

ISSN 1881-9028

日本IVF学会雑誌

Vol.24 No.1

2021

JSAR
Japan Society of Assisted Reproduction

論文

—原著—

- 次世代シーケンサーを用いた3前核由来胚盤胞の染色体解析 4
兼子 由美¹, 松井 有紀¹, 土屋 翔太郎¹, 板倉 和也¹, 和田 淳史¹, 尾崎 智哉¹, 田村 結城², 三東 光夫^{2,3},
荒木 泰行^{3,4}, 荒木 康久^{2,3,4}, 西村 満¹
¹西村ウイメンズクリニック/²日本リプロジェネティクス株式会社/³群馬パース大学/⁴株式会社高度生殖医療技術研究所

—原著—

- Noninvasive embryo evaluation method combining time-lapse images with biomarkers in follicular fluid
and serum 10
Rumi Nakazawa^{1,2}, Takehiko Matsuyama¹, Atsuko Shiota²
¹Department of Gynecology, Koujin Hospital, Marugame, Japan /²Graduate School of Kagawa Prefectural University of Health Sciences,
Takamatsu, Japan

—原著—

- 当院における卵管鏡下卵管形成術後の不妊治療成績について 19
須賀 真美, 兵頭 慎治, 鍋田 基生
つばきウイメンズクリニック

—原著—

- 東京の不妊症症例における新型コロナウイルス抗体 (SARS-CoV-2 IgG) 測定の結果 25
中川 浩次, 堀川 隆, 月花 瑤子, 三井 悠, 石山 俊輔, 板倉 彰子, 中尾 佳月, 森山 梓, 片岡 尚代, 壽圓 裕康, 黒田 恵司,
小代 裕子, 高見澤 聡, 杉山 カー
杉山産婦人科新宿

—原著—

- HIV-1 感染男性精液からのウイルス除去における sil-selectTM と PercollTM の臨床的有用性 29
嶋田 秀仁¹, 久慈 直昭²
¹銀座こうのとりにレディースクリニック/²東京医科大学 医学部 産科婦人科学教室

第24回 日本IVF学会学術集会 開催概要	35
日本IVF学会雑誌発行における投稿論文募集のお知らせ	36
日本IVF学会雑誌 投稿規定	37
一般社団法人 日本IVF学会 定款	39
一般社団法人 日本IVF学会 役員	45
編集委員会	46

次世代シーケンサーを用いた3前核由来胚盤胞の染色体解析

兼子 由美¹, 松井 有紀¹, 土屋 翔太郎¹, 板倉 和也¹, 和田 淳史¹, 尾崎 智哉¹,
田村 結城², 三東 光夫^{2,3}, 荒木 泰行^{3,4}, 荒木 康久^{2,3,4}, 西村 満¹

¹西村ウイメンズクリニック 〒433-3122 静岡県浜松市中区上島6丁目30-3

²日本リプロジェネティクス株式会社 〒371-0031 群馬県前橋市下小出町2丁目20-4

³群馬パース大学 〒370-0006 群馬県高崎市問屋町1丁目7-1

⁴株式会社高度生殖医療技術研究所 〒371-0105 群馬県前橋市富士見町石井909番地21

要旨: ARTにおける3前核(3PN)胚は、三倍体が危惧されているが染色体核型は不明なことが多い。次世代シーケンサー(NGS)は、染色体の異数性の検出には優れているが、倍数体の区別ができない欠点がある。一方、タイムラプスインキュベーターによる胚発育の観察は、胚の染色体構造の解析はできないが、第二極体(2PB)放出やPNの動態観察に優れている。そこで、NGS解析結果にタイムラプス所見を加味することで3PN由来胚盤胞の倍数性の判定の一助になると考え検討を行った。その結果、三倍体胚は21.4%、三倍体を疑う胚は21.4%、二倍体を疑う胚は14.3%、判別困難胚は42.9%と推定できた。三倍体胚ではPNの大きさが均等かつ2PBを認めず、二倍体を疑う胚ではPNの大きさが不均等かつ2PBを認めた。NGSによる三倍体の判定が困難な時は、2PBの有無およびPNの大きさの均等性を評価項目に加えることで、3PN由来胚盤胞における倍数性評価の補助となる可能性が示された。

キーワード: NGS, 3PN, タイムラプス画像解析, 倍数性

ランニングヘッド: 3PN由来胚盤胞にPN/PB所見を加味したNGS解析

緒言

体外受精において、受精確認時に3個の前核(3PN)を認める受精卵が時々観察される。これらは三倍体の可能性が高く、移植すると流産や胎状奇胎のリスクが高くなることが知られている^{1,2)}。3PNの発生原因は、一般体外受精(c-IVF)では多精子受精に起因するものが多いと考えられる^{2,3)}。一方、卵細胞質内精子注入法(ICSI)では注入される精子の数は1個であることから、第二極体(2PB)放出不全に起因すると考えられている^{2,6)}。現在のところ、3PN発生機序は十分解明されておらず、3PN胚は染色体倍数性異常が危惧されるため移植対象から除外され、培養を中断し廃棄されるのが一般的であり、3PN由来胚盤胞の染色体核型については不明な点が多い。

近年、胚の染色体異常の検出を目的とした着床前診断検査(preimplantation genetic testing: PGT)において、次世代シーケンサー(next generation sequencer: NGS)の導入が進んでいる。特に不妊治療において、染色体数に異常のある胚(異数性胚)の選別を目的としたPGT for aneuploidy (PGT-A)は、流産の予防策として

諸外国で広く臨床に導入されている⁷⁾。NGS解析は全ゲノムDNAを断片化し配列情報を増幅して網羅的に検査する方法であり、従来のGバンド分染法よりも高速、かつ高分解能で正確に検査できる新しい胚評価法であるが、性染色体のXのみを有しYを有さない胚の二倍体と三倍体の区別ができず、倍数性異常の検出はできない。一方、胚培養に普及しつつあるタイムラプスインキュベーターによる胚発育の観察は、染色体解析はできないものの、従来の定点観察では発見困難な事象について発育過程を振り返って分析することが可能であり、胚の動態を把握するうえで有用な形態解析手段となっている^{8,9)}。今回、3PN由来胚盤胞の染色体核型の解明を目的として、NGS解析所見にタイムラプス観察所見を加えた倍数性評価について検討を行ったので報告する。

対象および方法

2014年1月から2017年12月に、インフォームドコンセントのうえ患者から同意の得られた廃棄予定のICSI由来3PN(ICSI-3PN)胚のうち、胚盤胞で凍結保存した14個

の胚を対象とした。凍結胚盤胞の融解過程の途中に透明帯切開法による孵化補助を行い、継続培養後に栄養外胚葉 (trophectoderm: TE) 細胞が開口部から脱出を開始した胚にレーザー (OCTAX™, Vitrolife) 照射を行い、TE 細胞を3～5個採取した。得られた細胞は凍結状態 (−20℃以下) で検査ラボに輸送し、Sure Plex DNA Amplification Kit (Illumina) を用いてDNAを抽出して全ゲノム増幅を行い、DNA増幅の有無を電気泳動で確認した。次に、VeriSeq PGS Assay Kit (Illumina) を用いてライブラリーを調整後、NGS (MiSeq, Illumina) を用いて配列情報を取得し、BlueFuse Multi (Illumina) にて染色体数の解析を行った¹⁰⁾。得られた解析チャート (プロファイル) から染色体核型と倍数性の推定を行った。

培養中のタイムラプスイнкуベーターから得られ

た画像を専用のソフト (EmbryoViewer™, Virtolife) を用いて、2PB放出の確認およびPN直径の計測を行った。1個の胚内に確認された3個のPNは、直径の大きい順にPN 1, PN 2, PN 3とし、その最大径と最小径の計測値の差 (最大小径差, PN 1 − PN 3) をNGSによる倍数性の推定結果と照合し、関係性について検討した。

統計学的解析は、t検定あるいは χ^2 検定を用いて行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。なお、本研究は院内倫理委員会の承認を得て実施した。

結果

対象としたICSI-3PN由来胚盤胞14個の患者 (妻) 平均年齢は 36.2 ± 4.5 歳であった。各胚のTE細胞採取時

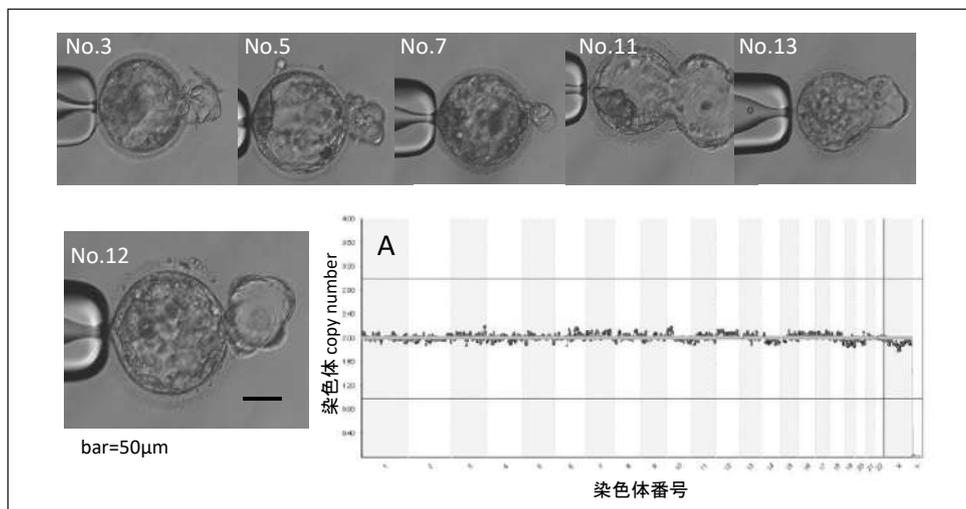


図1 倍数性判別不明胚のプロファイル。(第一群)

(A) No. 12. No. 3, 5, 7, 11, 13も同様の形状を示した。

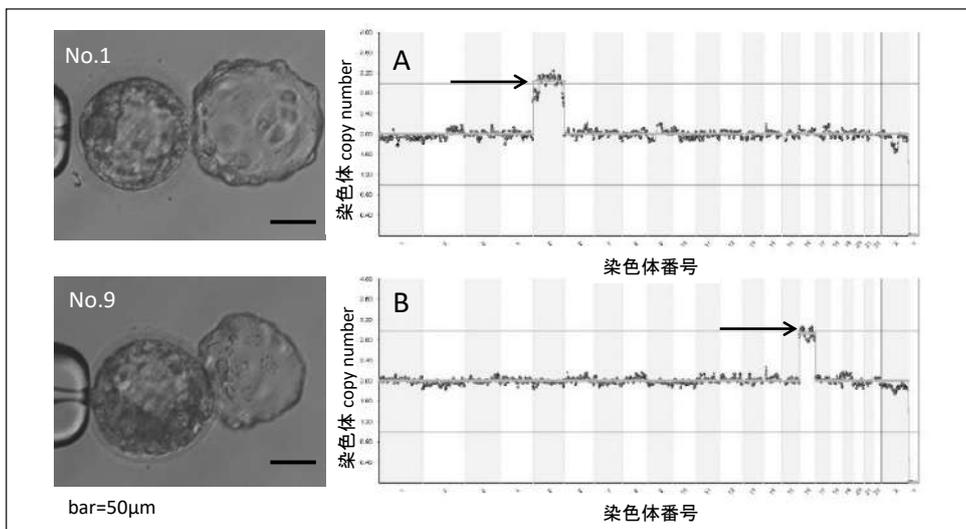


図2 二倍体を疑う胚のプロファイル。(第二群)

A: 胚 No. 1, B: 胚 No. 9. 矢印の copy number 値は 3.0 を示している (A, B).

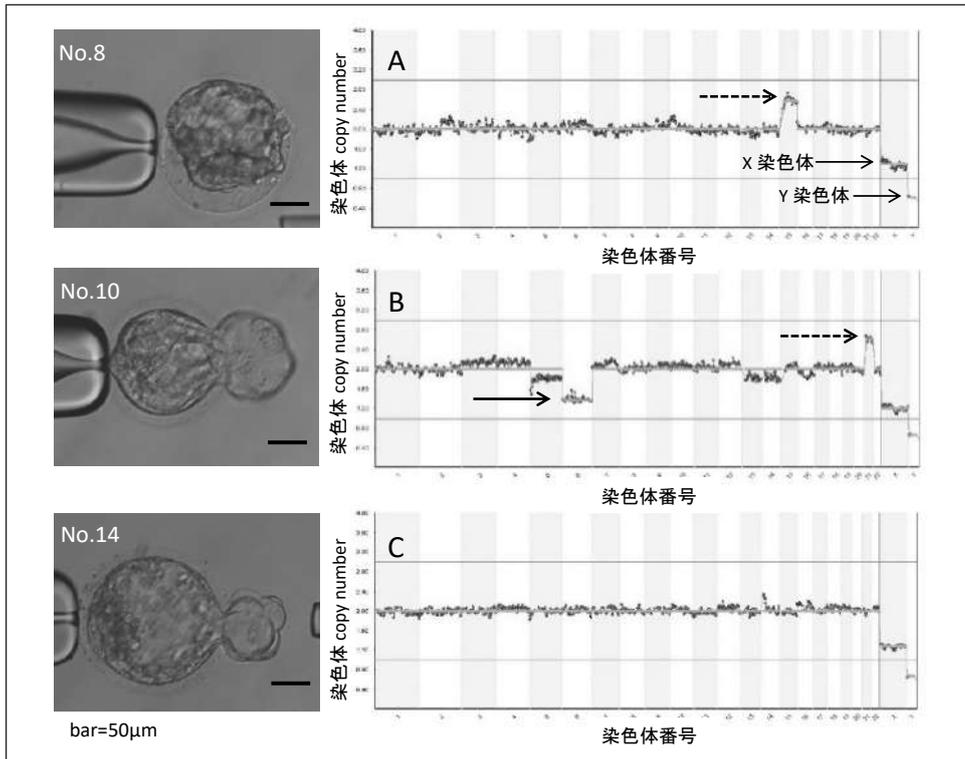


図3 三倍体胚 (X, Y 染色体有り) のプロファイル. (第三群)

(A) 胚 No. 8, (B) 胚 No. 10, (C) 胚 No. 14.

X 染色体 (copy number 値約 1.3) と Y 染色体 (copy number 値約 0.67) を認めた (A, B, C).
点線矢印の copy number 値は約 2.7, 実線矢印は約 1.3 を示している (B).

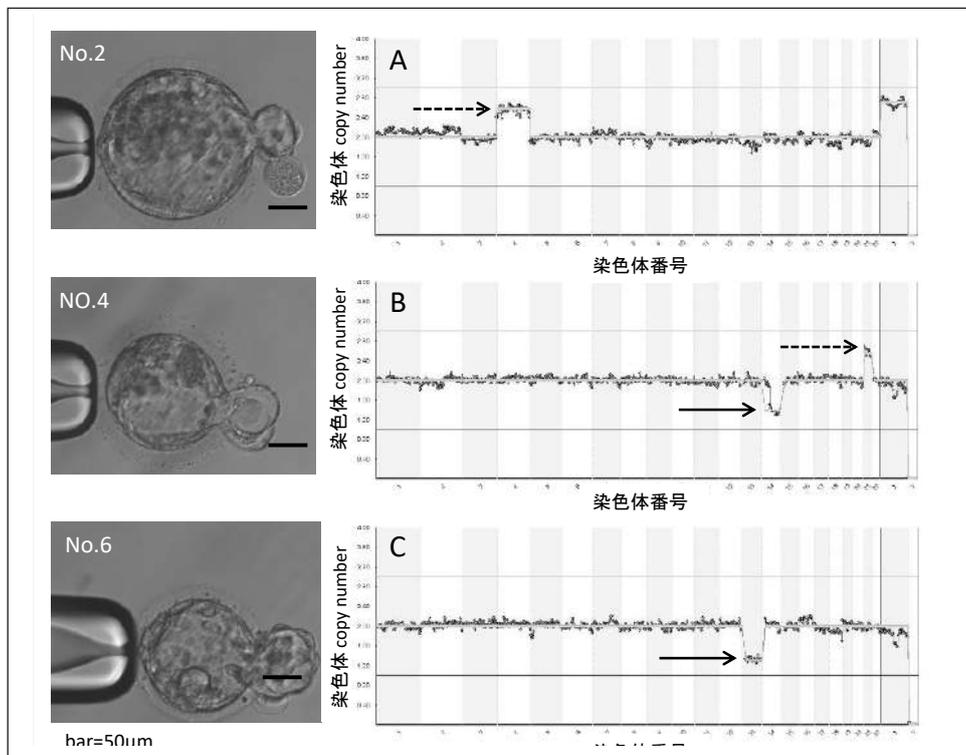


図4 三倍体 (X 染色体のみを有する) を疑う胚のプロファイル. (第四群)

A) 胚 No. 2, (B) 胚 No. 4, (C) 胚 No. 6.

点線矢印の copy number 値は約 2.7, 実線矢印は約 1.3 を示している (A, B, C)

の形態は様々な脱出状態が観察された(図1-4)。プロファイルの特徴から四群に分類した。第一群は、常染色体の他、X染色体を有する正常核型であるが、二倍体と三倍体等の倍数性判別不明型で42.9% (6/14) 認められた(図1)。第二群は二倍体でトリソミーを疑う型で14.3% (2/14) 認められた(図2)。第三群は性染色体X、Yを有する三倍体型で21.4% (3/14) 認められた(図3)。第四群は性染色体Xのみ有する三倍体を疑う型で21.4% (3/14) 認められた(図4)。NGSによる正常核型と判定した胚は、第一群の6個で42.9% (6/14) であった。第三群の1個(胚No. 14)の常染色体核型は正常型であったが、NGS解析によりX、Yを有する三倍体であることから異数性胚の異常核型とした。従って、異数性胚、すなわち異常核型胚は8個(胚No. 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 14)で57.1% (8/14) であった。正常核型

群と異常核型群はほぼ同率で存在していた(表1)。

タイムラプス画像を用いて、2PB放出の確認および消失直前のPN直径を計測した結果、XおよびY染色体を有する胚で三倍体と強く推定できた第三群の胚盤胞3個(胚No. 8, 10, 14)のうち2個(胚No. 8, 10)は2PBの放出を認めず、他1個(胚No. 14)は2PB放出後に再吸収される現象を確認した。これら3個(胚No. 8, 10, 14)の胚盤胞は、PNの最大小径差はいずれも1 μ mと小さく、3個のPNの大きさは均等傾向にあった。それに対して二倍体の疑いがあると判定された第二群の2個(胚No. 1, 9)の胚盤胞は、どちらも2PBの放出を認め、PNの最大小径差は各々10 μ m, 7 μ mと大きく、3個のPNの大きさは不均傾向にあった(表1, 図5)。

表1 ICSI-3PN 由来胚盤胞の染色体解析結果とPNサイズの関係

胚No.	妻年齢(歳)	胚日齢	グレード*	NGSの核型判定 (正常/異常)	2PBの有無	PNサイズ(μ m)			最大小径差(μ m) (PN1-PN3)	倍数性の予測
						PN1	PN2	PN3		
2	40	5	4AC	異常	+	26	25	16	10	三倍体の疑い
9	41	5	4AA	異常	+	25	24	15	10	二倍体の疑い
1	26	5	4AA	異常	+	22	22	15	7	二倍体の疑い
7	37	5	4AB	正常	-	24	19	17	7	判別不明
13	33	5	3BB	正常	おそらく+	21	19	17	4	判別不明
4	41	6	3A-BC	異常	おそらく-	20	19	18	2	三倍体の疑い
5	29	5	4AA	正常	+	24	23	22	2	判別不明
11	41	5	4AB-C	正常	-	23	22	21	2	判別不明
6	37	5	4AB	異常	-	22	21	21	1	三倍体の疑い
8	37	5	4AA	異常	-	25	24	24	1	三倍体
10	35	5	4CA	異常	-	18	18	17	1	三倍体
3	39	5	4AA	正常	-	22	21	21	1	判別不明
12	34	5	4AA	正常	-	24	23	23	1	判別不明
14	37	5	4BA	異常**	+ \rightarrow 吸収	23	23	22	1	三倍体

* Gardner 分類²³⁾ ** 常染色体は正常であったが、性染色体はXXYを示したため異常核型に分類した。
表は最大小径差の大きい順に整列。

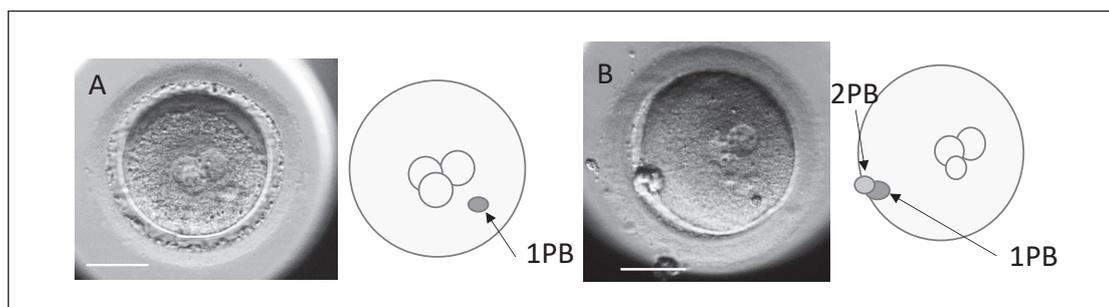


図5 2PBの有無およびPNサイズの均等性

(A) 三倍体胚. 2PBを認めず,PNサイズが均等. (B) 二倍体を疑う胚. 2PBを認め,PNサイズが不均等.

