

the repetitive spikes in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$), only producing several transient rises in $[Ca^{2+}]_i$ in mouse oocytes (Yazawa *et al.*, 2000). We presumed that the total absence of SOAF resulted in no activation and no Ca^{2+} responses in injected mouse oocytes, while insufficient SOAF activity could induce oocyte activation, but did not promote the oscillatory increases in $[Ca^{2+}]_i$, only several transient rises of $[Ca^{2+}]_i$ as seen with the ROS of hamsters and rabbits. Recently, Ogonuki *et al.* (2001) demonstrated that ROS from monkeys could induce oocyte activation and Ca^{2+} oscillations in a pattern similar to that of normal fertilization. It is possible that ROS from monkeys possess similar levels of SOAF activity as mature spermatozoa. Thus, the timing at which SOAF becomes biologically active during spermatogenesis and spermiogenesis differs among species.

To examine the basic mechanisms of spermatogenesis, we sought to determine if human ROS from non-obstructive azoospermic men have sufficient SOAF activity by examining oocyte activation and Ca^{2+} responses following injection into mouse oocytes. As a clinical investigation, we discussed the indications for ROS injection and the usefulness of this procedure in the treatment of non-obstructive azoospermia.

Material and methods

Preparation of mouse oocytes

B6D2F1 female mice (6–8 weeks old) were superovulated with an i.p. injection of 8 IU of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG; Teikokuzouki Co.), followed by 8 IU human chorionic gonadotrophin (hCG; Mochida Pharmaceutical Co.) after 48 h. Oocyte-cumulus complexes, obtained from oviducts approximately 16 h after hCG injection, were treated with HEPES-buffered human tubal fluid medium (mHTF; Irvine Scientific) containing 0.1% hyaluronidase (from bovine testis; 825 IU/mg; Sigma) to dissociate the cumulus cells. Cumulus-free oocytes were rinsed thoroughly and incubated in human tubal fluid medium (HTF; Irvine Scientific) with 10% synthetic serum substitute (SSS; Irvine Scientific) at 37°C under 5% CO_2 , 5% O_2 and 90% N_2 for up to 2 h before spermatid injection.

Patients

We examined ROS from 11 patients with non-obstructive azoospermia. These patients underwent intracytoplasmic sperm injection (ICSI) treatment using testicular sperm extracts (TESE) at Fukushima Medical University (FMU) Hospital. In all 11 male patients, preliminary pathological diagnosis of

testicular biopsies indicated hypospermatogenesis. Normal karyotypes and no defects of DAZ and SRY were detected by blood sampling. No female-related infertility factors were identified in these 11 couples. During the treatment cycle, all 11 patients produced spermatozoa upon testicular extraction, allowing successful TESE-ICSI. Prior to beginning experimentation, informed consent was obtained from all patients. The agreement of the ethical committee at FMU was also obtained.

Controlled ovarian hyperstimulation and oocytes retrieval

Controlled ovarian hyperstimulation was performed using the combination of a gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) analogue (buserelin acetate, Suprecur; Hoechst Japan Co.), follicle-stimulating hormone (FSH, Fertinom P; Serono Japan Co.), human menopausal gonadotrophin (HMG, Pergonal; Teikokuzouki Co.) and human chorionic gonadotrophin (HCG; Mochida Pharmaceutical Co.). GnRHa was administered at 600 µg/day from day 21 of the previous cycle; FSH was injected on days 3 and 4 (300 IU) and 5 and 6 (150 IU) of the treated cycle, with 150 IU HMG given daily beginning on day 7 until the maturation of follicles. When the two largest follicles reached mean diameters of 18 mm, 5000–10 000 IU HCG were administered. Oocyte retrieval was carried out under transvaginal ultrasound 35 h after HCG administration.

Procedure of testicular sperm extraction

Testicular sperm extraction (TESE) was performed on the same day as oocyte retrieval. After confirmation of the recovery of greater than two oocytes, TESE was performed using the open excisional method, which is similar to a diagnostic testicular biopsy. Briefly, a small incision was made in the skin of the scrotum under local anesthesia. In addition, after cutting the tunica albuginea, a small piece of testicular tissue, including seminiferous tubule, was excised. The sample isolated in the TESE procedure was washed thoroughly, placed in 0.5 ml mHTF and cut into small pieces with a pair of scissors. Repeated gentle pipetting was used to release the spermatogenic cells from the tubular fragments and disperse the cells into the medium. If spermatozoa could not be identified by microscopic examination, an additional excision was performed from a different site of testis. A 3 µl droplet of the spermatozoa-containing suspension was placed in a plastic Petri dish (chamber for microinjection), covered with mineral oil and incubated at 37°C for 2–3 h before injection.

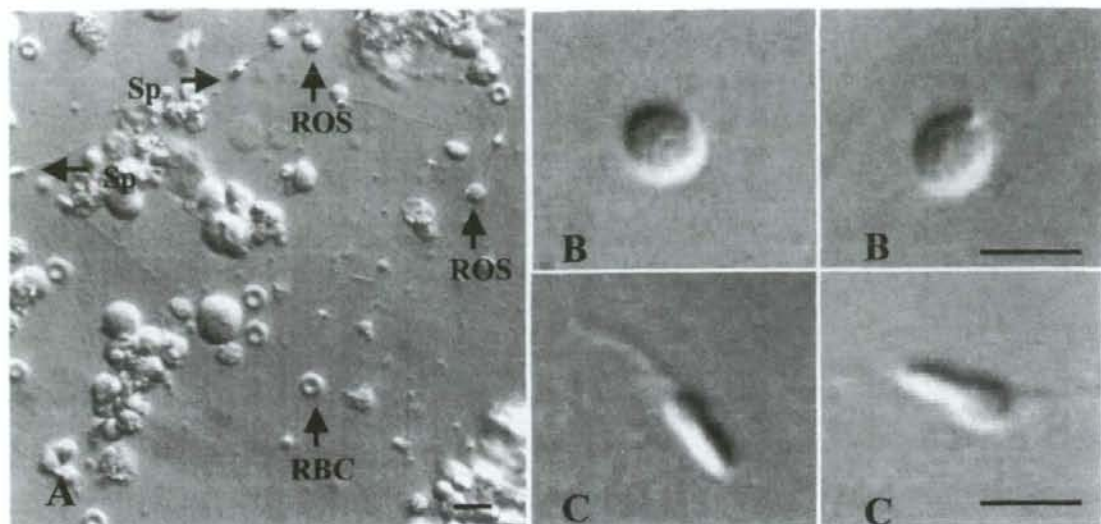


Figure 1 Wet preparation of a human testicular extraction isolated from a non-obstructive azoospermic patient (A). Isolated round spermatids (B) and isolated elongated spermatids (C) were suspended in medium. In (A), ROS, Sp and RBC (arrow) indicate round spermatids, testicular spermatozoa and red blood cells, respectively. Scale bar 10 μ m.

Preparation of human round spermatids

This suspension containing spermatogenic cells was mixed thoroughly with an equal volume of 0.9% NaCl containing 10% polyvinylpyrrolidone (PVP-360; Sigma). A 3 μ l droplet of this mixed suspension was kept for less than 2 h before the injection of the round spermatids into mouse oocytes. The chamber was mounted onto the stage of an inverted microscope equipped with a microinjection system (Fig. 1A).

Microinjection of testicular spermatozoa as a clinical treatment

After identification of motile spermatozoa, intracytoplasmic testicular sperm injection was performed using a micromanipulator with piezo-electric elements (model PMM-MB-A; Prime Tech Ltd) in a manner similar to that used for clinical treatments (Kimura & Yangimachi, 1995a; Yanagimachi, 1998). A single spermatozoon was sucked into an injection pipette (about 5 μ m inner diameter at the tip); application of a piezo pulse damaged the plasma membrane and immobilized the spermatozoa. A mature unfertilized oocyte (metaphase II) was secured by a holding pipette with the first polar body at the 12 or 6 o'clock positions. The zona pellucida was penetrated at the 3 o'clock position by applying several piezo pulses. After the tip of the needle was advanced into the ooplasm, the oolemma was punctured with one piezo pulse; the spermatozoon was then slowly expelled into the ooplasm before gently withdrawing the pipette.

All the procedures of intracytoplasmic sperm injection were performed in 3 μ l of mHTF on the stage of microscope warmed to 37°C. After injection, oocytes were washed three times in HTF and incubated under 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂ at 37°C.

Culture and transfer of embryos

After ICSI, oocytes were cultured for approximately 18 h. Normal fertilization was confirmed by possession of a second polar body and two pronuclei. Normally fertilized oocytes were cultured for another 48 h before assessing their quality according to the classification system by Veeck (1991). Up to two of the best embryos were then transferred into the uterus of a female partner. In some cases, fertilized oocytes were cultured for approximately 72 h after confirmation of fertilization, and then transferred into the uterus at the blastocyst stage. Luteal support (Progehormon® 50 mg/day, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd) was administered for 14 days, beginning on the day of oocyte retrieval. Pregnancy was confirmed by detection of increased urine HCG concentrations 14 days after embryo transfer.

Microinjection of human round spermatids into mouse oocytes (mouse oocyte activation assay; mouse test)

Round spermatid injection was performed using a micromanipulator with piezo-electric elements in a

