95個を使用した。培養は当院の現在の培養方法である15 $\mu$ L dropでの単一胚培養で行った。凍結胚を融解し「培養液交換無し」と当院の現在の培養方法である「培養液交換有り」の両実験区で症例ごとにsplitでの培養を行った。観察はDay3, 5, 6, 7で行い、胚盤胞発生率と良好胚盤胞率の比較を行った。「培養液交換有り」の実験区ではDay3, 5で培養液交換を行った。Gardner分類による3BB以上の評価の胚を良好胚盤胞とした。

### 【結果】

「培養液交換無し」の実験区では胚盤胞発生率がDay5, 6, 7でそれぞれ45.8%, 54.2%, 54.2%となり、良好胚盤胞率はそれぞれ14.6%, 31.3%, 33.3%となった(n=48)。

一方、「培養液交換有り」の実験区では胚盤胞発生率がDay5, 6, 7でそれぞれ46.8%, 57.4%, 59.6%となり、良好胚盤胞率はそれぞれ25.5%, 44.7%, 48.9%となった(n=47)。

両実験区間で胚盤胞発生率、良好胚盤胞率共に有意差は確認できなかった。

### 【考察】

当検討の結果から、有意差は見られなかったが、「培養液交換無し」の実験区では現在の培養方法と比較して良好胚盤胞率が低くなる傾向が確認できた。このことから、当院で現在使用している15 $\mu$ Lのdropは連続培養に適していない可能性が考えられる。以前に行った培養液量30 $\mu$ LのESを用いた検討において、培養成績は向上している。しかし、使用した培養液は当検討と同じだが、培養液量やデバイスの形状といった違いがある。そのため、連続培養系の確立に向けて、今後はこの培養液量やデバイスの形状といった点に着目して検討を行っていく必要がある。

## P-27 採精から媒精までの時間が体外受精の臨床成績に及ぼす影響

工藤 祐輔, 有地 あかね, 村松 裕崇, 伊藤 かほり, 大村 直輝, 門前 志歩, 遠藤 美幸, 向井 直子, 小峰 祝敏, 中橋 沙織, 野木 世莉那, 本藤 早紀, 中岡 優希, 原 愛弓, 遠藤美和, 大竹 由希子, 大原 基弘, 清水 康史, 依光 毅, 己斐 秀樹, 河村 寿宏  
田園都市レディースクリニック

### 【目的】

精液は脱水や温度により質が変化するため、精液検査も採取後1時間以内に検査を始めることが望ましいとされている(WHOラボマニュアル, 2010)。しかし、ARTを実施するにあたって、個々の患者の事情により、採精してから精液処理を開始するまでに要する時間が異なる。精子は精漿と分離することで受精能獲得抑制因子が除去され、capacitationを起こしやすくなる一方で、精漿が除去された精子は活性酸素等によりDNA断片化などの障害を受ける可能性がある。また、洗浄精液は必ずしも洗浄後すぐに体外受精に用いられるとは限らず、採精から媒精までの至適時間は明らかになっていない。そこで、採精から媒精までの時間経過が臨床成績に及ぼす影響について検討した。

### 【対象と方法】

検討1. 2010年1月～2013年12月に採卵を実施し、conventional IVF (cIVF) を施行した妻年齢39歳以下のうち、院外にて採精し持参した精液所見がWHOの基準を満たす292症例を対象とした。採精時刻から精液処理開始までの時間を1時間未満、1～2時間未満、2～3時間未満、3

時間以上の4群に分け、精子運動率、直線速度、正常受精率、Day3良好胚率、Day5胚盤胞発生率、臨床妊娠率、流産率を検討した。検討2. 検討1の結果を踏まえ、同対象のうち採精から3時間以内に精液処理を開始した255症例を対象とし、精液処理終了後から媒精までの時間を3時間未満、3～4時間未満、4時間以上の3群に分け、検討1と同様に臨床成績を検討した。

### 【結果】

検討1. 精液処理開始までの時間別の妻平均年齢(35.43±2.17, 35.71±2.66, 35.76±3.15, 35.42±2.69)に有意な差は認められなかった。正常受精率は1時間未満69.5%、1～2時間未満70.0%、2～3時間未満76.1%、3時間以上64.1%であり、2～3時間未満と比較して3時間以上で有意に低下した(P<0.05)。しかし、Day3良好胚率(59.1%, 60.9%, 64.7%, 64.0%)、Day5胚盤胞発生率(47.0%, 50.0%, 55.8%, 47.0%)、臨床妊娠率(23.5%, 29.6%, 36.5%, 27.9%)、流産率(0.0%, 24.6%, 22.2%, 11.1%)に差は認められなかった。検討2. 媒精までの時間別の妻平均年齢(36.07±2.17, 35.34±3.18, 35.83±2.69)に有意な差は認められなかった。正常受精率(65.8%, 75.2%, 72.4%)、Day3良好胚率(61.6%, 59.2%, 63.7%)、Day5胚盤胞発生率(50.7%, 51.1%, 53.0%)、臨床妊娠率(30.0%, 26.7%, 32.5%)、流産率(11.1%, 31.6%, 33.3%)に差は認められなかった。

### 【考察】

採精から精液処理開始までに3時間以上経過すると正常受精率は低下することが明らかとなった。しかし、Day3良好胚率、Day5胚盤胞発生率、臨床妊娠率、流産率に差は認められなかった。また、精液処理後から媒精までの時間経過は臨床成績に差は認められなかった。このことからcIVFを実施するにあたり、採精から3時間以内に精液処理を開始することができれば、臨床成績には影響がないことが示唆された。