考 察

体外受精において受精を確認する最も一般的な観察法は、媒精後20時間前後にPNの存在およびその数をチェックすることである。その時点で1PNであったり3PN、もしくはそれ以上のPNらしき多核形状を有する異常胚に遭遇することがある。1PNであっても胚盤胞まで発育した胚を移植後、妊娠し分娩に至った報告例はある^{11,12)}が、3PN由来胚を移植した妊娠報告例は極めて少ない。その理由は染色体異常の発生する頻度が高く、積極的に臨床に用いるメリットが少ないからだと思われる。しかしながら、3PN由来胚の染色体がどのような構造であるかは興味があり、特に良好胚盤胞まで発育した胚を見ていると染色体は正常であるのではないかと考えてしまう。最近のPGT-Aに使用されるNGSを用いた3PN胚の染色体について検討したMutiaらの報告によると、33.3%は正常核型で66.7%は異常核型であり、その異常の内訳は三倍体43.3%、モザイク13.4%、異数体10%と報告¹³⁾している。我々の3PN由来胚盤胞14個をNGSで検査した結果、正常核型胚は6個(42.9%)であった。しかし、性染色体がX染色体のみであるため正常核型であっても本測定キットの特性から二倍体か三倍体か区別することはできない(図1)。Mutiaらの結果では正常核型のプロファイルから二倍体としているが、X染色体のみ有する胚であれば三倍体と区別することはできないと思われる。今回の研究で二倍体のトリソミーと判定された2個の胚が存在していた(図2)。この2個ともX染色体のみの性染色体を有することより、二倍体か三倍体か区別することはできない。それゆえ、ここでは二倍体の疑いとして分類した。性染色体がX、Yを有する三倍体は明らかに特徴あるプロファイルを示すことから、比較的容易に判定することができる(図3)。つまり、X染色体、Y染色体のcopy number値が各々、1.33と0.67に位置しているからである。性染色体がX染色体のみを有し、加えていずれかの常染色体が1本分gainあるいはlossしている近三倍体と推定できる胚が3個(21.4%)含まれていた(図4)。仮に明確な三倍体と判定できた3個(図3)と、三倍体を疑う胚3個(図4)と更に倍数性判別不明とした6個(図1)を三倍体として加えれば、三倍体は85.7%(12/14)存在することになり、3PN由来胚盤胞の大部分は三倍体の可能性を否定できない。ただし、倍数性判別不明とした6個(図1)を二倍体と仮定すると、二倍体を疑う2個(図2)と併せてみると3PN由来胚盤胞の二倍体は57.1%(8/14)と推定することもできる。

NGSによる本キットで解析する限り、二倍体胚と三

倍体胚を区別することができない^{14,15)}。ところが、これらの胚発育を受精から胚盤胞までタイムラプスイメージングで培養・観察している形態所見と併せて判定できないかと考えた。記録された2PB放出の有無および形成された3個のPNの大きさを測定して均等性を精査してみたところ、2PBが放出された胚は42.9%(6/14)であり、半数近くの胚で認められた。中には2PBを放出後に再吸収された例も1例観察された。2PBを認めなかった3個のPNの大きさは均等傾向にあり、NGS解析で三倍体と強く推定できた胚盤胞は全てこのグループに属していた。一方、2PBを認めた3PN胚は3個のPNの大きさが不均等であることが多く、二倍体の疑いがあると推定した胚盤胞は全てこのグループに属していた(表1)。これらのことから、2PBが認められず、かつ3個のPNの大きさが均等であった胚盤胞は三倍体の可能性が高く、2PBを認め、かつ3個のPNの大きさが不均等の場合、その胚盤胞は二倍体である可能性が高いと推察された。

NGSとタイムラプス画像の形状動態を勘案して推察すれば、3PN由来胚盤胞の二倍体は2/14(14.3%)～8/14(57.1%)であり、三倍体は6/14(42.90%)～12/14(85.7%)の出現頻度と考えられる。ICSI-3PN由来胚に二倍体が含まれる報告があるので、3PNが全て三倍体になるのではない¹⁶⁻¹⁸⁾。Capalboらによれば、2個の同等大きさのPNと1個の小さいPNで構成された2.1PNと称した受精卵由来の胚盤胞の染色体解析の結果、約85%が二倍体であり、残り15%は三倍体であったと報告している¹⁹⁾。

正常受精由来胚の異数性胚の割合は、約45%と報告されている²⁰⁾。今回、倍数性判定が不明とした胚のプロファイルは正常核型で42.9%(6/14)であり、残り57.1%(8/14)が異常核型と考えれば、2PN由来でも3PN由来胚の胚盤胞でも染色体正常核型と異常核型の出現頻度は類似しているものと考えられた。また、正常受精から発育した胚のNGS解析による染色体モザイク率は年齢に関わらず10-20%と示されている^{21,22)}が、3PN由来胚のモザイク率は同程度の出現頻度なのか、さらに検査数を増やして検討する必要がある。

NGSによる三倍体の判定が困難な時、タイムラプス画像解析による2PBの有無およびPNの大きさの均等性に着目した所見を評価項目に加えることで、3PN由来胚盤胞における倍数性評価の一助となる可能性が示唆された。本研究により、胚盤胞まで発育したICSI-3PN由来胚には、三倍体の他に二倍体と推定できる胚も含まれていることが判明した。しかし、その取り扱いには症例数を増やして検討する必要がある。

参考文献

- 1) Staessen C, and Van Steirteghem AC: The chromosomal constitution of embryos developing from abnormally fertilized oocytes after intracytoplasmic sperm injection and conventional in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 12: 321–327, 1997.
- 2) Jacobs PA, Angell RR, Buchanan IM, Hassold TJ, Matsuyama AM, Manuel B: The origin of human triploids. *Ann Hum Genet*, 42: 49–57, 1978.
- 3) Chen Z, Yan J, Feng HL: Aneuploid analysis of trippronuclear zygotes derived from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in humans. *Fertil Steril*, 83: 1845–1848, 2005.
- 4) Flaherty SP, Payne D, Swann NJ, Matthews CD: Assessment of fertilization failure and abnormal fertilization after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Reprod Fertil*, 7: 197–210, 1995.
- 5) Macas E, Imthurn B, Roselli M, Keller PJ: Chromosome analysis of single-and multipronucleated human zygotes proceeded after the intracytoplasmic sperm injection procedure. *J Assist Reprod Genet*, 13: 345–350, 1996.
- 6) Macas E, Imthurn B, Rosselli M, Keller PJ: Fertilization and early embryology: The chromosomal complements of multipronuclear human zygotes resulting from intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 11: 2496–2501, 1996.
- 7) Capalbo A, Chokoshvili D, Dugoff L, Frannasiak J, Gleicher N, Pennings G, Simon C: Should the reproductive risk of a couple aiming to conceive be tested in the contemporary clinical context? *Fertil Steril*, 111: 229–238, 2019.
- 8) Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Basile N, Marcos J, Requena A: Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: a retrospective cohort study. *Fertil Steril*, 98: 1481–1489, 2012.
- 9) 兼子由美・飯泉文香・土屋翔太郎・松井有紀・佐藤和文・尾崎智哉・西村満：当院における EmbryoScope™ の培養成績について。日受精着床会誌，31：27–31，2014。
- 10) 田村結城・三東光夫：NGSを用いた PGT-A のデータ解析の実際。末岡浩 監修・荒木康久 編。着床前診断検査 (PGT-A) の基礎知識と細胞分離手技。pp 62–74, 医歯薬出版, 2019.
- 11) Ito F, Asano Y, Shimizu M, Honma H, Murata Y: Birth of nine normal healthy babies following transfer of blastocysts derived from human single-pronucleate zygotes. *J Assist Reprod Genet*, 32: 1401–1407, 2015.
- 12) Bradley CK, Traversa MV, Hobson N, Gee AJ, McArthur SJ: Clinical use of monopronucleated zygotes following blastocyst culture and preimplantation genetic screening, including verification of biparental chromosome inheritance. *Reprod Biomed Online*, 34: 567–574, 2017.
- 13) Mutia K, Wiweko B, Iffanolida PA, Febri RR, Muna N, Riayati O, Jasirwan SO, Yuningsih T, Mansyur E, Hestiantoro A: The frequency of chromosomal euploidy among 3PN embryos. *J Reprod Infertil*, 20: 127–131, 2019.
- 14) Marin D, Scott Jr RT, Treff NR: Preimplantation embryonic mosaicism: origin, consequences and the reliability of comprehensive chromosome screening. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 29: 168–174, 2017.
- 15) Marin D, Zimmerman R, Tao X, Zhan Y, Scott Jr RT, Treff NR: Validation of a targeted next generation sequencing-based comprehensive chromosome screening platform for detection of triploidy in human blastocysts. *RBM Online*, 36: 388–395, 2018.
- 16) Grau N, Escrich L, Martín J, Rubio C, Pellicer, A., Escribá, M.J.: Self-correction in trippronucleated human embryos. *Fertil Steril*, 96: 951–956, 2011.
- 17) Grau N, Escrich L, Galiana Y, Meseguer M, García-Herrero S, Remohí J, Escribá MJ: Morphokinetics as a predictor of self-correction to diploidy in trippronucleated intracytoplasmic sperm injection-derived human embryos. *Fertil Steril*, 104: 728–735, 2015.
- 18) Chen Z, Yan J, Feng HL: Aneuploid analysis of trippronuclear zygotes derived from in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in humans. *Fertil Steril*, 83: 1845–1848, 2005.
- 19) Capalbo A, Treff N, Cimadomo D, Tao X, Ferrero S, Vaiarelli A, Colamaria S, Maggiulli R, Orlando G, Scarica C, Scott R: Abnormally fertilized oocytes can result in healthy live births: improved genetic technologies for preimplantation genetic testing can be used to rescue viable embryos in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril*, 108: 1007–1015, 2017.
- 20) オリジオジャパン株式会社. ART Scientific 第3版. https://fertility.coopersurgical.com/wp-content/uploads/origio_Scientific-News4p_pdf-1.pdf. (2019.10.15)
- 21) Munné S, Blazek J, Large M, Martinez-Ortiz PA, Nisson H, Liu E, Tarozzi N, Borini A, Becker A, Zhang J, Maxwell S: Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*, 108: 62–71, 2017.
- 22) Munné S, and Wells D: Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril*, 107: 1085–1091, 2017.
- 23) Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB: Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*, 73: 1155–1158, 2000.

Noninvasive embryo evaluation method combining time-lapse images with biomarkers in follicular fluid and serum

Rumi Nakazawa^{1,2}, Takehiko Matsuyama¹, Atsuko Shiota²

¹Department of Gynecology, Koujin Hospital, Marugame, Japan

²Graduate School of Kagawa Prefectural University of Health Sciences, Takamatsu, Japan

ABSTRACT : To increase the success rate of assisted reproductive technologies, embryos with high developmental and implantation potential should be identified and selected. Here, we sought to establish a noninvasive and highly accurate embryo selection method by combining time-lapse monitoring parameters (at S2 and S3) with the following biomarkers in the follicular fluid (FF) and serum samples obtained from study subjects (using 70 eggs, FF, and serum in 58 cycles of conventional in vitro fertilization [c-IVF]) : dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) , insulin-like growth factor 1 (IGF-1) , reactive oxygen metabolites (d-ROMs) , biological antioxidant potential (BAP) , and an oxidative stress index (OSI: d-ROMs/BAP × 100) . Our analyses revealed significant positive correlations between some of the biomarkers in FF and serum: DHEA-S (r=0.88; p<0.01) , IGF-1 (r=0.83; p<0.01) , d-ROMs (r=0.55; p<0.01) , and OSI (r=0.45; p<0.01) . The BAP value was higher in FF than in serum in many cases. The follicular OSI in the abnormal fertilization (AF) group tended to be higher than that in the normal-fertilization (NF) group. The FF values of DHEA-S and IGF-1 and the serum DHEA-S tended to be higher in the NF group and blastocyst formation (BF) group. S2 and S3 were shortened in the NF and BF groups. These findings suggest that (1) oxidative stress is related to abnormal fertilization, (2) DHEA-S and IGF-1 are associated with normal fertilization and blastocyst formation, and (3) S2 and S3 are useful timepoints for evaluating embryos.

Key Words : Biomarker, Embryo evaluation, Embryo-synchronous development time, Noninvasive, Time-lapse imaging

Running Head : Embryo evaluation by time-lapse and biomarkers

INTRODUCTION

To increase the success rate of assisted reproductive technologies, it is important to select embryos with high developmental and implantation potential from among the eggs and embryos obtained by egg retrieval, prior to embryo transfer. A morphological evaluation is used in many centers to select the transferred embryos¹⁻⁵. The use of a time-lapse imaging incubator system has allowed us to observe the embryos, and such a system has been used to test the usefulness of dynamic parameters^{6,7}. However, there is still room for improvement in the process of selecting high-

potential embryos for transfer. We conducted the present study to explore a combined evaluation method with additional parameters. Our main goal is to establish a more accurate embryo evaluation method.

A human egg matures in the follicle, and after ovulation it is taken into the fallopian tube with the follicular fluid (FF), where it is fertilized and divides. In this study, we tested the hypothesis that the composition of the FF is important for oocyte maturation and fertilization, and we attempted to predict the quality of oocytes by measuring biomarkers in the FF in which the oocytes developed. We used dehydroepiandrosterone sulfate

(DHEA-S) and insulin-like growth factor 1 (IGF-1) as biomarkers of oocyte growth and aging⁸⁻¹⁰. We also measured reactive oxygen metabolite-derived compounds (d-ROMs) and the biological antioxidant potential (BAP), and we used the oxidative stress index (OSI: d-ROMs/BAP × 100).

It has been reported that with age, the production of free radicals increases and the endogenous defense mechanisms decrease¹¹ and may affect embryonic development^{12,13}. We therefore examined the relationships between the above-cited biomarkers and fertilization and embryo development. We speculated that if these biomarkers are revealed to be useful for selecting high-potential embryos, then evaluations of the quality of oocytes and embryos could be easily accomplished by measuring biomarkers in the patient's serum, which is easier to collect than FF. We therefore determined the correlations between the levels of the biomarkers in both serum and FF. We also determined the correlation between these biomarkers and the patient's age at oocyte pick-up (hereinafter referred to as the 'age').

We used time-lapse monitoring to assess early embryos because of the small number of cells, as we and other observers have found that the findings revealed by this monitoring are a stable marker^{14,15}. We focused on the three-cell stage (S2: t4-t3) and the stage from five cell to eight cells (S3: t8-t5) to investigate the relationship between fertilization and embryo development.

MATERIALS AND METHODS

The subjects were a retrospective cohort study of 70 eggs, FF, and serum in 58 cycles of assisted reproductive technology (c-IVF) conducted at Koujin Hospital from October 2018 to April 2019.

Blood E2 levels and follicle development were monitored. When the primary follicle was >18 mm, an Ovidrel Syringe 250 μg[®] or Buserelin Nasal Solution 0.15% "ILS" was administered by nasal spray. Next, 34-35 hr later, the follicles were punctured under transvaginal ultrasound guidance. The FF was then aspirated, and the oocytes were collected. To investigate the environment of the FF

and the quality of each oocyte, we targeted only the FF from which the oocyte was collected; no other FF was contaminating.

After confirmation of the second polar body (2PN) at 4-5 hr post-fertilization (c-IVF), the embryos were cultured in EmbryoScope[®] (ES+) (Vitrolife, Gothenburg, Sweden) in separate culture wells. When we confirmed blastocyst formation, the cells were frozen by rapid vitrification using a Vitrification Kit and Cryo-top (Kitazato Co. Fuji, Japan) and stored in liquid nitrogen. After the next cycle, thawing was performed using a Vitrification Kit (Kitazato) for 3-5 hr of recovery incubation in natural cycles or hormone replacement cycles. Single-blastocyst transfer was performed by transvaginal ultrasound using an ET catheter (Kitazato).

Pregnancy was determined by blood human chorionic gonadotropin (HCG) levels and transvaginal ultrasound to confirm the fetal sac.

Our further investigation was performed in two parts. In Part 1, we determined the correlation of each biomarker's values between the serum and FF of the respective patient. The correlations between age and biomarker levels was also examined. In Part 2, we performed difference tests between the normal fertilization (NF) group and abnormal fertilization (AF) group, between the blastocyst-forming group and non-forming group, and between the pregnant group and non-pregnant group. In each of these groups, we identified the levels of the biomarkers in both serum and FF (DHEA-S, IGF-1, d-ROMs, BAP, OSI) and evaluated the embryonic development (at S2 and S3) and clinical parameters, i.e., the age and body mass index (BMI) of the patients.

For our examination of the factors that may influence normal fertilization, blastocyst formation and pregnancy, we performed a logistic regression analysis (forward stepwise) to identify variables that met the criteria as influencing factors. The dependent variables were the presence/absence of normal fertilization, the presence/absence of blastocyst formation, and the presence/absence of pregnancy. The covariates in the analysis were the FF biomarker levels, the serum biomarker levels, S2, S3, BMI, and Age.

Collection of FF and serum

The collected FF was centrifuged (300g for 1 min) , and the supernatant was collected and stored in a deep freezer at -70°C . Serum was collected on the day the egg collection was performed and frozen in a deep freezer at -70°C .

Embryo evaluation

All embryos were cultured with ES+, and time-lapse images of each embryo were analyzed. 2PN confirmation was judged as normal fertilization, whereas other nuclei were judged as abnormal fertilization. We conducted a morphological evaluation to calculate the timing of the 2-Blastomere (t2), 3-Blastomere (t3), 4-Blastomere (t4) and 8-Blastomere (t8) division times. We also measured the synchronization of the second (s2: t4-t3) and third cell cycles (s3: t8-t5).

Method for measuring biomarkers in FF and serum

The d-ROMs and BAP values were measured using FREE Carrio Duo[®] System (WismerII, Tokyo). The oxidative stress index (OSI) was then calculated as: $\text{d-ROMs}/\text{BAP} \times 100$. A detailed description of d-ROM and BAP has been reported¹⁶⁾. DHEA-S was assayed using a fully automated enzyme immunoassay system, the AIA[®]-2000 (Tosoh Bioscience, Tokyo) , and the reagent used was the Ectest Tosoh[®] II, which is a dedicated reagent for the system. IGF-1 was assayed by the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) cobas[®] e 411 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) , and ECLusys[®] (Roche Diagnostics) was used as the reagent for this system.

