

Piezo-ICSIにおける穿刺方法の工夫, およびその有用性の検討

Examination of the utility of different puncture method protocols for Piezo-ICSI

武田 信好^{1*}・阿部 亜佳音¹・鈴木 寛規¹・船山 麻由子¹・佐藤 百合子¹・
小田原 圭²・鈴木 雅美¹・田中 可子¹・三箇島 睦実¹・小田原 靖¹
Nobuyoshi Takeda^{1*}, Akane Abe¹, Hiroki Suzuki¹, Mayuko Funayama¹, Yuriko Sato¹,
Kei Odawara², Masami Suzuki¹, Kanako Tanaka¹, Mutsumi Mikashima¹ and Yasushi Odawara¹

¹ ファティリティクリニック東京 〒150-0021 渋谷区

² 昭和大学医学部産婦人科学講座 〒142-8666 品川区

¹Fertility Clinic Tokyo, 3-13-11 Higashi, Shibuya-ku, Tokyo 150-0021, Japan

²Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan

要旨：本研究ではヒトのPiezo-ICSIにおける細胞膜の破膜方法の違いが、受精率と卵子変性率におよぼす影響について調べた。次の3種類の手法、①1回パルス法（透明帯貫通後にピペットを卵子直径の70%程度の位置まで押し進める。そして1回パルスをかけて細胞膜を穿破後、精子を注入する）、②3回パルス法（透明帯貫通後にピペットを卵子直径の70%程度の位置まで押し進めて1回目のパルスをかけて細胞膜を穿破後、80%程度の位置まで押し進めて2回目のパルス、さらに90%程度の位置まで押し進めて3回目のパルスをかけて精子を注入する）、③細胞膜伸展穿刺法（ピペットを卵子直径の90%程度の位置まで押し進めて細胞膜を十分に伸展させてから1回パルスをかけて細胞膜を穿破し精子を注入する）の比較を行った。また、Piezo-ICSIでの破膜はパルスをかけて行うが、ピペットを卵子細胞質に侵入させる際に細胞膜の伸展性が低く、パルスをかける前に膜が破れる（異常破膜）場合に変性率が上がることが報告されている。そこで、上記3法の異常破膜卵子の発生率も併せて比較した。1回パルス法・3回パルス法・細胞膜伸展穿刺法の正常受精率は74.7%、72.9%、77.2%であり有意差は認められなかった。また、異常破膜卵子の発生率は、14.5%、8.9%、20.7%であり、3法それぞれに有意差が認められた（ $P < 0.05$ ）。しかし、3法の卵子変性率は3.9%、2.1%、3.2%であり、有意差は認められなかった。次に、異常破膜卵子に対して1回パルス法は、破膜位置に精子を注入し、細胞膜伸展穿刺法は破膜位置にかかわらず90%の位置に注入した。その結果、それぞれの変性率は、23.8%、15.7%となり、細胞膜伸展穿刺法において低い傾向が認められた。3法の受精率には差はなかったが、卵子の変性率を低下させるには、細胞膜を十分に伸展させて、異常破膜が起こっても破膜位置より奥に精子を注入することが有効であり、細胞膜伸展穿刺法が優れた穿刺法あることが示唆された。

キーワード：Piezo-ICSI, 穿刺法, 卵子変性率

Abstract: In this study, we examined the effect of different methods of puncturing the cell membrane of human oocytes using Piezo-ICSI on the fertilization rate and oocyte degeneration rate. Three methods were compared. (1) One-pulse method: After piercing the zona pellucida, the pipette is pushed to a position of about 70% of the oocyte diameter. Then the cell membrane was punctured by applying one pulse, and the spermatozoa were injected. (2) Three-pulse method: After piercing the zona pellucida, the pipette was pushed to a position of about 70% of the oocyte diameter, and the cell membrane

(受付 2018年2月21日/受理 2019年3月7日)

