

—原著—

人為的な多精子受精胚作出のリスクを減らす
rescue ICSIの適応基準の検討
～タイムラプス観察から得られた第二極体放出時間を用いた考察～
Decision criteria for rescue ICSI reducing the risk of artificial polyspermy
—analysis of the extrusion time of the second polar body following
conventional IVF measured by a time-lapse imaging system—

岸田 拓磨*・菊地 裕幸・山田 健市・菅野 弘基・岸田 理英・佐藤 那美・
結城 笑香・吉津 葵・佐々木 郁弥・片桐 未希子・吉田 仁秋

Takuma Kishida*, Hiroyuki Kikuchi, Kenichi Yamada, Hiroki Kanno, Rie Kishida, Tomomi Sato,
Emika Yuki, Aoi Kitsu, Fumiya Sasaki, Mikiko Katagiri and Hiroaki Yoshida

仙台ARTクリニック 〒105-0004 仙台市

Sendai ART Clinic, 206-13 Nagakecho, Miyagino-ku, Sendai, Miyagi 983-0864, Japan

要旨：人為的な多精子受精を低減するrescue ICSIの適応基準の設定を目的とした。cIVF開始4時間後から卵子をタイムラプスインキュベーターで培養し、得られた観察データを用いて、様々な適応基準の下、rescue ICSI対象卵子を抽出した。抽出した卵子のうち、cIVFで正常受精しており、本来rescue ICSIを実施すべきではない卵子の割合(rescue ICSI非推奨卵率)を調査した。適応基準は、極体観察時間(cIVF 4, 5, 6, 7, 8時間目)と第二極体放出卵の割合(0% / 0～30% / 100%未満)を組み合わせて設定した。rescue ICSI非推奨卵率は極体観察を4時間目とした場合、37.4～40.8%であったが、8時間目ではほぼ0%になることが分かった。一方、第二極体放出卵の割合でrescue ICSI非推奨卵率に有意差は認められなかった。今回の結果から、rescue ICSIの人為的多精子受精を低減するには、極体観察時間を遅くすることが有効であると判明した。

キーワード：rescue ICSI, 人為的多精子受精, 適応基準

Abstract: The aim of this study was to establish the decision criteria for rescue ICSI reducing the risk of artificial polyspermy. Oocytes were cultured in a time-lapse incubator 4 hours after conventional IVF (cIVF). Then, the target oocytes for rescue ICSI were selected based on various decision criteria using data obtained by a time-lapse imaging system. The rate of normally fertilized oocytes following cIVF among the selected oocytes was examined for the risk rate of artificial polyspermy. The decision criteria were a combination of the appearance time of the second polar body (4, 5, 6, 7 or 8 h after cIVF) and the ratio of the oocytes extruding the second polar body (0% / 0~30% / less than 100%). When the appearance time of the second polar body was 4 h after cIVF, the risk rate range of artificial polyspermy was 37.4~40.8%; however, this rate decreased to nearly 0% when the appearance time was 8 h after cIVF. On the other hand, the risk rates of artificial polyspermy were not significantly different among the ratio categories of oocytes extruding the second polar body. These results indicate that a longer time to the appearance of the second polar body effectively reduces the risk of artificial polyspermy after rescue ICSI.

Key words: Rescue ICSI, Artificial polyspermy, Decision criteria

(受付 2019年12月17日 / 受理 2020年2月8日)

別刷請求先：〒983-0864 宮城県仙台市宮城野区名掛丁206-13 仙台ARTクリニック

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: labo@sendai-art-cl.jp

はじめに

生殖補助医療の臨床現場において、conventional IVF（以後、cIVF）後に1個も受精卵が得られない完全受精障害はおよそ10%の割合でみられると報告されている^{1,2)}。受精障害を回避する方法としてrescue ICSIが用いられているが、rescue ICSIの適応を判断する基準は各施設で独自に設定していることが多い。過去の報告におけるrescue ICSIの適応基準を表1に示した³⁻⁸⁾。Rescue ICSI適応の判断をするうえで重要なポイントとして、1つ目に受精兆候の指標となる第二極体の放出を観察するタイミングがあげられる。過去の報告では、cIVFから6時間後に観察しているものが多い^{4,7)}が、早いものでは4時間後に観察しrescue ICSIを行っている報告³⁾もある。ポイントの2つ目として、極体観察時の第二極体放出卵の割合があげられる。これまでの報告では、第二極体放出卵の割合が0%の症例（完全受精障害を疑う症例）のみを対象としている報告^{3,4)}から、100%未満の症例（第二極体を放出していない成熟卵の全て）を対象としている報告⁷⁾まで幅広い。

一方で、rescue ICSIを行う際に注意すべきことには、先に行われたcIVFによって正常受精が成立しているにも関わらず、それに気づかずにrescue ICSIを実施することで、人為的に多精子受精胚を作出するリスクがあげられる。人為的多精子受精胚を作出する割合は、rescue ICSI適応基準の内容如何によって大きく左右されるものと予想されるが、適応基準の検討についての報告^{8,9)}は少ない。