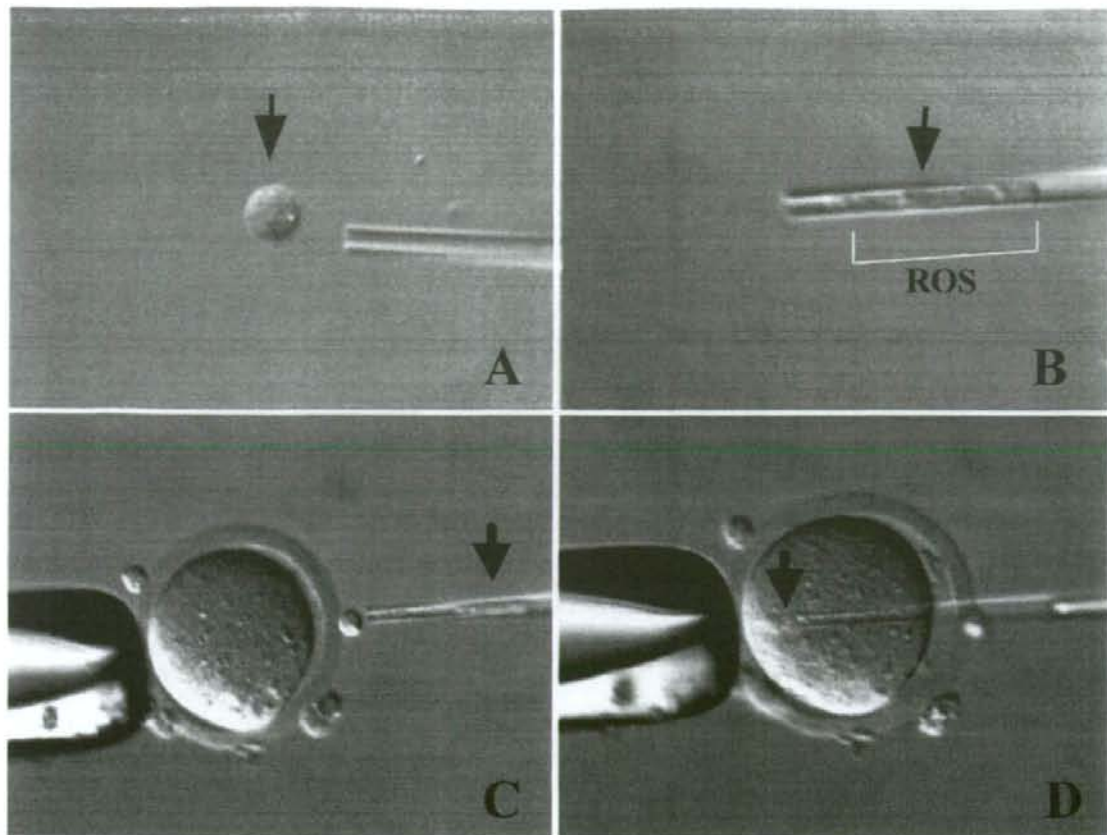


Figure 2 Human round spermatid injection into mouse oocytes using a piezo micromanipulator (mouse test). An isolated human round spermatid (ROS) was transferred into an injection pipette (A, B). The entire round spermatid was then injected into the ooplasm of unfertilized mouse oocyte (C, D).

similar manner as that used for testicular sperm injection. Human round spermatids (Sa1) can easily be distinguished from other spermatogenic and somatic cells by their size (about 7–8 μm in diameter, slightly larger than a red blood cell) and the presence of a round nucleus with a centrally located nucleolus (Fig. 1A, B) (Ogura & Yanagimachi, 1993; Aslam *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 1999). We performed round spermatid microinjection as previously described (Yazawa *et al.*, 2000). Briefly, a round spermatid was transferred into an injection pipette (about 6 μm inner diameter at the tip); its plasma membrane was damaged by the application of a piezo pulse (Fig. 2A, B). A mature unfertilized oocyte isolated from a B6D2F1 mouse was secured by a holding pipette with the metaphase II spindle at the 12 or 6 o'clock position. The entire round spermatid was injected into the ooplasm (Fig. 2C, D). All intracytoplasmic injection procedures were performed in 3 μl of mHTF on the stage of a microscope cooled to 17–18°C (Kimura & Yanagimachi, 1995;

Yazawa *et al.*, 2001). After injection, oocytes were held at room temperature for 10 min, washed three times in HTF and incubated under 5% CO_2 , 5% O_2 and 90% N_2 at 37°C. During these injection procedures, we were careful to avoid any additional procedures capable of inducing oocyte activation, such as vigorous cytoplasmic aspiration.

As a control, mature spermatozoa originating from fertile men, elongated spermatids (ELS, Fig. 1C) isolated from testicular biopsies of azoospermic patients and human tubal fluid medium lacking spermatid/spermatozoa were injected into oocytes.

Examination of oocyte activation

After a 5 h incubation, spermatid-injected oocytes were placed between a slide and a coverslip, fixed and stained with acetocarmine to examine the chromatin configuration of the spermatid and oocyte chromosomes. Oocytes with a second polar body and

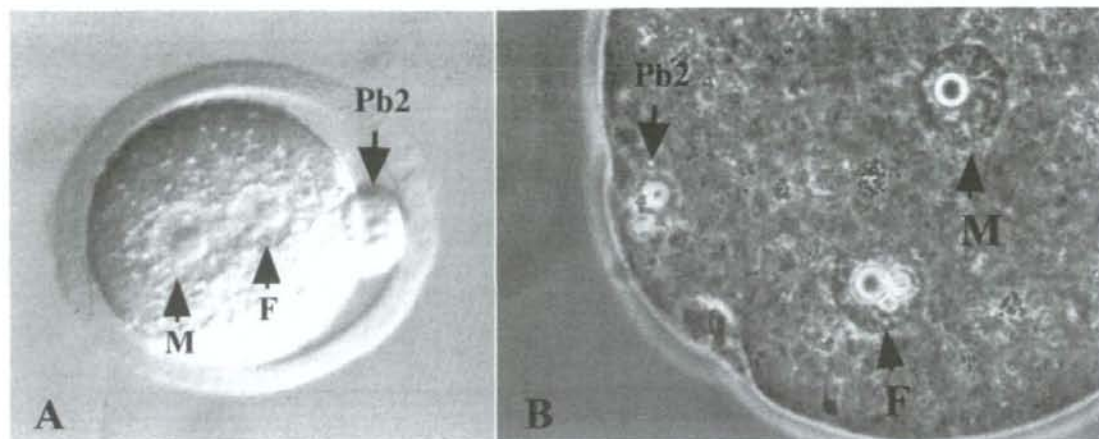


Figure 3 A normally fertilized mouse oocyte shown at 4 hours after injection with a human round spermatid. The oocyte was normally activated, forming a second polar body and two pronuclei – male pronucleus (M) and female pronucleus (F). Fresh zygote (A) and fixed, stained zygote (B).

two pronuclei (male and female) were considered to be activated (Fig. 3A, B).

Measurement of $[Ca^{2+}]_i$ of spermatid-injected oocytes

We examined the Ca^{2+} responses of spermatid-injected oocytes using Ca^{2+} -imaging on a confocal laser scanning microscope (Bio-Rad MRC-600, Nippon Bio-Rad Ltd). Prior to injection, oocytes were loaded for 30 min with the Ca^{2+} -sensitive fluorescent dye fluo-3 acetoxymethyl ester (Fluo-3/AM, Molecular Probes Inc.) in dimethylsulfoxide (final concentration $44 \mu\text{M}$ in HTF) with 0.02% Pluronic F-127 at 37°C . Loaded oocytes were washed thoroughly and placed in a $3 \mu\text{l}$ droplet of mHTF on a chambered coverglass (Lab-Tek, Nunc Inc.) covered with mineral oil. Intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) responses of injected oocytes were measured after the chamber was mounted on the stage of a phase-contrast inverted microscope equipped with an image processor. For the majority of oocytes, measurements of Ca^{2+} responses were initiated 15–20 min after injection and continued at 20 s intervals for approximately 60 min.

Results

In this study, we examined the clinical outcome of TESE-ICSI for 11 patients with nonobstructive azoospermia. We also investigated the ability of ROS isolated from testicular biopsies of these patients to promote oocyte activation and Ca^{2+} oscillations.

The mean age of the male patients was 36.5 (range 27–40), while that of the female partners was 32.6 (range

25–37). All 11 male patients had normal karyotypes (46,XY); no defects in the *DAZ* and *SRY* genes were detected. All 11 female partners were free of any obvious causes of infertility.

Results of clinical TESE-ICSI

Table 1 summarizes the clinical results of TESE-ICSI cycles for these 11 couples. For one case (case h), although two oocytes were retrieved, one of them was a metaphase I oocyte; therefore, only one oocyte could be injected with testicular spermatozoa. As the injected oocyte was not fertilized, embryo transfer could not be performed. Except for this case, greater than two oocytes were fertilized for each couple. The mean fertilization rate was 70.1% (47 of 67 injected oocytes were fertilized). Most of the fertilized oocytes cleaved; the mean rate of cleavage for all cases was 97.9% (46 of 47 fertilized oocytes cleaved). In six cases (b–d, g, j, k), embryo transfer was performed on day 3 of fertilization at the 8-cell stage of cleavage. In four cases (a, e, f, i), embryo transfer was performed on day 5 of fertilization at the blastocyst stage. In all cases, two embryos could be transferred into the uterus. Out of 10 transferred cycles, pregnancies were confirmed in two cases 14 days after transfer; a single gestational sac with fetal heart movement was detected later in both cases. The pregnancy rate was 20% and the implantation rate was 10% for all 10 cases.

Results of human ROS injection into mouse oocytes (mouse oocyte activation assay)

We examined ability of ROS from 11 non-obstructive azoospermic patients to induce Ca^{2+} oscillations

Table 1 Results of clinical TESE/ICSI

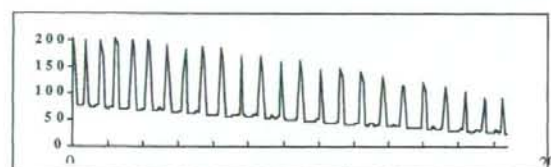
Case	No. of oocytes injected	No. of oocytes survived	No. of oocytes fertilized (%) ^a	No. of oocytes cleaved (%) ^b	No. of oocytes transferred	Pregnancy
a	9	6	6 (100)	6 (100)	3 (bl)	—
b	3	3	2 (67)	2 (100)	2	—
c	6	6	6 (100)	6 (100)	2	—
d	6	5	2 (40)	2 (100)	2	—
e	13	12	9 (75)	8 (89)	2 (bl) ^c	—
f	11	10	5 (50)	5 (100)	2 (bl) ^c	+
g	4	4	4 (100)	4 (100)	2	—
h	2	1	0 (0)	0 (0)	0 ^d	+
i	10	10	5 (50)	5 (100)	2 (bl) ^c	—
j	5	4	2 (50)	2 (100)	2	—
k	6	6	6 (100)	6 (100)	2	—

^aOocytes as percentage of survived oocytes.

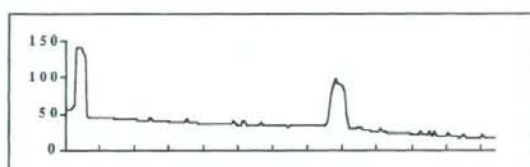
^bOocytes as percentage of fertilized oocytes.

^cBlastocyst transfer was performed on day 5 of fertilization.

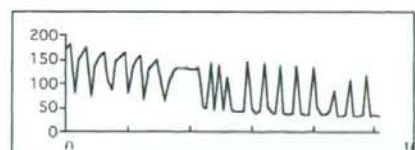
^dEmbryo transfer could not be performed because no cleavage embryos were obtained.