別刷請求先：〒150-0021 東京都渋谷区東3-13-11 ファティリティクリニック東京

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: nontakeda@gmail.com

was punctured with the first pulse; a second pulse was applied after pushing the pipette to about the 80% position; then, after pushing the pipette further to about the 90% position, the spermatozoa were injected by applying a third pulse. (3) Cell membrane puncture by expansion method: the pipette was pushed to a position of about 90% of the oocyte diameter. After the cell membrane had fully expanded, one pulse was applied to puncture the cell membrane and inject the spermatozoa. In membrane puncture with a pulse from Piezo-ICSI, it has been reported that the expandability of the cell membrane is low, and when the pipette pierces the oocyte cytoplasm, the membrane can break before application of the pulse (abnormal rupture of the membrane) increasing the degeneration rate. The incidence rate of oocytes with abnormal rupture of the membrane was also compared among the 3 methods. The normal fertilization rates of the one-pulse method, three-pulse method, and cell membrane puncture by expansion method were 74.7%, 72.9%, and 77.2% respectively, and there were no significant differences among them. The incidence rate of oocytes with abnormal rupture of the membrane was 14.5%, 8.9%, and 20.7% respectively, with significant differences among the three methods ($P < 0.05$). The total oocyte degeneration rates of the three methods were 3.9%, 2.1%, and 3.2% respectively, and there were no significant differences among them. In abnormally ruptured oocytes, injected spermatozoa into the location of the destruction. In the cell membrane puncture by expansion method, spermatozoa were injected at the position of 90% irrespective of the location of destruction. The respective denaturation rates were 23.8% and 15.7%, with a lower tendency being observed in the cell membrane extension puncture method. There were no differences among the fertilization rates of the three methods. However, the result of the cell membrane extension puncture method suggests that injecting spermatozoa at a position deeper than the membrane rupture position effectively avoids oocyte degeneration.

Key words: Piezo-ICSI, Puncture method, Oocyte degeneration rate

はじめに

Piezo-ICSIは、インジェクションピペットのシャンク部分先端を平坦にカットした形状のものを使用する。そして多数の圧電素子 (Piezo素子, piezoelectric element) を棒状に積層したものに電圧をかけたときに生ずる厚み方向の急速変形を振動としてインジェクションピペットに伝え、透明帯の貫通および細胞膜を穿破するシステムである。Piezo-ICSIは、従来からのスパイク付きインジェクションピペットを用いたICSI (conventional-ICSI; c-ICSI)¹⁾に比し、卵子の変性率が低下するとの報告がみられる²⁻⁵⁾。卵子変性率が低下した結果として受精率が上がることが期待されており、今後普及して行くことが予想される。

c-ICSIでは、インジェクションピペットを細胞質の70%程度まで穿刺後、細胞膜の吸引によって破膜をすることが多い。そして精子は、破膜した直後に同時吸引された周辺の細胞質とともに混和されて、注入する際にピペット先端より奥に放出されることが多い。この様な場合の細胞膜の破膜は視認されやすい。

しかしPiezo-ICSIでは、細胞膜の吸引は行わずにパルスによって破膜されるのみで、周辺の細胞骨格の破壊は最小限であると考えられる。そこでは破膜の際に伴う細胞膜の戻りを視認することにより精子の確実な注入が確認できる。しかし、細胞膜の戻りが視認できなかった場合、たとえば、①一時的にピエゾの利きが悪い、②破膜に伴う細胞膜の戻

りが非常に穏やかで施行者が認識できなかったなどの場合では精子をその場に置く形になり、精子注入の確実性に不安が残る。さらにインジェクションピペットを抜去する際に、精子がピペットに接着したために注入した位置が戻ってしまう場合や注入の際に液量が多くなってしまいう場合には、精子が確実に注入されたかの判断が難しいことがある。

ICSI手技における最大のポイントは、精子を確実に卵子細胞質内に注入することである。精子をより確実に注入できるPiezo-ICSIが定型化されれば、施行者の技術差が少なくなり、安定した受精率を得ることが可能になると考えられる。

我々は、インジェクションピペットを穿刺して細胞膜を破膜するためにパルスをかけた後、さらに奥へ刺し入れることにより確実に注入ができるのではと考えて3回パルス法を考案した。そして、このとき得られた知見をもとに試行した、細胞膜を破らないように細胞質奥まで引き延ばす方法 (細胞膜伸展穿刺法) を用いた場合は、卵細胞膜の伸展性が低い卵子⁶⁾の変性率がさらに低くなる可能性があると考えて対応も検討した。本研究では、①1回パルス法、3回パルス法、細胞膜伸展穿刺法の3法の比較、そして、②異常破膜発生卵子への対応法を検討し、受精率と卵子変性率について後方視的に評価した。

