

ISSN 1881-9028

日本IVF学会雑誌

Vol.21 No.2

2018

JSAR
Japan Society of Assisted Reproduction

論文集

論文

—原著—

- 卵管留水症における卵管切除が体外受精成績に及ぼす影響について 2
水澤 友利, 八田 桂奈, 林 奈央, 江夏 宜シエン, 十倉 陽子, 片山 和明,
岡本 恵理, 山田 聡, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英
英ウィメンズクリニック

—原著—

- 無精子症患者の悲観的自己感情の把握と治療転帰～無精子症患者へのカウンセリングの在り方～ 9
松浦 大創, 奥原 彩也香, 小熊 惇平, 加藤 泰宏, 佐藤 渚, 小川 奈津, 野尻 由香,
黒田 加代子, 野村 昌男, 古井 憲司
クリニックママ

—原著—

- ARTにおけるホルモン補充—日本 IVF 学会による 2013 年と 2017 年のアンケート調査の比較— 14
東口 篤司¹, 古井 憲司², 塩谷 雅英³, 森本 義晴⁴
¹札幌エンドメトリウムリサーチ/²クリニックママ/³英ウィメンズクリニック/⁴HORAC グランフロント大阪クリニック

—症例報告—

- Dish への表面処理の有無のヒト胚培養成績に関する検討 20
角 知英, 古橋 孝祐, 角本 知世, 辻 優大, 岩崎 利郎, 伊藤 宏一,
水澤 友利, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英
英ウィメンズクリニック

卵管留水症における卵管切除が体外受精成績に及ぼす影響について

水澤 友利, 八田 桂奈, 林 奈央, 江夏 宜シエン, 十倉 陽子, 片山 和明,
岡本 恵理, 山田 聡, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英

英ウイメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町1丁目1-2 三宮セントラルビル

要旨: 卵管留水症を合併した症例に対する卵管切除の有無別に体外受精治療への影響を比較した。非切除群209周期と切除群46周期で採卵数, 受精率, 胚発生に有意差は見られなかった。胚移植後の成績は非切除群192周期と切除群52周期で, 切除群の妊娠率55.8%は非切除群の妊娠率39.6%に比べ高く ($P=0.04$), 切除群の出生率40.4%は非切除群18.2%に比べ有意に高かった ($P=0.0008$)。切除群の流産率27.6%は非切除群50.4%に比べ有意に低かった ($P=0.04$)。年齢層別解析では40歳までは切除群が非切除群に比べ初回移植から高い妊娠率と出生率であった。41歳以降の累積出生率は非切除群と切除群は類似した値であった。40歳までの卵管留水症合併体外受精症例における胚移植の卵管切除は移植後の成績を改善させると考えられるが, 41歳以降の症例においては切除に関しては慎重な対応が必要であることが示唆された。

キーワード: 卵管留水症, 卵管切除, 体外受精, 妊娠予後, 年齢

緒言

卵管留水症は体外受精治療において胚移植後の成績に悪影響をもたらす要因となるという報告がある¹⁻³⁾。卵管留水症を有する不妊患者は卵管留水症がない症例と比べ, 体外受精治療における妊娠率が約50%減少すると言われており, 卵管留水症に対する卵管切除はその改善に繋がるとされている⁴⁻⁶⁾。しかし卵管切除, 断端部結紮などの外科的治療は, 術後に卵巣への血流供給の低下をもたらす可能性が示唆されており, 血流低下に伴い卵巣機能が低下し, 採卵数や受精率に影響するという報告^{7,8)}がある一方で, それを否定する報告も存在し⁹⁾外科的治療に対する見解には未だ議論がある。それに加えて卵管に対する外科的治療は通院入院期間, 費用, 合併症の可能性などの問題が生じる。また採卵数, 妊孕能が低下した年齢の高い女性の卵管留水症に対する卵管切除の適応についての報告は少なく¹⁰⁾, 卵管切除の適応については明らかにされていない。

そこで今回の研究では卵管留水症を合併した不妊患者において, 卵管切除が及ぼす影響を卵管切除の有無別で採卵数, 受精率, 胚発生を比較した。また卵管切除の有無別で移植後の妊娠率, 流産率, 出生率を比較した。さらに年齢層別に卵管切除の有無別累積妊娠率, 累積出生率を比較し, 年齢による切除の適応について考察した。

対象と方法

試験は2014年1月から2016年12月までに, 初診で当院を受診した女性を対象として後方視的に実施した。対象は同期間に採卵した255周期124名のうち, 卵管非切除群(非切除群):97名:209周期と, 卵管切除群(切除群):27名:46周期)とした。患者背景として卵管切除の有無別に年齢と不妊期間(月), 卵巣機能評価として抗ミュラー管ホルモン(anti-Mullerian hormone: AMH), 月経3日目の基礎卵泡刺激ホルモン(Follicular stimulation hormone: FSH)を比較した。次に両群における採卵数, 受精率, 胚発生率を比較した。更に同一期間中に胚移植を行った244周期(非切除群:192周期, 切除群:52周期)について, 妊娠率, 流産率, 出生率をそれぞれの年齢層, 累積妊娠率, 累積出生率別に後方視的に比較した。

卵巣刺激方法としては, 原則として排卵誘発に用いたヒト閉経期性腺刺激ホルモン(human menopausal gonadotropin: hMG), リコンビナントFSH(r-FSH)の総投与量が1,500U以上であったロングプロトコール, ショートプロトコールおよびアンタゴニストプロトコールなどの一般法, ならびにクエン酸クロミフェン, アロマターゼ阻害剤, シクロフェニルなどの内服薬を主とし, hMG, r-FSHを補助的に用いて総投与量が1,500U未満であったマイルド法とでそれぞれ比較した。

表 1 患者背景

			採卵時年齢	不妊期間(月)	AMH(ng/ml)	Day3FSH(mIU/mL)
非 切 除 群	～30歳	16周期(11名)	27.6±2.3	13.3±11.1	4.9±4.4	11.6±11.9
	31～35歳	58周期(40名)	32.9±1.3	33.5±28.7	4.4±10.1	8.0±6.5
	36～40歳	60周期(39名)	38.0±1.4	29.8±28.6	2.0±2.7	8.3±9.8
	41～歳	75周期(30名)	43.0±1.5	53.9±60.1	1.2±1.6	8.4±8.8
	(24～47歳)	209周期(97名)	37.6±5.1	38.2±43.8	2.5±5.8	8.5±8.3
切 除 群	～30歳	1周期(1名)	29	41		4.5
	31～35歳	8周期(6名)	32.9±1.4	32.3±48.3	3.1±1.1	5.9±3.1
	36～40歳	17周期(14名)	37.6±1.9	46.3±36.5	2.6±1.3	7.4±7.6
	41～歳	20周期(8名)	42.0±1.2	62.7±63.2	0.9±1.1	11.7±9.1
	(29～45歳)	46周期(27名)	38.5±3.9	50.9±51.5	1.8±1.5	7.0±7.5
t検定			P=0.185	P=0.12	P=0.12	P=0.26

表 2 排卵誘発方法別採卵数

		非切除群	切除群	t検定
《一般法》 ロング ショート アンタゴニスト	採卵周期	127	20	
	平均年齢	37.0±5.0	36.4±8.8	P=0.59
	採卵数	7.0±5.5	8.4±5.7	P=0.29
《マイルド法》 クエン酸クロミフェン アロマトラーゼ阻害剤 セキノビット エストロゲン低用量 等	採卵周期	82	26	
	平均年齢	38.5±5.3	40.1±3.3	P=0.07
	採卵数	2.4±2.2	1.6±1.1	P=0.02

採卵, 受精, 培養方法および発生した胚の形態学的評価方法は以前報告した論文¹¹⁾の内容と同様とし, 胚盤胞の評価はGardnerの分類を用いてGrade3BB以上と良好胚として比較した。

移植には受精から2日目の初期胚あるいは受精から5～6日目の胚盤胞を用いた。新鮮胚移植は採卵後2日目に初期胚を, 5日目に胚盤胞を移植した。凍結胚移植は自然周期において初期胚は排卵後2日目に, 胚盤胞は排卵後5日目に移植し, ホルモン補充周期において初期胚は月経17日目に, 胚盤胞は20日目に移植した。移植方法は初期胚のみ, 胚盤胞のみ, または二段階(初期胚と胚盤胞)のいずれかにおいて合計1～2個移植した。

黄体補充として新鮮胚移植は採卵後2日目よりプロゲステロン膈坐薬(600mg/日)を連日投与とエストラジオール貼付剤を隔日投与した。凍結胚移植では自然排

卵周期においては排卵後2日目よりプロゲステロン膈坐薬(600mg/日)を連日投与とエストラジオール貼付剤を隔日投与, ホルモン補充周期においては月経2日目よりエストラジオール貼付剤を2枚から6枚へ漸増, 15日目から3枚を隔日投与, プロゲステロン膈坐薬(900mg/日)15日目から連日投与した。比較項目は移植周期あたりの妊娠率, 妊娠周期あたりの流産率, 移植周期あたり出生率とした。有意差検定にはカイ2乗検定およびt検定を用いP<0.05を有意差ありとした。

結 果

対象とした124名の平均年齢は非切除群で37.6±5.1歳, 切除群で38.5±3.9歳(P=0.185)と両群に差はなかった(表1)。また平均不妊期間は非切除群で38.2±

表3 採卵数, 受精率, 胚発生率

	非切除群	切除群	P
平均年齢	37.6±5.1	38.5±3.9	0.19
実施数	952	185	
受精卵数	728	146	
受精率(%)	76.5%	78.9%	0.47
5日目胚盤胞達成数	268	58	
3BB以上	129	26	
3BB以上率(%)	48.1%	44.8%	0.65
良好胚盤胞	53	14	
良好胚盤胞率(%)	19.8%	24.1%	0.46

表4 移植周期あたり妊娠率, 流産率, 出生率

	非切除群192周期(95名)	切除群52周期(29名)	P
平均年齢	34.9±4.6(23-45歳)	35.4±3.6(29-41歳)	0.47(t-test)
妊娠率(妊娠周期/移植周期)	39.6%(76*/192)	55.8%(29/52)	0.04(χ ² 検定)
流産率(流産周期/妊娠周期)	50.4%(38/76)	27.6%(8/29)	0.04(χ ² 検定)
出生率(出生周期/妊娠周期)	18.2%(35/192)	40.4%(21/52)	0.0008(χ ² 検定)

*子宮外妊娠 4周期
20週破水 1周期
流産 13トリソミー1周期

43.8ヶ月, 切除群では50.9±51.5ヶ月(P=0.12)と有意差を認めなかった. 平均AMH値は非切除群で2.5±5.8(ng/ml), 切除群では1.8±1.5(ng/ml) (P=0.12), 平均FSHは非切除群で8.5±8.3(mIU/mL), 切除群では7.0±7.5(P=0.26)とそれぞれ差は認めなかった(表1).

平均採卵数は一般法において非切除群では(127周期)7.0±5.5個, 切除群(20周期)8.4±5.7個(P=0.29), マイルド法では非切除群が(82周期)2.4±2.2個, 切除群(26周期)1.6±1.1(P=0.02)と切除群で少なかった(表2).

受精率は非切除群では76.5%(728/952), 切除群では78.9%(146/185) (P=0.47), 3BB以上率は非切除群で48.1%(129/268), 切除群では44.8%(26/58) (P=0.65)であり, 良好胚盤胞率は非切除群19.8%(53/268), 切除群24.1%(14/58) (P=0.46)と, 受精率のすべての項目において有意差はなかった(表3).

胚移植後の成績は, 非切除群95名(192周期)と切除群29名(52周期)でそれぞれの移植周期あたりの妊娠

率は非切除群39.6%(76/192)と切除群55.8%(29/52) (P=0.04)と切除群が高く有意差を認めた. 妊娠周期あたりの流産率は非切除群50.4%(38/76)および切除群27.6%(8/29) (P=0.04)と非切除群が高く有意差を認めた. 移植周期あたりの出生率は非切除群が18.2%(35/192), 切除群が40.4%(21/52) (P=0.0008)と切除群が高く有意差を認めた. 非切除群では子宮外妊娠4周期, 20週の破水を1周期認めた. 切除群では子宮外妊娠は認められなかった(表4).

胚移植回数による累積妊娠率は非切除群では移植回数1回目23.4%(45/192), 2回目34.4%(66/192), 3回目38.0%(73/192), 4回目39.1%(75/192), そして6回目で39.6%(76/192)に達しそれ以降の妊娠症例はなかった. 切除群では1回目40.4%(21/52), 2回目51.9%(28/52), そして4回目で55.8%(29/52)に達しそれ以降の妊娠症例はなかった(図1).