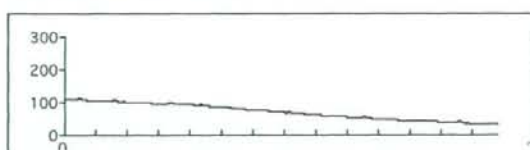
Type A: Normal oscillation pattern



Type C: Transient pattern



Type B: Atypical oscillation pattern



Type D: No-response pattern

Figure 4 Patterns of intracellular Ca^{2+} concentration changes in oocytes injected with human ROS. Type A: the normal oscillation pattern consisted of regular repetitive spike-shaped peaks in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ at intervals of 2–10 min. Type B: the atypical oscillation pattern exhibited irregular peaks of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in an oscillatory pattern. Type C: the transient pattern was composed of several (1–4) transient peaks in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Type D: the no-response pattern lacked any $[\text{Ca}^{2+}]_i$ peaks.

in mouse oocytes (mouse test). We previously described the classification of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ patterns of spermatid/sperm-injected oocytes into four groups (Yazawa *et al.*, 2000). In this study, the classification was modified slightly. A normal oscillation pattern (Type A) consisted of repetitive spike-shape Ca^{2+} rises at intervals of 2–10 min. An atypical oscillation pattern (Type B) consisted of irregular rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ with an oscillatory pattern. The transient pattern (Type C) exhibited only several (1–4) transient rises in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The no-response pattern (Type D) lacked any $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rises during the observation period (Fig. 4).

Eighty-two mouse oocytes were injected with human ROS from the 11 patients to examine $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations (Table 2). The ROS of all 11 patients exhibited some Ca^{2+}

oscillation-inducing ability, ranging from 25–100%. Of the ROS-injected oocytes examined in this study, we observed a normal oscillation pattern, transient pattern and no-response pattern in 48.8% (40/82), 13.4% (11/82) and 37.8% (31/82) of the oocytes examined, respectively; none of the oocytes exhibited an atypical oscillation pattern (Type B). We also examined the oocyte-activating activity of human ROS using a subset of the samples isolated by testicular extraction. A total of 119 oocytes were injected with human ROS from cases e–k; 100 survived the injection and 56 oocytes were activated (with a second polar body and more than two pronuclei) and 45 oocytes (45%) were normally activated (with a second polar body and two pronuclei). The rates of normal activation for these

Table 2 Results of intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) patterns and activation of human ROS injected oocytes

Case	No. of oocytes	Normal oscillation examined for [Ca ²⁺] _i (Type A) (%)	Atypical oscillation pattern (Type B) (%)	Transient pattern (Type C) (%)	No response pattern (Type D) (%)	No. of oocytes injected for activation	No. of oocytes survived	No. of oocytes arrested at MII	No. of oocytes activated	No. of 2PN eggs ^a (%)
a	4	1 (25)	0	0 (0)	3	—	—	—	—	—
b	6	2 (33)	0	0 (0)	4	—	—	—	—	—
c	7	4 (57)	0	2 (29)	1	—	—	—	—	—
d	5	5 (100)	0	0 (0)	0	—	—	—	—	—
e	8	4 (50)	0	2 (25)	2	12	11	5	6	6 (55)
f	8	5 (63)	0	2 (25)	1	12	10	4	6	5 (50)
g	9	4 (44)	0	1 (11)	4	21	14	3	11	9 (64)
h	7	3 (43)	0	1 (14)	3	7	7	4	3	3 (43)
i	9	3 (33)	0	1 (11)	5	20	18	7	10	8 (44)
j	9	6 (66)	0	0 (0)	3	25	21	18	7	6 (29)
k	10	3 (39)	0	2 (20)	5	22	19	6	13	8 (42)
Total	82	40 (49)	0	11 (14)	31 (38)	119	100	47	56	45 (45)

^aEggs as percentage of survived oocytes.

Table 3 Results of intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) patterns and activation of human sperm, ELS injected oocytes and sham operation (control)

Material injected	No. of oocytes	Normal oscillation pattern (Type A) (%)	Atypical oscillation pattern (Type B) (%)	Transient pattern (Type C) (%)	No response pattern (Type D) (%)	No. of oocytes injected for activation	No. of oocytes survived	No. of oocytes arrested at MII (%) ^a	No. of oocytes activated (%) ^a	No. of 2PN eggs (%) ^a
Sperm ^b	40	36 (90)	0 (0)	0 (0)	4 (10)	39	30 (77)	1 (3.3)	29 (97)	29 (97)
ELS ^c	17	11 (65)	3 (18)	0 (0)	3 (18)	22	18 (82)	4 (22)	14 (78)	12 (67)
Medium ^d (sham)	14	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (100)	49	46 (94)	46 (100)	0 (0)	0 (0)

^aEggs as percentage of survived oocytes.

^bEach oocyte was injected with mature spermatozoa originating from fertile men.

^cEach oocyte was injected with elongated spermatid originating from testicular biopsies of some cases.

^dEach oocyte was injected with a bolus (5 µl) of HTF medium without spermatozoa/spermatids.

seven cases ranged from 29 to 64%. Approximately half of human ROS-injected mouse oocytes exhibited a normal [Ca²⁺]_i oscillation pattern and were normally activated. We evaluated from these data that human ROS had already acquired the oocyte-activating and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities.

Results of human sperm and ELS injection and sham operation

When mature human spermatozoa isolated from fertile men and ELS from testicular biopsies of non-obstructive azoospermic patients were injected into mouse oocytes (Table 3), the rates of normal activation were 97% and 67%, respectively; oscillations were observed in 90 and 82% of examined oocytes, respectively. When human tubal fluid medium lacking sperm/spermatozoa were injected into mouse

oocytes (sham operation), neither activation nor Ca²⁺ oscillation was observed.

Discussion

We previously reported that the oocyte-activating and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities of ROS differed among species (mouse, hamster, rat and rabbit were examined). ELS from those experimental animals had the ability to induce oocyte activation and Ca²⁺ oscillations in a mouse oocyte activation assay (Yazawa *et al.*, 2000). Sousa *et al.* (1996) demonstrated that injection of human ROS into human oocytes with a Ca²⁺-ionophore activated the oocyte and induced Ca²⁺ oscillations. Ogonuki *et al.* (2001) recently demonstrated that greater than 90% of mouse oocytes were activated and intracellular Ca²⁺ oscillations were

induced in 64% of mouse oocytes following injection of cynomolgus monkey ROS. These results suggest that ROS of primates are more mature than those of rodents; the oocyte-activating Ca^{2+} oscillation-inducing factor (OA-COIF; maybe the same as SOAF or sperm factor) of primates appears in the earlier stages of spermiogenesis than seen in other animals.

In this study, we examined the oocyte activation and Ca^{2+} oscillation-inducing abilities of human ROS originating from azoospermic patients during their TESE/ICSI treatment cycles to determine if human ROS exhibit OA-COIF activity. We confirmed that human ROS already had the activity of OA-COIF (SOAF or sperm factor), despite the levels being less when compared with ELS or mature spermatozoa.

The possibility of using ROS injection as a clinical treatment for patients with non-obstructive azoospermia with maturation arrest during spermiogenesis was first described by Edwards *et al.* (1994). Prior to the clinical application of spermatid injection, normal fertilization and the delivery of offspring using ROS were reported in mice (Ogura & Yanagimachi, 1993; Ogura *et al.*, 1993, 1994; Kimura & Yanagimachi, 1995b) and rabbits (Sofikitis *et al.*, 1994). The first fertilization with human spermatids was reported by Vanderzwalmen *et al.* (1995), following injection of one late-stage spermatid obtained from testicular biopsy into a human oocyte. The late-stage spermatid used was oval shaped, which suggested that it was an elongating or elongated spermatid. The first pregnancy using an elongated spermatid (Sd1) was reported by Fishel *et al.* (1995). The first births of healthy babies following round spermatid injection were reported by Tesarik *et al.* (1995, 1996). These procedures utilized ROS from ejaculates for microinjection. This procedure was the first birth to be successful after the transfer of embryos obtained by injection of ROS from azoospermic patients. Since this first report, successful births using ROS or ELS from testicular biopsies have been achieved by several centres (Mansour *et al.*, 1996; Vanderzwalmen *et al.*, 1997; Barak *et al.*, 1998; Barros *et al.*, 1998; Bernabeu *et al.*, 1998; Kahraman *et al.*, 1998). The efficacies of spermatid injections for fertilization and implantation have been discussed in detail, with special concern placed on the developmental stage of the injected spermatids and the histopathology of testicular biopsy.

Although maturation arrest may occur at any stage of spermatogenesis, according to Aslam *et al.* (1998), spermatocyte arrest is most common. Arrest at the spermatid level is slightly less frequent, while spermatogonial arrest is least common. It is unclear if maturational arrest at the ROS stage exists. In their examination of the histology of testes from 125 patients with maturation arrest, Silber & Johnson (1998) found that maturation arrest always occurred in meiosis. No round spermatids were found, with the exception

of those cases in which elongated spermatids and spermatozoa were also identified. Whenever round spermatids were observed in an area of maturation arrest, elongated spermatids or mature spermatozoa were also observed (Shilber *et al.*, 1996). Thus, failure of ROS to develop into mature spermatozoa (spermiogenic failure) was never observed in patients with maturation arrest.

A number of authors, however, have reported that round spermatids were identified within testicular biopsy specimens, at places at which neither elongated spermatids nor mature spermatozoa could be found. Round spermatid injection (ROSI) was attempted as a clinical treatment for patients with such a situation; the results of these attempts were compared with those of elongated spermatid injection (ELSI) or mature spermatozoa injection (ICSI) (Vanderzwalmen *et al.*, 1997, 1998; Sousa, *et al.*, 1999; Lavran, *et al.*, 2000). According to Lavran *et al.*, out of 18 non-obstructive azoospermic patients who underwent TESE, mature spermatozoa were recovered from six (33%), round spermatids alone were identified in eight (44%) specimens and neither spermatids nor mature spermatozoa could be identified in the remaining four patients (22%). The fertilization and cleavage rates of ROSI (44.9 and 59.2%, respectively) were significantly lower than those seen following TESE/ICSI (69 and 91.8%, respectively). While the implantation and clinical pregnancy rates were 16.6 and 50%, respectively, in TESE/ICSI cycles, no transferred embryos were implanted in ROSI cycles. Similar results were obtained by Vanderzwalmen *et al.* (1997, 1998). In 42 (30.7%) of 137 non-obstructive azoospermic patients who underwent TESE, only spermatids could be identified; no mature spermatozoa could be identified in the biopsied specimens (complete spermiogenesis failure) (Vanderzwalmen *et al.*, 1997). Ninety-five (69%) of the 137 patients exhibited mature spermatozoa (partial spermiogenesis failure). The rates of fertilization and good quality embryo generation were lower in spermatid-injection cycles than those of TESE/ICSI cycles. Comparison of the resulting rates of fertilization, cleavage and pregnancy among elongated, elongating and round spermatids revealed that ROSI cycles were significantly less effective than elongated/elongating spermatid-injected cycles. The fertilization rate of spermatids isolated from patients with complete spermiogenesis failure was lower than that using spermatids isolated from patients with partial spermiogenesis failure (27 versus 8%) (Vanderzwalmen *et al.*, 1998). Fertilization and pregnancy rates of ROSI were significantly affected by the proportion of tubules demonstrating spermatozoa in previous testicular biopsies. When no spermatozoa could be identified in all tubules of previous testicular biopsies, the fertilization rate of ROSI decreased to 11% and no pregnancies could be established. If

spermatozoa could be identified in previous testicular biopsies, the fertilization rates ranged from 32 to 37% according to the percentage of tubules exhibiting spermatozoa.