対象と方法

対象

本研究にあたり、対象者には治療についてのインフォームドコンセントを得た。当院においてARTを施行した26歳～46歳までの568周期より得られた成熟卵子2,049個を対象にPiezo-ICSIを施行した。1回パルス法は2016年2月から同年11月(26歳～45歳, 平均年齢37.7±4.1歳, 696個), 3回パルス法は2016年3月から2017年2月(26歳～46歳, 平均年齢37.4±4.3歳, 705個), 細胞膜伸展穿刺法は2016年11月から2017年2月(28歳～45歳, 平均年齢38.3±3.7歳, 648個)までの症例であり, TESE・MESA症例は除外した。

ICSIの仕様

Piezo-ICSIに用いた器具およびセッティングについて説明する。Piezo-ICSIドライブユニット(MB-D型, プライムテック)および外形6 μmインジェクションピペット(PINU06-20FT, プライムテック)を用いた。PMMコントローラーのセッティングは, ZONA:INTENSITY 1.5, SPEED 2, Membrane:INTENSITY 1, SPEED 1とした。インジェクションピペットへのPMMオペレーションリキッド(プライムテック)の注入は, ピペットのシャンク手前の部分に1 cmとした。また, ICSI用ディッシュは, ガラスボトムシャーレ(87-453, ニプロ)を用いて, 精子選別用ドロップおよびイ

ンジェクションピペットへの精子充填にはSpermSlow™(オリジオ・ジャパン), ICSI用ドロップはNPS代替ヒト血清(NI Protein Substitute, ナカメディカル) 30%になるように添加したHepes buffer (FertiCult™, Sperm Washing & Flushing Medium, メディー・コンインターナショナル), およびインジェクションピペット内部コーティング用ドロップには7% PVP (90121, アイエスジャパン)を用いた。精子注入用インジェクターは空圧式(IM-11-2, NARISHIGE)を用いた。

検討項目1: 穿刺方法の違いによる受精率および胚盤胞率の検討

穿刺方法は, 以下の3法について検討した(図1)。①1回パルス法(従来法): 本法は, 透明帯貫通後にピペットを卵子直径の70%程度の位置まで押し進めて1回パルスをかけて細胞膜を穿破し精子を注入する。②3回パルス法: 本法は, 透明帯貫通後にピペットを卵子直径の70%程度の位置まで押し進めて1回目のパルスをかけて細胞膜を穿破する。そしてさらに80%程度の位置まで押し進めて2回目, またさらに90%程度の位置まで押し進めて3回目のパルスかけた後, 卵子直径90%程度奥の位置に精子を注入する。③細胞膜伸展穿刺法: 本法は, ピペットを卵子直径の90%程度奥の位置までゆっくり押し進めて(細胞膜を十分に伸展させて)1回パルスをかけて細胞膜を穿破し精子を注入する。