Statistical analysis

The result of the difference test was confirmed by the Levene test, and the two-sample t-test was performed when equal variance was observed. The two-sample t-test as a modification of Welch's test was used when the data were not equally dispersed. The significance of the results was assessed by SPSS Statistics 26 software (IBM, New York) using Student's t-test and the chi-square test. Differences were considered significant at $p < 0.05$. Multivariate correlations were calculated using Pearson's

moment correlation. We performed a logistic regression analysis using a stepwise variable increase. The logistic regression model was used to calculate the adjusted odds ratio (OR) over the 95% confidence interval (CI) to calculate the risks. The effect size calculation used Cohen's d.

Ethical considerations

This study was explained to the subjects, and their consent was obtained in accordance with the code of ethics of Kojin Hospital. The Graduate School of Kagawa Prefectural University of Health Sciences Ethics Review Committee approved the study (approval no.263).

RESULTS

From 58 cycles, 70 serum samples, FF, and oocytes were collected. Normal fertilization resulted in 56 cells, of which 40 formed blastocysts. A single blastocyst transfer was performed in 28 cycles, and a pregnancy was achieved in 10 cycles, of which seven were births and three were miscarriages. Twelve blastocysts were cryopreserved.

The characteristics of the patients are summarized in **Table 1**. The age at oocyte pick-up (OPU) ranged from 26 to 46 years (mean 39.2 ± 5.0 years) . All of the biomarker levels (mean \pm SD) were lower in the FF than in the serum for each of the patients.

Part 1: Correlations between serum and FF and between age and each biomarker's levels

As illustrated in **Figure 1**, the correlation between the biomarkers levels in the FF and serum was strong and positive for DHEA-S ($r=0.88$, $p < 0.01$) and IGF-1 ($r=0.83$, $p < 0.01$). The levels of d-ROMs ($r=0.55$, $p < 0.01$) and the OSI ($r=0.45$, $p < 0.01$) had a moderately positive correlation. However, there was no correlation between the BAP values in the FF and those in the serum ($r=0.22$, $p=0.66$) . It is interesting to note that BAP was found in 45.7% (32/70) of the cases, with higher levels in the FF than in the serum. The dotted area in **Figure 1D** shows the plot where the FF levels were higher than the serum levels.

Table 1 Characteristics of patients

Factor	Mean ± SD	
Total number of patients	58	
Total number of follicles	70	
Age of participants (years old)	39.2 ± 5.0	
BMI (kg/m ²)	22.7 ± 3.7	
S2(t4-t3) (h)	2.5 ± 4.5	
S3(t8-t5) (h)	10.0 ± 9.7	
Biomarker	Follicular fluid level	Serum level
DHEA-S(μg/dL)	199.8 ± 102.4	225.9 ± 106.1
IGF-1 (ng/mL)	97.3 ± 27.5	130.1 ± 32.8
d-ROMs (U.CARR)	324.0 ± 59.6	393.9 ± 61.3
BAP (μmol/L)	2057.9 ± 323.1	2098.3 ± 200.9
OSI (%)	16.0 ± 3.2	18.9 ± 3.0

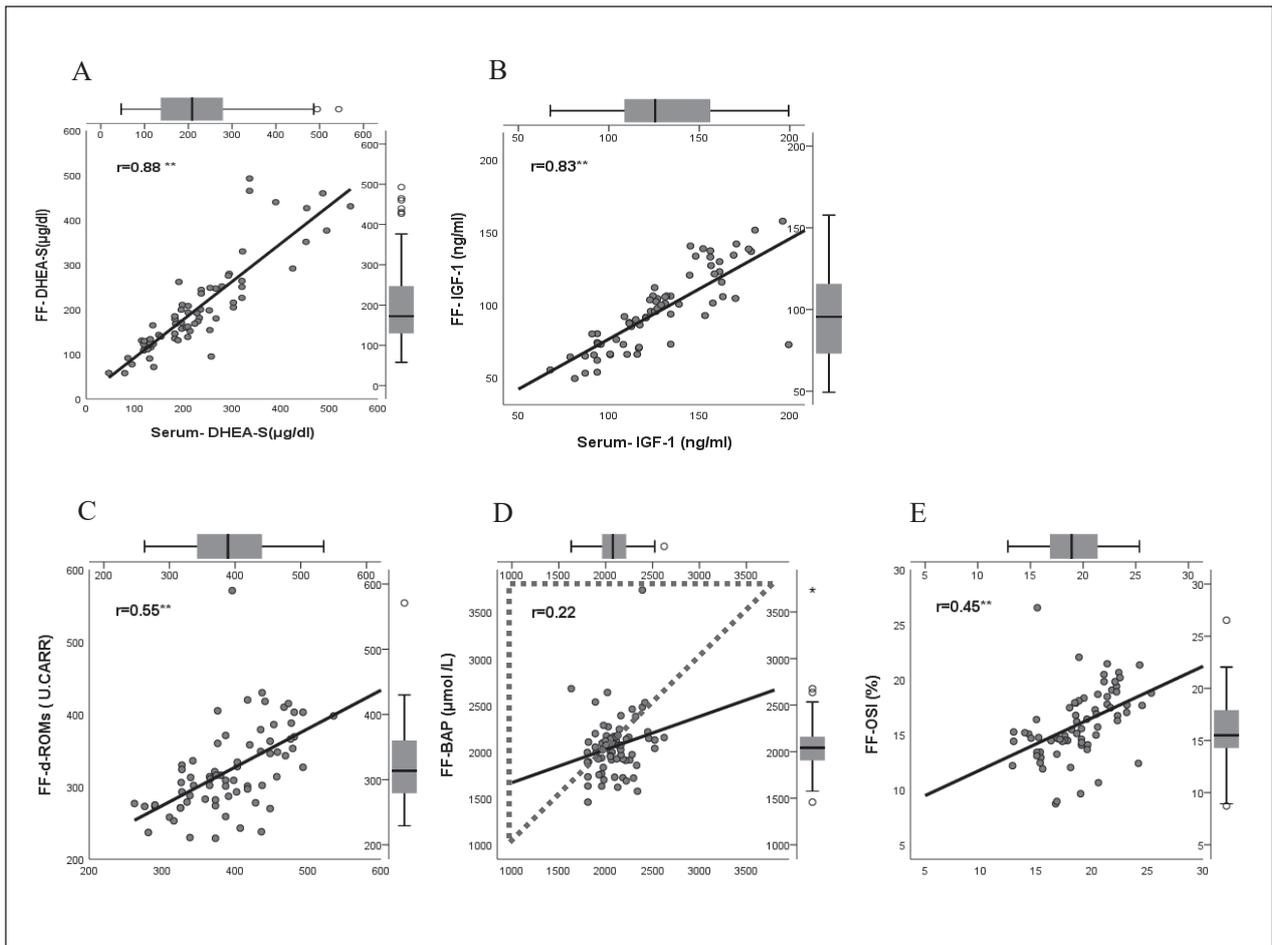


Figure 1 The relationship between the biomarkers' levels in follicular fluid (FF) and serum.

A: DHEAS. B: IGF-1. C: d-ROMs. D: BAP. E: The OSI. The dotted area in panel D is the plot in which the patient's FF level was higher than her serum level. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

The correlation between age and biomarkers is depicted in Figure 2. There was a weak negative correlation between FF-DHEA-S and age ($r = -0.25$, $p < 0.05$), but Serum-DHEA-S was not correlated with age ($r = -0.19$, $p = 0.10$). There was a moderately negative correlation between FF-IGF-1 and age ($r = -0.43$, $p < 0.01$) and between Serum-IGF-1 and age ($r = -0.41$, $p < 0.01$). In both the FF and serum, the values of d-ROMs, BAP, and OSI were not correlated with age.

Part 2: Test for differences and factor analysis of influence between each group

Table 2 summarizes the results of our comparison of the biomarker levels in FF and serum between the NF and AF groups. The normal fertilization rate was 80.0% (56/70). There was no significant difference in any of the biomarkers or in embryonic development between the NF and AF groups. However, the values of the following markers tended to be higher in the NF group compared to the AF group: FF-DHEA-S (204.7 ± 109.9 vs. 179.9 ± 63.8), Serum-DHEA-S (229.5 ± 113.7 vs. 211.6 ± 69.1), FF-IGF-1 (99.5 ± 26.1 vs. 88.7 ± 31.9), and Serum-IGF-1 (133.5 ± 33.3 vs. 116.5 ± 27.8 , respectively).

The d-ROMs values and the OSI tended to be lower in the NF group compared to the AF group. The results of the logistic regression analysis demonstrated that none of the factors that we examined affected the presence or absence of normal fertilization.

Table 3 summarizes the results of our comparison of the biomarker levels in FF and serum between the blastocyst-forming group and the non-forming group. The blastocyst formation rate was 71.4% (40/56). There was no significant between-group difference in any of the biomarkers, but the values of the following markers tended to be higher in the blastocyst-forming group compared to the non-forming group: FF-DHEA-S (217.0 ± 115.2 vs. 174.1 ± 91.6), Serum-DHEA-S (242.1 ± 118.2 vs. 198.1 ± 98.0), and FF-IGF-1 (100.5 ± 26.3 vs. 97.0 ± 26.2 , respectively). The patients were younger in the blastocyst-forming group than in the non-forming group.

S2 and S3 were delayed in the non-forming group compared to the blastocyst-forming group, but not significantly. The logistic regression analysis revealed that the two factors with significant ORs (95%CI) in the final model were age (OR 0.72, 95%CI: 0.54–0.95) and S3 (OR 0.889, 95%CI: 0.81–0.98).

Table 4 summarizes the results of our comparison of biomarker levels in FF and serum between the pregnant and non-pregnant groups. None of the biomarker levels and neither S2 nor S3 differed significantly between these groups. The pregnant group was significantly younger than the non-pregnant group (34.6 ± 3.9 vs. 40.1 ± 3.8 ; $p < 0.05$). The results of the logistic regression analysis showed that age was a significant factor in the final model (OR 0.67, 95%CI: 0.49–0.92).

DISCUSSION

Many embryo evaluation methods using time-lapse imaging have been reported¹⁷⁻¹⁹, and we have used such imaging as one of the methods for evaluating embryos. In this study, we focused on the synchronization of S2 and S3, as they are stages at which it is easy to determine cell division stably with small errors among observers. Our observations revealed that S2 was shortened in the normal-fertilization group, blastocyst-formation group and pregnancy group, although there was no significant difference. S3 was also shorter in the blastocyst-formation group than in the non-formation group. It has been suggested that a shorter S2 has a higher blastocyst formation rate²⁰, and that embryos that divide properly at the optimal time are good-quality embryos^{6, 21}. Our present findings also indicate that evaluations of S2 and S3 is an effective method for embryo selection. Since the goal of this study was to develop a method to select more high-potential embryos, the combined method that we used was designed to evaluate a composite of embryos with the addition of biomarkers as new parameters.

Our results did not confirm the validity of the addition of five biomarkers for the assessment of fertilization, blastocyst formation, or pregnancy establishment. However, two of the biomarkers, i.e.,

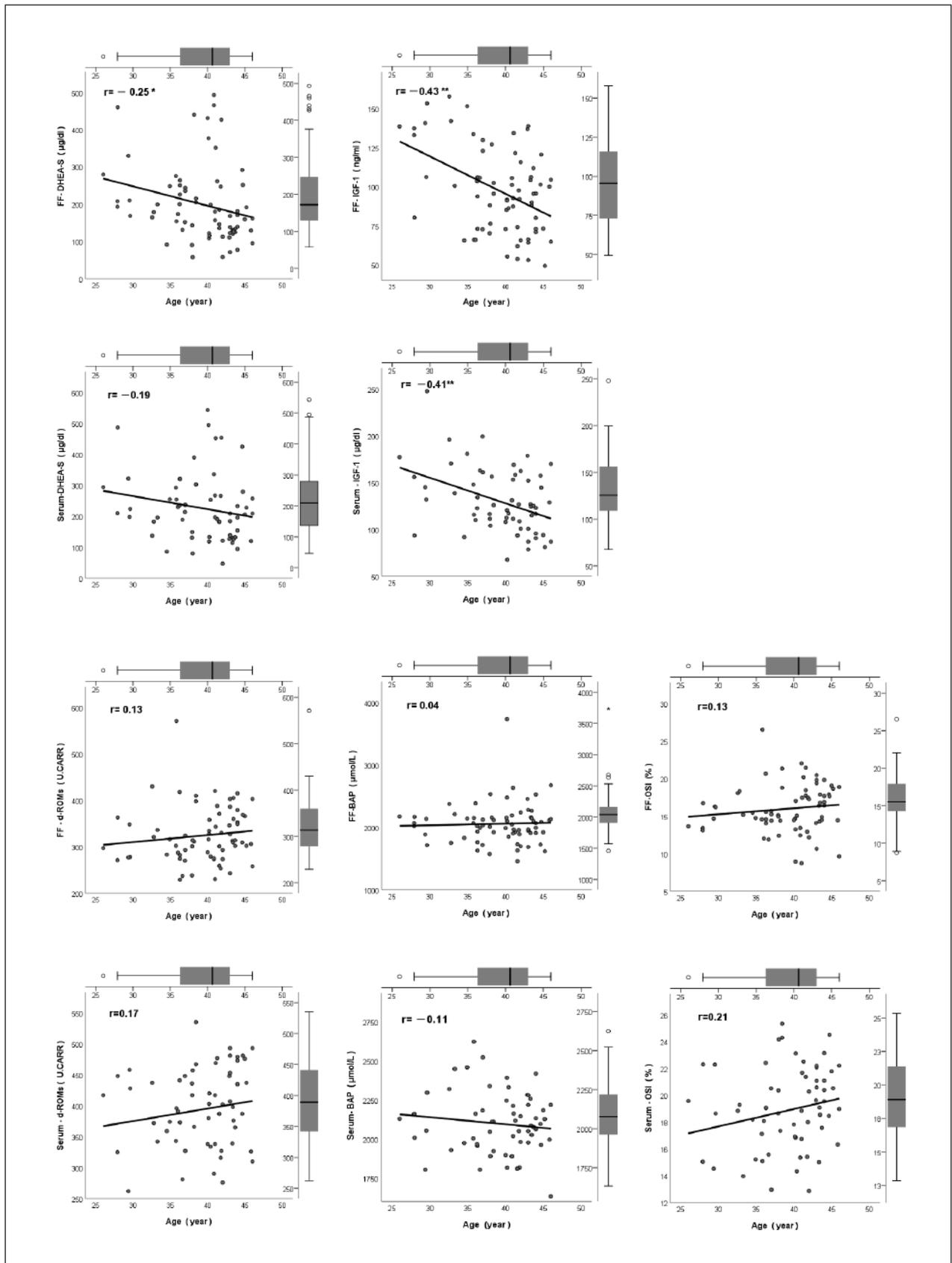


Figure 2 The relationship between age and the biomarkers' levels in the follicular fluid and serum.

The values of DHEA-S, IGF-1, d-ROMs, BAP, and the OSI are shown. The x-axis shows the patient's age at oocyte pick-up.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Table 2 Comparison between normal fertilization group and abnormal fertilization group: levels in follicular fluid and serum

Factor	normal(n=56)	abnormal(n=14)	P-value	effect size d
Age (years old)	39.2 ± 4.6	39.1 ± 6.6	0.949	0.02
BMI (kg/m ²)	22.4 ± 3.7	23.7 ± 3.3	0.236	0.36
S2(t4-t3) (h)	2.1 ± 4.2	4.3 ± 5.7	0.251	0.49
S3(t8-t5) (h)	9.6 ± 9.7	12.4 ± 10.1	0.414	0.29

Biomarker	Follicular fluid level (Mean ± SD)				Serum level (Mean ± SD)			
	normal(n=56)	abnormal(n=14)	P-value	effect size d	normal(n=56)	abnormal(n=14)	P-value	effect size d
DHEA-S(µg/dL)	204.7 ± 109.9	179.9 ± 63.8	0.278	0.24	229.5 ± 113.7	211.6 ± 69.1	0.575	0.17
IGF-1 (ng/mL)	99.5 ± 26.1	88.7 ± 31.9	0.191	0.40	133.5 ± 33.3	116.5 ± 27.8	0.083	0.53
d-ROMs (U.CARR)	320.6 ± 53.1	337.4 ± 81.9	0.349	0.28	390.8 ± 59.0	406.2 ± 70.8	0.404	0.25
BAP (µmol/L)	2082.2 ± 338.8	1960.6 ± 235.9	0.210	0.38	2094.4 ± 203.5	2113.7 ± 196.6	0.750	0.10
OSI (%)	15.7 ± 3.0	17.3 ± 3.7	0.094	0.51	18.8 ± 2.9	19.3 ± 3.7	0.534	0.16

Effect size calculation used Cohen's d.

Table 3 Comparison between blastocyst forming group and non forming group: levels in follicular fluid and serum

Factor	formation(n=40)	non formation(n=16)	P-value	effect size d	OR	95% CI	P-value
Age (years old)	38.5 ± 4.6	41.0 ± 4.0	0.074	0.56	0.72	0.54-0.95	0.021
BMI (kg/m ²)	22.0 ± 3.5	23.4 ± 4.2	0.236	0.38			
S2(t4-t3) (h)	1.7 ± 2.9	3.3 ± 6.3	0.206	0.39			
S3(t8-t5) (h)	7.5 ± 6.3	16.0 ± 14.8	0.066	0.90	0.89	0.81-0.98	0.018

Biomarker	Follicular fluid level (Mean ± SD)				Serum level (Mean ± SD)			
	formation(n=40)	non formation(n=16)	P-value	effect size d	formation(n=40)	non formation(n=16)	P-value	effect size d
DHEA-S(µg/dL)	217.0 ± 115.2	174.1 ± 91.6	0.190	0.39	242.1 ± 118.2	198.1 ± 98.0	0.193	0.39
IGF-1 (ng/mL)	100.5 ± 26.3	97.0 ± 26.2	0.659	0.13	132.7 ± 30.6	135.6 ± 40.5	0.767	0.09
d-ROMs (U.CARR)	322.3 ± 49.1	316.4 ± 63.5	0.708	0.11	390.4 ± 58.6	392.0 ± 62.1	0.929	0.03
BAP (µmol/L)	2063.4 ± 222.0	2129.3 ± 538.2	0.642	0.19	2088.0 ± 209.2	2110.6 ± 194.4	0.711	0.11
OSI (%)	15.8 ± 2.7	15.4 ± 3.7	0.696	0.13	18.8 ± 3.0	18.6 ± 2.5	0.780	0.07

Effect size calculation used Cohen's d.

Table 4 Comparison between pregnant group and non pregnant group: levels in follicular fluid and serum

Factor	pregnant (n=10)	non pregnant(n=18)	P-value	effect size d	OR	95% CI	P-value
Age (years old)	34.6 ± 3.9	40.1 ± 3.8	0.001 *	1.43	0.67	0.49-0.92	0.013
BMI (kg/m ²)	21.4 ± 3.1	21.6 ± 3.1	0.460	0.06			
S2(t4-t3) (h)	0.7 ± 0.7	2.1 ± 3.7	0.145	0.46			
S3(t8-t5) (h)	7.4 ± 6.4	6.7 ± 6.7	0.879	0.11			

Biomarker	Follicular fluid level (Mean ± SD)				Serum level (Mean ± SD)			
	pregnant (n=10)	non pregnant(n=18)	P-value	effect size d	pregnant (n=10)	non pregnant(n=18)	P-value	effect size d
DHEA-S(µg/dL)	216.5 ± 108.4	224.6 ± 119.2	0.860	0.07	226.2 ± 110.3	258.9 ± 134.3	0.518	0.26
IGF-1 (ng/mL)	98.2 ± 33.1	105.4 ± 23.8	0.508	0.26	126.4 ± 38.3	136.5 ± 25.0	0.409	0.33
d-ROMs (U.CARR)	321.3 ± 29.2	315.8 ± 55.7	0.774	0.11	395.3 ± 44.1	375.3 ± 55.4	0.336	0.39
BAP (µmol/L)	2130.0 ± 141.9	2124.8 ± 218.4	0.951	0.03	2162.2 ± 237.0	2075.4 ± 212.2	0.329	0.39
OSI (%)	15.2 ± 1.5	15.0 ± 2.9	0.891	0.08	18.6 ± 3.6	18.1 ± 2.4	0.685	0.17

Differences were considered significant when * P values < 0.05
Effect size calculation used Cohen's d.