What are the indications for ROS injection in clinical treatment?

ROS originating from severely defective testes, as seen in patients with complete spermiogenesis failure, might lack the ability to develop to term in part due to cytogenetic causes (Benkhalifa *et al.*, 2004). Clinical application of ROS injection might be appropriate for azoospermic patients who have exhibited spermatozoa in previous testicular biopsies, but lack spermatozoa in the specimens biopsied during treatment cycles; these are patients who do not exhibit complete spermiogenesis failure in previous diagnostic testicular biopsies. According to Vanderzwalmen *et al.* (1998), no spermatozoa could be identified in 25% of TESE/ICSI treatment cycles, despite the presence of spermatozoa in previous biopsies.

To date, many studies have been conducted to identify the oocyte-activating and Ca²⁺ oscillation-inducing factor (SOAF or sperm factor) and several proteins were put forward as candidates, such as a 33 kDa glucosamine-6-phosphate deaminase (Parrington *et al.*, 1996) and a truncated *c-kit* transmembrane receptor (Sette *et al.*, 1997). However, these were disputed later. In addition, more recently, the sperm-specific zeta isoform of phospholipase C, named PLC ζ , has been identified and demonstrated as a powerful candidate for a sperm factor (Cox *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2002). Microinjection of PLC ζ cRNA triggered Ca²⁺ oscillations similar to those observed at fertilization, mouse oocytes injected with PLC ζ content of a single sperm developed normally into blastocysts and mouse eggs microinjected with anti-PLC ζ antibody-treated sperm extract exhibited no Ca²⁺ responses. These findings and several supporting studies indicated that PLC ζ was a reliable candidate for being a sperm factor and this proposition seems to have been now validated (Fujimoto *et al.*, 2004; Roger *et al.*, 2004; Yoda *et al.*, 2004; Coward *et al.*, 2005; Sone *et al.*, 2005).

This study demonstrated that ROS from all of the patients examined exhibited some Ca²⁺ oscillation-inducing activity, but the rates at which ROS-injected oocytes displayed a normal oscillation pattern varied from 25 to 100% among patients. From our clinical and experimental data, we could not discern an obvious relationship between the rate of Ca²⁺ oscillation induction in the mouse assay and the clinical results. In cases in which pregnancies were achieved by TESE-ICSI treatment (cases f and i), the rates of Ca²⁺ oscillation induction by the mouse test were not always high (63 and 33%, respectively) in comparison with the other cases. We also reported

that Ca²⁺ oscillation-inducing ability was acquired at later stages of spermiogenesis than for oocyte-activating ability. Ca²⁺ oscillation is important in embryonic development until the blastocyst stage, but is not essential for embryonic development into normal offspring (Yazawa *et al.*, 2001). It is likely that, if the ROS of non-obstructive azoospermic patient could be restored for Ca²⁺ oscillation-inducing ability, these ROS have sufficient SOAF to allow the injected oocyte to develop normally into offspring.

In these experiments, biopsied specimens from all patients possessed testicular spermatozoa within their testicular tissue; we did not examine the activity of ROS from patients with complete spermiogenesis failure. As the clinical results of ROSI for patients with complete spermiogenesis failure are poor, it is possible that the ROS of these cases are lacking in any ability to induce Ca²⁺ oscillations; it may be necessary to perform such experiments in the future to confirm this defect and analyse potential therapies to reverse it.

References

- Aslam, K., Fishel, S., Green, S., Campbell, A., Garratt, L., McDermott, H., Dowell, K. & Thornton, S. (1998). Can we justify spermatid microinjection for severe male factor infertility. *Hum. Reprod. Update* **4**, 213–22.
- Barak, Y., Kogosowski, A., Goldman, S., Goldman, S., Soffer, Y., Gonen, Y. & Tesarik, J. (1998). Pregnancy and birth after transfer of embryos that developed from single-nucleated zygotes obtained by injection of round spermatids into oocytes. *Fertil. Steril.* **70**, 67–70.
- Barros, A., Bernabeu, R., Takahashi, K., Oliveira, C., Cremades, N., Silva, J., Sousa, M. & Tesarik, J. (1998). Intracytoplasmic injection of ejaculate and testicle spermatid: report of 35 cycles. *Hum. Reprod. (Suppl. 1)*, **13**, 154–5.
- Benkhalifa, M., Kahraman, S., Biricik, A., Tabakhi, N., Al-Odaib, A. & Ozand, P. (2004). Cytogenetic abnormalities and the failure of development after round spermatid injections. *Fertil. Steril.* **81**, 1283–8.
- Bernabeu, R., Cremades, N., Takahashi, K. & Sousa, M. (1998). Successful pregnancy after spermatid injection. *Hum. Reprod.* **13**, 1898–1900.
- Coward, K., Ponting, C.P., Cyang, H.Y., Hibitte, O., Savolainen, P., Jones, K.T. & Parrington, J. (2005). Phospholipase C ζ , the trigger of egg activation in mammals, is present in a non-mammalian species. *Reproduction* **130**, 157–63.
- Cox, L.J., Larman, M.G., Saunders, C.M., Hashimoto, K., Swann, K. & Lei, F.A. (2002). Sperm phospholipase C ζ from humans and cynomolgus monkeys triggers Ca²⁺ oscillation, activation and development of mouse oocytes. *Reproduction* **124**, 611–23.
- Edwards, R.G., Tarin, J.J., Dean, N., Hirsch, A. & Tan, S.L. (1994). Are spermatid injections into human oocytes now mandatory? *Hum. Reprod.* **9**, 2217–9.
- Fishel, S., Green, S., Bishop, M., Thornton, S., Hunter, A., Fleming, S. & Al-Hassan, S. (1995). Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet* **345**, 1641–2.

- Fujimoto, S., Yoshida, N., Fukui, T., Amanai, M., Isobe, T., Itagaki, C., Izumi, T. & Perry, C.F. (2004). Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. *Dev. Biol.* **274**, 370–83.
- Kahraman, S., Polat, G., Samli, M., Sozen, E., Ozgun, O.D., Dirican, K. & Ozbicer, T. (1998). Multiple pregnancies obtained by testicular sperm injection in combination with intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* **13**, 104–110.
- Kimura, Y. & Yanagimachi, R. (1995a). Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.* **52**, 709–20.
- Kimura, Y. & Yanagimachi, R. (1995b). Mouse oocyte injected testicular spermatozoa or round spermatids can develop into normal offspring. *Development* **121**, 2397–2405.
- Lavran, D., Nahum, H., Sc, B., Farhi, J., & Weissmann, A. (2000). Poor outcome with round spermatid injection in azoospermic patients with maturation arrest. *Fertil. Steril.* **74**, 443–9.
- Mansour, R.T., Aboulghar, M.A., Serous, G.I. (1996). Pregnancy and delivery after intracytoplasmic injection of spermatids into human oocytes. *Middle East Fertil. Soc. J.* **1**, 223–5.
- Ogonuki, N., Sankai, T., Yagami, K., Shikano, T., Oda, S., Miyazaki, S. & Ogura, A. (2001). Activity of a sperm-borne oocyte-activating factor in spermatozoa and spermatogenic cells from cynomolgus monkey and its localization after oocyte activation. *Biol. Reprod.* **65**, 351–7.
- Ogura, A. & Yanagimachi, R. (1993). Round spermatid nuclei injection into hamster oocytes form pronuclei and participate in syngamy. *Biol. Reprod.* **48**, 219–25.
- Ogura, A., Yanagimachi, R. & Usui, N. (1993). Behaviour of hamster and mouse round spermatid nuclei incorporated into mature oocytes by electrofusion. *Zygote* **1**, 1–8.
- Ogura, A., Matsuda, J. & Yanagimachi, R. (1994). Birth of normal young after electro fusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 7460–72.
- Parrington, J., Swann, K., Shevchenko, V.I., Sesay, A.K. & Lai, F.A. (1996). A soluble sperm protein that triggers calcium oscillations in mammalian eggs. *Nature* **379**, 364–8.
- Roger, N.T., Hobson, E., Pickering, S., Lai, F.A., Braude, P. & Swann, K. (2004). Phospholipase C ζ causes Ca²⁺ oscillations and parthenogenetic activation of human oocytes. *Reproduction* **129**, 697–702.
- Saunders, C.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royes, J., Blayney, L.M., Swann, K. & Lei, F.A. (2002). PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. *Development* **129**, 3522–44.
- Sette, C., Bevilacqua, S., Bianchini, A., Mangia, F., & Geremia, R. (1997). Parthenogenetic activation of mouse eggs by microinjection of a truncated c-kit tyrosine kinase present in spermatozoa. *Development* **124**, 2267–74.
- Shilber, S.J. & Johnson, J. (1998). Are spermatid injections of any clinical value?, ROSI and ROSNI revisited. *Hum. Reprod.* **13**, 509–15.
- Shilber, S.J., Liu, J., Van Stielteghem, A.C., Tournaye, H., Nagy, Z. & Devroey, P. (1996). Normal pregnancies resulting from testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection for azoospermia due to maturation arrest. *Fertil. Steril.* **66**, 110–7.
- Sofikitis, N., Miyagawa, I., Agapitos, E., Pasyiaos, P., Toda, T., Hellstrom, W.J. & Kawamura, H. (1994). Reproductive capacity of the nucleus of the male gamete after completion of meiosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* **11**, 335–41.
- Sone, Y., Ito, M., Shirakawa, H., Shikano, T., Takeuchi, H., Kinoshita, K. & Miyazaki, S. (2005). Nuclear translocation of phospholipase C-zeta, an egg-activating factor, during early embryonic development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**, 690–4.
- Sousa, M., Mendosa, C., Barros, A. & Tesarik, J. (1996). Calcium responses of human oocytes after intracytoplasmic injection of leukocytes, spermatozoa and round spermatids. *Mol. Hum. Reprod.* **2**, 853–7.
- Sousa, M., Barros, A., Takahashi, K., Oliveira, C., Silva, J. & Tesarik, J. (1999). Clinical efficacy of spermatid conception: analysis using a new spermatid classification schema. *Hum. Reprod.* **14**, 1279–86.
- Tesarik, J., Mendosa, C. & Testert, J. (1995). Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N. Engl. J. Med.* **333**, 525.
- Tesarik, J., Rolet, F., Brami, C., Sedbon, E., Thorel, J., Tibi, C. & Thebault, A. (1996). Spermatid injection into human oocytes. Clinical application in the treatment of infertility due to non-obstructive azoospermia. *Hum. Reprod.* **11**, 780–783.???
- Yanagimachi, R. (1998). Intracytoplasmic sperm injection experiments using the mouse as a model. *Hum. Reprod.* **13**(Suppl), 87–98.
- Yazawa, H., Yanagida, K., Katayose, H., Hayashi, S. & Sato, A. (2000). Comparison of oocyte activation and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities of round/elongated spermatids of mouse, hamster, rabbit, rat and human assessed by mouse oocyte activation assay. *Hum. Reprod.* **15**, 2582–90.
- Yazawa, H., Yanagida, K. & Sato, A. (2001). Oocyte activation and Ca²⁺ oscillation-inducing abilities of mouse round/elongated spermatids and the developmental capacities of embryos from spermatid injection. *Hum. Reprod.* **16**, 1221–8.
- Yoda, A., Oda, S., Shikano, T., Kouchi, Z., Awaji, T., Shirakawa, H., Kinoshita, K. & Miyazaki, S. (2004). Ca²⁺ oscillation-inducing phospholipase C zeta expressed in mouse eggs is accumulated to the pronucleus egg activation. *Dev. Biol.* **268**, 245–57.
- Vanderzwalmen, P., Lejeune, B., Nijis, M., Bertin, G.S., Vandamme, B., & Schoysman, R. (1995). Fertilization of an oocyte microinseminated with a spermatid in an in-vitro fertilization programme. *Hum. Reprod.* **8**, 502–3.
- Vanderzwalmen, P., Zech, H., Birkenfeld, A., Birkenfeld, A., Yemini, M., Bertin, G., Lejeune, B., Niji, M., Segel, L., Stecher, A., Vandamme, B., Roosendaal, E. & Schoysman, R. (1997). Intracytoplasmic injection of spermatids retrieved from testicular tissue: influence of testicular pathology, type of selected spermatids and oocyte activation. *Hum. Reprod.* **12**, 1203–13.
- Vanderzwalmen, P., Nijis, M., Stecher, A., Zech, H., Bertin, G., Lejeune, B., Vandamme, B., Chatziparasidou, A., Prapas, Y. & Schoysman, R. (1998). Is there a future for spermatid injection? *Hum. Reprod.* **13**(Suppl), 71–84.
- Veck, L.L. (1991). Typical morphology of the human oocyte and conceptus. In: *Atlas of Human Oocyte and Early Conceptus*, Vol. 2. Lippincott, Williams & Wilkins, Maryland, pp. 1–13.