受精の確認は, ICSI施行14～18時間後(D1)に前核の

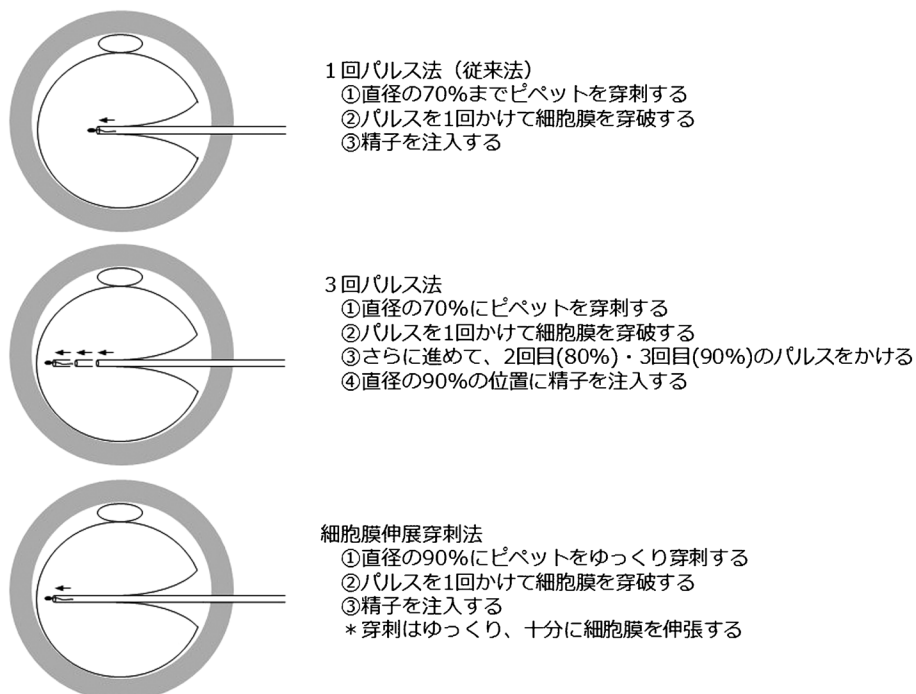


図1 今回検討したPiezo-ICSI法

確認をもって行った。そして受精判定の内訳は、2PN率（正常受精率）・1PN率・3PN率・0PN（その後分割したもの）率を算出した。さらに、正常受精卵を対象に胚盤胞率および良好胚盤胞率を検討した。良好胚盤胞はガードナー分類⁷⁾においてAA, ABおよびBAとした。

有意差の検定は、 χ^2 検定を用いてP値は0.05未満を有意差ありとした。

検討項目2：各穿刺法における異常破膜卵子発生率と変性率の検討

細胞膜の穿破様式を以下に分類した。正常破膜：ピペットを卵子細胞質に穿刺した後に、パルスをかけて細胞膜を破った場合とした。異常破膜：ピペットを卵子細胞質に進入させる際に卵細胞膜の伸展性が低く、パルスをかける前に膜が破れた場合とした⁸⁾。なお、異常破膜が発生したときの精子注入位置は、1回パルス法：異常破膜が発生した位置に精子を注入、3回パルス法：異常破膜が発生した位置にかかわらず70%の位置からパルスをかけ始めて90%の位置に精子を注入、細胞膜伸展穿刺法：異常破膜が発生した位置にかかわらず、90%の位置に1回パルスをかけてから精子を注入した。

検討は、①1回パルス法・②3回パルス法・③細胞膜伸展穿刺法について正常破膜卵子の変性率および異常破膜卵子発生率と変性率を検討した。

有意差の検定は、 χ^2 検定を用いてP値は0.05未満を有意差ありとした。

検討項目3：異常破膜発生卵子への対応法の検討

異常破膜が起こった際の対応について、次の2法において注入位置の違いについて検討した。①異常破膜後その場に

精子注入：1回パルス法において、ピペットを細胞質に進入させて細胞膜が破れた場所に1回パルスをかけて精子を注入した。②異常破膜後さらに進めて精子注入：細胞膜伸展穿刺法において、細胞膜が破れてもさらに細胞質直径90%程度の位置まで押し進めて1回パルスをかけてから精子を注入した。なお3回パルス法は、細胞膜伸展穿刺法に準じて卵子直径90%の位置に精子を注入したが、比較方法を単純化するために検討3からは外した。そして2PN率・胚盤胞率・良好胚盤胞率を比較検討した。

有意差の検定は、 χ^2 検定を用いてP値は0.05未満を有意差ありとした。

結果

検討項目1：穿刺方法の違いによる受精率および胚盤胞率の検討

1回パルス法の2PN率（正常受精率）・1PN率・3PN率・0PN（分割胚）率は、それぞれ74.7%、1.7%、2.2%、10.6%であった。次に3回パルス法は、それぞれ72.9%、2.3%、2.4%、9.6%であった。そして細胞膜伸展穿刺法は、それぞれ77.2%、1.7%、2.2%、6.9%であった。また、正常受精卵における胚盤胞率・良好胚盤胞率は、それぞれ1回パルス法56.7%、30.4%、3回パルス法57.4%、33.1%、細胞膜伸展穿刺法55.2%、30.6%であった。1回パルス法・3回パルス法・細胞膜伸展穿刺法の3群において、2PN率（正常受精率）・1PN率・3PN率・0PN（分割）率・胚盤胞率・良好胚盤胞率のいずれにも有意差は認められなかった ($P > 0.05$) (図2)。