DHEA-S and IGF-1 have been reported to be factors involved in follicle development, oocyte maturation, and embryo quality²²⁾. We observed strong positive correlations of DHEA-S and IGF-1 between serum and FF levels in the present investigation, and we therefore speculate that the measurement of serum levels could be used to estimate FF levels and could serve as a measure of egg maturation and embryo evaluation.

Terao et al.²³⁾ reported that d-ROMs, BAP, and the OSI in the follicular fluid were involved in fertilization and cell division. Our present analyses demonstrated that the values of d-ROMs, BAP, and the OSI were not affected by age factors. We thus speculate that if d-ROMs, BAP, and the OSI are involved in fertilization and cell division, measuring them could be useful for predicting embryo quality without the use of the age factor.

It is interesting to note that among the biomarkers examined in this study, only BAP was not correlated between the serum and FF. Locally generated reactive oxygen species (ROS) have been reported to play an important role in follicle development, egg maturation, and ovulation²⁴⁾, but it has been reported that high levels of ROS can cause oxidative stress in the oocytes and granulosa cells in the follicle, which may lead to a decrease in the quality of the oocytes²⁵⁾. On the other hand, antioxidants have been reported to act as scavengers to protect DNA and cellular components²⁶⁾. We observed herein that BAP was higher in the FF than in the serum in most cases, which suggests that there are more antioxidants in FF than in serum, and that the oocytes in the follicles may be protected by antioxidant effects. These findings suggest that oxidative stress is related to abnormal fertilization. Further research is needed to determine whether this phenomenon (i.e., the higher BAP values in FF) is related to egg quality and embryonic development.

Our present findings do not support a noninvasive, simple and accurate embryo selection method by combining biomarkers with parameters from time-lapse monitoring. However, our sample size was small because the study was limited to c-IVF in order to eliminate the differences in the speed of

division caused by sperm quality. In addition, because we examined minimum ovarian stimulation cycles and natural OPU cycles, there was no room to choose a single embryo to be transferred in each cycle. These limitations may have affected our inability to identify useful biomarkers as indicators for embryo evaluation. In the future, the ovarian stimulation protocol should be used and larger sample sizes should be tested.

If an evaluation method for selecting embryos based on embryonic developmental dynamics and biological biomarkers can be confirmed, the method could become a promising tool for noninvasively predicting blastocyst formation and successful pregnancy.

Conflicts of interest

The authors report no conflicts of interest in this study.

Acknowledgements

We thank Dr. Takehiro Nakamura, The Graduate School Kagawa Prefectural University of Health Science, and Dr. Takehiko Matsuyama, President of Koujin Hospital, for their guidance and advice on graduate school admission, and all of the members of the Koujin Hospital laboratory for their cooperation in the data collection.

References

- 1) Kirkegaard K, Ahlström A, Ingerslev H, J, Hardarson T : Choosing the best embryo by time lapse versus standard morphology. *Fertil Steril*, 103: 323–332, 2015.
- 2) Meseguer M, Rubio I, Cruz M, Nasil N, Marcos J : Embryo incubation and selection in a time-lapse monitoring system improves pregnancy outcome compared with a standard incubator: A retrospective cohort study. *Fertil Steril*, 98 : 2012.
- 3) Chen A A, Tan L, Suraj V, Reijo Pera, R, Shen S : Biomarkers identified with time-lapse imaging: Discovery, validation, and practical application. *Fertil Steril*, 99: 1035–1043, 2013.
- 4) Kaser D. J, Racowsky C : Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. *Hum Reprod*, 20: 617–631, 2014.

- 5) Otsuki J, Iwasaki T, Enatsu N, Katada Y, Furuhashi K, Shiotani M: Noninvasive embryo selection: kinetic analysis of female and male pronuclear development to predict embryo quality and potential to produce live birth. *Fertil Steril*, 112 : 874–881, 2019.
- 6) Milewski R, Czerniecki J, Kuczyńska A, Stankiewicz B, Kuczyński W : . Morphokinetic parameters as a source of information concerning embryo developmental and implantation potential. *Ginekol Pol*, 87 : 677–684 2016.
- 7) Souter I, Dimitriadis I, Bormann C. L, Hauser R, Messerlian C : Maternal predictors of morphokinetic embryo parameters using time-lapse (TL) imaging. *Fertil Steril*, 106 : 308, 2016.
- 8) Nawata H, Yanase T, Goto K, Okabe T, Ashida K : Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech Ageing Dev*, 123 : 1101–1106, 2002.
- 9) Takayanagi R, Goto K, Suzuki S, Tanaka S, Shimoda S, Nawata H : Dehydroepiandrosterone (DHEA) as a possible source for estrogen formation in bone cells: Correlation between bone mineral density and serum DHEA-sulfate concentration in postmenopausal women, and the presence of aromatase to be enhanced by 1, 25-dihydroxyvitamin D3 in human osteoblasts. *Mech Ageing Dev*, 123 : 1107–1114, 2002.
- 10) Papierska L, Rabijewski M, Kasperlik-Załuska A, Zgliczyński W: Effect of DHEA supplementation on serum IGF-1, osteocalcin, and bone mineral density in postmenopausal, glucocorticoid-treated women. *Adv Med*. 57 : 51–57, 2012.
- 11) Igarashi H, Takahashi T, Nagase S : Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. *Reprod Med Bio*. 14 : 159–169, 2015.
- 12) Nakagawa K, Hisano M, Sugiyama R, Yamaguchi K : Measurement of oxidative stress in the follicular fluid of infertility patients with an endometrioma. *Arch Gynecol Obstet*, 293 : 197–202, 2016.
- 13) Karabulut S, Korkmaz O, Kutlu P, Gozel H. E, Keskin I: Effects o follicular fluid oxidative status on human mural granulosa cells, oocyte competency and ICSI parameters. *Eur. J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 252 : 127–136, 2020.
- 14) Adolfsson E, Andershed A. N : Morphology vs morphokinetics: A retrospective comparison of interobserver and intra-observer agreement between embryologists on blastocysts with known implantation outcome. *J Bras Reprod Assist*, 22 : 228–237, 2018.
- 15) Paternot G, Wetsels Alex M, Willems D, Devroe J, Debrock S, D'Hooghe T. M, Spiessens, C : Intra- and interobserver analysis in the morphological assessment of early stage embryos during an IVF procedure: A multicentre study. *Reprod Biol Endocrinol*, 9 : 1–5, 2011.
- 16) Celi P, Sullivan M, Evans D : The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood. *Vet. J*, 183 : 217–218, 2010.
- 17) Goodman L. R, Goldberg J, Falcone T, Austin C, Desai N : Does the addition of time-lapse morphokinetics in the selection of embryos for transfer improve pregnancy rates? A randomized controlled trial. *Fertil Steril* : 275–285, 2016.
- 18) Otsuki J, Iwasaki T, Katada Y, Tsutsumi Y, Tsuji Y, Furuhashi K, Koikeguchi S, Shiotani M: A higher incidence of cleavage failure in oocytes containing smooth endoplasmic reticulum clusters. *J Assist Reprod Genet*, 35 : 899–905, 2018.
- 19) Omidi M, Faramarzi A, Agharahimi A, Khalili M. A : Noninvasive imaging systems for gametes and embryo selection in IVF programs: a review. *J Microsc*, 287 : 253–264, 2017.
- 20) Desai N. N, Ploskonka S, Goldberg J, Austin C, Falcone, T : Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. 54: *Reprod Bio Endocrinol*, 2014.
- 21) Ergin E. G, Ergin Elif G, Çalıřkan E, Yałcinkaya E, Oztel Z, Çokelez K, Ozay A, Ozornek H. M Frequency of embryo multinucleation detected by time-lapse system and its impact on pregnancy outcome. *Fertil Steril*, 4 : 1029–1033, 2014.
- 22) Hattori K, Yanase T, Goto K, Okabe T, Ashida K : Luteinizing Hormone Facilitates Antral Follicular Maturation and Survival via Thecal Paracrine Signaling in Cattle . *Endocrinol*, 159 : 2337–2347, 2018.
- 23) Terao, H. Wada-Hiraike O, Nagumo A, Kunitomi C, Azhary Jerilee M. K. Harada M, Hirata T, Hirota Y, Koga K, Fujii T, Osuga Y : Role of oxidative stress in follicular fluid on embryos of patients undergoing assisted reproductive technology treatment. *J Obstet Gynaecol*. 45:1884–1891, 2019.
- 24) Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M: Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Hum Reprod*, 5 : 409–413, 1999.
- 25) Pasqualotto, E. B, Agarwal A, Sharma Rakesh K, Izzo V. M, Pinotti J A, Joshi N. J, Rose B. I. : Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertil Steril*, 81 : 973–976, 2004.
- 26) Agarwal A, Saleh R. A, Bedaiwy M. A : Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril*, 79: 829–843, 2003.

当院における卵管鏡下卵管形成術後の不妊治療成績 について

Outcomes of infertility treatment after falloposcopic tuboplasty at our hospital

須賀 真美, 兵頭 慎治, 鍋田 基生

Mami Suga, Shinji Hyodo, Motowo Nabeta

つばきウイメンズクリニック 〒791-1104 愛媛県松山市北土居5丁目11番7号
TSUBAKI Women's Clinic

要旨： 当院では、卵管通過障害の不妊患者に対し積極的に卵管鏡下卵管形成術（FT：falloposcopic tuboplasty, 以下FT）を行っている。当院でのFT後の妊娠率、妊娠に関連する因子、その後の治療経過について検討した。2017年1～9月にFTを施行した121例のうち、除外症例を除く98例を対象とした。1, 3, 6, 9ヶ月後までの妊娠率、年齢、血中AMH値、クラミジア感染既往、子宮内膜症、開腹歴、またART移行例について検討した。FT後non-ART妊娠は、1ヶ月後10例（11.2%）、3ヶ月後26例（29.2%）、6ヶ月後30例（33.7%）、9ヶ月後31例（34.8%）であり、ART妊娠は6ヶ月後14例（15.7%）、9ヶ月後27例（30.3%）であった。また、血中低AMH値、子宮内膜症、開腹歴、卵管閉塞を有する症例は、FT後の一般不妊治療において、妊娠予後不良となる可能性があることが示唆された。

キーワード： 不妊症, 卵管因子, 卵管鏡下卵管形成術(FT)

ランニングヘッド： 当院における卵管鏡下卵管形成術後の不妊治療成績

英文要旨： At our hospital, we actively perform falloposcopic tuboplasty (hereinafter, FT) for infertile patients with tubal obstruction. We examined the pregnancy rate after FT, factors associated with pregnancy, and the subsequent course of treatment. Of the 121 patients who underwent FT between January and September 2017, 98 patients were enrolled after excluding the ineligible patients. The pregnancy rate; age; blood anti-Müllerian hormone (AMH) level; history of chlamydial infection and laparotomy; endometriosis; and transition to assisted reproductive technology (ART) were evaluated after 1, 3, 6, and 9 months. Non-ART pregnancies after FT were observed in 10 patients (11.2%) after 1 month, 26 patients (29.2%) after 3 months, 30 patients (33.7%) after 6 months, and 31 patients (34.8%) after 9 months, and ART pregnancies were observed in 14 patients (15.7%) after 6 month, 27 patients (30.3%) after 9 months. Moreover, it was suggested that patients with low blood AMH level, endometriosis, a history of laparotomy, and fallopian tube obstruction have poor pregnancy prognosis in general fertility treatment after FT.

キーワード： infertility, tubal factor, falloposcopic tuboplasty

緒言 (目的, 背景)

女性側の不妊原因のうち約3割が卵管因子といわれている。その原因は、上行性感染、子宮内膜症、器質的な圧迫や癒着、異物などがあげられる。卵管鏡下卵管形成術(FT：falloposcopic tuboplasty)は、卵管通過障害があり、自然妊娠を望む患者に対する有効な治療手段として知られている¹⁾²⁾。当院では、卵管通過障害を有する不

妊症患者に対し、積極的にFTを行っている。当院におけるFT施行後の妊娠率、妊娠に関連する因子、その後の治療経過について検討した。

対象と方法

当院では、スクリーニング検査として全症例に子宮卵管造影検査(HSG:Hysterosalpingography)を施行し、

卵管狭窄もしくは閉塞と診断された症例に積極的にFTを施行している。閉塞と診断した症例には直ちにFTを勧めている。また、狭窄と診断した症例のうち過去に不妊治療歴がある場合は、閉塞症例と同様に直ちにFTを勧めているが、過去に不妊治療歴がない症例には、タイミング療法や人工授精（AIH）を複数回行っても妊娠成立しない場合にFTを施行するようにしている。また、明らかな卵管水腫は適応から除外している。

2017年1～9月に当院でFTを施行した121例のうち、3ヶ月未満に受診を中止した23例を除く98例を対象とした。本研究は、当院の倫理審査委員会承認を受けた後、当該期間に同意を取得した患者に対して行われた。

1, 3, 6, 9ヶ月後までの妊娠率と、9ヶ月後の時点でのnon-ART妊娠、ART妊娠、未妊娠の3群間において、年齢、血中AMH値、クラミジア感染既往、子宮内膜症、開腹歴、卵管障害の程度と部位について、それぞれ比較検討した。検定にはF検定、Sidal法を用いた。

結果

FTによる合併症の発症はなかった。3例が卵管通過困難で手術を完遂できず、4例が術後卵胞発育を認めなかった。また、3例に高度な男性不妊が判明した。それらはいずれも、3ヶ月以内にARTにstep upしていた。

FT施行後の妊娠率は、タイミング妊娠・AIH妊娠を含むnon-ART累積妊娠が、1ヶ月後10例（11.2%）、3ヶ月後26例（29.2%）、6ヶ月後30例（33.7%）、9ヶ月

後31例（34.8%）であった。また、ART累積妊娠が、6ヶ月後14例（15.7%）、9ヶ月後27例（30.3%）であった。FT施行後9ヶ月には、non-ART妊娠およびART妊娠の計58例（66.3%）が妊娠に至った（図1）。

FT後9ヶ月時点での妊娠状況は、non-ART妊娠群31例、ART妊娠群27例、3ヶ月以降で治療中止した症例を含む未妊娠群40例であった（図2）。この3群間で妊娠関連因子について比較検討を行った。

手術施行時年齢は23～43歳で、non-ART妊娠群が平均33.7歳、ART妊娠群が平均34.5歳、未妊娠群が平均35.2歳であった。同順で上昇傾向にはあったが、それぞれの対象間に有意差はなかった（図3）。

不妊期間は3～120ヶ月で、non-ART妊娠が平均25.6ヶ月、ART妊娠が平均23.9ヶ月、未妊娠が平均34.7ヶ月であった。未妊娠群でやや長い印象はあったが、有意差は認めなかった（図4）。

血中AMH値は0.15～22.8ng/mLで、non-ART妊娠が平均5.45ng/mL、ART妊娠が平均4.36 ng/mL、未妊娠が平均3.98ng/mLでnon-ART妊娠群で高値であったが、有意差は認めなかった（図5）。

クラミジア感染の既往では、non-ART妊娠が9.7%、ART妊娠が11.1%、未妊娠が5%であり、妊娠率に関与していなかった（図6）。

子宮内膜症有病率は、non-ART妊娠が6.5%、ART妊娠が7.4%、未妊娠が15%であった。有意差はなかったものの、未妊娠群ではnon-ART妊娠群と比較して2倍以上の有病率であった（図7）。