生殖補助医療と看護の役割

生殖補助医療の基礎知識

不妊因子からみたARTの成績
—重症男性不妊症例に焦点をあてて—

柳田 薫*¹ Yanagida Kaoru 藤倉 陽子 Fujikura Yoko 片寄 治男 Katayose Haruo
岩本 晃明 Iwamoto Teruaki

*¹ 国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター長

●要旨

ARTには人工授精(AIH)、体外受精(IVF)、顕微授精(ICSI)がある。乏精子症や精子無力症が存在するとき、AIHが選択される。それで妊娠しなければIVFが選択される。精液パラメーターで捉えたとAIHとIVFの精液パラメーターの守備範囲は極めて似ている。ある程度以下のレベルの精液パラメーターではAIHでもIVFでも有効性が少ない。真に重症男性不妊症例が治療できるのはICSIである。しかし、遺伝的安全性が十分に確認されていないのが現状である。

●Key Words

人工授精、体外受精、顕微授精、卵細胞質内精子注入法、男性不妊症

●はじめに

不妊原因の中で主要なものは女性側の卵管因子で、外来でも多いという印象がある。本稿のテーマは男性不妊症例の生殖補助医療(ART)の成績であり、その男性因子は全不妊原因の30~45%を占め、不妊男性因子の治療を行わずして不妊治療を行うことはできないのが現状である。男性因子がクローズアップされるようになったのはARTの導入が契機であり、それ以前にはそれほど注目されていたようには記憶していない。1978年の体外受精・胚移植の成功¹⁾、そして、1992年の顕微授精(卵細胞質内精子注入法)の成功²⁾が男性不妊の存在を改めて知らしめたように思われる。それは、それまで著効する男性不妊症の治療がなかったこと、そして体外受精あるいは顕微授精でそれらの治療に活路が開けたこと、そしてそれらの治療でも有効性が期待できない重症男性不妊症が存在していることなど、男性不妊症の病態がより鮮明に捉えられるようになったからである。

●不妊症の中の男性不妊症

不妊症夫婦の割合は10~15%とされている。不妊症の原因には男性不妊症と卵管性、卵巣性(排卵性、ある

表1 ●男性不妊症の原因

1. 造精機能障害
 - 1) 特発性
 - 2) 精索静脈瘤
 - 3) 染色体異常
 - 4) 停滞精巣
 - 5) 薬剤性
 - 6) 発熱性疾患
 - 7) その他
2. 輸精路通過障害
 - 1) 精管欠損症
 - 2) 炎症性
3. 副性器機能障害
4. 射精障害
5. 抗精子抗体
6. その他

いは内分泌学的), 子宮性, 頸管性, 免疫学的などの原因を有する女性因子がある。女性因子に対する比率は, 女性因子: 男性因子で7: 6ともいわれる。男性不妊症の原因を表1にあげたが, 種々の原因がある。しかし, 視点を変えれば男性の性機能の目的は父親の遺伝情報を子(受精卵)に伝えることであるので, 男性の妊孕能は受精できる精子がどの程度存在するかで評価される。したがって, 男性不妊症の治療には精液検査による精液パラメーターの評価が重要な検査となる。

通常の診療の中で行いうる男性妊孕能の検査は, 精液検査以外ないといっても過言ではない。本来ならば精子が受精を成立させるために必要な機能, 例えば先体反応を起こすこと, 精子の運動性が超活性化(hyper-activation)すること, 精子-卵子融合することなどの機能が重要なものであって, 精子濃度や運動率が男性の妊孕能を直接表現しているのではないことを承知しておかなければならない。精子濃度や精子運動率だけで男性の妊孕能を評価できる基準値があれば, 治療法の選択がクリアカットに行えて有益である。しかし, 実際はそうではなく, いわゆるグレーゾーンがやや広く, 臨床家の経験的判断によって評価がなされることが多々ある。男性不妊で重症と形容される場合, 前述した曖昧さと同様にその定義は不明である。男性不妊症の治療には薬物療法, 手術療法および生殖補助医療がある。一般的に薬物療法の奏効率は低く, 手術療法では実施できる施設が限られ

表2 ●WHO 精液パラメーターの正常値

精液量	2 ml 以上
精子濃度	$20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上
総精子数	$40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上
精子運動率	前進性精子50%以上または高速前進精子25%以上
精子形態	正常形態 15%以上
精子生存率	75%以上
白血球数	$1 \times 10^6/\text{ml}$ 以下

(WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction, 3rd ed. Published on behalf of the World Health Organization, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1999. より引用)

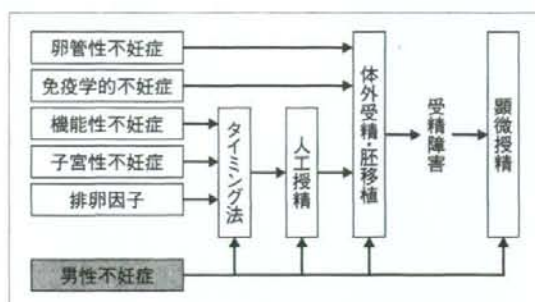


図1 ●不妊症治療の概要

ていることなどの制約が入り, その恩恵にあずかることができるクライアントは限られることになる。そして, やはり生殖補助医療がどちらかという頼りにされている治療という位置づけにあるのが現状である。ただし, 医療の第一の目的である本来の機能を回復させることからはやや遠ざかる治療となっている。

●精液パラメーターと男性不妊症の治療方針

重症男性不妊症とは人工授精を実施しても妊娠に至らず, 体外受精にステップアップするケースとも捉えられる。しかし, 人工授精が有効と考えられる精液パラメーターと体外受精が有効と考えられる精液パラメーターはほとんど同じレベルであるというのが実状である。参考までに表2にWHOによる精液パラメーターの基準値を示した。

●不妊治療の中の男性不妊治療

不妊治療の基本的方針はタイミング法、人工授精、体外受精そして顕微授精である。不妊症全体をみた場合の、それぞれの不妊因子の治療の流れを図1に示した。不妊原因は卵管性、免疫学的、子宮性、排卵因子、原因不明そして男性因子をあげた。女性側因子に対する治療法はタイミング法、人工授精、体外受精の順に選択され進行する。原因によっては、卵管因子などのようにタイミング法や人工授精を跳ばして、最初から体外受精を選択する場合がある。一方、男性因子は精子濃度や運動率からの評価によりタイミング法、あるいは人工授精、体外受精そして顕微授精がダイレクトに選択される。もちろん、選択された治療法で妊娠に至らなかった場合には、治療がステップアップされる。

●重症男性不妊症の治療成績

1) 人工授精

AIHが適応となる精液パラメーターについては、子宮内腔に注入される運動精子数が 2.0×10^6 個にて妊娠例が報告されているが、一般的に 10.0×10^6 個以上が望ましい。

実際に AIH を行った症例での精液検査の平均値は、精子濃度が $63.0 \times 10^6/\text{ml} \pm 51.6(\text{SD})$ 、精子運動率が $47.8\% \pm 2.7(\text{SD})$ であった³⁾。また WHO の診断基準によって精液パラメーターを評価すると、精液所見が正常な症例は全体の45%、乏精子症が5%、乏精子無力症が11%、精子無力症が39%となっており、精子無力症が多い。

妊娠率に関して、文献報告を集めると(表3)、対周期妊娠率は7.5%、対症例妊娠率が23.8%となった⁴⁾。また、自験例の分析では、精子濃度が $5 \times 10^6/\text{ml}$ または運動率が10%以下では妊娠例を認めず、精液パラメーターが正常所見群と異常所見群の比較では妊娠率(3.7% vs. 2.4%)、および妊娠に要した AIH 実施回数(4.0回 vs. 5.4回)に有意差を認めなかった³⁾。