累積出生率は非切除群では移植1回目11.5%(22/192), 2回目15.1%(29/192), 3回目17.7%

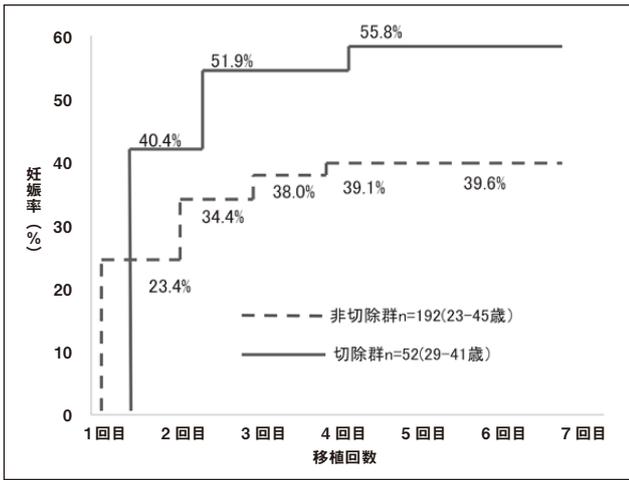


図1 累積妊娠率

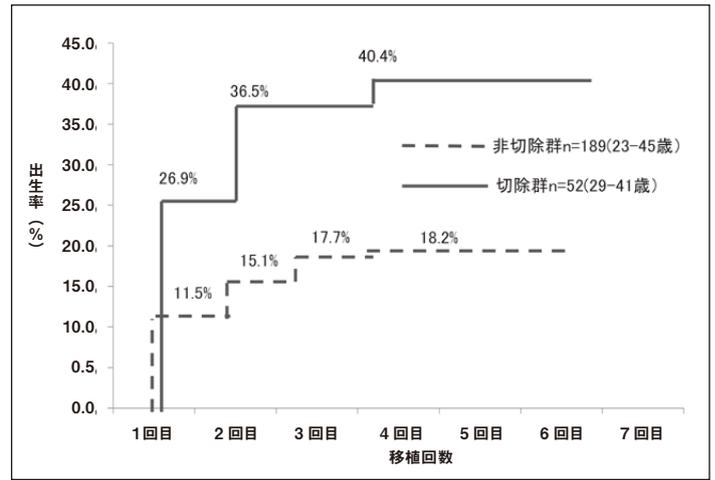


図2 累積出生率

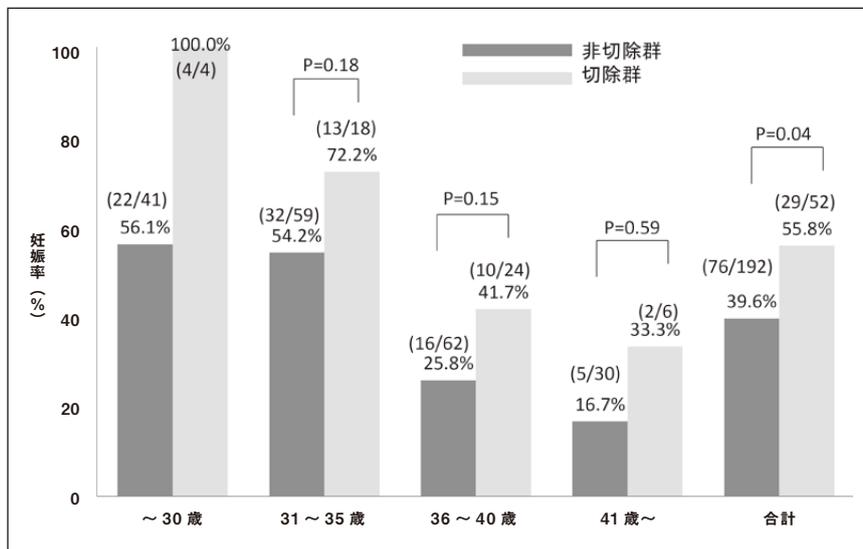


図3 年齢層別妊娠率

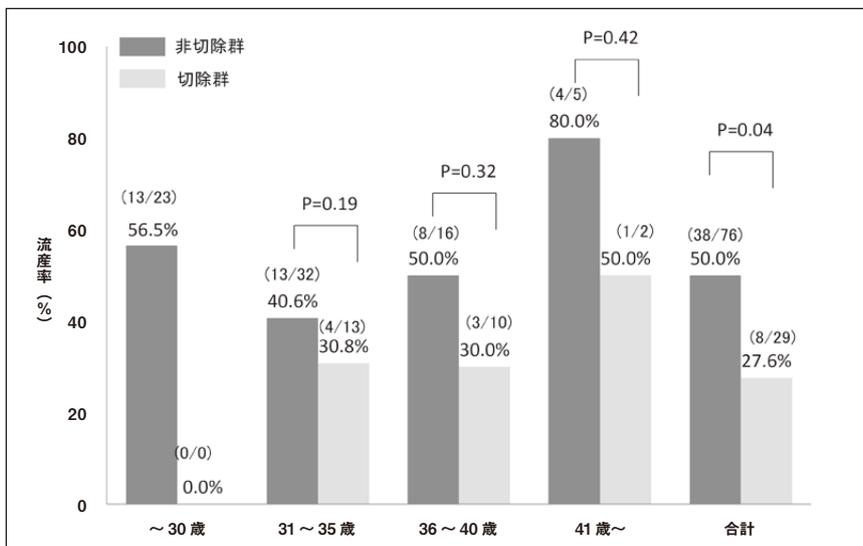


図4 年齢層別流産率

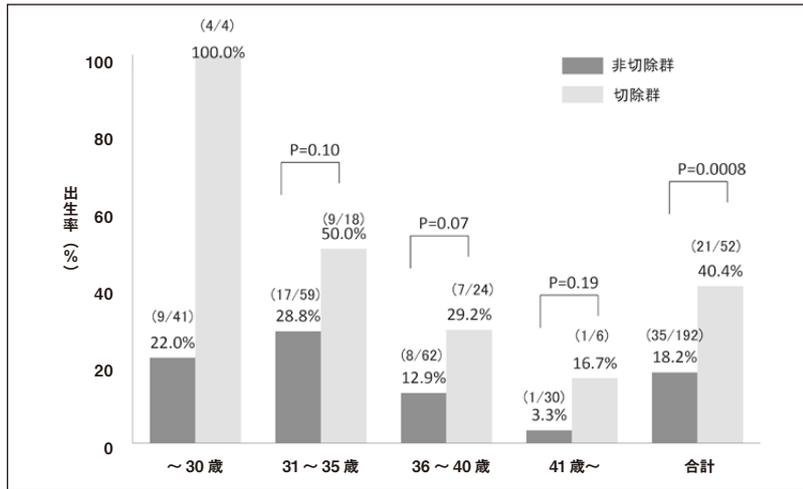


図5 年齢層別出生率

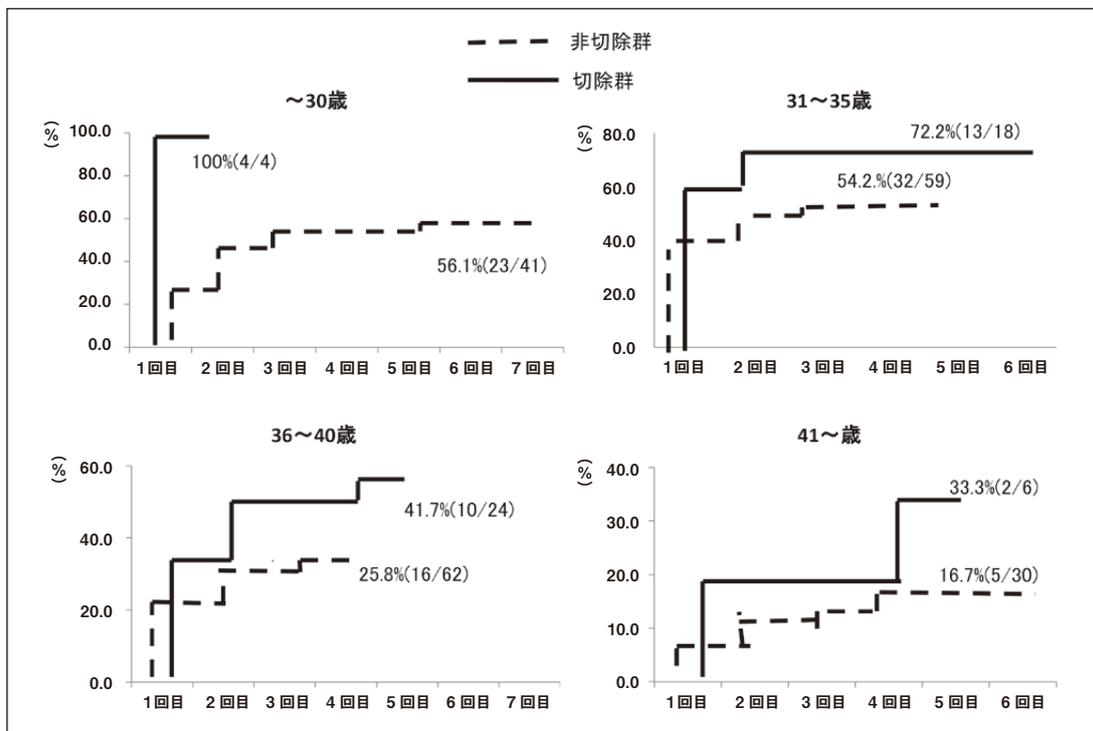


図6 年齢層別累積妊娠率

(34/192), そして4回目にて18.2%(35/192)となりそれ以降の出生症例はなかった. 切除群では1回目26.9%(14/52), 2回目36.5%(19/52)となり4回目で40.4%(21/52)となりそれ以降の出生症例はなかった(図2).

年齢層別妊娠率において, いずれの年齢層でも非切除群に比べ切除群が高く, 全体で切除群が高く有意差を認めた(図3). 年齢層別流産率は31歳以上で非切除群が切除群より高い傾向で, 全体では非切除群50.0%(38/76)および切除群27.6%(8/29) (P=0.04)と

非切除群が高く有意差を認めた. 30歳までの症例は切除群に該当するものがなかった(図4). 年齢層別出生率はいずれの年齢層でも切除群が非切除群に比較して高く, 全体として切除群は非切除群より高く有意差を認めた(図5). 年齢層別の累積妊娠率ではどの年齢層においても初回の移植から非切除群より切除群が高い傾向を示し, それぞれ3~4回目の移植で妊娠率がプラトーに達する傾向があった(図6). 年齢層別の累積出生率においては, 31歳から40歳までは切除群

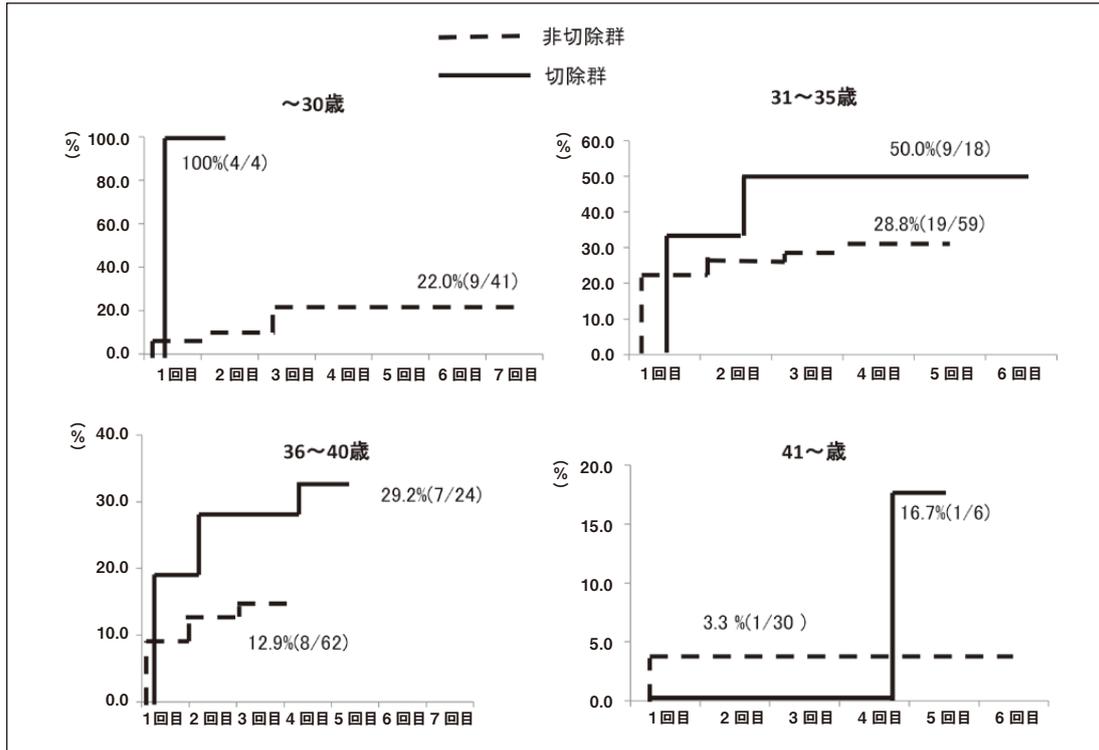


図7 年齢層別累積出生率

が非切除群に比較して高く、移植3～4回目でプラトーに達する傾向を示した(図7)。

考 察

今回の研究では卵管留水症に対する卵管切除の有無別での採卵数、受精率、胚発生率、良好胚盤胞率には有意差は殆ど認めなかった。近年では卵管留水症に限らず、卵管病変に対する卵管切除は卵巣機能に影響しないという報告があり¹²⁻¹⁵⁾、本研究でもこれに矛盾しない結果であった。マイルド法における採卵数の差は臨床的に大きな差を生じると判断しなかった。