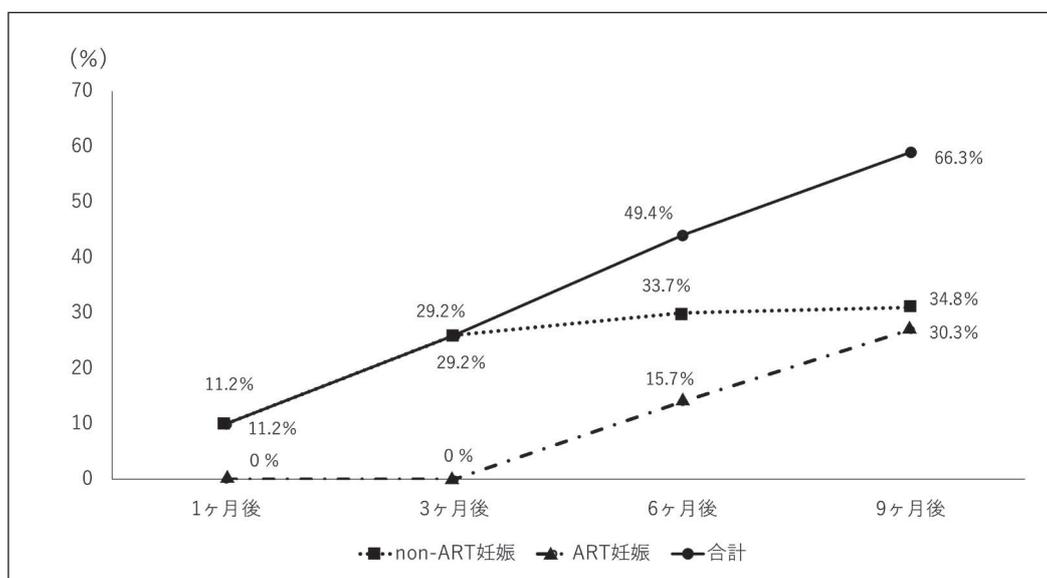


図1 FT後の累積妊娠率

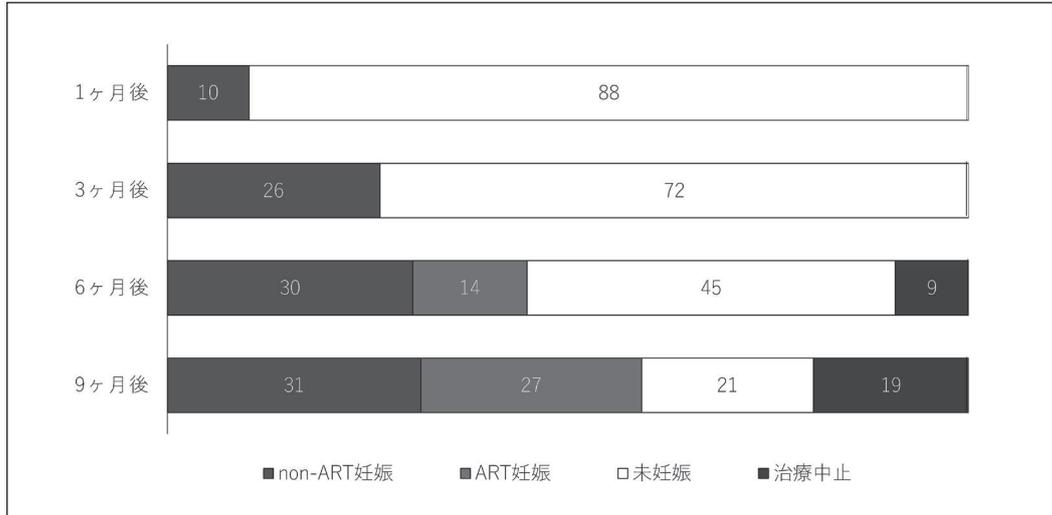


図2 FT 施行後の経過

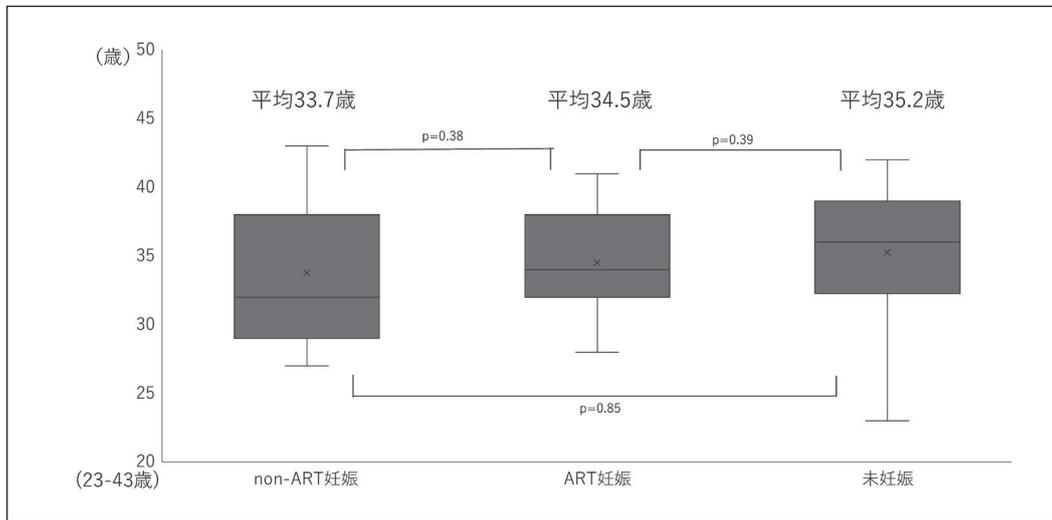


図3 手術施行時年齢

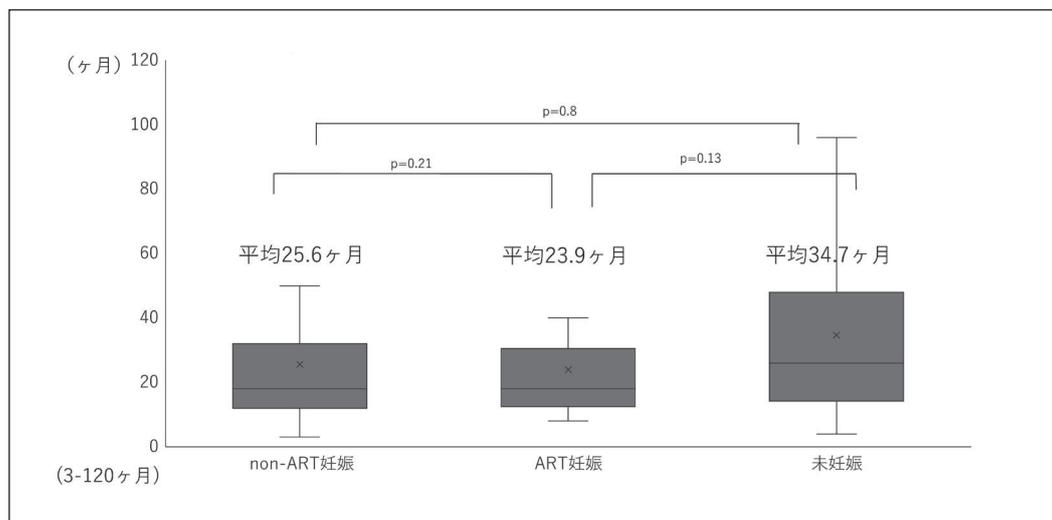


図4 FT 施行までの不妊期間

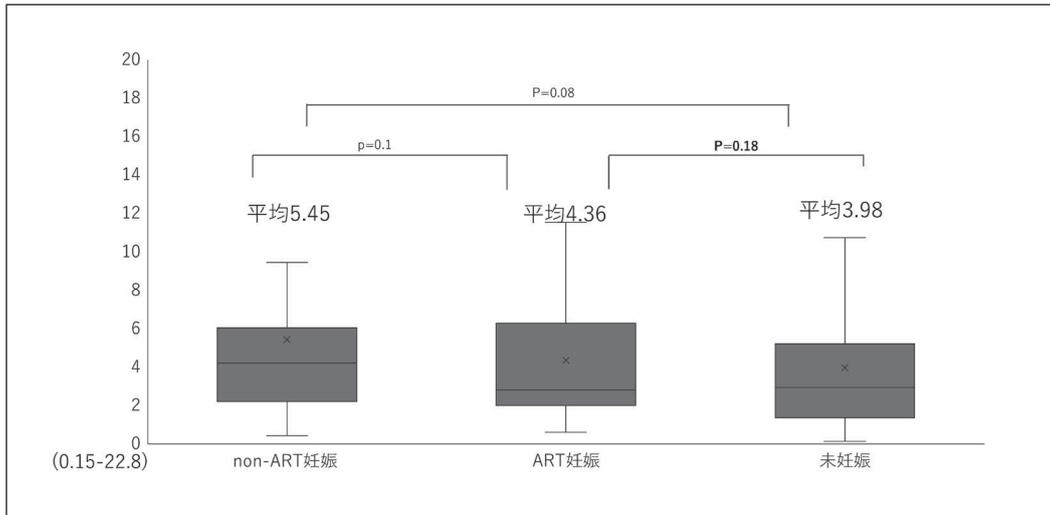


図 5 AMH

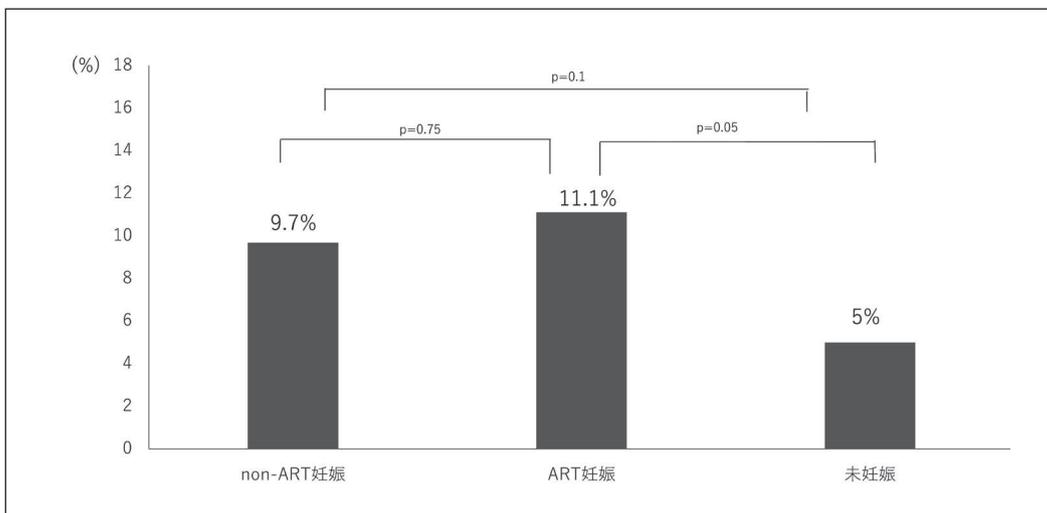


図 6 クラミジア感染

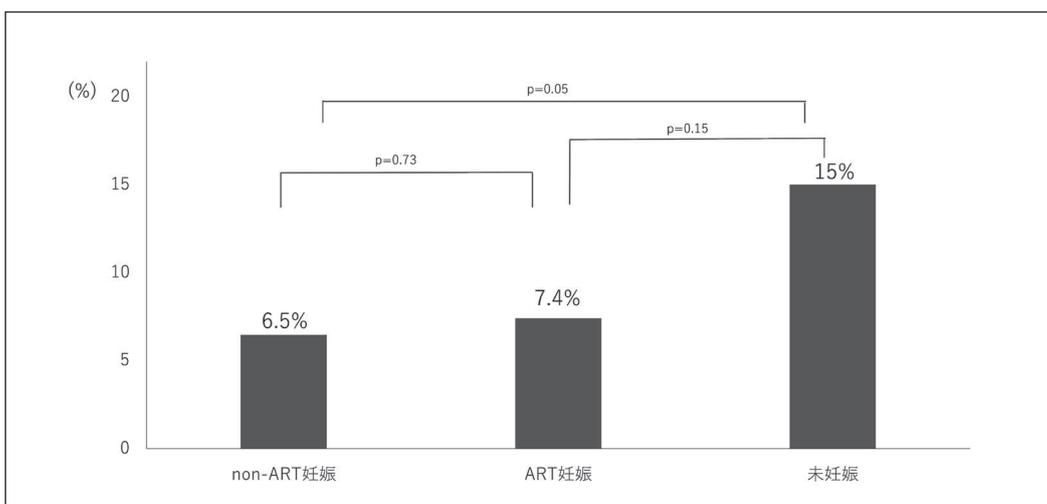


図 7 内膜症

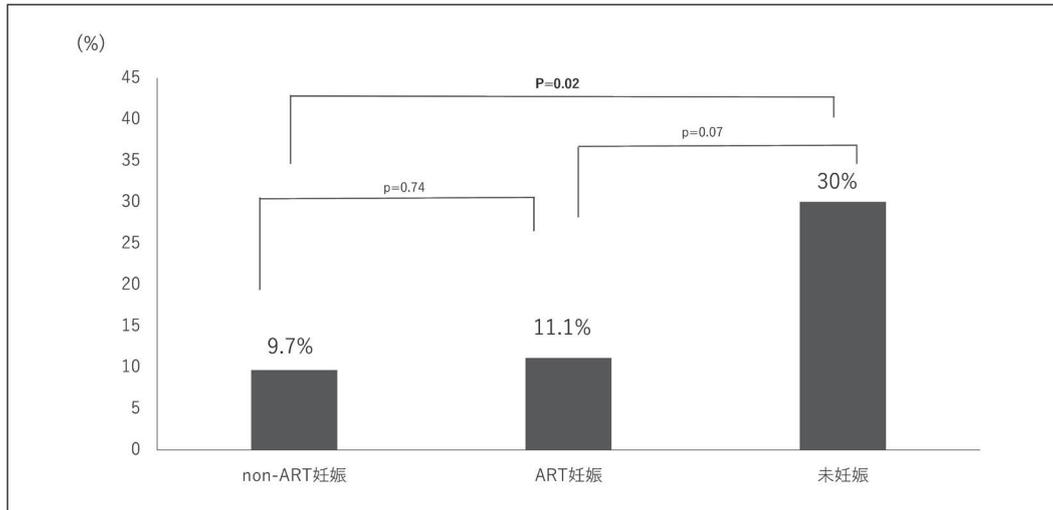


図8 開腹歴

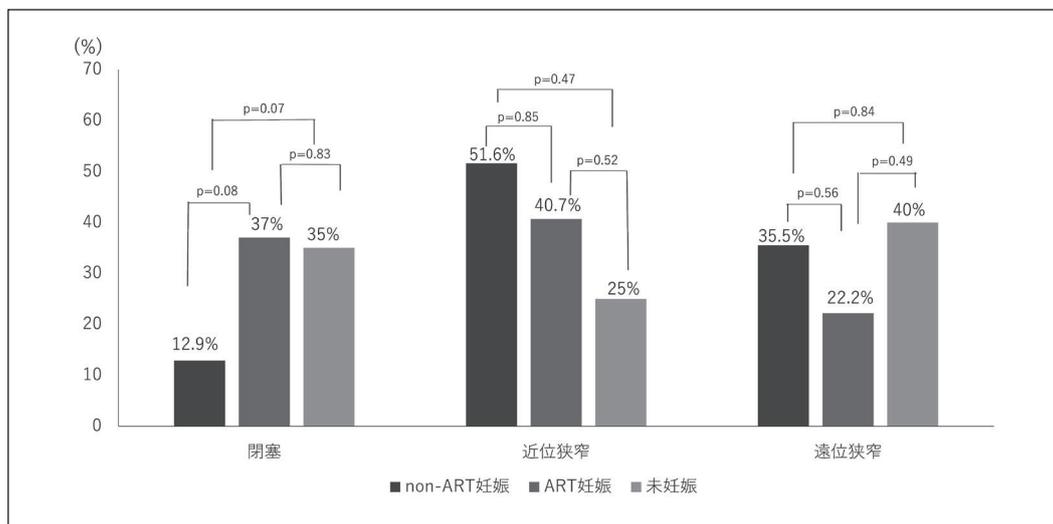


図9 卵管通過障害の部位と程度

開腹歴は、non-ART妊娠が9.7%、ART妊娠が11.1%、未妊娠が30%と増加傾向にあり、non-ART妊娠群と未妊娠群間で有意差を認めた(図8)。

卵管通過障害の部位と程度について比較した。多くの場合、障害部位は1ヶ所ではなく多発しており、狭窄部位が近位と遠位部にある場合は遠位狭窄とした。卵管閉塞症例では、non-ART妊娠率は12.9%と低い傾向にあった。また、近位狭窄例ではnon-ART妊娠率が50%以上あり、FTの有効性が示されたものの、遠位狭窄例では3群間に差がなかった(図9)。

考察

FT施行後、同一周期でも妊娠しており、FTは施行後直ちに効果があることがうかがえた。また、non-ART妊娠は、6ヶ月後の33.7%までは増加傾向にあったが、9ヶ月後は34.8%と、妊娠率に大きな変化はなかった。末岡らは、FT治療後の妊娠成績に関して、FT成功例のうち約30%が妊娠に至り、妊娠が成立するまでの期間は平均7.3ヶ月で、妊娠症例のうちの87%が1年経過するまでに妊娠を成立させていたと報告している²⁾。当院でもFT後6ヶ月以降のnon-ART妊娠は約30%でプラトーとなっており、妥当な結果と考える。

今回の検討では、年齢、不妊期間、クラミジア感染既往

の有無でnon-ART妊娠, ART妊娠, 未妊娠の3群間に大きな差はなかった. しかし, 塩谷らは, FT後であっても39歳以上で妊娠率は低下するため, 年齢にも留意が必要であると報告している³⁾. また, FT後6ヶ月で累積妊娠率は80%以上となるため, 術後早期にARTを選択すべき症例にはタイミングを逸さないよう助言が必要との提言もある³⁾. 今回の我々の検討では, 年齢因子で差を認めなかったが, 年齢を考慮してFT後の治療戦略を考える必要があるだろう.

また, 血中AMH値での比較検討では, 有意差はなかったもののnon-ART妊娠, ART妊娠, 未妊娠の順に低下傾向にあった. AMHは, 生殖補助医療における妊娠率との関連性は弱い, 不妊治療を受けている女性, 特にAMHが非常に低い患者へのカウンセリングには臨床的に有要である⁴⁾, という報告もあり, FT後に患者と治療方針について相談する際に, 留意したい項目である.

子宮内膜症の有病率は, non-ART妊娠群で低い傾向にあり, 子宮内膜症は以前から報告があるように, 卵管通過障害の原因にとどまらず, 体内受精に影響があると示唆された⁵⁾.

開腹歴のある症例では, non-ART妊娠群と比較して未妊娠群が多かった.

卵管近位狭窄の症例は, non-ART妊娠群が多い傾向にあり, Tanakaらの報告にもあるように, FTのよい適応であるといえる⁶⁾. また, 卵管閉塞を有する症例は, non-ART妊娠で低い傾向にあり, たとえFTで閉塞卵管が開通しても, 卵管の機能的障害があり妊娠に至らない可能性がある, または術後早い段階で再狭窄・再閉塞している可能性があると考えられた.

以上から, 卵管通過障害のある不妊患者において, 血中低AMH値, 子宮内膜症, 開腹歴, 卵管閉塞を有する症例は, FT後であっても妊娠予後不良となる可能性があり, 早期にARTにstep upをすすめる指標となると考える.

また, FTは卵管通過障害のある不妊患者にとって, 一般不妊治療での妊娠成立に効果的な治療方法であるが, 年齢やその他の妊娠関連因子を考慮し, 術後の治療方針やstep upを決定していくことが重要と考える.

利益相反状態の開示

今回の論文に関して開示すべき利益相反はありません.

参考文献

- 1) Sueoka K, Asada H, Tsuchiya S, Kobayashi N, Kuroshima M, Yoshimura Y: Falloposcopic tuboplasty for bilateral tubal occlusion. A novel infertility treatment as an alternative for in-vitro fertilization? Hum Reprod. 13 (1) : 71-4. 1998.
- 2) 末岡浩・田中守: 卵管通過障害に対する卵管形成術. 産と婦, 84: 215-220, 2017.
- 3) 塩谷雅英・苔口昭次: 卵管障害に対する卵管鏡. 臨産婦, 60: 172-177, 2016.
- 4) Reshef Tal et al: Antimullerian hormone as predictor of implantation and clinical pregnancy after assisted conception: a systematic review and metaanalysis. Fertil Steril, 103 (1) : 119-130, 2015.
- 5) Tom Tanbo, Peter Fedorcsak: Endometriosis-associated Infertility: Aspects of Pathophysiological Mechanisms and Treatment Options Acta Obstet Gynecol Scand. 96 (6) : 659-667. 2017.
- 6) Tanaka Y, Tajima H, Sakuraba S, Shimokawa R, Kamei K: Renaissance of surgical recanalization for proximal fallopian tubal occlusion: falloposcopic tuboplasty as a promising therapeutic option in tubal infertility. J Minim Invasive Gynecol, 18 (5) : 651-9. 2011.

東京の不妊症症例における 新型コロナウイルス抗体 (SARS-CoV-2 IgG) 測定の結果

The measurement of SARS-CoV-2 IgG among the infertile patients in Tokyo

中川 浩次, 堀川 隆, 月花 瑤子, 三井 悠, 石山 俊輔, 板倉 彰子, 中尾 佳月, 森山 梓,
片岡 尚代, 壽圓 裕康, 黒田 恵司, 小代 裕子, 高見澤 聡, 杉山 力一

Nakagawa K, Horikawa T, Gekka Y, Mitsui Y, Ishiyama S, Itakura A, Nakao K, Moriyama A, Kataoka H, Juen H, Kuroda K,
Ojira Y, Takamizawa S, Sugiyama R

杉山産婦人科新宿 〒160-0023 東京都新宿区西新宿1-19-6 山手新宿ビル
Sugiyama Clinic Shinjuku

要旨: 2020年5月～6月の第1回目の緊急事態宣言解除直後の当院へ通院中の性成熟期の不妊女性1,500名を対象に新型コロナウイルス抗体陽性率を検討した。方法としては、書面による本人の同意を得た後ホルモン採血の際の余剰血清を用い、新型コロナウイルス抗体はSARS-CoV-2 IgG抗体測定キット(ELISA; DARUI BIOTECH社製)を用いて測定した。対象者の平均年齢は38.4歳であった。1,500名のうち17名(1.1%)においてSARS-CoV-2 IgGが陽性を示した。これら17名のうち海外渡航歴を有していたのは3名(17.6%), 発熱の既往を認めたのは2名(11.8%)であり, 残りの12名(70.5%)は本人に全く心当たりのないままに不顕性感染をしていたと推測された。不顕性感染者が他者への感染を起こすことは十分に予測されるため, 我々, 生殖医療に携わる医療従事者であっても, 一人一人が感染しないような対策を十分に講じる必要があると考えられる。

キーワード: 新型コロナウイルス抗体IgG, 発熱, 不妊女性, 不顕性感染, 海外渡航歴

ランニングヘッド: 不妊症患者の新型コロナウイルス抗体陽性率

英文要旨: The COVID-19 has been pandemic since February, 2020, and in April, 2020, declaration of the state of emergency applied to the whole nation in Japan. Moreover, the JSRM suddenly issued the recommendation stating that the start of new treatment cycle for infertility treatment had better be postponed. Therefore, the clinicians dealing with infertility treatment in Japan were confused what and how they have to do, because there was little accurate information about COVID-19 available. While meantime, we measured and evaluated the SARS-CoV-2 IgG among the infertile patients living in Tokyo. Between May and June in 2020, the total of 1,500 infertile women who wished to have a baby were recruited in this evaluation. After written informed consent was obtained from all subjects, the extra blood sample was kept in the freezer (-18 °C) until its use. The SARS-CoV-2 IgG ELISA kit was used for measuring the antibodies and the sample showing higher titer than the control was judged as positive. The 17 women showed positive and the prevalence was 1.1% (17/1,500). Among them, only 2 women (11.7%) had a history of fever-up, and 3 had overseas travel records (17.6%), and 12 women (70.5%) might be latently infected. Since these women might be contagious, the clinicians have to pay attention not to catch the COVID-19.