## P-28 胚発育速度に基づく新鮮胚移植の臨床成績

秋吉 俊明, 松尾 完, 南 志穂, 西垣 みなみ, 松崎 彰子, 福嶋 倫子, 上田 泰子, 松尾 恵子, 佐藤 春菜, 川口 由美, 山口 敦巳, 岡本 純英  
ART岡本ウーマンズクリニック

### 【目的】

当院は、タイムラプスインキュベーターにより、syngamy から4細胞期胚までの胚発育速度が胚盤胞形成の予測となり、8細胞期胚以降の胚発育速度が胚盤胞形成時期の予測因子になることを報告した。そこで今回は、Day2およびDay3にて新鮮胚移植(以下D2ETおよびD3ET)を実施した胚の発育速度を先の報告から得た知見と比較し、臨床成績について検討した。

### 【方法】

2013年1月から10月にICSIを施行し、2個以上の受精卵を得た78件(D2ET 31件, D3ET 47件)を対象とした。すべての胚はICSI後、すぐにタイムラプスインキュベーターによる培養を行った。

D2ET胚はsyngamy、2細胞期到達時間、4細胞期到達時間を測定し、D3ET胚はD2ET測定項目に加え、8細胞期到達時間を測定した。各基準時間は、先の報告から得られた知見よりsyngamy 23.3hr、2細胞

期到達時間 25.3hr、4細胞期胚 37.8hr および8細胞期胚 53.7hr とし、基準時間よりも発育速度の速い胚と遅い胚に分けた。

Day2にて基準値よりも速い胚は、syngamy、2細胞期胚、4細胞期胚の順にA、B、C群とし、遅い胚をD、E、F群とした。また、Day3にて基準値よりも速い胚をsyngamy、2細胞期胚、4細胞期胚および8細胞期胚の順にG、H、I、J群とし、遅い胚をK、L、M、N群とした。各群の妊娠率、流産率を求めた。

### 【結果】

各群の妊娠率と流産率は順に、A群(31.8%;42.9%)、B群(30.4%;42.9%)、C群(34.8%;25.0%)、D群(22.2%;0.0%)、E群(25.0%;0.0%)、F群(12.5%;100.0%)、G群(27.8%;30.0%)、H群(26.5%;22.2%)、I群(32.3%;30.0%)、J群(34.8%;25.0%)、K群(9.1%;0.0%)、L群(15.4%;50.0%)、M群(6.3%;0.0%)、N群(12.5%;33.3%)であった。胚発育速度による胚盤胞形成と胚盤胞形成時期の基準時間から臨床成績の有意差は認められなかったものの、4細胞期到達以降の早期到達胚は遅延胚よりも妊娠率が高値となった。流産率は、胚発育速度の速い胚において、胚発育が進むにつれて低値となった。

### 【考察】

ET胚を選択する際、8細胞期到達時間から胚発育速度の速い胚を選択することで、臨床成績の向上の可能性が示唆された。これは、新鮮胚移植において、胚盤胞形成の予測因子による判断よりも胚盤胞形成時期の予測因子による胚選択が有用である可能性が示唆された。

## P-29 完全合成ガラス化凍結保存液を用いたヒト胚盤胞の凍結保存 ーヒト血清アルブミン (HSA) は polyvinylpyrrolidone (PVP) で代替可能か?ー

沖津 摂, 小見山 純一, 清川 麻知子, 小田 隆司, 三宅 馨  
三宅医院 生殖医療センター

### 【背景】

ART に用いられる胚培養液や凍結保存液には細胞内浸透圧や pH の調整, 配偶子や胚の dish などへの接着防止を目的としてヒト血清アルブミン (HSA) が添加されている。ドナー由来タンパクは潜在的に未知の病原性疾患への感染の可能性が指摘されており, その解決策の一つとして高価な組み換え型ヒトアルブミンが開発されている。Polyvinylpyrrolidone (PVP) は N-ビニル-2-ピロリドンの重合した高分子化合物であり, 化粧品や錠剤 (医薬品または食品) の賦形剤や結合剤などとして使用されている。ART 分野では, ICSI 時の精子の運動性を緩和する目的で用いられている。また, 生存精子分離のために用いられるパーコールやその代替物質は PVP でコーティングされた直径 15 ~ 30nm 程度のケイ酸コロイド粒子から成っている。今回, 我々は PVP がヒト初期胚の凍結融解液に含まれる HSA の代替物と

して利用可能か調べた。

### 【方法】

廃棄処分となった Day5 凍結保存胚を融解し, 3 ~ 5 時間の回復培養後に形態評価を行って胚のグレードがほぼ均等になるよう 2 群に分けた。1% HSA (HSA 群) あるいは 1% PVP (PVP 群) 添加 mHTF を基礎溶液として作成した凍結・融解液を用い, Kuwayama *et al.* (2000) の方法に準じてガラス化凍結保存を行った。融解後, 2 ~ 4 時間の回復培養後に形態評価を行った。なお, 再拡張の確認された胚を生存胚とした。次に生存胚の一部を同様の手法で再度凍結・融解し, 融解液 (TS) 中でデバイス先端から胚が剥離されるまでの時間を最長で 180 秒まで測定した。

### 【結果】

HSA 群と PVP 群間で凍結融解後の生存率 (97.6 vs 87.8%), スコア維持率 (75.0 vs 63.9%) に有意差はなかった。剥離試験において, 60 秒以内にデバイス先端から胚が剥離した割合は HSA 群で 100% であったのに対し PVP 群では 18.5% と有意に低く ( $p < 0.0001$ ), さらに PVP 群では 180 秒経過後でも剥離した胚の割合は 22.2% だった。

### 【結論】

ヒト胚盤胞の凍結保存において PVP は HSA の代替物として利用可能であるが, 融解過程においてデバイス先端からの胚の剥離が困難になる現象が見られ, 操作性に改善の余地がある。