一方で、移植後の妊娠率を切除群と非切除群で比較すると、切除群の妊娠率が有意に高く、これは年代別に比較しても卵管留水症では年齢にかかわらず卵管の外科的切除により妊娠率が上昇する可能性が考えられた。流産率は切除群の30歳以下や41歳以上の症例が少なく十分な検討に到らなかったが、31～40歳では切除群が非切除群より低い結果であり、全体でも切除群が非切除群より低い傾向を示した。Hulusiらの論文では卵管留水症は明らかに流産率を高め(オッズ比5.2333; 95% CI, 1.563-3.482)約10～50%⁴⁾、Andersonらは卵管留水症の流産率70%は非卵管留水症症例の36%

より高く¹⁾、またCamusらは卵管留水症の流産率が43%、コントロール群では31.1%より高いと報告しており⁵⁾これらの報告に矛盾しない結果であると判断し、卵管留水症の卵管切除は流産予防に効果的であると再確認できた。これより卵管留水症は流産への悪影響があり卵管切除は流産予防に効果的であると判断した。

年齢層別解析、累積妊娠率、累積出生率の解析から40歳まではいずれの年齢層においても、移植が3～4回までで非切除群、切除群の両群で妊娠率、出生率がプラトーに達する傾向を示し、1回目の移植から切除群は非切除群より高い妊娠率と出生率を示した。41歳以降については切除群の症例が極端に少なく、非切除群に比べ切除群の出生率が高い結果であったが、実質出生児数は同じであった。胚移植後、妊娠から出生にいたるまでに41歳以上に関しては卵管留水症以外の要素が大きくかかわっている可能性が示唆され、41歳以上の卵管切除の適応の有効性における判断が難しく、更なる検討が必要と判断した。

今回の検討の結果より、40歳までの卵管留水症症例において胚移植前に卵管切除して移植するという選択が有効と考えるが、外科的治療にかかる通院入院期間、費用、合併症のリスクなどを考慮しこれらを検討したうえで切除しない状態での移植を選択した場合、3～4

回目の移植で妊娠, 出産に至らなければ手術の適応について再度積極的に検討してみる価値があると判断した。また反復手術症例や反復腹膜炎などの高度な腹腔内癒着が推定される場合や重篤な基礎疾患合併などで外科的治療が困難と判断される症例では代替治療として2001年にHurst BSらが報告しているドキシサイクリンの投与¹⁶⁾, 卵管起始部の塞栓術¹⁷⁾などの有効性と安全性を検討してゆく必要がある。結論として本研究では卵管留水症合併体外受精症例における卵管切除は採卵数, 受精率, 胚発生に影響しなかった。移植後の成績は, 卵管切除をしなくても妊娠は成立するが卵管切除をしない状態の妊娠率, 出生率は卵管切除した症例より低く, 流産率は高い傾向であり, 胚移植の妊娠予後の改善のために移植前の卵管切除は効果的であると判断した。41歳以降に関しては卵管切除の有無別の累積出生児数が同じであることより, 出生にいたるまでに卵管留水症以外の要素の影響が大きいことが示唆され, 切除に関しては慎重な対応が必要であることが示唆され, 今後症例数を増やした更なる検討が必要と判断した。

参考文献

- 1) Andersen AN, Yue Z, Meng FJ, Petersen K: Low implantation rate after in-vitro fertilization in patients with hydrosalpinges diagnosed by ultrasonography. *Hum Reprod*, 9: 1935-1938, 1994.
- 2) Strandell A, Waldenström U, Nilsson L, Hamberger L: Hydrosalpinx reduces in-vitro fertilization/embryo transfer pregnancy rates. *Hum Reprod*, 9: 861-863, 1994.
- 3) Kassabji M, Sims JA, Butler L, Muasher SJ: Reduced pregnancy outcome in patients with unilateral or bilateral hydrosalpinx after in vitro fertilization. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 6: 129-132, 1994.
- 4) Zeyneloglu HB, Arici A, Olive DL: Adverse effects of hydrosalpinx on pregnancy rates after in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril*, 70: 492-499, 1998.
- 5) Camus E, Poncelet C, Goffinet F, Wainer B, Merlet F, Nisand I: Pregnancy rates after in-vitro fertilization in cases of tubal infertility with and without hydrosalpinx: a meta analysis of published comparative studies. *Hum Reprod*, 14: 1243-1249, 1999.
- 6) Strandell A, Lindhard A, Waldenström U, Thorburn J, Janson PO, Hamberger L: Hydrosalpinx and IVF outcome: a prospective, randomized multicentre trial in Scandinavia on salpingectomy prior to IVF. *Hum Reprod*, 14: 2762-2769, 1999.
- 7) Gelbaya TA, Nardo LG, Fitzgerald CT, Horne G, Brison DR, Lieberman BA: Ovarian response to gonadotropins after laparoscopic salpingectomy or the division of fallopian tubes for hydrosalpinges. *Fertil Steril*, 85: 1464-1468, 2006.
- 8) Chan CC, Ng EH, Li CF, Ho PC: Impaired ovarian blood flow and reduced antral follicle count following laparoscopic salpingectomy for ectopic pregnancy. *Hum Reprod*, 18: 2175-80, 2003.
- 9) Dar P, Sachs GS, Strassburger D, Bukovsky I, Arieli S: Ovarian function before and after salpingectomy in artificial reproductive technology patients. *Hum Reprod*, 15: 142-144, 2000.
- 10) Vejtorp M, Petersen K, Andersen AN, Yue BZ, Meng BF: Fertilization in vitro in the presence of hydrosalpinx and in advanced age. *Ugeskr Laeger*, 17: 4131-4134, 1995.
- 11) 古橋孝祐・矢田桃子・辻優大・大月純子・岩崎利郎・伊藤宏一・水澤友利・松本由紀子・若口昭次・塩谷雅英: 受精障害に対する rescue-ICSI の培養成績および胚移植成績について. *日 IVF 会誌*, 20: 3-7, 2017.
- 12) Dar P, Sachs GS, Strassburger D, Bukovsky I, Arieli S: Ovarian function before and after salpingectomy in artificial reproductive technology patients. *Hum Reprod*, 15: 142-144, 2000.
- 13) Noventa M, Gizzo S, Saccardi C, Borgato S, Vitagliano A, Quaranta M, Litta P, Gangemi M, Ambrosini G, D'Antona D, Palomba S: Salpingectomy before assisted reproductive technologies: a systematic literature review. *J Ovarian Res*, 9: 74, 2016.
- 14) Venturella R, Morelli M, Lico D, Di Cello A, Rocca M, Sacchinelli A: Wide excision of soft tissues adjacent to the ovary and fallopian tube does not impair the ovarian reserve in women undergoing prophylactic bilateral salpingectomy: results from a randomized, controlled trial. *Fertil Steril*, 104: 1332-1339, 2015.
- 15) Kotlyar A, Gingold J, Shue S, Falcone T: The effect of salpingectomy on ovarian function. *J Minim Invasive Gynecol*, 24: 563-578, 2017.
- 16) Hurst BS, Tucker KE, Awoniyi CA, Schlaff WD: Hydrosalpinx treated with extended doxycycline does not compromise the success of in vitro fertilization. *Fertil Steril*, 75: 1017-1019, 2001.
- 17) Tsiami A, Chaimani A, Mavridis D, Siskou M, Assimakopoulos E, Sotiriadis A: Surgical treatment for hydrosalpinx prior to in-vitro fertilization embryo transfer: a network meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*, 48: 434-445, 2016.

無精子症患者の悲観的自己感情の把握と治療転帰 ～無精子症患者へのカウンセリングの在り方～

松浦 大創, 奥原 彩也香, 小熊 惇平, 加藤 泰宏, 佐藤 渚, 小川 奈津, 野尻 由香,
黒田 加代子, 野村 昌男, 古井 憲司

クリニックママ 〒503-0807 岐阜県大垣市今宿 3-34-1

要旨： 無精子症患者 (n=36) と正常精液所見患者 (n=47) に対し, 中村らの楽観主義尺度を一部修正し, 楽観的自己感情因子と悲観的自己感情因子を比較検討した. 無精子症患者 (n=32) に TESE, MESA を施行し, 精子凍結保存 (n=15) を行った. その後 ICSI を施行し, 得られた胚を新鮮胚移植あるいは凍結融解胚移植をし, 転帰を調査した. その結果, 無精子症患者 (14.6 ± 1.6) は, 正常精液所見患者 (11.3 ± 2.2) と比較して, 「悲観的自己感情因子」が有意に高得点であった ($P < 0.05$). TESE, MESA を施行した無精子症患者 (n=32) のうち, 精子凍結保存が可能であった無精子症患者 (n=15) の出産率は 46.7% (7/15) であった. 無精子症患者に対し適切な情報 (出産率など) を提供し, 患者の悲観的感情を軽減するカウンセリングが必要である.

キーワード： 無精子症, TESE, 治療転帰, 男性心理, カウンセリング

緒言

男性不妊患者の中には, 無精子症患者が存在する. 我々の先行研究では, 不妊治療で通院する夫婦の不妊原因のうち, 男性因子は 30.1% であった¹⁾. 男性不妊は精液所見により, 精子濃度 15×10^6 /ml 未満を乏精子症, 精子運動率 40% 未満を精子無力症, 形態正常精子 4% 未満を奇形精子症, 精液が射出されない状態を無精液症, 精液を遠心分離した後に沈査中に精子が存在しない状態を無精子症とし, 表記, 分類されている²⁾.

無精子症である場合, 挙児を希望するも自己の努力では克服できない状況に直面する場合も多い. そのため, 悲観的な感情が強くなる可能性が考えられる. 戸ヶ崎ら³⁾は, 悲観主義者は, 対極する楽天的志向性を有する楽観主義者と比べ, 希望を失い, 目標を諦めてしまう傾向があると報告している. 悲観的感情を抱え, 先入観だけで治療を行わずに挙児を断念することを防止するために, 適切な情報提供が必要である. 無精子症患者に対し, 泌尿器科医師による精巣内精子採取法 (TESE), あるいは顕微鏡下精巣上体精子吸引法 (MESA) が適応される. 1993年には, Schoyamanら⁴⁾により, 精巣組織から精子を抽出する精巣内精子採取法 (TESE) を施行し, 顕微授精 (TESE-ICSI) に成功して以来, TESE-ICSI が行われているが, TESE で回収された精子は精巣上体を通過していないため, 運動性を示さない精子が

混在する. また, TESE あるいは MESA により回収された精子は凍結保存される. 採卵により卵子が回収された際, 凍結精子は融解処理され ICSI に供されるが, 融解後に運動性を示さない精子も存在し, ICSI での運動精子を選別する際に苦勞を強いられる. そのため融解後の精子の所見により, 精子運動性を誘起する精子活性化処理として, ペントキシフィリン (PTX) が使用される. 松浦ら⁵⁾は, ヒト精子において, PTX 処理後の精子運動率, 生存率への影響, さらに先体反応誘起が及ぼす精子生存率について経時間変化を検討し, PTX 過剰添加は精子生存率を低下させることを報告した. また, PTX による精子活性化効果では, 精液を 37°C に加温することにより, 精子の力学的エネルギーが向上する報告がある⁶⁾. ペントキシフィリンの児への影響については, ICSI 施行時にペンキシフィリンにより活性化を誘起した場合, 生児の異常は認められず, PTX の安全性が確認されている⁷⁾. このように, 無精子症患者は, 精子採取における TESE あるいは MESA, 精子活性化, ICSI など, 受精卵を得るまでの治療過程で, 心身共に大きな負担を抱えることとなる.