キーワード: SARS-CoV-2 IgG, Fever up, Latent infection, Oversea travel

緒言

2020年1月に新型コロナウイルスの新規感染者が本邦で初めて確認され, 2021年2月で1年以上が経過

したが, 現在でも新規感染者数や新型コロナウイルス関連の死者数も増加の一途をたどり, 我々の生活様式も大きく変化した。2020年1月の段階では新型コロナウイルスの生態や特徴が何も分かっていなかったため

日本中が大騒ぎとなり、さらに新規感染者数の増加に伴い2020年4月に政府から緊急事態宣言が発出された。この緊急事態宣言の発出後、産婦人科領域でも大きな変化を強いられ、2020年4月に日本生殖医学会から、「不妊治療に関して新規治療の開始を見合わせる事、不妊治療に関するその他の非緊急処置をすべて延期することを推奨いたします」という内容のメールが会員全員へ通知され、臨床の現場で様々な葛藤が生じた。2020年春の段階では、新規感染者数は新聞やテレビ等で連日繰り返し報道されていたが、我々生殖医療に従事する者にとっては性成熟期の女性がどの程度感染しているのかは全く不明であった。そのような状況下において我々は、2020年5月～6月の緊急事態宣言下の時期に東京や東京近郊に在住している性成熟期女性の新型コロナウイルス抗体保有率を調査する機会を得たので報告する。

対象と方法

拳児希望のため杉山産婦人科新宿を受診した女性に対して新型コロナウイルスに対する抗体測定を行うことに関して院内の倫理委員会の承認を得た。2020年5月22日～6月24日までの間に、当院を受診し、さらに不妊治療のためのホルモン採血が必要であり、かつ新型コロナウイルス抗体測定に関して書面による同意を得られた1,500名の女性を対象とした。抗体測定のための検体は、ホルモン検査のために採取した血液の残血清を用いた。まず、ヘパリンナトリウム添加のベノジェット真空採血管で血液を5ml程度採取し、転倒・混和した後、速やかに3,300rpmで5運管遠心分離を行う。血漿成分を凍結用スピッツに移し-18℃にて抗体測定まで凍結保存した。新型コロナウイルス抗体はSARS-CoV-2 IgG抗体測定キット (ELISA; DARUI BIOTECH

社製)を用いて測定した。

判定は新型コロナウイルス陰性血清の抗体価との比較をすることで判断し、試薬メーカーの推奨する基準より上昇している血清を「陽性」と判断した。陽性の判断は、また、測定を行った時期より遡って直近3か月以内の外国への渡航歴、本人及び家族の発熱(37.5℃以上)の有無に関してもアンケート法にて調査した。

結果

対象症例1,500名の平均年齢は38.4歳であった。この1,500名のうち、新型コロナウイルスIgG抗体が陽性を示したのは17名(1.1%)であった(表1)。抗体陽性17名のうち、海外渡航歴を有していたのは3名(17.6%)であり、発熱の既往を認めたのは2名(11.8%)であった。これらの5名(直近3か月以内の外国への渡航歴、もしくは37.5℃以上の発熱を認めた)に重複している症例はなかったため、17名中12名(70.5%)は、本人に全く心当たりのないままに不顕性感染をしていたと推測される(図1)。一方、この12名、本人ではなく家族に発熱を認めた症例は3名に認めた。

考察

新型コロナウイルス感染を診断するには、主に2通りの方法があり、鼻腔内や口腔内の検体をPCRで検査方法と血清中の新型コロナウイルスに対する抗体を測定する方法とである。PCR検査は、症状の有無に関わらず、ウイルスが検査部位(鼻腔内や口腔内等)に一定数以上存在していることで感染と診断する検査である。新型コロナウイルスそのものを直接検出していることで、「今現在」感染していることが分かる。しかし、感染能を有するウイルスが体内に存在している(例えば腸管内

表1 検査対象の背景

	当院	東京 A ^{#1}	東京 B ^{#2}
測定時期	2020年5月, 6月	2020年6月	2020年12月
対象症例数(人)	1,500	1,971	3,399
年齢(歳, 平均)	38.4	-	-
性別	女性	男女	男女
コロナ抗体陽性者数(人)	17	2	31
抗体陽性率(%)	1.1	0.1	0.91

#1 厚生労働省: 抗体保有調査結果 HPより抜粋

#2 厚生労働省: 抗体保有調査(第2回)速報結果 HPより抜粋

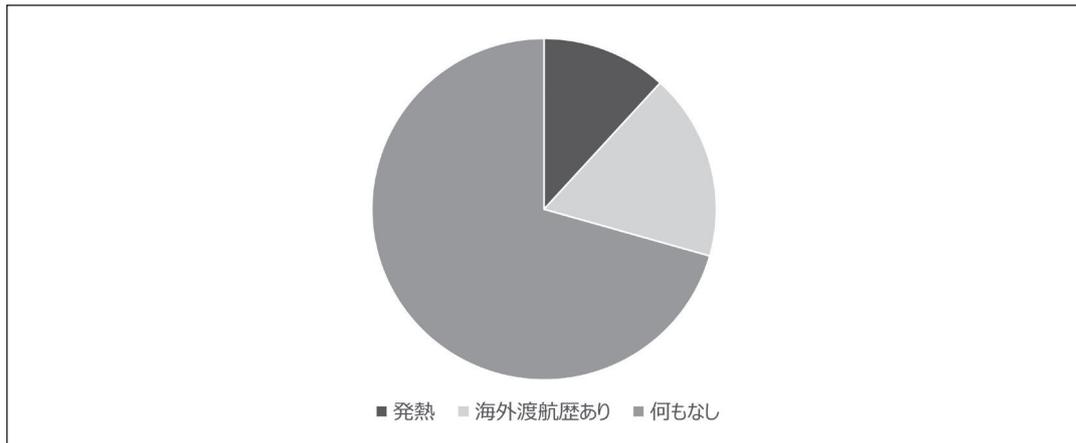


図1 新型コロナウイルス抗体陽性者の内訳 (n=17)

抗体陽性 17 名のうち、発熱の既往を認められたのは 2 名 (11.8%)、海外渡航歴を有していたのは 3 名 (17.6%) であった。これらの 5 名 (直近 3 か月以内の外国への渡航歴、もしくは 37.5°C 以上の発熱を認めた) に重複している症例はなかったため、17 名中 12 名 (70.5%) は、本人に全く心当たりのないままに不顕性感染をしていたと推測される。

等)が、鼻腔内や口腔内にウイルスを認めないか、或いは少量の場合は、PCR検査では検出できない。一方、抗体検査は、症状の有無に関わらず、ウイルスに感染したことを証明する検査となるが、現在、ウイルスに感染中かあるいは、感染し治癒した後なのか、さらには、治癒してからの期間等を明確に明らかにすることは不可能である。感染既往を検出するには適している検査である。今回抗体測定に使用した検査キットは、中国製の Durai Biotech社製の ELISAキットを用いた。本キットを用いて測定したところ、健康成人/結核患者(80名)を用いた偽陽性率は 2.5% (2/80) であり、一方、新型コロナウイルス陽性患者(79名)の陽性率は 82.3% (65/79) と報告されている¹⁾。

東京都の新型コロナウイルス感染症対策サイトによると、2020年4月1日～6月30日の3か月間の東京都におけるコロナウイルスの新規陽性者数は3,584名であったが²⁾、これらの新規陽性者の年齢分布については詳細には報告されていない。日本生殖医学会からは、一方的に不妊治療に関して新規治療の開始を見合わせる、という通達が届いたが、発熱等の症状を有した患者が受診したり高血圧、糖尿病などの生活習慣病の管理を主に行っている内科系のクリニックとは違い、受診者全員が性成熟期の健康女性であるという点から非常に特徴的な年齢層の女性のみが受診する不妊クリニックにおける新規感染者数や感染既往者の現状が調査されていない状況でのこの通達は、ただただ我々不妊クリニックの不安を煽るものでしかなかった。今回の我々の検討では、性成熟期女性の抗体陽性率は 1.1%

(17/1,500)であったことから、検討を行った時期では、少なくとも100名に1人程度の割合でコロナウイルスに感染していたことが明らかとなった。また、これらの陽性者のうち、70.5%では、本人の発熱の既往もなく、また、直近3か月の海外渡航歴がない、いわば本人としては、全く心当たりのない女性であった。これらの結果から、1,500名中、本人に新型コロナウイルスに感染した、と心あたりがあったのは5名、0.3%であり、非常に少数であることが明らかとなった。

現在では新型コロナウイルス感染症の典型的な症状は「発熱」「倦怠感」「空咳」であるが、2020年5月当時では、新型コロナウイルスに感染した際の典型的な症状は、「発熱」であったため、我々もこの症状に焦点を絞って解析をした。しかし、我々の検討では、感染者17名のうち「発熱」という形で症状を呈したのは2名(11.8%)であった。つまり、88.2%の症例では「発熱」という形での症状を呈さず、不顕性感染が成立していたと考えられた。2021年現在でも、不顕性感染は他者への感染のリスクを負っているため、隔離が必要とは考えられるが、現実的には不顕性だとなかなか見つけ出すことが困難である。

抗体保有者の割合に関して、厚生労働省は2020年6月に東京都の一般住民1,971名を対象として調査を行っており³⁾、その時の陽性率は0.1% (2/1,971)であった。一方、2021年2月の調査では東京都の抗体陽性率は0.91% (31/3,399)と若干の上昇を認めているが、集団免疫獲得には程遠い状態であると考えられる⁴⁾。我々の検討では、2020年6月の段階でのコロナ抗体の

抗体陽性率は1.1%と、東京都の同時期の0.1%と比して統計学的に有意に ($P < 0.001$) 高い抗体陽性率を示した。東京都の検討では、対象者の性別や年齢層は公表されていないが、幅広い年齢層の男女を対象としていると推察され、その点が我々との相違点(我々の対象は性成熟期女性)であると考えられる。新型コロナウイルスの抗体が陽性であったということは、新型コロナウイルスの感染既往を示していると考えられることができるため、これらの対象年齢や性別が異なることで、不顕性感染のリスクが異なるのか興味のあるところである。

この度、2020年5月～6月の第1回目の緊急事態宣言解除直後の東京における性成熟期女性での新型コロナウイルス抗体陽性率を検討した。同時期の東京都の一般住民男女における抗体陽性率より高い値を示したことは、大変興味深い結果となった。これらの抗体陽性者の約7割は発熱なし、海外渡航歴なし、不顕性感染を示したことになる。不顕性感染者が他者への感染を起こすことは十分に予測されるため、我々、生殖医療に携わる医療従事者であっても、一人一人が感染しないような対策を十分に講じる必要があると考えられる。

参考文献

- 1) Lin D, Liu L, Zhang M, Hu Y, Yang Q, Guo J, Dai Y, Xu Y, Cai Y, Chen X, Huang K, Zhang Z: Evaluations of the serological test in the diagnosis of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections during the COVID-19 outbreak. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03978-6>, 2020.
- 2) 東京都の新型コロナウイルス感染症対策サイト。報告日別による陽性患者数の推移。
<https://stopcovid19.metro.tokyo.lg.jp/>, (2021.02.01)
- 3) 厚生労働省 HP. 抗体検査について。抗体保有調査結果
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000121431_00132.html, (2021.02.06)
- 4) 厚生労働省 HP: 抗体検査について。抗体保有調査(第2回)速報結果。
https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000121431_00132.html, (2021.02.06)

HIV-1 感染男性精液からのウイルス除去における sil-select™ と Percoll™ の臨床的有用性

Clinical efficacy of semen processing for HIV-1 positive male semen using sil-select™ and Percoll™

嶋田 秀仁¹, 久慈 直昭²

Hideto Shimada¹, Naoaki Kuji²

¹銀座こうのとりレディースクリニック 〒104-0061 東京都中央区銀座1丁目3-9 マルイト銀座ビル7F

²東京医科大学 医学部 産科婦人科学教室 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1

¹Ginza-Kounotori ladies clinic

²Department of OB/GYN, Tokyo Medical University

要旨: HIV-1感染男性精液からのウイルス除去における, silane-coated colloid silicagel (sil-select™) を用いた精液処理(連続密度勾配遠心法+swim up)による精子回収率と, 回収精子の妊孕性を検討した。洗浄精子を用いた不妊治療のために当院を受診したHIV-1感染男性と陰性女性夫婦で二種類の密度勾配溶剤で洗浄を希望した31例の検討では, swim up後の回収精子濃度はPercoll™とsil-select™それぞれ 4.41 ± 6.04 , 5.56 ± 11.44 ($\times 10^6/\text{ml}$)で, 有意差は認められなかった。sil-select™を用いて精液処理を行ったのち, この精子を用いて行った103症例の顕微授精の成績は移植当たり妊娠率26% (68/262), 着床率21% (75/361)で, 精液洗浄例のうちこれまで48例の生産分娩を得ており, 妻への水平感染も, 児の先天異常の発生も認められていない。sil-select™を用いた精液処理は従来のPercoll™と比較してHIV-1治療奏功例においては精子回収率に差がなく, 回収精子による不妊治療の結果も良好であると考えられた。

キーワード: HIV-1, Silane, Percoll, 顕微授精, 密度勾配

ランニングヘッド: sil-select™を用いたHIV-1感染男性からのウイルス除去

英文要旨: To evaluate clinical efficacy of semen processing for HIV-1 positive male semen using silane-coated colloid silicagel (sil-select™), sperm recovery was compared with the processing using Percoll™. Sperm concentration after processing (continuous density gradient and swim up) using sil-select™ and Percoll™ for 31 semen specimens were 4.41 ± 6.04 , 5.56 ± 11.44 ($\times 10^6/\text{ml}$), respectively. Utilizing recovered sperm, 26% (68/262) pregnancy rate per embryo transfer and 21% (75/361) implantation rate were achieved by ICSI. Out of 103 couples, forty-eight live birth were achieved. No congenital anomaly and no infection to female partner were recognized so far. In conclusion, sil-select™ has the similar clinical efficacy as Percoll™ on semen processing for HIV-1 positive male.

キーワード: density gradient, HIV-1, ICSI, Percoll, silane

緒言(目的, 背景)

Human Immunodeficiency virus-1 (以下HIV-1) は現在でも世界の多くの罹患者を持つ感染症であり, 我が国でもいまだに新規感染者が発生している¹⁾。

HIV-1は精液を介して水平感染することが確認されているため, 1990年代より密度勾配溶剤を用いた洗浄操作により精液中のウイルスを除去, 洗浄後の精子浮

遊液にウイルスが存在しないことを確認した後にこれを用いて人工授精・体外受精などの不妊治療を行う試みがなされてきた²⁾。

Percoll™ (ポリビニルピロリドン添加コロイドシリカゲル) は1977年に発売開始された密度勾配溶剤で, 物理学的特性や分離への応用について詳しく研究されており³⁾, 現在でも細胞や細胞内小器官, ウイルスなど様々な粒子の分離・濃縮に用いられている。ただこの

溶剤は研究目的に開発された薬剤であるため組織反応性⁴⁾、エンドトキシンの混入⁵⁾などの潜在的な危険性が提起され、実施に臨床上有害事例の報告はないものの、現在日常臨床での使用が困難となっている。そのため精子洗浄の目的で現在わが国でも用いられているのは IsolateTM、SepaspermTMなどのsilane-coated colloid silicagelである。ポリビニルピロリドンと異なってsilaneは製造工程における滅菌や洗浄が容易であり、これを用いた密度勾配溶剤ではエンドトキシンの混入が少ない。

HIV-1感染男性の精液からHIV-1ウイルスを分離する場合、我々はsilane-coated colloid silicagelがPercollTMに比較して洗浄効率が低くなる可能性を見出したため⁶⁾、PercollTMの潜在的な有害作用を含めて患者の同意を取ったうえでこの密度勾配溶剤を用いてHIV-1感染男性の精液を洗浄、洗浄後精子をもちいて顕微授精を行って多数の妊娠出産例を得てきた⁷⁾。しかしHIV-1感染症に有効な薬剤が次々に開発され、この治療を求めて来院する患者の殆どで血中ウイルス量が測定感度以下となってきたため、洗浄にかかわる密度勾配についても、ウイルスの除去効率より、できるだけ人体に害の少ない溶剤が望ましいと考えられる。

そこで我々は2014年から従来のPercollTMと並行して、endotoxin含有量の少ないsilane-coated colloid silicagelであるsil-selectTMを用いて精液洗浄を行ってきた。今回、2種の密度勾配溶剤の洗浄効率の比較、およびsil-selectTM処理でえられた精子を用いた生殖補助医療(ICSI)の臨床成績を検討したので報告する。

対象と方法

1. PercollTMとsil-selectTMの洗浄効率の比較

2014年4月から2016年2月までに、当院で患者の同意のもとPercollTMとsil-selectTMの二つの溶剤を用いて精液洗浄を行った31症例について解析した。この間、従来型のPercollTMを用いるか、あるいは新しい培養液であるsil-selectTMを用いるか、または二つの方法を同時に行うかは患者の選択とした。なおsil-selectTMのみで洗浄する症例は、原則血中ウイルスが直近6か月で測定感度以下の症例のみとした。

精液は3-5日間の禁欲期間ののち、用手法にて清潔な容器に採取した。

精液洗浄の方法は以下の通りである⁷⁾。試験管(Round tube, #2059, Falcon)中に2mlの80% PercollTM(北里コーポレーション)、あるいは2mlの90% sil-selectTM(FertiPro NV, Belgium; メディー・コン インター

ナショナル)にそれぞれHanks液を重層、傾斜回転式密度勾配作成機にて垂直から76度傾斜させ回転、それぞれ2本の連続密度勾配を作成した⁸⁾。液化精液をHanks液にて2倍希釈したのち、計4本に1-2mlの希釈液化精液を重層、1600g、10分間遠心分離した。上清を廃棄、沈渣を0.5mlに懸濁し、1mlの培養液に二重のチューブを用いて沈渣を下層に静かに静置、45分間swim upし、上層0.5mlを採取して精子濃度を測定するとともに、HIV-1遺伝子の有無をnested-RTPCR法にて検索した⁹⁾。

2. sil-selectTMによる精液処理後の顕微授精の臨床成績

2014年4月から2018年12月までにsil-selectを用いて洗浄を行った103症例について、洗浄精子を用いた顕微授精の精液を検討した。顕微授精の卵巣刺激は、hMG/recombinant FSH 150-225IU連日投与で、Clomiphene citrate併用、GnRH antagonist併用法あるいはGnRH agonist併用long法を、患者の特性に応じて選択した。hCG5000単位(ゴナトロピン5000, ASKA)によるtrigger後、34-35時間で経膈採卵、3-4時間の前培養後ICSIを行った。培養液はsequential medium (SydneyIVF Fertilization, Cleavage, Blastocyst medium, Cook Medical; 東機質)を用い、採卵後72-144時間で全胚凍結した。全胚凍結した理由は、胚培養液のHIV-1の有無を再度PCRで確認したためであり、凍結はCryotop(北里コーポレーション)にてガラス化凍結を行った。凍結胚移植は全例、ホルモン補充周期での胚移植を行っており、月経3日目からエストラジオールパッチ0.72mg(エストラーナ、久光製薬)4枚隔日貼付を2週間続けたのち、内膜厚が7mm異常となっていることを確認、その後エストラーナに加えてプロゲステロン膈坐剤100mg(ルティナス膈錠、フェリングファーマ)1日3錠を開始、開始6日目に胚盤胞を移植した。以後、エストラジオールパッチおよびプロゲステロン膈坐剤を継続し、胚移植後2週間で血中hCG測定(妊娠判定基準; hCG \geq 2mIU/mL)にて妊娠成立を確認した。妊娠成立した場合、ホルモン補充は妊娠12週になるまで継続した。

統計学的検討は、swim up精子濃度についてはPercollTM群、sil-selectTM群でそれぞれ2回行ったswim up濃度を平均した値を、t検定にて比較解析し、P<0.05を有意差ありとした。

なお、本研究は東京大学倫理委員会にて臨床研究として認可を受けている。研究参加者には文書による同意を得て研究参加を募った。

結 果

1. Percoll™とsil-select™による洗浄結果

31例全例でswim up運動精子が得られた。swim up精子濃度はPercoll群 $4.41 \pm 6.04 \times 10^6/\text{ml}$, sil-select™群 $5.56 \pm 11.44 \times 10^6/\text{ml}$ で、有意な差はみられなかった(表1)。