検討項目2：各穿刺法における異常破膜卵子発生率と変性率の検討

1回パルス法・3回パルス法・細胞膜伸展穿刺法において

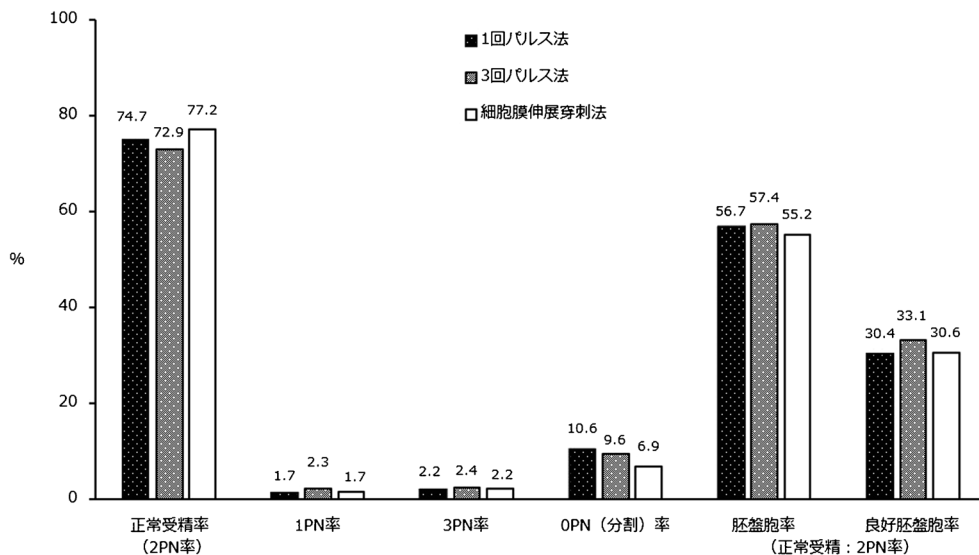


図2 各穿刺法における受精率と胚盤胞率 (2PN)