そこで, 本研究では, 不妊治療適応患者のうち, 無精子症患者の割合を調査し, 無精子症患者の「ストレス要因」, 「治療姿勢」, および心理的状态として「楽観的自己感情」と「悲観的自己感情」, また, 無精子症患者の治療転帰 (妊娠率, 出産率, 治療の断念など) について検討

受付 2018年6月21日 / 受理 2018年7月28日

責任著者: 松浦 大創 e-mail [daizouclimama@chorus.ocn.ne.jp]

した。さらに、無精子症患者をはじめ、男性不妊患者はICSIの施行が不可欠であることから、ICSIに対する受容姿勢について調査を行った。

対象および方法

2011年1月から2017年12月まで当院に不妊治療目的でカウンセリング(60分間)を受けた患者(n=1,427)のうち、精液検査、ホルモン検査による無精子症患者(n=36)を対象とした。そのうち、無精子症患者(n=20)に対し、当院独自の質問紙により、「ストレス要因」、「治療に対する意欲(積極的、消極的)」を調査した。また、無精子症患者群(n=36)のうち、同意が得られた無精子症患者(n=5)に対し、中村ら⁸⁾の楽観主義尺度を一部修正し、楽観的自己感情因子(20点満点)と悲観的自己感情因子(20点満点)を適用した(表1)。また、同様に

精液所見が正常患者である非無精子症患者(n=47)に対し、楽観主義尺度を適用し、両者を比較検討した(検討1)。なお、本尺度は12項目から構成されている。楽観的自己感情因子は項目1, 4, 5, 11の4項目(5点×4項目=20点満点)、悲観的自己感情因子は項目3, 8, 9, 12の4項目(5点×4項目=20点満点)、フィラー(分析除外項目)は項目2, 6, 7, 10(5点×4項目=20点満点)である。採点方法は、非常にあてはまる:5点、ややあてはまる:4点、どちらともいえない:3点、ややあてはまらない:2点、全くあてはまらない:1点である。楽観的自己感情では、得点が高いほど楽観的自己感情傾向が強く、悲観的自己感情では、悲観的自己感情得点が高いほど悲観的自己感情が高いことを意味する。

当院と連携を結ぶ近隣の泌尿器科医師によりTESE、MESAを施行(n=32)し、当院へ精巣組織を移送した。当院にて胚培養士(エンブリオロジスト)が、精巣組織

表1 当院独自の質問紙(中村ら⁸⁾の楽観主義尺度を一部修正)

氏名:	生年月日(西暦):	年	月	日	年齢:	歳	性別:男・女
アンケート結果は、匿名で学会などに報告することがあります。本日のカウンセリングおよびアンケート調査を受けることに同意しますか? ○で囲んで下さい。 ・同意する ・同意しない							
以下の状況において、(日常生活、通院・治療の中で)あなた自身の最も適した考えを下記の選択肢1, 2, 3, 4, 5から1つ選び、○で囲んで下さい。 選択肢: 1. 全くあてはまらない 2. ややあてはまらない 3. どちらともいえない 4. ややあてはまる 5. 非常にあてはまる							
1. 治療結果がどうなるかはっきりしない場合は、いつも一番良い面(結果が良いこと)を考える。 → 1, 2, 3, 4, 5							
2. たやすくリラックスできる。 → 1, 2, 3, 4, 5							
3. なにか自分にとってまずいことになりそうだと思うと、たいていそうになってしまう。 → 1, 2, 3, 4, 5							
4. いつも物事の明るい面を考える。 → 1, 2, 3, 4, 5							
5. 治療後の将来に対して非常に楽観的である(出産できても、できなくてもその時はその時。なるようになる)。 → 1, 2, 3, 4, 5							
6. 自分は多くの友人に恵まれている。 → 1, 2, 3, 4, 5							
7. 忙しいこと(通院、仕事、家事など)は私にとって重要な事である。 → 1, 2, 3, 4, 5							
8. 治療結果などが自分の都合どおり(思い通り)に運ぶだろうなどとは期待しない。 → 1, 2, 3, 4, 5							
9. 物事が自分の思い通りに運んだためしがない。 → 1, 2, 3, 4, 5							
10. たとえ嫌な事(妊娠判定が陰性など)でも簡単には動揺しない。 → 1, 2, 3, 4, 5							
11. 「憂いの影には喜びがある」ということを信じている。 → 1, 2, 3, 4, 5							
12. 自分の身に思いがけない幸運が訪れるのを当てにすることは、めったにない。 → 1, 2, 3, 4, 5							
13. あなたが当院での不妊治療で、最も強くストレスを感じていることはなんですか? 無い場合は「なし」と回答して下さい。 治療中のストレス1位:							
14. 不妊治療に対する現在の考え、お気持ちは如何ですか。1つ選び、○を囲んで下さい。 ・積極的に治療を受けたい ・治療へのためらいや不安がある ・治療は受けたくない ・まだ分らない ・その他()							
15. 治療に関するご意見・ご要望があれば、ご記載下さい。							

を細切した後、遠心分離し、上清と沈査の精子の有無を倒立顕微鏡で確認して、精子を回収した。回収された精子を Sperm Freeze凍結保存液 (KITAZATO) に混和し、セラムチューブに分注し、 -196°C 液体窒素で凍結保存した。その後、精子凍結保存を実施できた症例に対し採卵を施行した。採卵された成熟卵子に ICSI により供される凍結精子は、融解後、ペントキシフィリン (PTX) 処理による活性化処理を行い、精子運動が活発であり、直進性が高い精子を ICSI に選択するように努めた。なお、PTX 処理は、Pentoxifylline PF-05 (KITAZATO) を 37°C に加温した後、精液浮遊液と 1:1 になるように混和し PTX 処理精液とした。PTX 処理精液から運動精子を採取し、洗浄後に精子の不動化を行い ICSI に供した。ICSI を施行し、得られた胚は既報⁹⁾ に準じたホルモン補充療法による凍結融解胚移植をし、その後の転帰 (妊娠、出産、治療断念など) を調査した (検討 2)。

また、2018 年 2 月から 2018 年 5 月まで、精液検査により精液所見が不良であった男性不妊患者 (n=23) に対し、ICSI に対する受容姿勢について、当院独自の質問紙「ICSI に抵抗があるか否か、ICSI に抵抗がある場合の理由」により検討した (検討 3)。

本研究は倫理的な配慮として、患者に全ての治療、調査において同意書 (「回答内容を学会などに報告することがある」趣旨を記載) を配布し、予め口頭および書面により伝達し、同意の有無を確認した。統計処理は一次元 ANOVA 解析を行い、結果を JMP IN software program (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いて統計分析した。平均値の有意差検定にはカイ 2 乗検定、あるいは t 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

結 果

検討 1 では、体外受精適応患者 (n=1,427) のうち、不妊の要因が無精子症である無精子症患者は 36 名であり、無精子症患者の占有率は 2.5% (36/1,427) であった。同意が得られた無精子症患者群 (n=20, 32.9 ± 2.9 歳) のストレス要因は、「治療結果 (挙児できるか否かへの不安)」30.0% (6/20), 「自責の念」10.0% (2/20), 「治療内容への不安」5.0% (1/20), 「治療時間」5.0% (1/20), 「治療費」5.0% (1/20), 「特にストレスはない」45.0% (9/20) であった。また、「無精子症患者 (n=20, 32.9 ± 2.9 歳) と正常精液所見患者 (n=47, 36.0 ± 5.7 歳) の治療意欲の比較」では、無精子症患者の積極的治療姿勢 75.0% (15/20) は、正常精液所見患者の積極的治療姿勢 55.3% (26/47) と比較して有意に高率であった ($P < 0.05$)。さらに、同意が得られ、楽観主義尺度を実施した「無精子症患者 (n=5, 32.6 ± 2.9 歳) と正常精液所見患者 (n=47, 36.0 ± 5.7 歳) における楽観的自己感情と悲観的自己感情との比較」では、無精子症患者 (n=5) の「悲観的感情因子」の得点 (14.6 ± 1.6) は、正常精液所見患者 (n=47) の「悲観的感情因子」の得点 (11.3 ± 2.2) と比較して、有意に高得点であった ($P < 0.05$)。なお「楽観的感情因子」については、有意差は認められなかった (表 2)。

検討 2 では、無精子症患者 (n=36, 33.7 ± 4.2 歳) の治療選択の転帰は、TESE・MESA 希望患者は 88.9% (32/36), 非配偶者間人工授精 (AID) 希望患者は 8.3% (3/36), 非配偶者体外受精希望患者 2.8% (1/36), であった (表 3)。

表 2 無精子症患者と正常精液所見患者における楽観的自己感情と悲観的自己感情との比較

	年齢	楽観的感情因子 (20 点満点)	悲観的感情因子 (20 点満点)
無精子症患者 n=5	32.6 ± 2.9	12.6 ± 2.7	14.6 ± 1.6^a
正常精液所見患者 n=47	36.0 ± 5.7	14.3 ± 2.7	11.3 ± 2.2^b

a-b 間に有意差あり ($P < 0.05$)。Mean \pm SD.

表 3 無精子患者 (n=36) の治療選択の転帰

TESE/MESA	AID	非配偶者間 IVF
88.9% (32/36)	8.3% (3/36)	2.8% (1/36)

無精子症患者 (n=36) 年齢: 33.7 ± 4.2 歳。Mean \pm SD.

表4 TESE/MESA 施行患者 (n=32) の治療転帰

精子を採取し精子凍結保存実施 46.9% (15/32)				精子を採取できず精子凍結保存実施できず 53.1% (17/32)		
出産	流産	治療継続	治療断念	AID	非配偶者間 IVF	治療断念
46.7% (7/15)	6.7% (1/15)	27.7% (4/15)	20.0% (3/15)	17.6% (3/17)	17.6% (3/17)	64.7% (11/17)

TESE/MESA 施行患者 (n=32) 年齢: 34.7 ± 5.2 歳. Mean ± SD.

TESE・MESAを施行した患者(n=32, 34.7 ± 5.2歳)のうち, 精子が回収でき精子凍結保存ができた患者は46.9% (15/32)であった. TESE・MESAにより凍結精子が得られた無精子症患者の体外受精後の出産率は, 46.7% (7/15)であった(表4). 一方, TESE・MESAを施行するも精子回収できなかった患者は53.1%(17/32)であり, その後の治療転帰は, 非配偶者間人工授精(AID)は17.6%(3/17), 非配偶者間体外受精は17.6%(3/17), 治療断念は64.7% (11/17)であった(表4). なお, 割合(率)の算出における分母は患者数とした.

検討3では, ICSIに対する当院独自の質問紙により, 「男性不妊患者(n=23, 37.5 ± 6.9歳)のICSIへの受容姿勢」, また「ICSIに抵抗がある場合はその理由」を検討した. その結果, 「ICSIに抵抗がある」と回答した男性不妊患者は39.1% (9/23)であり, その理由は, 「ICSIが児の健康に及ぼす影響への不安」は33.3%(3/9), 「なんとなく」は33.3% (3/9), 「夫婦以外の第三者が精子を選別することに対する不快感」は22.2%(2/9), 「ICSIの費用」は11.1%(1/9)であった.

考 察

検討1では, 無精子症患者は, 正常精液所見患者と比較して, 「悲観的感情因子」の得点が有意に高得点であった(P<0.05)(表2). このことから, 挙児が望めない可能性が高い状態を理解し, 「悲観的自己感情」の傾向が高い可能性が示唆された. カウンセリングの蓄語録の中には, 医師から「無精子症」であると診断された際, 男性不妊患者の心理状況の説明として, 「ショックでよく覚えていない」, 「今後どうすればよいのか, 混乱した」, 「結果を受け入れられなかった」, 「本当に自分の精液の検査結果なのか, 他の患者の結果と間違えているのでは」など, 精神的なダメージと治療の方向性を見失う喪失感, 悲観的な感情が表出していた. 悲観的な人々と比べ, 楽観的な人々は心身ともにより健康であるとされている¹⁰⁾. 無精子症患者が悲観的に思考するストレス要因(ストレッサー)を明確にする必要性がある. LazarusとFolkmanら¹¹⁾は心理的ストレス理論において, 「ストレッサーを処理しようとして, 意識的に行われる認知

的努力(行動および思考)」をコーピングとして定義づけた. 尾関ら¹²⁾は, コーピング(対処法)を「問題焦点型」(情報収集や再検討などの問題解決に直接関与する行動), 「情動焦点型」(ストレッサーにより引き起こされる情動反応に焦点をあてて気持ちを調節する行動), 「回避・逃避型」(不快な出来事から逃避し否定的に解釈する行動)の3つに分類し定義づけた. 我々の女性不妊患者を対象とした先行研究において, 治療期間別ストレス要因に対するコーピングの相違では, 問題焦点型および情動焦点型には有意差は認められなかったが, 回避・逃避型では治療期間1年未満および1年以上2年未満と2年以上との間に有意差(P<0.05)が認められ, 治療期間の長期化によりストレス対処方法が「回避・逃避型」に偏重することが明らかとなった¹³⁾. 楽観性の高い人は, 状況が統制可能であると判断された場合に問題焦点型コーピングにより, 問題をポジティブに捉え現実を受け入れるとされている¹⁴⁾. 今後, 男性不妊である無精子症患者にもストレス対処法(コーピング)を取り入れることにより, 悲観的な感情を軽減する可能性も考えられる. 本研究では, ストレス要因として「治療結果(挙児できるか否かへの不安など)」30.0% (6/20)が挙げられていた. 不安の原因を把握し, ストレス対処(コーピング)をすることが必要である. また, 積極的治療姿勢が強い傾向も認められた. これらの知見と本研究結果から, 無精子症患者は悲観的な考え方を示すが, 問題焦点型コーピングにより, 問題をポジティブに捉え現実を受け入れている可能性が示唆された. カウンセリングの中では, 「どうすれば精子を増やす方法はないのか」など, 不安を表出する中にも, 問題を積極的に解決する姿勢が見受けられた. 以上から, カウンセリングの在り方として, 男性不妊患者に対して, 現状(結果)の把握を支援し, 精神的なダメージを共感するカウンセリングに努める必要がある. 悲観的になるストレス要因を明確にし, 患者の意思と治療姿勢に配慮した治療計画を提供すること, また, 状況次第では治療を断念するのか否かについて支援する必要がある.