当院ではcIVFを4時間で行っており、媒精終了直後から全ての成熟卵子をタイムラプスインキュベーターで培養し、第二極体の放出と前核形成について観察している。この既存のタイムラプスデータを用い、様々な適応基準の下でrescue ICSI対象卵を抽出し、それらの対象卵のうち、cIVFで正常受精していた割合を調査することで、人為的多精子受精胚作出のリスクを評価することができると考えた。

そこで今回我々は、rescue ICSIによる人為的多精子受精胚を防ぐ適応基準の設定を目的として検討を行った。まず検討1では、タイムラプス観察によって第二極体が放出される時間を調査し、その後の受精と胚発生について調査した。次に検討2では、検討1で得られたデータを用いて、様々な

適応基準の下でrescue ICSI対象卵を抽出し、cIVFで正常受精していた割合を調査した。

対象と方法

当院で2017年7月から2019年7月に、cIVFを行った376症例437周期（平均年齢35.9歳）で得られた卵子のうち、媒精終了時点（cIVF開始4時間後）で成熟していた1,481個の卵子を対象とした。なお、本研究は臨床研究の倫理指針に従い、仙台ARTクリニックの倫理委員会の承認を受け、研究情報の公開や患者情報の取り扱いについてはオプトアウトの手続きにより行った。

卵巣刺激はGnRHアンタゴニスト法、クロミフェン+hMG法、自然周期法を各患者の卵巣予備能に合わせて適宜選択して行い、GnRHアゴニストまたはhCG投与から34時間後に経膈超音波下で採卵を行った。回収した卵子は媒精まで2~3時間の前培養を行った。精子は密度勾配遠心法を用いて洗浄濃縮を行った。受精方法は、患者の希望、精液検査結果、洗浄濃縮後の精子の状態、前回の治療結果をもとに患者と医師との相談のうえ、選択した。前培養後の卵子は、濃度を 8×10^4 個/mlに調整した精子とともに、500 μ l/wellの培養液に卵子を1~4個ずつ入れ、4時間の媒精を行った。媒精終了後、卵子周囲の卵丘細胞を除去し、極体の個数を確認してからタイムラプスインキュベーター（CCM-iBIS, ASTEC, 日本）内で培養を行った。タイムラプス培養中は、z軸と水平に10 μ m間隔で11横断面の撮影を15分おきに行った。培養は、前培養から媒精20時間後までは5% HSA-solution (Vitrolife, Sweden) 添加 Quinn's advantage fertilization medium (Sage, USA) を用い、その後6日間はSAGE 1-Step (Sage) またはONESTEP メディウム (ナカメディカル, 日本) を用いて、37°C, 6% CO₂, 5% O₂, 89% N₂環境下で行った。

検討1 : cIVF後の第二極体放出時間の観察とその後の胚発生の調査

媒精終了時点で極体が2個存在する卵子と受精最終判定時（媒精20時間後）までに第二極体の放出が見られた卵子を第二極体放出卵として、累積の第二極体放出卵率を調査した。さらに、第二極体放出時間で6群（媒精開始から4時間以内、

表1 これまでの報告におけるrescue ICSIの適応基準

極体観察時間 ^{*1}	第二極体放出卵の割合 ^{*2}	著者 / 発表年
4時間目	0% (完全受精障害を疑う症例のみに実施)	Jinら ³⁾ / 2014年
6時間目	0% (完全受精障害を疑う症例のみに実施)	Chenら ⁴⁾ / 2003年
6時間目	0 ~ 30%	Guoら ⁵⁾ / 2017年
6時間目	0 ~ 30%	後藤ら ⁶⁾ / 2014年
6時間目	100% 未満(第二極体の放出が見られない全ての成熟卵に実施)	芝原ら ⁷⁾ / 2010年
7時間目	0 ~ 50% / 0 ~ 30% ^{*3}	清水ら ⁸⁾ / 2010年

^{*1} 第二極体の観察を行いrescue ICSIを行った時間、^{*2} 周期ごとに得られた成熟卵子のうち第二極体が放出した卵子の割合、^{*3} 著書内で0 ~ 50%の群と0 ~ 30%の群で比較を実施。

4時間超～5時間以内, 5時間超～6時間以内, 6時間超～7時間以内, 7時間超～8時間以内, 8時間超～20時間以内)に分け, 正常受精率(2個の前核と2個の極体を有する卵子の割合), 1前核形成率, 3前核形成率, 分割率, 総胚盤胞発生率を調査した。さらに, 正常受精率と総胚盤胞発生率については患者年齢が交絡因子となりうる可能性を考慮し, 第二極体放出時間と患者年齢を説明変数としてロジスティック回帰分析を行った。受精の判定はタイムラプス画像にて行い, 受精最終判定時までの前核と極体の数で評価した。

検討2: 様々な適応基準の下で抽出したrescue ICSI対象卵子における人為的多精子受精胚作製の可能性についての検討(図1)