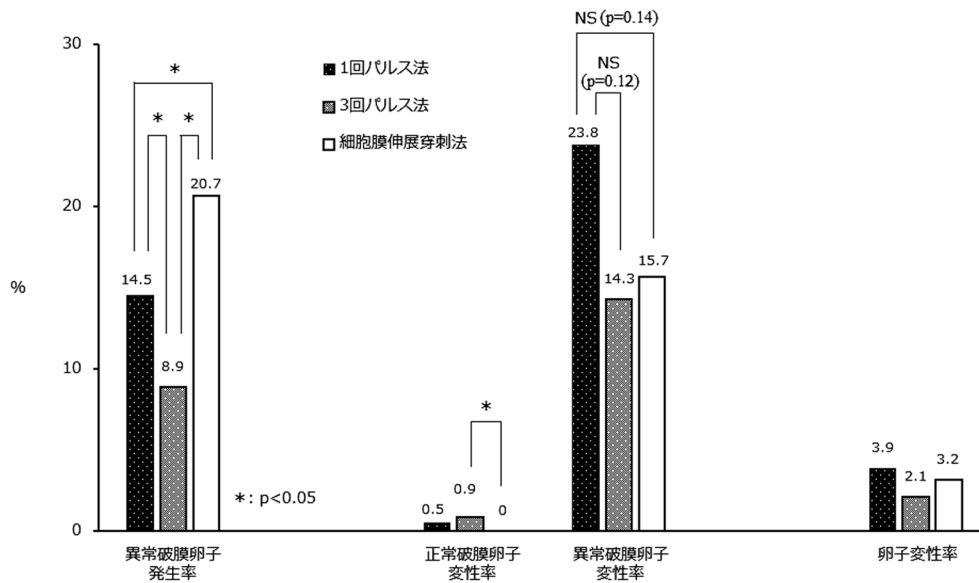


図3 各穿刺法における異常破膜卵子発生率と変性率

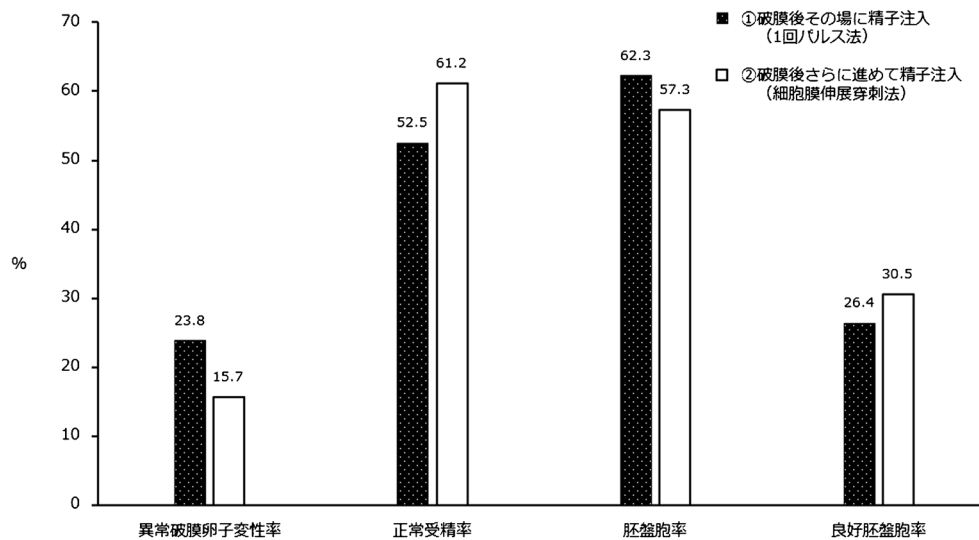


図4 異常破膜卵子への対応

卵子に異常破膜が起きた割合は、それぞれ14.5%、8.9%、20.7%であった。これら3群において、いずれの比較においても有意差が認められた ($P < 0.05$) (図3)。

1回パルス法・3回パルス法・細胞膜伸展穿刺法の施行における正常破膜卵子の変性率はそれぞれ0.5%、0.9%、0%であり、3回パルス法・細胞膜伸展穿刺法において有意差が認められた ($P < 0.05$) (図3)。また、異常破膜卵子の変性率は23.8%、14.3%、15.7%であった。これら3群において有意差は認められなかった ($P > 0.05$) (図3)。

変性率は、それぞれ3.9%、2.1%、3.2%であった。これら

3群において有意差は認められなかった ($P > 0.05$) (図3)。

検討項目3：異常破膜発生卵子への対応法の検討

①異常破膜後その場に精子注入において、変性率・正常受精率・胚盤胞率・良好胚盤胞率はそれぞれ23.8%、52.5%、62.3%、26.4%であった。次に、②異常破膜後さらに進めて精子注入では15.7%、61.2%、57.3%、30.5%であった。これら2群において有意差は認められなかった ($P > 0.05$) (図3, 図4)。

考 察

検討項目1より、1回パルス法・3回パルス法・細胞膜伸展穿刺法において受精率に有意差を認めなかったことより、いずれの穿刺方法でも精子がほぼ確実に注入されていると考えられた。そして、胚盤胞率・良好胚盤胞率にも有意差は認めず、穿刺法の違いによる胚発生への影響は少ないと考えられた。

検討項目2より、各穿刺法における異常破膜発生率では、各群間に有意差を認めた。本来、1回パルス法と3回パルス法において、どちらの穿刺法も1回目のパルスは同じ70%の位置でかける予定なので差が出ないはずである。今回の検討で差を認めた原因は、Piezo-ICSIの導入にあたり経験が浅かったことに起因しているものと考えられた。当院において最初に導入したのは1回パルス法であった。その施行において以下のようなことが影響したと考えられた。一般に透明帯を貫通する際に囲卵腔が狭い卵子は変性しやすい。つまり、固い透明帯を穿破するにあたり、ときに少し押し気味に何回もパルスをかけたとそのときの振動や、穿破直後にピペット先端が細胞膜へ接触したことなどが損傷に繋がったことが考えられた。そして、徐々に透明帯の穿破法について工夫を重ねることになった。穿刺部位は、卵子の極体位置を12または6時の位置に保持して、通常は囲卵腔が広い部分を選んだ。しかし囲卵腔が狭い場合は、インジェクションピペットにパルスをかけながら透明帯の最も内側、直前まで進めていったん停止させた。そして、内部の細胞膜にダメージを与えないようにその場でパルスを数回かけながら、透明帯最内層部を貫通した。この方法によってかなりの異常破膜が回避され、次に導入した3回パルス法の成績に反映されたと考えられた。