検討2では, TESE・MESAを施行した患者(n=32)のうち, 精子が回収でき精子凍結保存ができた患者は46.9%(15/32)であった. その後, TESE・MESAによ

り凍結精子が得られた無精子症患者の体外受精後の出産率は、46.7%(7/15)であった(表4)。なお、健康な児が得られ、無精子症患者であった場合でも精子が回収できれば、ご夫婦の遺伝子を有する児を授かる可能性がある。こうした治療転帰を、無精子症患者に伝えることにより、今後の治療を選択する際の情報源と成り得る。

検討3では、ICSIが必要となる男性不妊患者のうち、「ICSIに抵抗がある」と回答した男性不妊患者は、39.1%(9/23)であり、その理由は、「ICSIが児の健康に及ぼす悪影響への不安」が44.1%(4/9)であった。ICSIに不安を抱える患者も存在することが明らかとなった。ICSI、TESE-ICSIにより妊娠した児の自閉症スペクトラム障害が、IVFと比較して高率で発生することが懸念されている。ARTで出産した児において生後5年間で、自閉症と診断される頻度は、ICSIの児においては、IVFの児と比較して有意に高率であると報告されている¹⁵⁾。TESE、MESA施行の場合は、凍結精子保存、ICSI適応となるので、凍結精子およびICSIの安全性について、事前に説明する必要がある。今後も、ICSIを施行した児の精神的な健康も含めた追跡調査を行うことが望ましいと考えられた。一方、TESE・MESAを施行するも精子回収できなかった患者53.1%(17/32)の治療転帰は、治療断念は64.7%(11/17)が最も高率であった(表4)。精子が回収できない場合、AID(非配偶者間人工授精)、非配偶者間体外受精、挙児の断念、養子縁組などの選択肢から決断を迫られる。治療結果を伝えるのみにとどまらず、看護師、心理士などが中心となり、心理面でのサポートも必要である。

以上から、無精子症患者をはじめ、男性不妊患者の心理状況を軽視せず、カウンセリングを提供する機会を設けなければならない。無精子症患者の治療転帰の中には、挙児の獲得、挙児の断念、治療の断念、AID、非配偶者間体外受精、養子縁組など、多岐にわたる。そのため、患者当事者をはじめ、その家族(両親、兄弟姉妹など)も含め、将来の子供の福祉を見据えたカウンセリングが必要である。

謝 辞

当院と提携を結び、TESE・MESAにご協力いただきました社会医療法人 蘇西厚生会松波総合病院 泌尿器生殖科部長 萩原徳康先生に深謝致します。

参 考 文 献

- 1) 松浦大創・黒田加代子・西田明美・川地美穂・井上万規子・林奈津・小早葉月・野尻由香・藤田智久・野村昌男・北川武司・

- 古井憲司：男性不妊患者において妻の就労がワーク・ファミリー・コンフリクト(WFC)に及ぼす影響。日不妊カウンセリング会誌, 11: 151-156, 2012.
- 2) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen: 2010.
- 3) 戸ヶ崎泰子・坂野雄二：オブティミストは健康か。健康心理学研究, 6: 1-11, 1993.
- 4) Schoyaman R, Vanderzwalmen P, Nijis M, Segal L, Segal-Bertin G, Greets L, VanRoosendaalE, Schoysman D. : Pregnancy after fertilization of human testicular sperm. Lancet, 242: 123, 1993.
- 5) 松浦大創・林奈穂子・高西昭宏・西川恭弘・磯部哲也：精子無力症におけるN, 2-dibutyryladenosine 3', 5-cyclic monophosphateとpentoxifylline on mortality, viability and acrosome reaction in the spermatozoa of asthenozoospermic patients. 日臨床エンブリオロジスト会誌, 10: 24-26, 2008.
- 6) 大西佐知・糸井史陽・玉置幸嵩・西川和代・磯部哲也：加温またはペントキシフィリン添加による精子活性化効果の定量的評価。日受精着床会誌, 35: 163-168, 2018.
- 7) 松山茜・岡部綾美・齊藤綾・村上夢美・松岡里衣・福井敬介：顕微授精における未受精例に対するペントキシフィリンを用いた精子活性化処理の有用性。日受精着床会誌, 32: 82-85, 2015.
- 8) 中村陽吉：楽観主義尺度。山本眞理子・堀洋道編, 心理測定尺度集I, pp208-209, サイエンス社, 2001.
- 9) 松浦大創・長谷川英里・河村愛・高木梢・外川景子・藤本朋子・福手麻千衣・田中いづみ・古橋華代・林茂子・西田明美・川地美穂・井上万規子・黒田加代子・市川渚・小川奈津・野尻由香・野村昌男・北川武司・古井憲司：胚移植不成功の防止策と心理的サポート～低反応レベルレーザー活性化治療(LLLT)の効果とストレスコーピング～。日IVF会誌, 18: 6-9, 2015.
- 10) Scheier, M. F., Carver, C. S. : Optimism, coping, and health: Assessment and implications of generalized coping expectancies. Health Psychol, 4: 219-247, 1985.
- 11) Lazarus, R. S., Folkman, S.: Stress, Appraisal, and Coping. Springer, New York., 1984.
- 12) 尾関友佳子：大学生用ストレス自己評価尺度の改訂—トランスアクションナルな分析に向けて—。久留米大学大学院比較文化研究科年報, 1: pp95-114, 1993.
- 13) 松浦大創・古井憲司・北川武司・野村昌男・藤田智久・野尻由香・林奈津・足立樹・小早葉月・布川翔太・黒田加代子・和田信吾：体外受精施行前に女性患者が抱える問題把握および心理的支援の検討。日受精着床会誌, 29: 164-168, 2012.
- 14) Scheier, M, F., Weintraub, J, K., Carver, C, S. : Coping with stress: Divergent strategies of optimists and pessimists. J Pers Soc Psychol, 5: 1257-1264, 1986.
- 15) Kissin, D, M., Zhang, Y., Boulet, S, L., Fountain, C., Bearman, P., Schieve, L., Yeargin-Allsopp, M., Jamieson, D, J. : Association of assisted reproductive technology (ART) treatment and parental infertility diagnosis with autism in ART-conceived children. Hum Reprod, 30: 454-465, 2015.

ARTにおけるホルモン補充 —日本IVF学会による2013年と2017年のアンケート調査の比較—

東口 篤司¹, 古井 憲司², 塩谷 雅英³, 森本 義晴⁴

¹札幌エンドメトリウムリサーチ 〒064-0953 北海道札幌市中央区宮の森3条2丁目4-17

²クリニックママ 〒503-0807 岐阜県大垣市今宿3丁目34-1

³英ウィメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町1丁目1-2 三宮セントラルビル

⁴HORAC グランフロント大阪クリニック 〒530-0011 大阪府大阪市北区大深町23-1 グランフロント大阪タワー B15F

要旨: 日本IVF学会は、2014年から2016年に上市された4種類のmicronized progesterone膾劑発売の前後で、ARTにおけるホルモン補充がどのように変化したかを調査するため、膾劑発売後の2017年12月に全国のART実施施設を対象として「生殖医療におけるホルモン補充に関する調査」と題するアンケート調査をおこない、膾劑発売前の2013年2月におこなわれた同様のアンケート調査結果と比較した。その結果、卵胞ホルモンの使用状況にはあまり変化がなかったが、黄体ホルモンに関してはmicronized progesterone膾劑の使用が飛躍的に増加し、自家製progesterone膾劑とprogesterone筋注製劑の使用が大幅に減少していることが確認された。一方、世界では使われることのないchlormadinone acetate, 避妊用ピルが少なからず使われている日本の状況は、ややこれら薬劑の使用に減少傾向が認められたものの依然として継続していることが明らかとなった。

キーワード: 新鮮胚移植, 凍結胚移植, 卵胞ホルモン, 黄体ホルモン, 全国アンケート調査

はじめに

日本IVF学会は2013年2月、当時の国内の黄体補充の実態を調査するため日産婦ART登録施設に「ARTにおけるホルモン補充に関する調査」と題するアンケート調査を実施した¹⁾。その結果、世界的にはあまり使用されないと予想されるconjugated estrogenが比較的多く使用され、世界的には全く使用されないことのないchlormadinone acetate, 避妊用ピル(ethynilestradiol+norgestrel)や、最近では世界的にもほとんど使用されないmedroxyprogesterone acetateが少なからず使用されていることが判明した。当時のアンケート調査報告は、このように国内の事情が世界標準から大きく偏移している傾向は高濃度の経口estradiol製劑, micronized progesterone膾劑が国内で入手できないことが原因のひとつではないかと考え、これらの製劑のより容易な入手法の必要性を示唆している。その後2014年9月から2016年9月にかけて4種類の剤形の異なるmicronized progesterone膾劑(ルティナス[®], ウトロゲスタン[®], ルテウム[®], ワンクリノン[®])が国内で市販されることになったが、2017年9月の時点で4種類のmicronized progesterone膾劑が出揃ってから1年が経過し、日本IVF学会は国内の黄

体補充がmicronized progesterone膾劑発売前後でどのように変化したかを調査したいと考え、2017年12月に2013年2月と同様のアンケート調査を実施した。

方法

2017年12月、日本産科婦人科学会ART登録施設603施設に図1～4の4つの質問を郵送し、返信用封筒で無記名の返信を依頼した。

結果

267施設(44.3%)から回答が得られた。結果を図5～9に示した。図5は黄体補充として卵胞ホルモン, 黄体ホルモンを使用するか, 使用しないかの結果である。新鮮胚移植でも凍結胚移植でも2013年と2017年で目立った変化はなかった。

図6は各施設が使用した卵胞ホルモン製劑の中でその薬劑が何%を占めるかを、図7は、何%の施設がその卵胞ホルモンを使用しているかを、それぞれ2013年と2017年で比較したグラフである。図6, 7で卵胞ホルモンに著明な変化は認められなかった。図8は各施設が使用した黄体ホルモン製劑の中でその薬劑が何%を占

受付 2018年8月20日/受理 2018年8月31日

責任著者: 東口 篤司 e-mail [a-azumaguchi@muse.ocn.ne.jp]

「生殖医療におけるホルモン補充に関する調査」

凍結胚移植におけるホルモン補充に関する質問です

質問1 凍結胚移植において自然周期、過排卵周期、ホルモン補充周期にかかわらず、妊娠中に卵胞ホルモンを使う場合、現在どのような卵胞ホルモンをお使いでしょうか？ ビルは黄体ホルモンとの合剤ですが、ビルも含めてお答えください。該当する□にチェック(☑)を入れてください。複数選択可です。

卵胞ホルモンは使わない

- プレマリンなど結合型 estrogen
- Prognova などエステル型 estradiol
- ジュリナ、Estrace など micronized estradiol
- エストラナなど estradiol の貼付剤
- ディビゲルなど estradiol のゲル剤
- デボシンなど mestranol
- プラノバルなど経口避妊薬
- オバホルモンドポー、ペラニンデポーなどエステル型 estradiol の筋注剤

他にお使いの卵胞ホルモンがある場合、記載してください

- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある

その他の方法あるいはご意見がありましたらご記載ください

図1 凍結胚移植では、どのような卵胞ホルモンを補充するか

質問2 凍結胚移植において自然周期、過排卵周期、ホルモン補充周期にかかわらず、妊娠中に黄体ホルモンを使う場合、現在どのような黄体ホルモンをお使いでしょうか？ ビルは卵胞ホルモンとの合剤ですが、ビルも含めてお答えください。該当する□にチェック(☑)を入れてください。複数選択可です。

黄体ホルモンは使わない

- 自家製（医薬品製造業許可を持たない国内施設での製造） progesterone 錠剤
- ルティナス、ウトロゲスタン、ルテウム、ワンクリノンなど micronized progesterone の錠剤
- Utrogestan など micronized progesterone の経口剤
- デュファストンなど dydrogesterone
- ルトラールなど chlormadinone acetate
- プロベラ、ヒスロンなど medroxyprogesterone acetate
- ヒスロンHなど高用量 medroxyprogesterone acetate
- プラノバルなど経口避妊薬
- プログホルモンドポーなど progesterone の筋注剤
- プログデポー、オオホルミルテウムデポーなど hydroxyprogesterone caproate の筋注剤

他にお使いの黄体ホルモンがある場合、記載してください

- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある

その他の方法あるいはご意見がありましたらご記載ください

図2 凍結胚移植では、どのような黄体ホルモンを補充するか

新鮮胚移植におけるホルモン補充に関する質問です

質問3 自然周期、過排卵周期にかかわらず新鮮胚移植において妊娠中に黄体ホルモンを使う場合、現在どのような黄体ホルモンをお使いでしょうか？ ビルは卵胞ホルモンとの合剤ですが、ビルも含めてお答えください。該当する□にチェック(☑)を入れてください。複数選択可です。

黄体ホルモンは使わない

- 自家製（医薬品製造業許可を持たない国内施設での製造） progesterone 錠剤
- ルティナス、ウトロゲスタン、ルテウム、ワンクリノンなど micronized progesterone の錠剤
- Utrogestan など micronized progesterone の経口剤
- デュファストンなど dydrogesterone
- ルトラールなど chlormadinone acetate
- プロベラ、ヒスロンなど medroxyprogesterone acetate
- ヒスロンHなど高用量 medroxyprogesterone acetate
- プラノバルなど経口避妊薬
- プログホルモンドポーなど progesterone の筋注剤
- プログデポー、オオホルミルテウムデポーなど hydroxyprogesterone caproate の筋注剤

他にお使いの黄体ホルモンがある場合、記載してください

- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある

その他の方法あるいはご意見がありましたらご記載ください

図3 新鮮胚移植では、どのような黄体ホルモンを補充するか

質問4 自然周期、過排卵周期にかかわらず新鮮胚移植において妊娠中に卵胞ホルモンを使う場合、現在どのような卵胞ホルモンをお使いでしょうか？ ビルは黄体ホルモンとの合剤ですが、ビルも含めてお答えください。該当する□にチェック(☑)を入れてください。複数選択可です。