31例中、28例が直近6か月までの血液中ウイルス遺伝子検査で測定感度以下(20-40copies/ml以下)であったが、測定感度以上であった3例も含め、31例全例でPercoll™群、sil-select™群いずれも洗浄後の精子浮遊液にはPCRでHIV-1遺伝子は検出されなかった。

2. sil-select™による洗浄精子を用いた生殖補助医療の結果

swim upおよび除去にPercoll™と差がないことが確認されたため、2016年3月以降はHIV-1治療奏功例には原則全例sil-select™による洗浄を勧めた。ただし、前述したようにウイルス量が高い症例では洗浄効率が

sil-selectで低下する懸念があり⁶⁾、またsil-selectにおけるHIV-1合併重度男性不妊症例での精子回収効率が不明であったことから、血中ウイルス量の高い症例、または重度の男性不妊症例ではPercoll™のみ、あるいはsil-select™とPercoll™二つの方法で洗浄を行った。

2014年4月より2018年12月までにsil-select™により洗浄した精子を用いて行った生殖補助医療の結果を表2に示す。洗浄総数は103症例、妻の平均年齢は34.8歳と比較的若年である。妊娠率は採卵あたり29%、胚移植あたり26%、着床率は21%であった(生化学的妊娠も含む)。生化学的妊娠も含めた妊娠数は68例で、うち48例(71%)が生産分娩に至っている。現在のところ妻への水平感染も、児への先天異常もみられていない。

考 察

今回の検討では、従来用いられていたPercoll™の代用として、silane-coated colloid silicagelが同等に有

表1 Percoll™とsil-select™による精液洗浄

	Percoll™	Sil-select™	p
症例数	31	31	
原精液 濃度($\times 10^6/\text{ml}$, mean \pm SD)	71.0 \pm 60.6		
運動率(% , mean \pm SD)	49.8 \pm 17.0		
swim up 精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$)	4.41 \pm 6.04	5.56 \pm 11.44	n.s

表2 sil-select™ 洗浄精子による生殖補助医療

(2014/4-2018/12)

	n	(%)
洗浄総数	103	
夫年齢(歳, mean \pm SD)	36.9 \pm 5.0	
妻年齢(歳, mean \pm SD)	34.8 \pm 4.9	
精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$, mean \pm SD)	51.6 \pm 38.9	
精子運動率(% , mean \pm SD)	62.3 \pm 76.4	
swim up 精子濃度 ($\times 10^6/\text{ml}$, mean \pm SD)	0.14 \pm 0.26	
血中ウイルス濃度測定感度以下	89/103	(86)
妊娠(採卵あたり)	55/192	(29)
妊娠(胚移植あたり)	68/262	(26)
平均移植胚数(mean \pm SD)	1.38 \pm 0.39	
着床率	75/361	(21)
総妊娠数	68	
生産	48	(71)

用であるかを、sil-select™を用いて検討した。その結果重症男性不妊以外で、かつ治療が奏功してHIV-1血中濃度が測定感度以下の症例に対しては、80% Percoll™に代えて90% sil-select™を用いてもswim upで回収される精子濃度は有意差がなく、またこの精子を用いた生殖補助医療においても水平感染を起こすことなく、良好な治療成績を得ることができた。

近年のHIV-1治療の進歩により、一定期間血中のウイルス量が測定感度以下である患者については、性交を含む接触による水平感染の危険性は無視できるとする意見が強くなっている。すでに2009年に、HIV-1感染男性であっても血中ウイルス濃度が感度以下、血中CD4が一定期間以上持続すれば自然性交による妻への感染リスクは極めて低いとする報告がなされ¹⁰⁾、これらの事実から適切なHIV化学療法施行時に男女間感染がおこる確率はおよそ1万回の性交渉につき1件と推計されている¹¹⁾。

このような事実から、接触による感染の危険性が実際には天文学的に少ないにも関わらず、現在でも診療拒否を含む社会的差別の標的となってしまうHIV-1感染症患者の状況を打破しようと、2016年よりUndetectable = Untransmittable (U=U)；「血中HIV-1遺伝子量が測定感度以下であれば性行為を含む接触による感染は無視しうる」という認識がHIV-1診療を行う医療者の間で共有され始め¹²⁾、我が国でも日本エイズ学会が2018年にこのキャンペーン支持を打ち出している¹³⁾。

我々は2002年からPercoll™による精液洗浄と、洗浄精子浮遊液による顕微授精治療を行ってきたが、このようなHIV-1感染症診療の変化により、精液に含まれるHIV-1ウイルス量も飛躍的に低減していることが予想される。そうすると、洗浄効率が高いために緊急避妊的に使用されていたPercoll™の使用が、risk-benefitの面からその妥当性に疑問が生じる。そこで我々も2014年より、通常の生殖補助医療で用いられている密度勾配溶剤がPercoll™の代替となるかどうかを確認することとした。

silane-coated colloid silicagel密度勾配による精液処理は、Percoll™と同等の精子回収率があることが報告されてきた¹⁴⁻¹⁵⁾。ただ、その時点で密度勾配を使用しないswim upのような方法もあり、また製造物責任法の関係から生産企業そのものがPercoll™の使用を勧めない立場を示したことから、Percoll™とsilane-coated colloid silicagelの分離効率を詳細に比較した文献は少ない。今回の結果は精液所見の比較的良好、治療が奏功している男性の精液についてのものであり、重症男性不妊や、血中ウイルス量が感度以上のHIV-1感

染男性精液の処理においてどちらが有効であるかは現時点では不明である。実際我々の経験では、血中ウイルス量が高い症例で洗浄精子液にPercoll™処理ではHIV-1遺伝子が検出されなかったが、sil-select™処理では検出された例が複数存在し、Percoll™処理が適当である症例の存在が示唆されている。さらに密度勾配処理自体が精子に悪影響を与える可能性も近年指摘されており¹⁶⁻¹⁷⁾、今後密度勾配溶剤自体を使用しない精液処理法を検討する必要もあるだろう。

HIV-1治療が進んで治療が奏功する患者が多くなっても、結婚したカップルの6人に一人と言われる不妊症患者はHIV-1感染男性カップルにも存在する。従って妊娠のために生殖補助医療を必要とするHIV-1感染男性と非感染女性の夫婦はこれからも皆無にはならないであろうし、そのほかにも治療が奏功せず血中ウイルス量が測定感度以下にならない患者や、妻の年齢の関係でできるだけ早い治療を望む患者も一定数存在するであろう。その際、密度勾配溶剤処理がもつ潜在的な害を考慮しながらも、適切な密度勾配溶剤の選択を含む洗浄法の知識はやはり必要であると考えられる。

なおsil-select™は現在、メディーコンインターナショナル(大阪府)より、「精子密度勾配遠心用培地」(Extra Sperm Selection™)として販売されているが、内容はsil-select™ 90%と全く同一である。

参考文献

- 1) 令和元(2019)年エイズ発生動向年報(1月1日～12月31日)。エイズ予防情報ネット。
<https://api-net.jfap.or.jp/status/japan/nenpo.html>, (2021.2.28)
- 2) Semprini AE, Levi-Setti P, Bozzo M, Ravizza M, Taglioretti A, Sulpizio P, Albani E, Oneta M, Pardi G: Insemination of HIV-1-negative women with processed semen of HIV-1-positive partners. *Lancet*, 340 (8831) : 1317-1319, 1992.
- 3) Pertoft H: Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J Biochem Biophys Methods*, 44 (1-2) : 1-30, 2000.
- 4) Arora M, Carver-Ward JA, Jaroudi KA, Sieck UV: Is Percoll safe for in vivo use? *Fertil Steril*, 61 (5) : 979-981, 1994.
- 5) Scott L, Smith S: Mouse in vitro fertilization, embryo development and viability, and human sperm motility in substances used for human sperm preparation for assisted reproduction. *Fertil Steril*, 67 (2) : 372-381, 1997.
- 6) Kuji N, Yoshii T, Hamatani T, Hanabusa H, Yoshimura Y, Kato S: Buoyant density and sedimentation dynamics of HIV-1 in two density-gradient media for semen processing. *Fertil Steril*, 90 (5) : 1983-1987, 2008.

- 7) Inoue O, Kuji N, Ito H, Yamada M, Hamatani T, Oyadomari A, Kato S, Hanabusa H, Isaka K, Tanaka M: Clinical efficacy of a combination of Percoll continuous density gradient and swim-up techniques for semen processing in HIV-1 serodiscordant couples. *Asian J Androl*, 19 (2) : 208-213, 2017.
- 8) 吉田宏之・久慈直昭・吉井毅・田中雄大・橋場剛士・浅田弘法・末岡浩・吉村泰典・野澤志朗・加藤真吾：連続密度勾配洗浄法の標準化と精液よりのHIV-1 ウイルス除去。日産婦誌, 55 : 274 (S -256), 2003.
- 9) Kato S, Hanabusa H, Kaneko S, Takakuwa K, Suzuki M, Kuji N, Jinno M, Tanaka R, Kojima K, Iwashita M, Yoshimura Y, Tanaka K: Complete removal of HIV-1 RNA and proviral DNA from semen by the swim-up method: assisted reproduction technique using spermatozoa free from HIV-1. *AIDS*, 20 (7) : 967-973, 2006.
- 10) Attia S, Egger M, Müller M, Zwahlen M, Low N: Sexual transmission of HIV-1 according to viral load and antiretroviral therapy: systematic review and meta-analysis. *AIDS*, 23 (11) :1397-1404, 2009.
- 11) Supervie V, Viard JP, Costagliola D, Breban R: Heterosexual risk of HIV-1 transmission per sexual act under combined antiretroviral therapy: systematic review and bayesian modeling. *Clin Infect Dis*, 59 (1) : 115-122, 2014.
- 12) Undetectable=Untransmittable. Prevention Access Campaign. <https://www.preventionaccess.org/undetectable>. Published July 2016. Updated February 2021, (2021.2.28)
- 13) 「U=U キャンペーン」 支持について。日本エイズ学会。
<https://jaids.jp/news/%e3%80%8cuu%e3%82%ad%e3%83%a3%e3%83%b3%e3%83%9a%e3%83%bc%e3%83%b3%e3%80%8d%e6%94%af%e6%8c%81%e3%81%ab%e3%81%a4%e3%81%84%e3%81%a6/> (2021.2.28)
- 14) Perez SM, Chan PJ, Patton WC, King A: Silane-coated silica particle colloid processing of human sperm. *J Assist Reprod Genet*, 14 (7) : 388-393, 1997.
- 15) Söderlund B, Lundin K.: The use of silane-coated silica particles for density gradient centrifugation in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*, 15 (4) : 857-860, 2000.
- 16) Zini A, Mak V, Phang D, Jarvi K: Potential adverse effect of semen processing on human sperm deoxyribonucleic acid integrity. *Fertil Steril*, 72 (3) : 496-499, 1999.
- 17) Zini A, Nam RK, Mak V, Phang D, Jarvi K: Influence of initial semen quality on the integrity of human sperm DNA following semen processing. *Fertil Steril*, 74 (4) : 824-827, 2000.

お知らせ

第24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

ご挨拶

COVID-19の第4波が日本全国に押し寄せ、10都道府県の緊急事態宣言も延長が繰り返されている昨今、皆様如何お過ごしでしょうか。

さて、学術集会まであと4ヶ月と迫り、参加登録と一般演題の募集を開始する時期となりました。

塩谷雅英理事長ともご相談させていただき、醍醐渡邊クリニックの渡邊浩彦先生とともに進めております。第24回日本IVF学会学術集会および臨床エンブリオロジスト学会は、現在のところ現地開催する予定で準備を進めております。

大会テーマの“Think of it!”に絡めた、“考えること”のラインアップもほぼ整いました。2021年10月2-3日に滋賀県の琵琶湖ホテルで皆様にお目にかかれることを楽しみにしております。

第24回日本IVF学会学術集会長

村上 節 (滋賀医科大学産科学婦人科学講座教授)



学会概要(案)

【10月2日】

- ・丁寧な不妊診療を考える (副会長講演)
演者：渡邊浩彦先生
- ・着床環境改善策を考える (シンポジウム)
演者：中山貴弘先生 神谷博文先生
後藤 栄先生 宮崎 薫先生
- ・受精法のブレイクスルーを考える
(日本臨床エンブリオロジスト学会)
演者：畠山将太先生 鈴木亮祐先生
前川朋広先生 佐藤琢磨先生
- ・産婦人科診療のマイルストーンを考える
(イブニングセミナー)
演者：早川 智先生

【10月3日】

- ・生殖医療の原点を考える
対談：福田愛作先生 松元まろん様
- ・自然の脅威への対応を考える
演者：吉田仁秋先生
- ・卵巣刺激の個別化診療を考える
- ・精巣と卵巣の機能低下を考える
演者：島田昌之先生
- ・着床障害の原因を考える (ランチョンセミナー)
演者：木村文則先生
- ・ARTの保険診療化を考える
演者：Chang-Woo Choo先生 涌井菜央先生 杉山カ一先生
- ・MRK症候群の妊孕性を考える
演者：木須伊織先生 根津八紘先生

- スケジュール 会期：2021年10月2日(土)～10月3日(日)
会場：琵琶湖ホテル (滋賀県大津市浜町2-40)

- 学術集会長 村上 節 (滋賀医科大学産科学婦人科学講座教授)

- 学術集会副会長 渡邊 浩彦 (醍醐渡邊クリニック院長)

- メインテーマ Think of it!

- その他ご案内 懇親会や会場などのご案内、参加登録の詳細は
学会ウェブサイト (<https://www.jsar.or.jp/>) にてご案内予定です。

日本IVF学会雑誌発行における 投稿論文募集のお知らせ

2012年より、日本 IVF 学会では学会雑誌を新刊・発行する運びとなりました。本雑誌は体外受精-胚移植に関する基礎的研究、臨床的研究に関する論文を掲載し、新たな知見を広く世界に知らせることを目的としています。

対象読者は、体外受精-胚移植に関連するすべての研究者、臨床医、技術者で、体外受精という技術を集学的に理解し、評価し、そして高めることに目標を置き、編集発行されます。

関係者の皆様には、ふるってご投稿をよろしくお願いいたします。
次号の発行は 2021 年 9 月 を予定いたしております。因みに原稿の締め切りは 2021 年 7 月 20 日（火）とさせていただきます。

取り扱いテーマ

妊娠および不妊、IVFおよび生殖補助、生殖内分泌学、生殖生理学、受精、配偶子提供、卵母細胞および卵巣発生学、精母細胞および精巣発生学、着床前遺伝子診断（PGD）、胎児の遺伝性疾患、着床および器官形成、妊娠、胎児、出産、倫理、カウンセリング

詳細はウェブサイト
(<https://www.jsar.or.jp/dissertation/submission/>)
をご覧ください。

JSAR
Japan Society of Assisted Reproduction
一般社団法人
日本IVF学会

1. 本誌の目的と対象読者

本誌は生殖医療に関連する基礎研究、臨床研究に関する論文を対象とし、新たな知見を広く世界に知らせることを目的とする。対象読者は生殖医療に関わる全ての研究者、臨床医、技術者、培養士、検査技師、看護職、心理士等である。

2. 投稿資格

著者は原則として本学会会員に限る。ただし、編集委員会が認めた場合はこの限りでない。

3. 投稿内容と種類

投稿論文は原著、短報、総説、レター、症例、その他とし、他誌に発表、掲載されていない学術論文に限る。

4. 倫理的配慮

研究に際しては「ヘルシンキ宣言」、厚生労働省「臨床研究に関する倫理指針」、および外科関連学会協議会「症例報告を含む医学論文および学会発表における患者プライバシー保護に関する指針」などの倫理指針を遵守し、投稿に際しては倫理委員会の承認を得たことを論文中に記載する。

5. 利益相反

投稿者は本会にて定める「利益相反に関する指針」に従い、利益相反状態を明らかにするため、所定の申込書に記入し、投稿論文とともに提出し、開示すべき利益相反関係があれば論文中に記載する。

6. 投稿論文の採否

論文は編集委員会において審査・査読を行い、採用決定したものを掲載する。審査の結果、原稿の修正を求められることがある。

7. 著作権

本誌掲載論文の著作権は本学会に帰属する。

8. 執筆要項

- 1) 原稿は、原則としてパーソナルコンピュータ上のWordで作成する。
- 2) 原稿は原則として日本語とし、A4版横書き、11ポイント、1ページに約1,200字(40字×30行)とする。
- 3) 投稿原稿の1編は、本文、文献、図表を含めて以下の枚数以内とする。

原著論文 8枚(約9,600字以内)
総説 8枚(約9,600字以内)
研究報告 8枚(約9,600字以内)
短報 4枚(約4,800字以内)
症例報告 4枚(約4,800字以内)
レター 2枚(約2,400字以内)
その他 8枚(約9,600字以内)

<原著論文/研究報告>

原著論文は、表紙、要旨・キーワード、本文、参考文献、図・表・写真およびその説明文から構成される。※(和文・英文)

- 1) 第1ページに表題[※]、著者名[※]、所属[※]、住所、連絡先(氏名、所属、住所、電話番号、FAX番号、Eメールアドレス)を記載する。表題には略語を使用しない(以下の略語は本文中も含め使用可とする:AID, AIH, ART, BT, E2, ET, FSH, hCG, hMG, ICSI, IMSI, IVF, LH, MESA, OHSS, P4, PCO, PCOS, PESA, PRL, TESE, MD-TESE)。
- 2) 第2ページには和文要旨(400字以内)、キーワード(5個以内、50音順)およびランニングヘッド(25字以内)を記載する。
- 3) 第3ページには英文要旨(250ワード以内)、キーワード(5個以内、abc順)を記載する。
- 4) 第4ページ以降の本文は緒言(目的、背景)、対象と方法、結果、考察、(謝辞)、参考文献の順に記載する。
- 5) 参考文献は引用順に記載し、本文中にも同じ文献番号をつける。著者名は全員とし、下記のように記載する。雑誌名については、原則として省略法で記載する(例:日IVF会誌, 日受精着床会誌, 日産婦誌, Hum Reprod, Fertil Steril等)。

①雑誌

著者名:表題. 雑誌名, 巻(号):頁一頁, 発行年(西暦). ※(号数)の記載については有/無いずれも可とする。

〈例1〉三宅麻喜・笠井剛・藤江道子・平田修司・星和彦:アルギネート包埋法またはマイクロピペットを用いた極少数精子の凍結保存法について. 日受精着床会誌, 22: 58-61, 2005.

〈例2〉Nakamoto T, Okada H, Nakajima T, Ikuta A, Yasuda K, Kanzaki H: Progesterone induces the fibulin-1 expression in human endometrial stromal cells. Hum Reprod, 20: 1447-1455, 2005.

②書籍

著者名:表題. 編集者名, 書名, pp頁一頁, 発行所, 発行年(西暦).

〈例1〉森崇英:ARTの倫理と体制. 森崇英・久保春海・岡村均編, 図説ARTマニュアル, pp 9-17, 永井書店, 2002.

〈例2〉Okamura H, Katabuchi H, Nagai R: Ultrastructure of human ovulation: histofunctional parameters. In: Motta, PM., ed. Microscopy of reproduction and development: a dynamic approach, pp 155-161, Antonio Delfino Ediore, 1997.

③ウェブサイト

そのページの題名. ウェブサイト名. 入手先URL, (入手日付)

〈例1〉倫理に関する見解. 公益社団法人日本産科婦人科学会.

<http://www.jsog.or.jp/ethic/index.html>, (2015.10.1)

④ウェブサイトから入手した文献

著者名. 文献名. 版表示, 出版年. 入手先URL, (入手日付)

〈例1〉厚生労働省編. 最近の医療費の動向 (年次版). 平成26年度, 2015.

<http://www.mhlw.go.jp/topics/medias/year/14/index.html>, (2015.10.1)

⑤学会ガイドライン

インターネットから引用した場合は④ (ウェブサイトから入手した文献) を, 雑誌から引用した場合は① (雑誌) を参照のこと.