3回パルス法の開発経緯について説明する。従来法である1回パルス法を施行したとき、c-ICSIと同様に卵子細胞膜の破膜が起こり、細胞膜が穿刺部位の方向に戻る現象が確認できた。しかし、精子が確実に入っているなら、受精率が100%に限りなく近づいていくのではと期待したが90%に届かなかった。そこで、もっと確実に精子を注入する方法はないかと考えた。まず確実に奥へ注入する方法として、パルスを3回かけて奥へ注入する方法を考えた。ここでの3回のパルスには特に意味はなく、定型化するにあたり決めた。そして、複数回のパルスが精子に対して安全であるかを確かめるために、運動精子をインジェクションピペットに吸引したまま何度かかけて、運動性が失われないことを確かめた。ただし、ガラス管内で急に方向転換しようとして管の内壁に強く触れたときは運動性が失われた。これらのことから、不動化後の精子ならば運動性はなく、ピペット内壁に強く接触する可能性は低いので、頭部に対するパルスの影響が少ないと考えて施行に至った。そして、異常受精が増えるなどの影響が観察されなかったことより、精子をインジェクションピペット内部に保持したままならパルスを追加しても侵襲は少ないと考えられた。また、精子注入の際に経験

するトラブル事例として、ピペットに精子が付着して注入が困難な場合または精子注入の確認に不安がある場合は、精子頭部がピペット先端に触れない状態であるならば、ガラス管の内外問わずにパルスをかけて遊離させることは有効と考えられた。このとき得られた、卵子の破膜位置より奥の直径90%程度に注入すると卵子変性率に低下傾向が見られる知見に、ICSIにおける細胞膜修復機序の理論を加えれば究極に卵子変性率が低下するのではとの考えに至った。

そして、最後に導入した方法が細胞膜伸展穿刺法である。細胞膜伸展穿刺法は、マウス卵子に対する穿刺法を定型化した方法である^{8,9)}。細胞膜伸展穿刺法について説明する。マウス卵子に対するPiezo-ICSIは、木村らによって確立され、細胞膜の修復機序に言及している⁸⁾。すなわち、奥に押し込まれた細胞膜が破膜直後の細胞質の流出を防ぎ、細胞膜に戻るまでに修復が起こるとしている。そこで、ヒトでも細胞膜を破らずに卵子直径の90%程度までインジェクションピペットを刺し入れ注入すれば、卵子変性率が低下するのではと考えた。そこで注意した点は、①細胞膜を十分に伸展させるためになるべくゆっくりピペットを穿刺すること。実際には10秒ほど時間をかけた。②細胞膜が急に伸びる現象が発生したならば、いったん休止して伸びきるのを待ってから穿刺を再開すること。このようにすると細胞膜を破らずに卵子の直径90%程度まで穿刺できることが多かった。③途中で細胞膜が破れても(異常破膜の発生)さらに卵子の直径90%程度まで穿刺した。細胞膜伸展穿刺法において、細胞膜をゆっくりではあるがかなり引き延ばして注入したため、パルスをかける前に破膜に至る卵子が有意に上昇した。しかし、正常破膜卵子において細胞膜伸展穿刺法は、1回パルス法・3回パルス法に比し、卵子変性率が低い傾向または有意に低いことが示された。これは引き延ばされた細胞膜同士が接着する面積の増大が寄与したものと考えられた。