卵胞ホルモンは使わない

- プレマリンなど結合型 estrogen
- Prognova などエステル型 estradiol
- ジュリナ、Estrace など micronized estradiol
- エストラナなど estradiol の貼付剤
- ディビゲルなど estradiol のゲル剤
- デボシンなど mestranol
- プラノバルなど経口避妊薬
- オバホルモンドポー、ペラニンデポーなどエステル型 estradiol の筋注剤

他にお使いの卵胞ホルモンがある場合、記載してください

- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある
- _____ を使うことがある

その他の方法あるいはご意見がありましたらご記載ください

以上です。ご協力ありがとうございました。

図4 新鮮胚移植では、どのような卵胞ホルモンを補充するか

めるかを示すグラフである。2013年と2017年を比較すると、新鮮胚移植ではmicronized progesterone膾劑が5%から37%に著しく増加したのに伴ってprogesterone筋注が19%から10%に、自家製progesterone膾劑が16%から2%に減少していた。また凍結胚移植でもmicronized progesterone膾劑が6%から37%に著しく増加したのに伴ってprogesterone筋注が19%から10%に、自家製progesterone膾劑が16%から3%に減少していた。図9は何%の施設がその黄体ホルモンを使用しているかを示すグラフである。2013年と2017年を比較すると、新鮮胚移植ではmicronized progesterone膾劑が13%から82%に著しく増加したのに伴ってprogesterone筋注が47%から23%に、自家製progesterone膾劑が40%から4%に減少していた。また凍結胚移植でもmicronized progesterone膾劑が18%から91%に著しく増加したのに伴ってprogesterone筋注が55%から26%に、自家製progesterone膾劑が47%から6%に減少していた。

図7でconjugated estrogenを使用している施設は新鮮胚移植で24%から29%に、凍結胚移植では43%から30%と全体的に大きな変化はなかった。Ethinylestradiol(避妊用ピル)を使用している施設は新鮮胚移植で21%から7%に、凍結胚移植では13%から8%に減少していた。図9でchlormadinone acetateを使用している施設は新鮮胚移植で29%から22%に、凍結胚移植では40%から26%に、norgestrel(避妊用ピル)を使用している施設は新鮮胚移植で16%から6%に、凍結胚移植では14%から8%に、medroxyprogesterone acetateを使用している施設は新鮮胚移植で8%から2%に、凍結胚移植では11%から3%に、いずれもやや減少していた。

考 察

Micronized progesterone膾劑の国内生産によって国内における卵胞ホルモンの使用状況に大きな変化はなかったが、黄体ホルモンの使用状況は2013年に比べて大きく変化し、約90%の施設がmicronized progesterone膾劑を使用することとなり、自家製progesterone膾劑の使用が著しく減少し、progesterone筋注の使用が半減したことが今回の2017年の調査で判明した。

2013年と2017年のアンケート調査の結果をみると、いくつかの国内の黄体補充の特徴が窺える。まず、世界的には全く使用されていないchlormadinone acetate、避妊用ピルが少なからず使われていること、世界的に最近では使用されなくなったmedroxyprogesterone acetateも少ないが国内では使用されていること、さら

に、世界的には使用が少ないと予想されるconjugated estrogenの占める割合が比較的多いことなどが挙げられる²⁾。また、その薬劑が全体の何%を占めるかというデータ(図6, 8)とその薬劑が何%の施設で使用されているかというデータ(図7, 9)を対比させると、国内の別な特徴を窺うことができる。図9に示したように90%前後の施設がmicronized progesterone膾劑を使用しているにもかかわらず図8では全体の37%しか占めていない。また図7でestradiol patchが65~94%の施設で使用されているにもかかわらず図6では全体の39~45%しか占めていない。これらのデータは、国内では一人の症例に複数のホルモン製劑を組み合わせて使用しているか、症例によって薬劑を使い分けているか、その両方か、の可能性を予想させる。世界的には薬劑と筋注などprogesterone製劑を組み合わせて使用している施設は17.3%とされていることを考えると³⁾、複数の薬劑を使用している傾向も国内の特徴の一つかと思われる。

今回のアンケート調査の結果を見る限り、国内の黄体補充は2013年から2017年にかけて全体的に世界標準に近づいていることが判明したが、依然として日本独自の傾向は続いていることも明らかとなった。今後この傾向は、方向を変えるべきなのか、変える必要はないのか、検討する必要があると考えられた。

参 考 文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Vaisbuch E, de Ziegler D, Leong M, Weissman A, Shoham Z. Luteal-phase support in assisted reproduction treatment: real-life practices reported worldwide by an updated website-based survey. *Reprod Biomed Online*. 28: 330-335, 2014.