2) 体外受精

IVFが適応となる精液パラメーターは媒精濃度が $10 \times 10^5/\text{ml} \sim 20 \times 10^5/\text{ml}$ であるので、この濃度が調整できればよいことになる。原精液の精液パラメーターでいうと、やはり $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の精子濃度が必要であり、真に重症な男性因子例には有効性が低いと考えられる。

体外受精・胚移植(IVF)の適応は卵管性不妊症、乏精子症、免疫性不妊症、原因不明不妊症などである。日本産科婦人科学会の2004年(平成16年)度倫理委員会・登録・調査小委員会報告(日産婦、2006)によると、平成16年分の体外受精・胚移植の臨床実施成績は、表4の結果となっている³⁾。胚移植あたりの妊娠率は25%を超えるが、移植あたりの生産率は17.9%である。妊娠を十分に期待できる実施回数4回であり、原因別に検討すると卵管因子が4回、男性因子が4回、原因不明が2回となっている(吉村ら、2001)³⁾。平均受精率では男性因子が卵管因子よりも有意に低値であり、当然のことといえた。適応別の成績については、男性因子例では卵管性不妊症と比較して低い傾向を認めた(16.4% vs. 11.8%)。反復実施に伴う累積妊娠率の評価では、男性因子例では反復実施5回目まででほとんどの妊娠が得られ、それ以降では妊娠例がなかった³⁾。しかし、この成績は他の原因と比較して特徴的なものではない。

3) 顕微授精

現在実施されている顕微授精は、卵細胞質内精子注入法(Intracytoplasmic sperm injection: ICSI)である。これは1個の精子を卵子内に注入する方法であるので、精液パラメーターがきわめて劣悪な男性因子例にも有効である。重症男性因子例に真に有効な方法が ICSI であると考えられる。

顕微授精の適応は「難治性の受精障害で、これ以外の治療によっては妊娠の見込みがないか極めて少ないと判断される場合」で、IVFの受精障害や受精障害が予測されるような重症男性因子例(精子減少症、精子無力症、精子奇形症、無精子症など)に適応される。自験例からでは、精子濃度が $5 \times 10^6/\text{ml}$ 未満では ICSI の適応と、また $5 \times 10^6/\text{ml} \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$ ではグレーゾーンと考えている。

表3 人工授精の成績に関する主要論文報告(会議録を含む)

著者 (施設名)	報告年	症例数	実施 周期数	対症例妊娠率(%)	対周期妊娠率(%)	症例当たりの 平均施行回数	妊娠例の平均 施行回数
後藤ら ³⁾ (京 都)	1991	40	75	7.5	4.0	—	
藤本ら ⁴⁾ (京都市立)	1992	154	336	15.6	7.4	2.2	
松岡ら ⁵⁾ (大阪市立)	1992	151	325	14.6	6.8	2.2	
武田ら ⁶⁾ (愛 媛)	1993	56	135	17.8	7.4	2.4	1.6
飯田ら ⁷⁾ (順天堂)	1993	268	700	20.9	8.0	2.6	
石原ら ⁸⁾ (埼 玉)	1993	122	410	20.5	6.1	3.4	6.3
森 ら ⁹⁾ (札 幌)	1995	91	552	38.5	6.3	6.1	
桑原ら ¹⁰⁾ (徳 島)	1996	56	266	23.2	4.9	4.8	
朱垂ら ¹¹⁾ (広 島)	1997	62	311	22.6	4.5	5.0	
廣瀬ら ¹²⁾ (滋 賀)	1998	1311	3279	24.3	9.7	—	
保條ら ¹³⁾ (愛 知)	1999	88	651	29.5	4.0	7.4	
小原ら ¹⁴⁾ (自 治)	2000	382	1493	38.0	9.7	3.9	
著者ら(福島県立)	2004	279	1223	12.9	2.9	4.7	4.6

[吉村泰典, 柳田薫, 他: 配偶子・胚提供を含む統合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究, 不妊原因に応じた最適な不妊治療の選択指針の確立に関する研究, その2(吉村泰典班), 平成15年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)分担研究報告書, p 90-106, 2004. より引用]

平成16年度の体外受精・胚移植などの臨床実施成績報告(日本産科婦人科学会倫理委員会・登録・調査小委員会)によれば, 射精精子を用いたICSI(子宮腔内移植)では, 採卵あたり17.8%, 移植あたり26.0%の妊娠率であった⁵⁾。移植あたりの生産率が16.7%で, 流産率が22.2%である。同報告では無精子症という分類がされていないが, 「その他の採精精子」という分類には無精子症が主体と考えられる。この分類での成績は, 採卵あたり18.6%, 移植あたり25.2%の妊娠率であった。移植あたりの生産率が17.8%で, 流産率が19.1%であった。この成績は, 射精精子のものと同様のものであり, ICSIでは男性因子の重症度に依存しない一定の成績が得られることがわかる⁵⁾。ただし, 無精子症であっても精巣精子回収法(TESE)によって精子が回収されることが前提となる。無精子症の場合, TESEで精子が回収できる確率は約70%である⁶⁾。マイクロダイセクションTESEを行うと約90%で精子が回収されるといわれる。累積妊娠率を調べると, 6回目以降で妊娠率の低下が明らかとなり, 5回目での累積妊娠率が約90%となることから, ICSIが有効と考えられるのは実施回数

表4 平成17年度の日本産科婦人科学会倫理委員会報告(平成16年の成績)

	IVF-ET	ICSI
患者総数	29,023	26,835
治療周期数	41,328	40,548
採卵総回数	39,397	39,822
移植回数	28,858	27,172
採卵あたり妊娠率	21.6%	17.8%
移植あたり妊娠率	29.5%	26.0%
妊娠あたり流産率	21.3%	22.2%
妊娠あたり多胎妊娠率	18.0%	15.7%
多胎妊娠あたり超多胎妊娠率	7.4%	5.9%
出生児数	6,686	5,373
移植あたり生産率	19.3%	16.7%

5回以内であった(吉村ら, 2001)³⁾。

前述したように, 無精子症でもその治療成績は通常のICSIと同じように期待できるが, 不動精子しか得られないケースでは成績の低下が予測される。その理由は,

不動精子では死滅している精子が含まれており、ICSIにそれらの死滅精子を選択して顕微注入に用いられる場合があるからである。

①精子死滅症

Vital stain (eosin 染色, Live/Dead Fertilitestain) によって、すべての精子が死滅している。死滅精子では当然、退行性変化が起きており、DNAも傷害されるので、ICSIの成績はまったく期待できない。この場合にはTESEを行い生存精子が存在すればその精子を用いる。

②不動精子しか得られない症例

不動精子しか得られない症例では、vital stainによって生存精子が認められる。この場合では、生存精子を hypoosmotic swelling test (HOST) を行って選択する⁶⁾。この方法が困難な場合にはTESEにて精子を回収する。

●おわりに

男性因子はその原因として原因が不明な場合が多い。そのためか薬物療法の効果が得られにくい。そこで、AIHやIVFなどの生殖補助医療による治療がなされる。乏精子症や精子無力症では程度が軽ければ、AIHやIVFでも治療できるが、重症の場合にはICSIが適応となる。ICSIはIVFより、より侵襲が大きい治療で、妊娠し誕生した子どもへの遺伝的リスクが昨今問題になっている。つまり、ICSIでは出生児の *de novo* の染色体異常が1.1~2.9%、遺伝性異常が0.5~1.1%に認められ、一般児よりも高いことが報告されている。また、性染色体異常の頻度も増加するようである⁷⁾⁻⁹⁾。さらに、造精機能関連遺伝子異常が男児へ遺伝するリスクも存在する。したがって、安易なICSIの実施は避けたほうがよいといえる。しかし、すでに述べたように重症男性因子例ではICSIに頼らざるを得ないのが現状であり、リ

スクの有無を明確にすることが今後の課題である。

●引用・参考文献●

- 1) Steptoe, P. C. and Edwards, R. G.: Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, 12: 2(8085): 366, 1978.
- 2) Palermo, G., Joris, H., Devroy, P., et al: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet*, 340: 17-18, 1992.
- 3) 吉村泰典, 他: 生殖補助医療の適応及びそのあり方に関する研究, 生殖補助医療の適応に関する研究 - 男性不妊症に対する生殖補助医療技術の応用に対するガイドラインに関する研究(吉村泰典班), 平成12年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)研究報告書, p 603-614, 2001.
- 4) 吉村泰典, 柳田薫, 他: 配偶子・胚提供を含む統合的生殖補助技術のシステム構築に関する研究, 不妊原因に応じた最適な不妊治療の選択指針の確立に関する研究, その2(吉村泰典班), 平成15年度厚生科学研究費補助金(子ども家庭総合研究事業)分担研究報告書, p 90-106, 2004.
- 5) 平成17年度倫理委員会・登録・調査小委員会報告(平成16年度分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および平成18年6月における登録施設名), 日本産科婦人科学会雑誌, 58: 1554-1579, 2006.
- 6) Liu, J., Tsai, Y. L., Katz, E., et al: High fertilization rate obtained after intracytoplasmic sperm injection with 100% nonmotile spermatozoa selected by using a simple modified hypo-osmotic swelling test. *Fertil Steril*, 68: 373-375, 1997.
- 7) Bonduelle, M., Aytöz, A., Van Assche, E., et al: Incidence of chromosomal aberrations in children born after assisted reproduction through intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 13: 781-782, 1998.
- 8) ESHRE Task Force on Intracytoplasmic Sperm Injection: Assisted reproduction by intracytoplasmic sperm injection: a survey on the clinical experience in 1994 and the children born after ICSI, carried out until 31 December 1993. *Hum. Reprod.*, 13: 1737-1746, 1998.
- 9) Loft, A., Petersen, K., Erb, K., et al: A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. *Hum. Reprod.*, 14: 2143-2148, 1999.