- 6) 図・表・写真: 図・表はパワーポイント, 写真はjpegデータで作成する. 個々に符号をつけ, 本文中に挿入位置 (図1, 表1, 写真1など) を明示する. 掲載時のサイズは編集委員会に一任とする. 写真は白黒印刷で掲載される.
- 7) 表記が規定の通りではない原稿について, 再提出をお願いする場合がある.

<総説>

最近における内外の研究または理論的技術的知識を総合してまとめたもので, できるだけ解説的な内容とする.

原著論文と形式は同様であるが項目分けについては特に定めず, 著者の自由な構成とする. 本文の後に謝辞, 文献, 表, 図の順に記載する.

<短報/症例報告>

論文のうち臨床症例やより簡潔な形での研究の報告が可能なものについては症例報告ないし短報とする.

- 1) 第1ページには原著論文と同様な内容を記載する.
- 2) 第2ページには要旨 (250字以内), キーワード (3語) およびランニングヘッド (25字以内) を記載する.
- 3) 第3ページ以降, 症例報告では緒言, 症例報告, 考察の項目に分け, 短報はこれらの区分をつけないこととする.
- 4) 参考文献は10編以内とする.

<レター>

レターは原著や症例報告より簡潔な形で報告が可能なもの, また検査・診断・治療などの技術に関する新知見や, 臨床に関する興味深い経験を簡潔に解説したものとする.

- 1) 第1ページには原著論文と同様な内容を記載する.
- 2) 第2ページ以降にはキーワード (3語) およびランニングヘッド (25字以内) ならびに本文を項目分けせずに記載する.
- 3) 参考文献は5編以内とし, 文献の表題を省く.

9. 原稿の送付方法

投稿論文は, 「投稿フォーマット」に準じて記載したものを, 日本IVF学会の論文投稿用指定アドレス宛に, E-mailにて投稿する.

詳細はウェブサイト

(<https://www.jsar.or.jp/dissertation/submission/>) をご覧ください.

10. 別刷申し込み

別刷を希望する場合, 初校の校正時に必要部数を申し出ること. 記入がない場合は別刷不要とみなし, 掲載後の別刷希望には応じられない. 別刷料金は50部10,000円 (税抜) とする.

一般社団法人 日本IVF学会 定款

第1章 総 則

(名 称)

第1条 当法人は、一般社団法人日本IVF学会と称する。学会の英文名称は、Japan Society of Assisted Reproduction (略称 JSAR) とする。

(目 的)

第2条 当法人は、生殖補助医療である体外受精法 (In Vitro Fertilization (以下「IVF」という。)) 及びその関連領域に関する研究の発展、知識の交流を図り、もって医学の進歩に寄与することを目的として、次の事業を行う。

- (1) 学術集会の開催
- (2) 各種の学術的調査、研究
- (3) 内外関連学術団体との連絡及び提携
- (4) 学会雑誌の発行
- (5) その他当法人の目的達成に必要な事業

(主たる事務所の所在地)

第3条 当法人は、主たる事務所を横浜市に置く。

(公告方法)

第4条 当法人の公告は、官報に掲載して行う。

(機 関)

第5条 当法人は、当法人の機関として社員総会及び理事以外に理事会及び監事を置く。

第2章 社員及び会員

(会員の資格及び種別)

第6条 当法人の会員は、当法人の目的に賛同する医師、エンブリオロジスト (胚培養士)、臨床検査技師、看護師、薬剤師、臨床心理士、研究者又は理事会の承認を得た者とし、次の4種に分類する。なお、名誉会員及び功労会員の資格並びにその他の事項については、本定款に定めるもののほか、理事会の定める規則による。

- (1) 正 会 員 当法人の目的に賛同して当法人の活動に参画するために入会した個人
- (2) 名誉会員 当法人の目的に賛同して入会した会員のうち、IVFに関する研究の発展に関する貢献が顕著な者
- (3) 功労会員 当法人の進歩発展に特別の功績があり、当法人の発展に功労があった者
- (4) 賛助会員 当法人の目的に賛同し、当法人の事業を賛助するために入会した団体又は法人

(社 員)

第7条 一般社団法人及び一般財団法人に関する法律 (以下「法人法」という。) 第11条第1項第5号等に規定する社員は、正会員の中から理事会において選定された者とする。

2 社員は、法人法第35条以下に規定する社員総会を組織し、当法人の重要事項を審議、議決する。

(入 会)

第8条 当法人の会員となるには、当法人所定の入会申込方法により入会の申込みをし、会費を納入のうえ、理事長の承認を得なければならない。再入会の場合も同様とする。

(会 費)

第9条 会員は、当法人の目的を達成するため必要とする経費として、別途定める規則に従い会費を支払う義務を負うものとする。ただし、名誉会員は会費を納めることを要しない。

(正会員の権利)

第10条 正会員は次の権利を有する。

- (1) 当法人の主催する学術集會に定められた参加費で参加することができる。
- (2) 当法人の雑誌に投稿することができる。

(退社又は退会)

第11条 社員は、次に掲げる事由によって退社する。

- (1) 正会員の資格を喪失したとき。
- (2) 社員本人の退社の申し出。退社の申し出は1か月前にするものとするが、やむを得ない事由があるときは、会費をすべて支払った後にいつでも退社することができる。なお、既に支払った会費の払い戻しはしないものとする。
- (3) 死亡
- (4) 除名

2 会員は、次に掲げる事由によって退会する。

- (1) 会員本人の退会の申し出。ただし、既に支払った会費の払い戻しはしないものとする。
- (2) 死亡又は解散
- (3) 会費の不払い(期限を定めて催告した場合に限る。)
- (4) 除名

3 社員の除名は、正当な事由があるときに限り、法人法第30条及び第49条第2項第1号の定める社員総会の特別決議によってすることができる。

4 会員の除名は、正当な事由があるときに限り、理事会の決議によってするものとする。

(社員名簿及び会員名簿)

第12条 当法人は、社員及び会員の氏名及び住所を記載した社員名簿及び会員名簿を作成し、当法人の主たる事務所に備え置くものとする。社員名簿をもって法人法第31条に規定する社員名簿とする。

2 当法人の社員及び会員に対する通知又は催告は、社員名簿及び会員名簿に記載した住所又は社員及び会員が当法人に通知した居所にあてて行うものとする。

第3章 社員総会

(招 集)

第13条 当法人の定時社員総会は、毎事業年度末日の翌日から3か月以内に招集し、臨時社員総会は、必要に応じて招集する。

2 社員総会は、法令に別段の定めがある場合を除くほか、理事会の決議に基づき理事長がこれを招集する。理事長に事故若しくは支障があるときは、副理事長がこれを招集する。

3 社員総会を招集するには、会日より1週間前までに、社員に対して招集通知を発するものとする。

4 前項の招集通知は、書面による通知の発出に代えて、社員の承諾を得て、電磁的方法により通知を発することができる。

(招集手続の省略)

第14条 社員総会は、社員全員の同意があるときは、招集手続を経ずに開催することができる。

(議長)

第15条 社員総会の議長は、理事長がこれに当たる。ただし、理事長に事故若しくは支障があるときは、副理事長又はその他の理事が当たる。

(決議の方法)

第16条 社員総会の決議は、法令又は定款に別段の定めがある場合を除き、総社員の議決権の過半数を有する社員が出席し、出席した当該社員の議決権の過半数をもって行う。

2 書面による議決権の行使は、議決権行使書面に必要な事項を記載し、当法人に提出して行う。

3 電磁的方法による議決権の行使は、当法人の承諾を得て、議決権行使書面に記載すべき事項を当法人に提供して行う。

4 前2項の規定によって行使した議決権の数は、出席した社員の議決権の数に算入する。

(社員総会の決議の省略)

第17条 社員総会の決議の目的たる事項について、理事又は社員から提案があった場合において、その提案に社員の全員が書面又は電磁的記録によって同意の意思表示をしたときは、その提案を可決する旨の社員総会の決議があったものとみなす。

(議決権の代理行使)

第18条 社員は、当法人の社員又は議長を代理人として、議決権を行使することができる。ただし、この場合には、社員総会ごとに代理権を証する書面を提出しなければならない。

2 前項の社員又は代理人は、代理権を証明する書面の提出に代えて、当法人の承諾を得て、同書面に記載すべき事項を電磁的方法により提供することができる。

(社員総会議事録)

第19条 社員総会の議事については、法令に定める事項を記載した議事録を作成し、議長及び議事録署名人が署名又は記名押印して10年間当法人の主たる事務所に備え置くものとする。

2 議事録署名人の選定は、議長が出席した社員の内1名を指名し、出席した当該社員の議決権の過半数をもって行う。

第4章 役員

(役員等)

第20条 当法人に次の役員を置く。

- | | |
|----------|-------|
| (1) 理事長 | 1名 |
| (2) 副理事長 | 若干名 |
| (3) 常務理事 | 20名以内 |
| (4) 理事 | 45名以内 |
| (5) 監事 | 2名以内 |

(役員等の職務)

第21条 当法人の役員等の職務は次のとおりとする。

- (1) 理事長は、法令及び本定款で定めるところにより、当法人を代表し、業務の執行を統括する。
- (2) 副理事長は、理事長を補佐し、理事長が事故その他の事由により職務を執行できないときはその職務を代行する。
- (3) 常務理事は、理事会において別に定めるところにより、当法人の業務を分担執行する。

(4) 理事は、理事会を構成し、法令及び本定款で定めるところにより、当法人の業務を執行する。

(理事の資格)

第22条 当法人の理事は、当法人の社員又は会員若しくはその関係者の中から選任する。ただし、必要があるときは、上記以外の者から選任することができる。

(理事及び監事の選任の方法)

第23条 当法人の理事及び監事の選任は、社員総会において総社員の議決権の過半数を有する社員が出席し、出席した当該社員の議決権の過半数をもって行う。

2 副理事長及び常務理事の選任規程は別に定める。

(代表理事)

第24条 当法人に理事長1人を置き、理事会において理事の過半数をもって選定する。

2 理事長は、法人法上の代表理事とする。

3 理事長は、当法人を代表し会務を総理する。

4 他の理事は理事長を補佐し、理事長に事故があるときは、理事長があらかじめ理事会の承認を得て定めた順位に従いその職務を代行し、理事長が欠けたときはその職務を行う。

(理事及び監事の任期)

第25条 理事及び監事の任期は、選任後2年以内に終了する事業年度のうち最終のものに関する定時社員総会の終結の時までとする。

2 任期満了前に退任した理事又は監事の補欠として選任された者の任期は、前任者の任期の残存期間と同一とする。

3 増員により選任された理事の任期は、他の在任理事の任期の残存期間と同一とする。

(報酬等)

第26条 理事及び監事の報酬、賞与その他の職務執行の対価として当法人から受け取る財産上の利益は、社員総会の決議によって定める。

(監事の職務及び権限)

第27条 監事は、理事の職務の執行及び会計を監査し、法令の定めるところにより、監査報告を作成する。

2 監事は理事に対して、いつでも事業の報告を求め、当法人の業務及び財産の状況を調査することができる。

第5章 理事会

(招集)

第28条 当法人の理事会は、年2回招集し、臨時理事会は、必要に応じて招集する。

2 理事会は、理事長がこれを招集し、会日の1週間前までに各理事及び各監事に対して招集の通知を発するものとする。ただし、緊急の場合にはこれを短縮することができる。

3 理事長に事故若しくは支障があるときは、副理事長がこれを招集する。

(招集手続の省略)

第29条 理事会は、理事及び監事の全員の同意があるときは、招集手続を経ずに開催することができる。

(議長)

第30条 理事会の議長は、理事長がこれに当たる。ただし、理事長に事故若しくは支障があるときは、副理事長がこれに代わるものとする。

(理事会の決議)

第31条 理事会の決議は、法令又は定款に別段の定めがある場合を除き、議決に加わることができる理事の過半数が出席し、その過半数をもって行う。

(理事会の決議の省略)

第32条 理事が理事会の決議の目的である事項について提案をした場合において、当該提案につき議決に加わることができる理事の全員が書面又は電磁的記録により同意の意思表示をしたとき（監事が当該提案に異議を述べた場合を除く。）は、当該提案を可決する旨の理事会の決議があったものとみなす。

(職務の執行状況の報告)

第33条 理事長は、自己の職務の執行の状況を理事会に報告するものとする。

(理事会議事録)

第34条 理事会の議事については、法令に定める事項を記載した議事録を作成し、出席した代表理事（代表理事に事故若しくは支障があるときは議長たる副理事長）及び監事がこれに署名又は記名押印し、10年間主たる事務所に備え置くものとする。

第6章 会 計

(事業年度)

第35条 当法人の事業年度は、毎年8月1日から翌年7月31日までとする。

(計算書類等の定時社員総会への提出等)

第36条 理事長は、毎事業年度、法人法第124条第1項の監査を受け、かつ同条第3項の理事会の承認を受けた計算書類（貸借対照表及び損益計算書）及び事業報告書を定時社員総会に提出しなければならない。

2 前項の場合、計算書類については社員総会の承認を受け、事業報告書については理事がその内容を定時社員総会に報告しなければならない。

(計算書類等の備置き)

第37条 当法人は、各事業年度に係る貸借対照表、損益計算書及び事業報告書並びにこれらの附属明細書（監事の監査報告書を含む。）を、定時社員総会の日から2週間前の日から5年間、主たる事務所に備え置くものとする。

(剰余金の不配当)

第38条 当法人は、剰余金の配当はしないものとする。

第7章 解散及び清算

(解散の事由)

第39条 当法人は、社員総会の決議その他法令で定められた事由により解散するものとする。

(残余財産の帰属)

第40条 当法人が清算をする場合において有する残余財産は、社員総会の決議を経て、公益社団法人及び公益財団法人の認定等に関する法律第5条第17号に掲げる法人又は国若しくは地方公共団体に贈与するものとする。

第8章 附 則

(設立時社員の氏名及び住所)

第41条 当法人の設立時社員の氏名及び住所は、次のとおりである。

神戸市	塩 谷 雅 英
神戸市	森 本 義 晴
岐阜県大垣市	古 井 憲 司

(設立時役員)

第42条 当法人の設立時理事、設立時監事及び設立時代表理事は、次のとおりとする。

設立時理事	塩 谷 雅 英
設立時理事	古 井 憲 司
設立時理事	石 川 元 春
設立時理事	沖 津 撰
設立時理事	藏 本 武 志
設立時理事	高見澤 聡
設立時理事	詠 田 由 美
設立時理事	福 田 愛 作
設立時理事	細 井 美 彦
設立時理事	向 田 哲 規
設立時理事	山 下 正 紀
設立時理事	吉 田 淳
設立時理事	吉 田 仁 秋
設立時代表理事	塩 谷 雅 英
設立時監事	森 本 義 晴
設立時監事	久 保 春 海

(最初の事業年度)

第43条 当法人の最初の事業年度は、当法人成立の日から平成29年7月31日までとする。

(定款に定めのない事項)

第44条 この定款に定めのない事項については、すべて法人法その他の法令の定めるところによる。

以上、一般社団法人日本IVF学会設立に際し、設立時社員 塩谷 雅英 他2名の定款作成代理人である 司法書士 田近 淳 は、電磁的記録である本定款を作成し、電子署名をする。

平成28年10月21日

設立時社員 塩 谷 雅 英

設立時社員 森 本 義 晴

設立時社員 古 井 憲 司

上記設立時社員の定款作成代理人

横浜市

司法書士 田 近 淳

(登録番号 第981号)

改訂：平成30年10月28日

一般社団法人 日本IVF学会 役員

Japan Society of Assisted Reproduction

- 理事長 塩谷 雅英 (英ウイメンズクリニック 理事長)
- 副理事長 古井 憲司 (クリニックママ 理事長)
- 常務理事 石川 元春 (いしかわクリニック 理事長)
沖津 摂 (楠原ウイメンズクリニック 培養室 培養部長)
蔵本 武志 (蔵本ウイメンズクリニック 理事長)
柴原 浩章 (兵庫医科大学 産科婦人科学 主任教授)
杉山 カー (杉山産婦人科 理事長)
高見澤 聡 (杉山産婦人科 新宿 副院長)
詠田 由美 (アイブイエフ詠田クリニック 理事長・院長)
福田 愛作 (IVF大阪クリニック 院長)
細井 美彦 (近畿大学 学長)
向田 哲規 (広島HARTクリニック 理事長・院長)
山下 正紀 (山下レディースクリニック 院長)
吉田 淳 (木場公園クリニック 理事長・院長)
吉田 仁秋 (仙台ARTクリニック 理事長)
渡邊 浩彦 (醍醐渡辺クリニック 院長)
- 理事 浅田 義正 (浅田レディースクリニック 理事長)
東口 篤司 (札幌エンドメトリウムリサーチ 代表)
安藤 寿夫 (豊橋市民病院 総合生殖医療センター センター長)
岩崎 利郎 (英ウイメンズクリニック 研究開発部長・東京農工大学名誉教授)
岩瀬 明 (群馬大学大学院 医学系研究科 産科・婦人科学 教授)
大谷 徹郎 (神戸ARTレディスクリニック 院長)
岡田 英孝 (関西医科大学 産婦人科 教授)
岡本 純英 (ART岡本ウーマンズクリニック 理事長・院長)
河村 寿宏 (田園都市レディースクリニック 理事長・院長)
北脇 城 (京都府立医科大学 産婦人科学教室 教授)
古賀 文敏 (古賀文敏ウイメンズクリニック 理事長・院長)
菅沼 信彦 (名古屋学芸大学 看護学部 看護学科 教授)
鈴木 直 (聖マリアンナ医科大学 産婦人科学 教授)
竹下 直樹 (東邦大学医療センター佐倉病院 臨床遺伝診療センター 教授)
戸枝 通保 (ARTレディスクリニックやまうち 顧問)
徳永 義光 (空の森クリニック 理事長)
中岡 義晴 (IVFなんばクリニック 院長)
中山 貴弘 (足立病院 生殖内分泌医療センター長)
榎原 久司 (大分大学医学部 産科婦人科学 教授)
藤原 敏博 (フェニックスアートクリニック 院長)
藤原 浩 (金沢大学 産婦人科学 教授)
松田 和洋 (松田ウイメンズクリニック 理事長・院長)
三谷 匡 (近畿大学 生物理工学部 遺伝子工学科 学科長・教授)
村上 節 (滋賀医科大学 産科学婦人科学講座 教授)
- 監事 久保 春海 (東邦大学 名誉教授/日本不妊予防協会 理事長)
森本 義晴 (HORACグランフロント大阪クリニック 院長/IVF JAPAN CEO)

(50音順)

- 事務局 〒226-0003 神奈川県横浜市緑区鴨居6-19-20 株式会社ヒューマンリプロ・K 内
TEL: 045-620-7560 FAX: 045-620-7563 E-mail: info@ivf-et.net
WEB SITE: <https://www.jsar.or.jp/>

(2020年11月1日改訂)

編集委員会

- 編集委員長 高見澤 聡 (杉山産婦人科 新宿)
- 副編集委員長 沖津 摂 (楠原ウイメンズクリニック)
竹下 直樹 (東邦大学医療センター佐倉病院)
竹内 巧 (リプロダクションクリニック東京)
- 編集委員 岩崎 利郎 (英ウイメンズクリニック)
緒方 洋美 (オガタファミリークリニック)
菅沼 信彦 (名古屋学芸大学)
平岡 謙一郎 (亀田総合病院)
福永 憲隆 (浅田レディースクリニック)
古井 辰郎 (岐阜大学大学院)
細井 美彦 (近畿大学)
水野 里志 (IVF大阪クリニック)
藪内 晶子 (加藤レディースクリニック)

(50音順)

- 編集委員会事務局 〒226-0003 神奈川県横浜市緑区鴨居6-19-20 株式会社ヒューマンリプロ・K 内

(2020年11月1日現在)

-
- 発行責任者 理事長 塩谷 雅英

発行日：2021年6月21日 制作：株式会社デュナミス
発行者：一般社団法人 日本IVF学会 印刷所：株式会社東光社



日本IVF学会雑誌

Vol.24 No.1

www.jsar.or.jp