検討項目3より、異常破膜卵子の変性率は2群間に有意差は認められなかった。しかし、1回パルス法に比し、細胞膜伸展穿刺法は変性率に低下傾向が認められた($P=0.14$)。渡辺らは、細胞膜の伸展性が低い場合、精子を注入する際の培養液注入が破膜した細胞膜の早期回復を妨げ、卵子変性率が上昇したと推測している¹⁰⁾。今回の検討において細胞膜伸展穿刺法は、異常破膜した部位よりもかなり奥に精子を注入したため、同時に注入された培養液(SpermSlowTM含む)の細胞膜修復に対する影響が少なくなったものと推測された。また、細胞膜伸展穿刺法における細胞膜伸展の効果によって、細胞膜同士が接着する面積の増大、または元の位置に戻るまでの時間が長くなったことによる膜修復までの猶予の延長が、異常破膜発生時においても変性率の低下に繋がったと考えられた。

Piezo-ICSIにおいて、細胞膜伸展性に乏しく異常破膜が発生した場合の対処法として、これまで異常破膜部位に精子注入を避けて、新たに別の部位に正常破膜を期待して穿刺する方法が提唱されている^{10,11)}。しかし、2度目の穿刺部

位も異常破膜となることもあり、技術的にも煩雑と考えられる。これに対して、細胞膜伸展穿刺法は異常破膜が発生してもそのまま卵子直径90%程度までインジェクションピペットを押し進めて精子を注入するだけであり、技術的にも簡単で有用と考えられた。

1回パルス法・3回パルス法・細胞膜伸展穿刺法において、受精率・変性率・胚発育のあいだに差はなく、いずれの方法を用いても問題はないことが示唆された。しかし、卵子の変性を回避するには、細胞膜を十分に伸展させ、異常破膜が起こっても破膜位置より奥に精子を注入することが有効であり、細胞膜伸展穿刺法が最も優れた穿刺法である可能性が示唆された。Piezo-ICSIは、さらなる理論的・技術的検討を重ねて成熟させることにより、ICSI全体の成績向上に繋がるものと考えられた。

文 献

- 1) Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. and Van Steirteghem, A.C. (1992): Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340, 17–18.
- 2) Huang, T., Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1996): The use of piezo micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection of human oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 13, 320–328.
- 3) Yanagida, K., Katayose, H., Yazawa, H., Kimura, Y., Konnai, K. and Sato, A. (1999): The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum. Reprod.*, 14, 448–453.
- 4) Takeuchi, S., Minoura, H., Shibahara, T., Shen, X., Futamura, N. and Toyoda, N. (2001): Comparison of piezo-assisted micromanipulation with conventional micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection into human oocytes. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 52, 158–162.
- 5) Hiraoka, K. and Kitamura, S. (2015): Clinical efficiency of Piezo-ICSI using micropipettes with a wall thickness of 0.625 μm . *J. Assist. Reprod. Genet.*, 32, 1827–1833.
- 6) 平岡謙一郎・齋藤雅人・林奈津実・梶 哲也・市橋あゆみ・栖原貴子・大塚喜人・石川智則・木寺信之・大内久美・高木清考 (2016) : ヒト卵子へのPiezo-ICSIにおいて最適な破膜位置はどこか? *J. Mamm. Ova Res.*, 1, S17.
- 7) Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T. and Schoolcraft, W.B. (2000): Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil. Steril.*, 73, 1155–1158.
- 8) 木村康之 (2009) : Piezo ICSIの開発. *J. Mamm. Ova Res.*, 26, 69–78.
- 9) Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995): Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52, 709–720.
- 10) 渡辺真一・松永利恵・見田 渉・三浦 恵・小林勇毅・山中菜穂子・上畑みな子・牧野 弘・宮村浩徳・桑波田曉子・越知正憲・堀内俊孝 (2017) : ピエゾICSIにおいて卵子変性を回避するための再穿刺は胚発生と妊孕能に影響しない. *日本受精着床学会雑誌*, 34 (1): 24–27.
- 11) 岩山 広・石山 舞・下田美鈴・中谷絢乃・山下正紀 (2015) : ピエゾICSIにおいて卵細胞膜の高伸展部位を特定するための複数回穿刺はヒト卵子の生存性および体外胚発生のリスクファクターにならない. *J. Mamm. Ova Res.*, 32: S24.