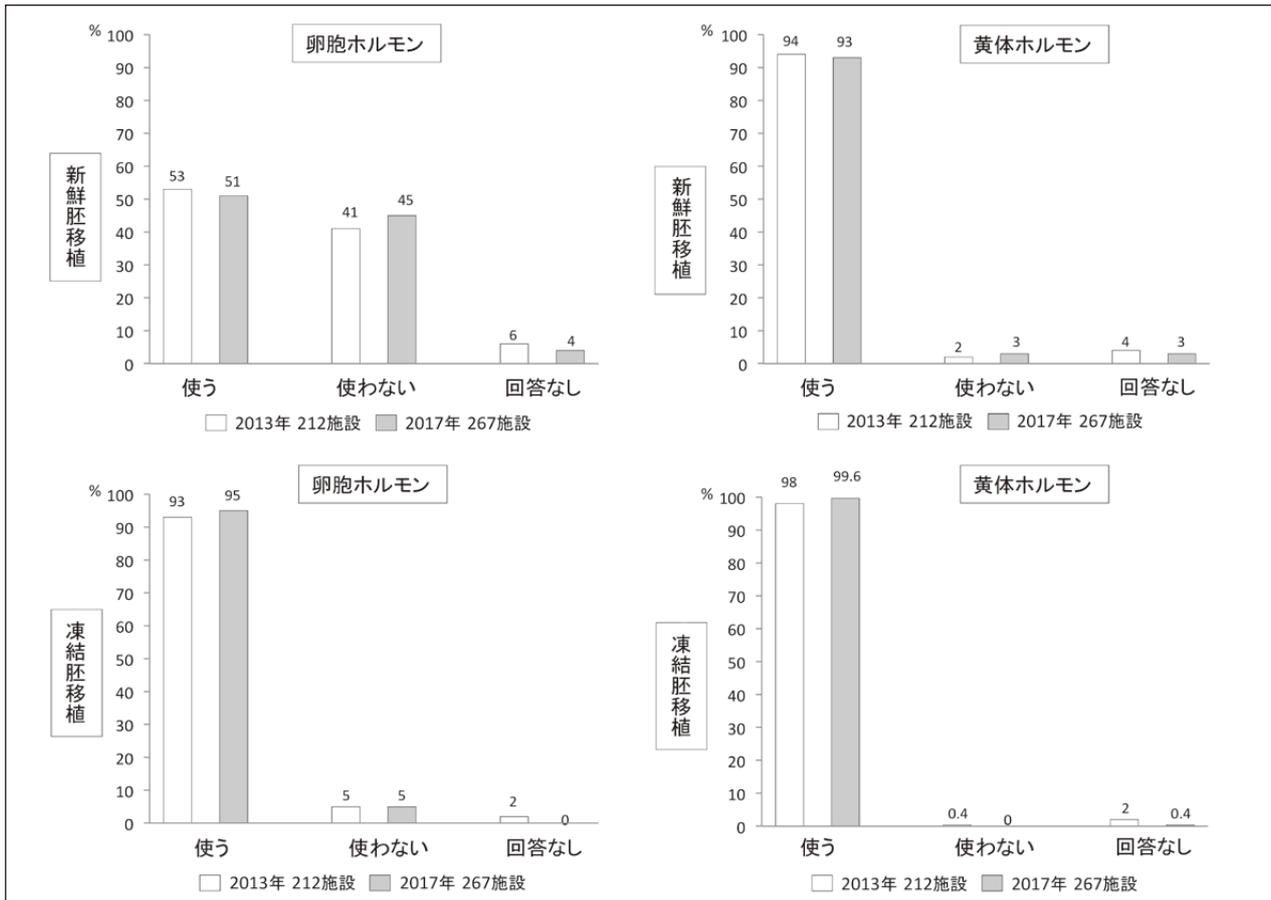


図5 新鮮胚移植、凍結胚移植で卵胞ホルモン、黄体ホルモンを補充するか、しないか

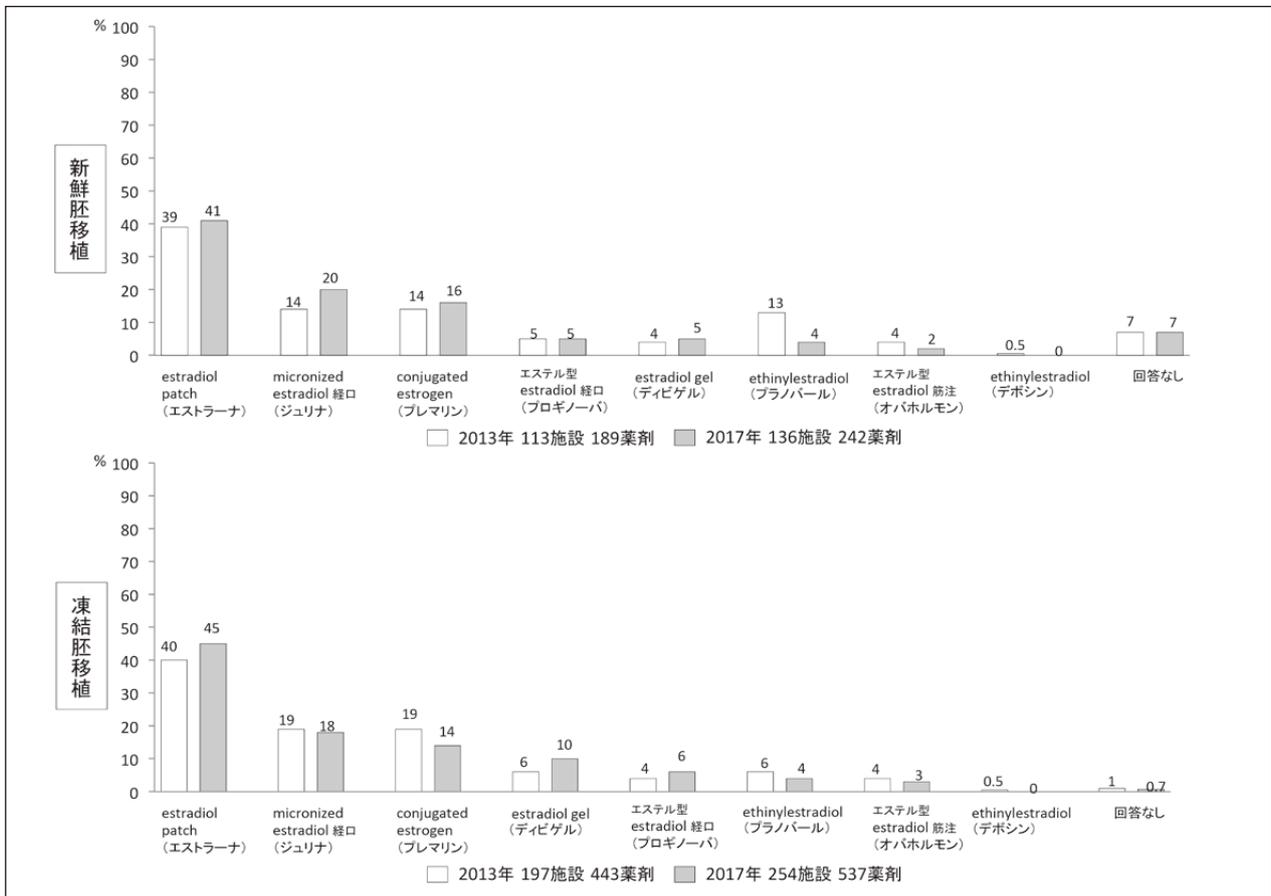


図6 卵胞ホルモン製剤の中でその薬剤が何%を占めるか

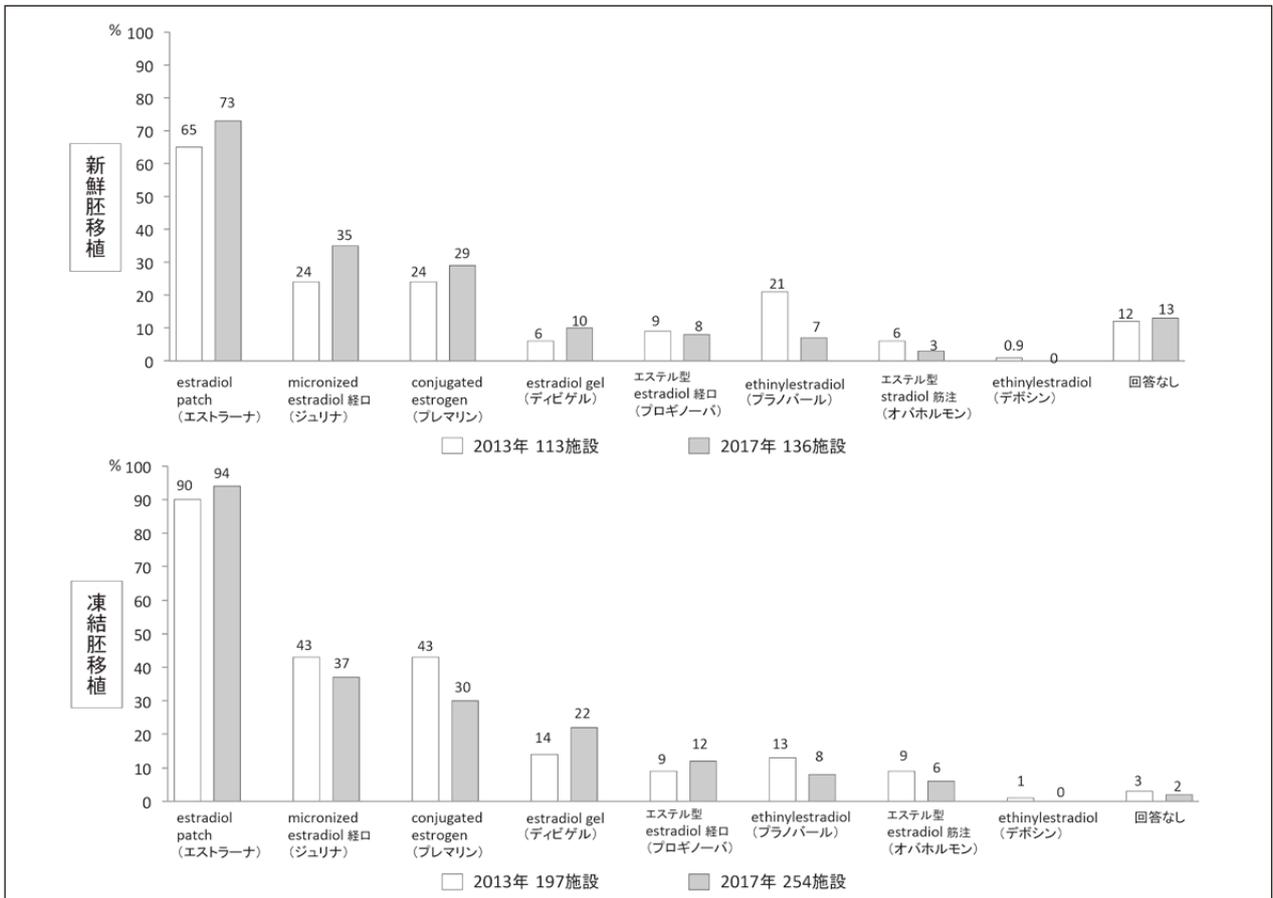


図7 何%の施設がその卵胞ホルモンを使用しているか

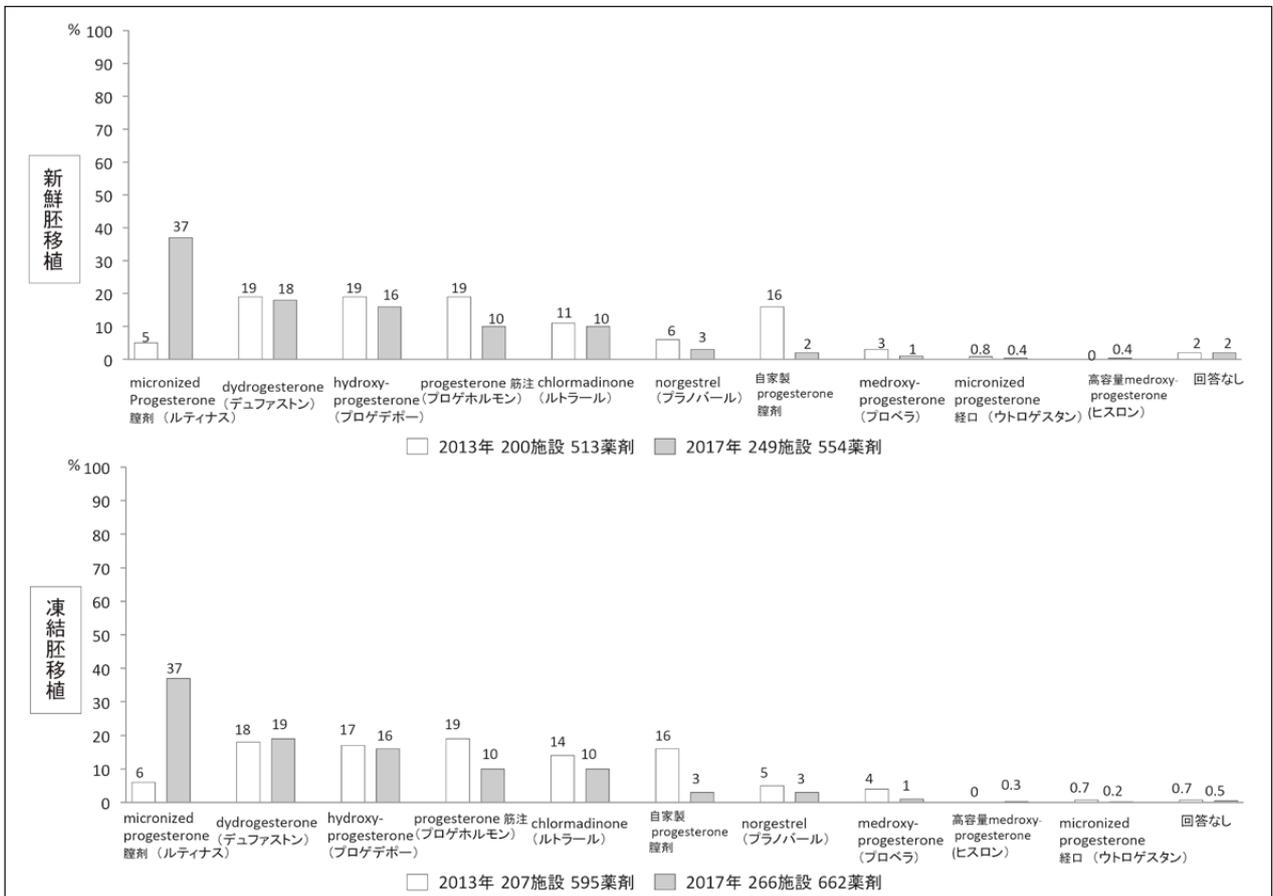


図8 黄体ホルモン製剤の中でその薬剤が何%を占めるか

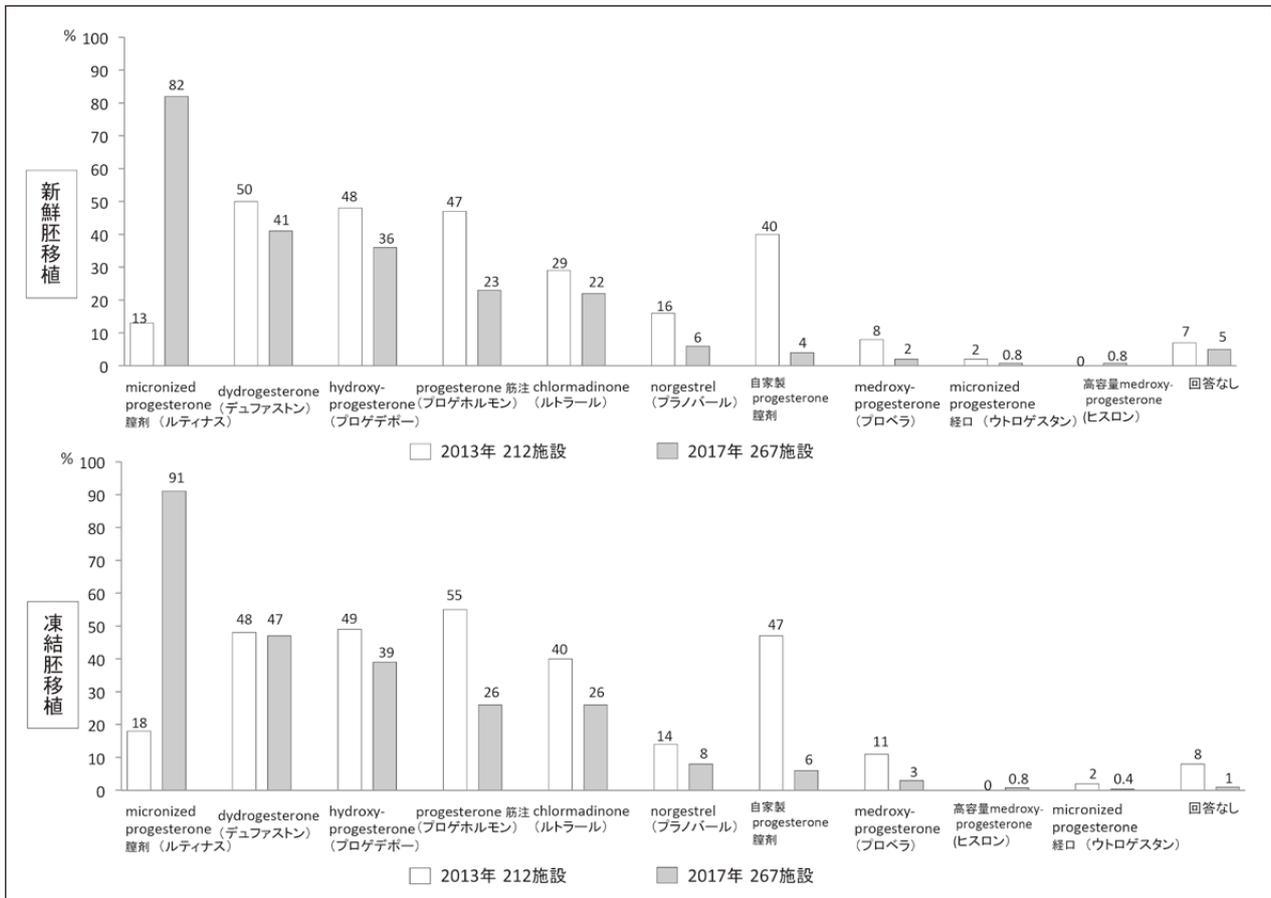


図9 何%の施設がその黄体ホルモンを使用しているか

Dish への表面処理の有無のヒト胚培養成績に関する検討

角 知英, 古橋 孝祐, 角本 知世, 辻 優大, 岩崎 利郎, 伊藤 宏一, 水澤 友利,
松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英

英ウィメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町1丁目1-2 三宮セントラルビル

要旨: ヒト胚の培養においてディッシュ表面処理が培養に与える影響について比較検討した報告は現在までない。本研究では、ディッシュ表面処理の有無が胚培養成績に与える影響について検討したので報告する。2016年7月～9月を対象期間とし、受精判定時に2PNが4個以上得られた136周期(2PN=968)を対象症例とし、表面処理を行ったNunc製ディッシュと行っていないFalcon製ディッシュに分けてsplit培養を行った。Day2時の分割率, 良好分割率, 継続培養胚当たりのDay5胚盤胞発生率, 良好胚盤胞発生率に両群間の有意な差はなかった。以上の結果からヒト胚の培養においてはディッシュ表面の細胞接着処理は必ずしも必要ないことが示唆された。

キーワード: ディッシュ表面処理, Falcon, Nunc, 胚盤胞発生率

緒言

現在, 国内の多くの体外受精実施施設において, ディッシュ表面に細胞接着性処理を施した細胞培養用ディッシュが広く用いられている。その理由として体外受精が細胞培養の研究から生まれ, その細胞研究において細胞接着性処理された細胞培養用ディッシュが広く用いられてきた。細胞培養において細胞の特性に合致したディッシュ及び培養器を使用することは重要である。細胞には培養時にディッシュ表面に接着する細胞と接着しない浮遊細胞があり, 接着する細胞の培養に適しているディッシュは, 細胞接着性処理されたディッシュであり, この処理をすることで細胞がディッシュ表面に接着しやすくなり, したがって増殖しやすくなる。また浮遊細胞は細胞がディッシュ表面と接着することなく増殖する為, ディッシュとして適しているのは表面未処理あるいは細胞接着低下処理されたディッシュである。初期の段階の胚は透明帯に覆われており, 接着して増殖する必要がない為, 体外受精においてのディッシュは細胞吸着作用は必ずしも必要ないことが示唆される。しかし, 表面処理の有無によってメディアムのスポットの形状も異なる可能性があるため, 培養環境が異なる可能性がある。松浦ら¹⁻³⁾は傾斜体外培養システム(TECS)など適度なストレスを与えることで, ブタ卵丘細胞の膨化が促進されること, 単為発生における胚盤胞発生率が上昇することを示している。また橋本ら⁴⁾はブタ前胎状期卵胞から取り出したブタ卵胞卵子顆粒膜細胞複合体(OGCs)のドーム状構造の形成率は, プラズマ放電処理

されたディッシュで培養した方がそうでない場合に比べて有意に高くなったと報告しており, ディッシュのコーティングの違いが卵子の成熟能を変化させる可能性を示唆した。またVan⁵⁾らは細胞接着処理されたNunc製とFalcon製ペトリディッシュを使い, マウス胚での培養成績を比較検討しており, 差はないと報告している。この様に動物胚を用いたディッシュの違いによる検討は行われているが, ヒト胚を使ったディッシュ表面処理の違いによる培養成績を比較検討した報告はない。