顕微授精での受精障害

Fertilization failure in ICSI



柳田 薫(写真) 高田智美

Kaoru YANAGIDA^{1,2} and Satomi TAKADA³

国際医療福祉大学臨床医学研究センター¹、同病院リプロダクションセンター²、山王病院リプロダクションセンター³

○顕微授精では体外受精での受精障害も適応となり、受精の成立を強力に図る。不妊治療のなかでは受精成立にもっとも信頼がおける治療方法である。この方法をもってしても1~8%の頻度で受精障害が発生してしまう。その場合の原因は卵子側と精子側とに存在する。現時点である程度解析されている原因としては、精子がもっている卵活性化因子の異常があり、受精障害例の約50%にその原因が考えられる。その場合には卵活性化因子の作用を補完する意味で、卵活性化処理を行う臨床試験が試みられている。現時点ではカルシウムイオンフォア処理、電気刺激処理、ストロンチウム処理などによる妊娠分娩例が報告されている。この卵活性化併用の顕微授精は過去の顕微授精で受精障害となったケースに適応となるが、遺伝的安全性ははまだ十分に確立されていない。



Key word 顕微授精、卵細胞質内精子注入法、受精障害

体外受精の受精障害は約10%の頻度で認められるが、顕微授精では約3%程度とまれである。しかし、受精障害が発生したときの対応策がなく、難治性不妊症といえる。本稿では、受精障害の原因と対策について考察する。

顕微授精のなかでも、ここでは卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)での受精障害について述べる。ICSIの受精率は生殖補助医療のなかではもっとも高い受精率が得られる。しかし、なかにはまれであるが、ICSIを行っても受精卵が得られない症例が存在する。受精の成立は精子と卵子の相互作用によって成立するので、精子と卵子のそれぞれに原因の存在した可能性がある。また、受精障害例への対処も今後の課題である。

受精障害にはtotal(complete)fertilization failureとlow fertilization rateとがある。前者はICSIを行った卵子すべてに受精が成立しなかった場合、後者は受精率が10~25%以下の低率である場合である。ここでは前者の場合の受精障害について述べる。

ICSIでの受精障害の現状

ICSIの結果を調べると、ICSIの治療周期当たり7.9%(2,066治療周期, 2006.1~2007.12, 山王病院リプロダクションセンター)に認められた。2,066治療周期での受精率を分布図で示すと図1のようになり、受精率100%の例が57.0%を占めていた。また、ICSIを行った卵子数も受精率と密接な関連がある。ICSIを行った卵子が1個の場合、受精障害の頻度は13.3%となり、受精障害のリスクがきわめて高い。2個では3.1%、3個で0.9%、4個で1.3%となり、3個以上ではほぼ1%以下で、6個以上での受精障害はなかった(図2)。平均ICSI卵数は3.7個であった。自験例の既報と比べると数値は異なるが¹⁾、傾向は同一で、1個ICSIでの受精障害のリスクはきわめて高い。その原因は不明であり、卵巣刺激法の種類などの分析が必要であるが、卵巣刺激に対して低反応であったことは事実で、そのような状況下で採卵された卵子の質が不良であったこと、技術的なこと(最初のICSI後に、ICSI関連機器の不調があれば再調整が行われるなども含まれる)が推測される。

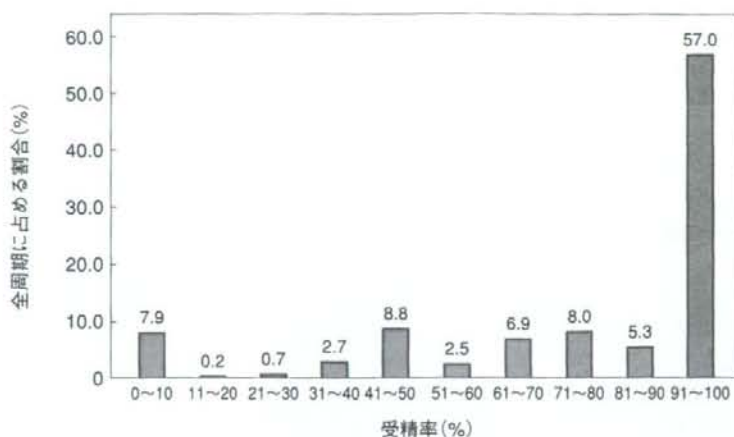


図 1 各ICSI治療周期の受精率の分布

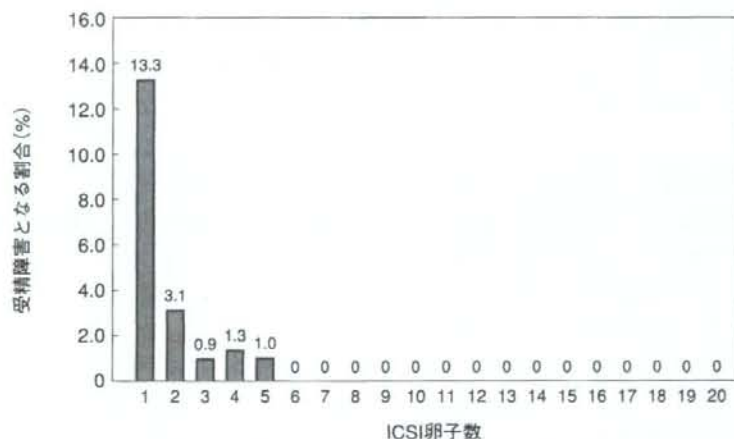


図 2 ICSIを行った卵子数と受精障害となる割合の関係

つぎに、受精障害の再発性について述べる。初回に ICSI を実施し、そのときの結果が受精率 0% の場合、第 2 回目の ICSI を計画して実施した場合、受精障害がふたたび発生する頻度は 13% となった。このようなことが起こる頻度は全治療周期の 0.7% に相当する。2 回続けて受精障害となった症例では受精過程の異常が恒常的に存在している可能性が示唆される¹⁾。

受精障害の原因

ICSI は受精のプロセスにおいて受精能獲得から精子卵子融合までの過程をバイパスして受精を成立させるので、問題はそれ以後の受精過程にあると考えられる。図 3 に受精過程を示したが、精

子卵子融合より後の過程とは、卵子活性化、精子頭部の脱凝縮から前核形成に至る過程となる。

1. 卵子活性化の異常

ICSI では精子と卵子の細胞膜融合が起こらないので、卵活性化の刺激は精子が持ち込む卵活性化因子によると考えられる。この因子は明確に同定されていないが、現在では精子がもっている phospholipase C zeta (PLC zeta) と考えられている²⁾ (「サイドメモ」参照)。この因子の活性が低い場合や欠如していることが受精障害の原因として考えられる。まったく欠如していれば卵子活性化は起こらず、ICSI を行っても卵子は第 2 減数分裂中期のままとなる。卵子内に注入された精子は不動化がなされ、核蛋白が正常で、なおかつ卵子内の還元機

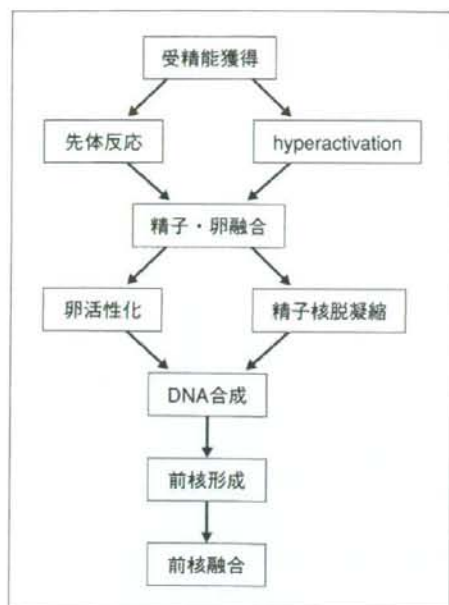


図 3 受精のプロセス

構が正常であれば脱凝縮だけすることになる。卵活性化因子の活性が低下している場合、卵子の活性化機構が多少刺激されたのであれば、卵細胞内の maturation promoting factor (MPF) が低値となり第二極体が放出されるが、活性化因子の活性が低いと MPF が再合成されてしまい、卵活性化機構が停止することもある。この場合、卵子には第二極体の放出が認められ、卵細胞質内に注入されている精子は脱凝縮し、その後 premature chromatin condensation (PCC) を起こしていることもある (metaphase III)。

サイド
メモ

精子の卵活性化因子

顕微授精において精子の卵活性化因子は、卵子内に顕微注入された後に、精子細胞膜の崩壊に伴って、精子頭部から卵子内にリークし、卵活性化にかかわる刺激伝達系を介して、卵子内にカルシウムオシレーションとよばれる律動的な一過性カルシウムイオン濃度上昇を発生し、卵子を活性化させる。つまり第二減数分裂中期で停止していた分裂を再開する作用をもつ。現在ではこの因子の候補として精子の phospholipase C zeta (PLC zeta) が有力とされている。

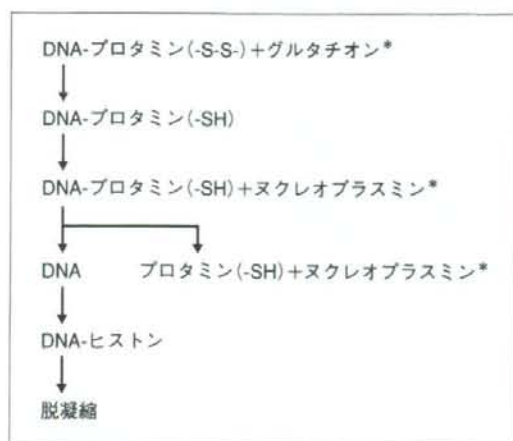


図 4 精子核脱凝縮のメカニズム(文献³⁾より改変)
* : sperm nucleus-decondensing factor.

2. 精子頭部脱凝縮の異常

成熟した精子の頭部には DNA がたいへんコンパクトにパッケージされている。その状態では受精に必要な DNA 合成ができない。そのためのプロセスが脱凝縮である。成熟精子の核蛋白はプロタミンであり、まず、これが還元されてプロタミン内のジスルフィド結合(-SS)が減じられ、つぎにプロタミンと親和性が強いヌクレオプラスミンが作用しプロタミンと結合する。このとき、DNA は卵子内に存在するヒストンと結合することになる³⁾。このようにして DNA のパッケージが緩み、脱凝縮に至る(図 4)。

核蛋白にジスルフィド結合が多量に産生された場合は通常の卵子内の還元機構では不十分となり、脱凝縮障害を起こす可能性がある⁴⁾。いわゆる男性のエイジングの影響なども考えられる。また、通常は核蛋白に過剰のジスルフィド結合がつかないようにチオール残基(-SH)に亜鉛イオンが結合している。この亜鉛は副生殖腺(おもに前立腺)から分泌されるので、該当部位の炎症などによる亜鉛の供給低下なども原因になりうる。理論上考えられる。このような場合の ICSI された精子の所見については、精子の脱凝縮障害、つまり無変化の精子頭部を認めることになると思われる。このような原因と精子のもつ卵活性化能の有無との関連については知見がない。精子の核蛋白異常が精子卵子融合の障害と密接に関連すること

が報告されている。つまり、このような核蛋白異常が精子頭部の細胞膜機能異常と関連することになり、卵活性化因子の発現異常と関連する可能性も否定できず、今後の研究成果に期待したい。

3. 前核形成などの異常

雌雄前核が形成されると精子星状体が雌性前核を中央に牽引し、両前核の融合に重要な働きをする。精子星状体の中心となり精子中心体に異常があるとこの過程が障害され、受精障害となる。最近では精子中心体の異常についての研究報告が認められ⁵⁾、その実態の全容が明らかになることを期待したい。

● 受精不成立卵子の所見

ICSI 実施後の受精判定時 (ICSI 後 20~22 時間) に受精不成立と判定された卵子のホルマウント標本を作製し、グルタルアルデヒドで固定、アセトラクモイドで染色を行い観察すると、ICSI 後生存し、かつ受精しなかった卵子の 10.6% に ICSI された精子が認められなかった⁶⁾。これらの卵では ICSI 後に注入された精子が穿刺部位より排出されてしまったものと考えられる。また、2.6% の卵では卵外の卵細胞膜に付着していた。残りの 86.8% の卵では精子が卵内に観察されたが、いずれの卵も前核形成と第二極体放出を認めなかった。

これらの卵子について卵細胞質内に注入された精子の状態は、①脱凝縮した精子核のみを認めた (68.2%)、②変化がない精子頭部のみを認めた (27.3%)、③PCC を認めた (4.5%)、のいずれかであった⁶⁾。①の状態は卵子は活性化しておらず、ICSI されて不動化処理を受けた精子が非特異的に脱凝縮を起こしたと思われる。②の状態では無変化な精子頭部が存在しているが、これは精子細胞膜が破綻していない可能性 (不動化処理が不十分) と、精子核が非常に堅くパッケージされている (前出) 可能性が考えられる。前者の場合では不十分な精子不動化処理以外に、精子注入時に伸展された卵細胞膜に精子が包まれてしまったことも考えられる。これは細胞膜の伸展性がよい卵子の場合に起こりうることである。③の状態は①と同じである。脱凝縮した精子クロマチンが MPF が高

いたために PCC となったと考えられる。以上のことから ICSI 後に受精しなかった卵の約 70% は精子が卵内に注入されていたにもかかわらず、卵活性化が起こらなかったと理解できる。

ICSI 後に受精が成立しなかった卵子に対して、いわゆる 1 day old ICSI を妊孕能が確認されているボランティアの精子で行うと約 70% に受精が確認できた¹⁾。つまり ICSI 後に受精を認めなかった卵子の約 50% は精子側の原因であることが推測される。残りの原因についての詳細な検討はなされていないが、前述したような種々の原因が考えられることになる。

● 受精障害への対処

受精障害の原因として卵活性化因子の異常が考えられるのであれば、コンセンサスが得られていないが卵活性化処理併用の ICSI という対処法がある。しかし、他の原因については対処法がないのが現状である。

ICSI 後の受精障害の再発率は 13% であるので、多くの症例は 2 度目の ICSI で受精卵を得ることができる。しかし、受精障害のリスクが高い場合には、現在報告されている方法として卵活性化処理を併用することがあげられる。臨床研究として実施されている方法はカルシウムイオノフォア (A23187) 処理⁷⁾、電気刺激法 (electroporation, electrostimulation と同じ)⁸⁾、およびストロンチウム処理などがある⁹⁾。これらの方法はいずれも ICSI の受精障害例に対して実施され、分娩例が得られている。

卵活性化の効率からいうと、電気刺激法がもっともよく、つぎにカルシウムイオノフォアとなる。ストロンチウム処理は効果の安定性がやや欠ける。いずれの方法も活性化効果の機序は卵細胞内の一過性のカルシウムイオンの増加である。電気刺激とカルシウムイオノフォア処理では単発のカルシウムイオンの一過性上昇が得られ、卵子が活性化される。これに対してストロンチウム処理はマウスで多用されているところで、マウスでは正常過程の受精と同じように、カルシウムイオンの一過性上昇の後にカルシウムオシレーションが続く。したがってマウスではストロンチウム処理は

表 1 カルシウムイオノフォア処理の方法

1. A23187 を DMSO に溶解して 1 mM の stock solution をつくる (暗所, 冷凍保存)
2. Stock solution 10 μ l を regular medium 990 μ l に添加し, 10 μ M の処理液をつくる
3. 卵を処理液に 10 分間 (7~15 分) 浸ける
4. Regular medium で 3 回洗浄する

生理的活性化刺激に近いもので, 好ましいと考えられている。しかし, ヒト卵子ではストロンチウム処理後のカルシウムオシレーションが観察されておらず, ストロンチウム処理による卵活性化機序は明らかになっていない。その機序が明らかになっているカルシウムイオノフォア処理, および電気刺激法が好ましいと思われる。電気刺激法については, ICSI する前に電気刺激を加えるか, ICSI 後に刺激を加えるかの 2 法がある。ICSI 後に電気刺激を加える機序は不明であるが, 精子染色体の異常 (構造異常) が 40~60% に認められる。したがって, ICSI 前に電気刺激を加えることが推奨されるが, ヒト卵に対してこのプロトコールを実施すると ICSI 後の卵子の変性率がきわめて高くなってしまふ。電気刺激による卵子細胞膜の損傷の修復が短時間では十分になされていないことによると考えられる。以上により, 現時点ではカルシウムイオノフォア処理がもっとも行きやすい方法と思われる (表 1)。

ICSI 後の受精判定を IVF での 6-hours after ICSI のように¹⁰⁾, 早い時期で行い, 受精していない場合に卵活性化刺激を加えるという方法も考案される。ICSI 後の受精判定の時期をいつ行うかがキーポイントである。ICSI での受精で大事なことは精子の不活化処理の完遂度である。しっかりと不活化処理を行わないと受精の開始が遅れることになる。まだ, 十分検討されたデータはないが, ICSI 後 4~6 時間程度で受精の評価を行いたい。早い時間というのは, 卵子の老化を考えてのことと, もうひとつは卵細胞内に注入された精子は脱凝縮を

起こし, 時間経過とともに PCC に至ることになるが, PCC は異常なクロマチンの凝縮で染色体や DNA 損傷が誘起される可能性がある。よって, PCC に変化する前に手を打つ必要がある。

おわりに

ART での受精障害は ART を実施してはじめてわかるもので, これ以上の受精に関する方法がない ICSI の場合ではたいへん困る事態となる。受精の判定時間や, 人為的卵活性化処理法などがキーポイントとなる。今後の研究により, 受精障害への対処法が確立されることを望む。

文献

- 1) 柳田 薫: 難治性受精障害への対応. 日本産科婦人科学会雑誌, **56**: N485-N488, 2004.
- 2) Saunders, C.M. et al.: PLC zeta: asperm-specific trigger of Ca(2+) oscillations in eggs and embryo development. *Development*, **129**: 3533-3544, 2002.
- 3) Yanagimachi, R.: *The Physiology of Reproduction*, 2nd ed. Raven Press, New York, 1994, pp.189-317.
- 4) Kuvist, U.: Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin-decondensation ability in man. *Acta Physiol. Scand.*, **109**: 79-84, 1980.
- 5) Terada, Y. et al.: Centrosomal function assessment in human sperm using heterologous ICSI with rabbit eggs: a new male factor infertility assay. *Mol. Reprod. Dev.*, **67**: 360-365, 2004.
- 6) 柳田 薫・他: ICSI と卵の活性化. 産婦人科の世界, **49**: 361-368, 1997.
- 7) Hoshi, K. et al.: Intracytoplasmic sperm injection using immobilized or motile human spermatozoon. *Fertil. Steril.*, **63**: 1241-1245, 1995.
- 8) Yanagida, K. et al.: Successful fertilization and pregnancy following ICSI and electrical oocyte activation. *Hum. Reprod.*, **14**: 1307-1311, 1999.
- 9) Yanagida, K. et al.: Successful pregnancy after ICSI with strontium oocyte activation in low rates of fertilization. *Reprod. Biomed. Online*, **13**: 801-806, 2006.
- 10) Chen, C. et al.: Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. *Hum. Reprod.*, **18**: 2118-2121, 2003.

11. 顕微授精

柳田 薫 片寄治男 藤倉洋子 岩本晃明

はじめに

卵細胞質内精子注入法 (ICSI) では生理的な受精にかかわる精子の選択がなされず、生殖補助医療に携わる人間が、1個の精子を選択する。また、その授精の方法も体外受精と比較すると侵襲的である。従って、ICSIにおいては、いかに良質の精子を選択するか、発生過程に問題がないのか、遺伝的安全性はどうかなどが問題となる。また、無精子症例では効率のよい精子回収のために MD-TESE が開発されている。

Q-1・顕微授精に用いる精子の選び方、処理方法について?

精子の使命は父方の遺伝情報を卵子に届けることなので、精子 DNA の正常性が保たれている精子を選択することが重要となる。正常な DNA を持つ精子を選択する方法として現在試みられている方法を以下に解説する。

1. 運動性良好精子を選択する方法

死滅した精子でも受精し胚発生が可能なこともあるが、原形質膜の破綻は DNA の破壊につながるような精子では個体発生ができない。原形質膜が健全であれば DNA が障害を受けにくいと考えられる。具体的には最も運動が活発な精子を選択する。精子 DNA の断片化

の研究から、運動性が悪い精子は精子 DNA 断片化が多いと報告されている¹⁾。さらに精子のミトコンドリア DNA の断片化と精子運動性の低下とが負の相関にある²⁾。実際の臨床データからも、DNA 他断片化の程度は IVF の受精率とも負の相関があり¹⁾、さらに精子の直線速度 (straight line velocity) が高いほど ICSI での受精率が高くなるとの報告があり³⁾、間接的に、精子運動性がよい精子は DNA が健全であることを示唆している。

精子回収法については、精液採取後、精液の処理開始から培養時間が長くなればなるほど、精子染色体の異常率が増加することや、培養時間や遠心操作が増加するにつれて精子 DNA の断片化が増加することが報告されているので、無意味な培養や遠心操作を慎み、精液静置法や密度勾配遠心法でも短時間で合理的な精子回収法を心がける必要がある。

2. 強拡大観察下の精子形態により選択する方法

ノマルスキー微分干渉装置を用いて CCD からモニターディスプレイに精子の画像を写し、最終倍率約 6,000 倍で精子形態を観察する。正常形態の精子を選択して ICSI を行うと、妊娠率と生児獲得率が有意に高いことが報告されている⁴⁾。いくつかの追試がなされ同様の結果が導き出されている。この場合、必要な機器はノマルスキー微分干渉装置と対物レンズ (×60~×100, 油浸) で、比較的簡単に準備ができる。

3. HA-coated slide sperm-binding assay で精子を選択する方法

成熟した精子は原形質膜にヒアルロン酸受容体が発現している。また、ヒアルロン酸に結合

Kaoru YANAGIDA, Haruo KATAYOSE, Yoko FUJIKURA, Akira IWAMOTO
国際医療福祉大学病院リプロダクションセンター
〒329-2763 那須塩原市井口 537-3