そこで本研究では, ディッシュ表面処理の有無が, ヒト胚の受精後の培養成績に与える影響を検討することを目的とし, プラズマ放電表面処理され細胞接着性を高めている研究用ディッシュ(Falcon 3002)と表面処理されていないIVF専用ディッシュ(Nunc 150270)における培養成績を比較検討したので報告する。

対象と方法

1. 対象

2016年7月～9月を対象期間とし, IVFかICSIを実施し, 受精判定時に2PNが4個以上得られた136周期(2PN=968)を対象症例とし, 同一症例を親水性のFalcon製ディッシュ(Falcon群; 2PN=478), 疎水性のNunc製ディッシュ(Nunc群; 2PN=490)に分けてsplit培養を行った。

また, 当院では個人情報保護法に基づいて医療情報の管理を行っており, 個人情報の保護に厳重な注意を払い, 体外受精, 顕微授精, 胚移植法を施行する際にも, 個人情

報の守秘・プライバシーを尊重している。また、体外受精を施行する前に、学会・論文発表などについては匿名性を保ち個人情報保護について説明し、患者の同意を文書にて得ている。また利益相反状態は無い。

2. 採卵、培養方法、Dishの形状違いの評価方法

卵巣刺激法は、原則としてLong protocol, Short protocolまたはAntagonist protocolを用い、卵胞発育とE₂値をモニターしながら管理し、第二主席卵胞径が18mmを超えた時点でhCG5,000単位を投与し、36時間後に静脈麻酔下、経膈超音波ガイド下に採卵を行った。回収した卵子はUniversal IVF Medium (Origio, Denmark) 中で採卵から3～5時間の前培養を行った。精子は横田⁶⁾らの方法に従い、2層パーコール法で遠心分離を行い、良好な精子を回収した。IVFは精子濃度を 10×10^4 cells/mlに調整して媒精に供した。ICSIは前培養後に顆粒膜細胞を除去した卵子に、形態が正常な運動精子を不動化してマイクロマニピレーター (OLYMPUS, ON2-99D-3) を装着した倒立顕微鏡 (OLYMPUS, IX-73) を用いて穿刺注入した。受精確認は媒精およびICSI後18～20時間後に行い、global medium (LifeGlobal, Canada) + 10% HSA (LifeGlobal, Canada) を用いて胚培養を行った。卵子、胚の培養は37℃, 5.5% CO₂, 5% O₂, 89.5% N₂の気相条件下⁷⁾で培養を行った。また培養液の直径をそれぞれのDishに形成されている6個の50 μlの直径と高さを測定して平均値を求めた。

3. 分割期胚及び胚盤胞の形態学的評価

分割期胚の評価はVeeckの分類⁸⁾を用いて行い、Day0時を採卵日とし、Day2時、Grade1,2の4-cell及びGrade3以上の5-cell以上の胚を良好分割期胚とした。また、胚盤胞の評価はGardnerの分類⁹⁾を用いて、Grade3BB以上を良好胚盤胞とした。

4. 評価項目

Day2時の分割率、および良好分割率(4-cell G2≤)、継続培養胚当たりのDay5胚盤胞発生率、および良好胚盤胞発生率(G3BB≤)、継続培養胚当たりのDay5、Day6の胚盤胞発生率、および良好胚盤胞発生率(G3BB≤)、またIVF、ICSI症例に分け、それぞれの項目について比較検討を行った。また、統計学的解析にはχ²検定を用い、P<0.05を有意差ありとした。

5. 結果

本研究における全対象症例の平均年齢は34.4 ± 4.4

歳、平均ART回数は1.7 ± 1.4回であった。またFalcon群、Nunc群の培養成績は、Day2分割率はそれぞれ97.7%と98.6% (p=0.31)、Day2良好分割率では57.2%と56.5% (p=0.84)、Day5胚盤胞発生率は53.8%と57.3% (p=0.32)、Day5良好胚盤胞発生率は25.9%と25.5% (p=0.89)、Day5、Day6の胚盤胞発生率は62.7%と64.9% (p=0.53)、ならびにDay5、Day6の良好胚盤胞発生率は28.4%と26.0% (p=0.46)であった(表1)。またIVFを行った対象症例の平均年齢は34.7 ± 4.8歳、平均ART回数は1.9 ± 1.7回であった。またFalcon群、Nunc群の培養成績は次のようであった。Day2分割率は98.0%と99.0% (p=0.47)、Day2良好分割率は56.7%と55.1% (p=0.69)、Day5胚盤胞発生率は60.3%と59.8% (p=0.90)、Day5良好胚盤胞発生率は30.2%と27.3% (p=0.49)、Day5、Day6の胚盤胞発生率は66.8%と67.6% (p=0.86)、ならびにDay5、Day6の良好胚盤胞発生率は31.9%と27.7% (p=0.32)であった(表2)。同様にICSIを行った対象症例の平均年齢は33.8 ± 3.6歳、平均ART回数は1.4 ± 0.6回であった。またFalcon群、Nunc群の培養成績は次のようであった。Day2分割率は97.1%と97.7% (p=0.99)、Day2良好分割率は58.0%と59.1% (p=0.84)、Day5胚盤胞発生率は42.8%と52.9% (p=0.092)、Day5良好胚盤胞発生率は18.8%と22.1% (p=0.50)、Day5、Day6の胚盤胞発生率は55.8%と60.0% (p=0.48)、ならびにDay5、Day6の良好胚盤胞発生率は22.5%と22.9% (p=0.94)であった。この結果より全ての項目において両群間に有意な差は認められなかった(表3)。またFalcon群、Nunc群に形成されたドロップの直径の平均はそれぞれ7.7 ± 2.1mmと6.9 ± 3.3 mm (P<0,001)であり、高さの平均は1.0 ± 0.8 mmと1.3 ± 0.8 mm (P<0,001)と両群間に有意な差が認められた(図1)。

6. 考察

今回我々は受精判定時に2PNが4個以上得られた周期を対象症例とし、プラズマ放電処理された研究用Falcon製ディッシュとIVF専用で未処理のNunc製ディッシュにヒト胚を分けて培養することで、培養成績を比較した。橋本ら⁴⁾はプラズマ放電処理されたディッシュでのブタのOGCsのドーム状構造の形成率は、それが行われていないディッシュよりも有意に高いことを示し、ディッシュの表面処理の有無が影響することを示したが、今回の研究では差が見られなかった。Van⁵⁾らは細胞接着処理されたNunc製とFalcon製ペトリディッシュを使い、マウス胚での培養成績を比較検討して差が

表 1 表面処理されたdish (Falcon 群) とされていないdish (Nunc 群) を用いた時の培養成績

	Falcon 群 (478 個)	Nunc 群 (490 個)	有意差
分割率	97.7 % (467 / 478)	98.6 % (483 / 490)	NS
良好分割率	57.2 % (267 / 467)	56.5 % (273 / 483)	NS
D 5 の胚盤胞発生率	53.8 % (199 / 370)	57.3 % (227 / 396)	NS
D 5 の良好胚盤胞発生率	25.9 % (96 / 370)	25.5 % (101 / 396)	NS
D 5, D 6 の胚盤胞発生率	62.7 % (232 / 370)	64.9 % (257 / 396)	NS
D 5, D 6 の良好胚盤胞発生率	28.4 % (105 / 370)	26.0 % (103 / 396)	NS

表 2 表面処理されたdish (Falcon 群) とされていないdish (Nunc 群) を用いて IVF を実施した時の培養成績

	Falcon 群 (304 個)	Nunc 群 (315 個)	有意差
分割率	98.0 % (298 / 304)	99.0 % (312 / 315)	NS
良好分割率	56.7 % (169 / 298)	55.1 % (172 / 312)	NS
D 5 の胚盤胞発生率	60.3 % (140 / 232)	59.8 % (153 / 256)	NS
D 5 の良好胚盤胞発生率	30.2 % (70 / 232)	27.3 % (70 / 256)	NS
D 5, D 6 の胚盤胞発生率	66.8 % (155 / 232)	67.6 % (173 / 256)	NS
D 5, D 6 の良好胚盤胞発生率	31.9 % (74 / 232)	27.7 % (71 / 256)	NS

表 3 表面処理されたdish (Falcon 群) とされていないdish (Nunc 群) を用いて ICSI を実施した時の培養成績

	Falcon 群 (174 個)	Nunc 群 (175 個)	有意差
分割率	97.1 % (169 / 174)	97.7 % (171 / 175)	NS
良好分割率	58.0 % (98 / 169)	59.1 % (101 / 171)	NS
D 5 の胚盤胞発生率	42.8 % (59 / 138)	52.9 % (74 / 140)	NS
D 5 の良好胚盤胞発生率	18.8 % (26 / 138)	22.1 % (31 / 140)	NS
D 5, D 6 の胚盤胞発生率	55.8 % (77 / 138)	60.0 % (84 / 140)	NS
D 5, D 6 の良好胚盤胞発生率	22.5 % (31 / 138)	22.9 % (32 / 140)	NS

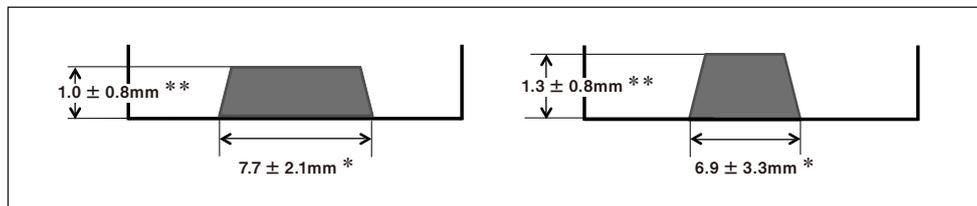


図 1 ディッシュの種類の違いによるスポットの形式の違い

左の図は Falcon を用いたドロップの形状であり、右の図は Nunc を用いたドロップの形状である。
両群で直径、高さにおいて有意な差が見られた。
* ($p < 0.001$) ** ($p < 0.001$)

ないと報告しており、Nunc 製と Falcon 製では同等の成績が得られており、本研究と同様である。

またディッシュによってドロップの直径や高さに差

があり、受精卵にかかる圧力が異なる可能性があるため、培養結果に差が見られることが考えられた。しかし、このような差があるにも関わらず、受精卵の培養成績には差

がなかった為、グループ培養におけるドロップの形状の差は胚の成長に影響を及ぼすことは少ないと推測できた。この様に今回の検討よりヒト胚培養においてディッシュへのプラズマ放電処理は必ずしも必要ないことが示唆された。

また今回の検討では研究用dishとIVF専用ディッシュを使用している。日本においては受精卵を培養する容器に関しては厳格な規定はないが、欧米諸国では厳格な基準を設けており、様々な試験を通過したディッシュの使用を義務付けている。今後の不妊治療の培養では、日本においても胎胚毒性試験、細胞毒性試験、変異原性試験などを通過し、またCEマーク取得、FDA510(k)に登録されているなど、より安全性に特化したディッシュを選択していく必要があるのではないかと考えられる。

- 9) Gardner DK and Schoolcraft WB: Towards reproductive certainty: Fertility & genetics beyond. Proceedings of the 11th World Congress on in Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics, pp. 347-371, Carnforth Parthenon Press, 1999.

参考文献

- 1) Matsuura K, Hayashi N, Kuroda Y, Takiue C, Hirata R, Takenami M, Aoi Y, Yoshioka N, Habara T, Mukaida T, Naruse K: Improved development of mouse and human embryos using a tilting embryo culture system. *Reprod Biomed Online*, 20: 358-364, 2010.
- 2) Koike T, Matsuura K, Naruse K, Funahashi H: In-vitro culture with a tilting device in chemically defined media during meiotic maturation and early development improves the quality of blastocysts derived from in-vitro matured and fertilized porcine oocytes. *J Reprod Dev*, 565: 552-557, 2010.
- 3) 松浦宏治・成瀬恵治: Dynamic culture systemによる受精卵発育促進とその機構解明. *J Mamm Ova Res*, 28: 174-179, 2011.
- 4) Hashimoto S, Ohsumi K, Tsuji Y, Harauma N, Miyata Y, Fukuda A, Hosoi Y, Iritani A, Morimoto Y: Growing porcine oocyte-granulosa cell complexes acquired meiotic competence during in vitro culture. *J Reprod Dev*, 2007 53: 379-384, 2006.
- 5) Van den Bergh M, Emiliani S, Biramane J, Vannin AS, Englert Y: Randomized autocontrolled comparison of the embryo culture performance of Nunc and Falcon petri dishes. *J Assist Reprod Genet*, 16: 306-309, 1999.
- 6) 横田梨恵・古橋孝祐・辻優大・大月純子・伊藤宏一・水澤友利・松本由紀子・荅口昭次・塩谷雅英: 2種類の精子調整法における培養成績の比較. *日IVF会誌*. 20: 21-24, 2017.
- 7) 角本知世・後藤栄・橋本洋美・泉陽子・江口素子・古橋孝祐・水田真平・田中里美, 稲飯健太郎・片田雄也・宮田ちさと・米山雅子・黒田泰史・岸加奈子・松浦まき・後藤優介・東山龍一・成松美彩・松本由紀子・荅口昭次・塩谷雅英: 2種類の培養液を用いた培養成績の検討. *日本臨床エンブリオロジスト学会プログラム・講演抄録集・実技書*. 15: 24, 2009.
- 8) Veeck LL: Atlas of the human oocyte and early conceptus, 2nd ed, pp. 151-153, Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1991.