検討1で得られたタイムラプスデータを用い, 様々な適応基準の下, rescue ICSIの対象となる卵子を抽出した。Rescue ICSI対象卵のうち, cIVFで正常受精した卵子をrescue ICSIによって人為的に多精子受精を引き起こす可能性があり, 本来ならrescue ICSIを実施するべきではない卵子として, その割合(以後, rescue ICSI非推奨卵率)を比較検討した。rescue ICSIの適応基準には, 極体を観察する時間と, その時点での第二極体放出卵の割合を用いた。極体を観察する時間は, 媒精開始から4, 5, 6, 7, 8時間目に設定した。第二極体放出卵の割合は, 0%, 0～30%, 100%未満と設定し, 各時間でそれぞれの基準に該当する症例の第二極体を放出していない卵子を, rescue ICSI対象卵とし

て抽出した。なお, 第二極体放出卵の割合について補足すると, 0%は完全受精障害が疑われる症例, 0～30%は完全受精障害と受精率が30%以下の低受精率症例, 100%未満は受精していない全ての成熟卵子に対してそれぞれrescue ICSIを実施することを想定して設定した。

統計解析には前述のロジスティック回帰分析の他に, フィッシャーの正確確率検定とボンフェローニの多重比較検定を用い, 有意水準を5%として有意差検定を行なった。




結果






検討1

cIVF終了(媒精開始4時間後)の時点で成熟していた1,481個の卵子のうち, 受精最終判定時(媒精20時間後)までに第二極体を放出した卵子の割合は1,288個(87.0%)であった。さらに, 第二極体放出卵のうち, 累積の第二極体放出率は4時間以内では84.7%, 5時間以内では92.7%, 6時間以内では97.6%, 7時間以内では99.1%, 8時間以内では99.5%であった(表2)。8時間目以降に第二極体を放出した卵子の放出時間と個数は, 10時間目に2個, 11時間目に2個, 14時間目に1個, 17時間目に2個であった。

正常受精率, 1前核形成率, 3前核形成率, 分割率, 総胚盤胞発生率において, 第二極体放出時間別の成績に有意な差は認められなかった(表2)。今回, 胚盤胞に成長した胚のうち, 最も遅く第二極体を放出した卵子は媒精から7時間45分後に第二極体を放出しており, 胚移植後に妊娠, 出産

(例) rescue ICSIの適応基準として極体観察時間を4時間、第二極体放出卵の割合を0～30%と設定した場合

-  : 観察時に1PBであり、受精判定時に正常受精と判定された卵子
-  : 観察時に1PBであり、受精判定時に正常受精以外(未受精、異常受精等)と判定された卵子
-  : 観察時に2PBであった卵子

症例	卵子の状態と個数	第二極体放出卵の割合	rescue ICSI適応基準	rescue ICSI対象卵子	非対象卵子	rescue ICSI非推奨卵率 [*]
A	1PB x3 個 2PB x0 個	0% (0/3)	該当			0% (0/3)
B	1PB x3 個 2PB x1 個	25.0% (1/4)	該当			33.3% (2/3)
C	1PB x2 個 2PB x1 個	33.3% (1/3)	該当せず			—
D	1PB x0 個 2PB x3 個	100% (3/3)	該当せず			—

^{*} 適応基準に該当する症例の第二極体を放出していない成熟卵子をrescue ICSI対象卵子として抽出し, それらの卵子のうちcIVFで正常受精した卵子(図中の黒塗り卵子)の割合を, rescue ICSI非推奨卵率として比較検討した。

図1 rescue ICSI対象卵抽出とrescue ICSI非推奨卵率の例

表2 第二極体放出時間別の臨床成績

	第二極体放出時間(cIVF開始～)						合計
	4時間以内	4時間超～ 5時間以内	5時間超～ 6時間以内	6時間超～ 7時間以内	7時間超～ 8時間以内	8時間超～ 20時間以内	
第二極体放出卵数	1,091	103	63	20	4	7	1,288
累積の第二極体放出卵率 ^{*1}	84.7%	92.7%	97.6%	99.1%	99.5%	100.0%	-
正常受精率(個)	81.0% (884)	82.5% (85)	85.7% (54)	80.0% (16)	50.0% (2)	28.6% (2)	81.0% (1,043)
1前核形成率(個)	2.8% (31)	4.9% (5)	6.3% (4)	5.0% (1)	0% (0)	14.3% (1)	3.3% (42)
3前核形成率(個)	11.1% (121)	7.8% (8)	6.3% (4)	5.0% (1)	25.0% (1)	28.6% (2)	10.6% (137)
分割率(個)	98.0% (866)	98.8% (84)	92.6% (50)	93.8% (15)	100.0% (2)	50.0% (1)	97.6% (1,018)
Day3以降培養胚数	787	70	44	14	1	1	917
総胚盤胞発生率(個)	66.2% (521)	57.1% (40)	56.8% (25)	50.0% (7)	100.0% (1)	0% (0)	64.8% (594)

^{*1} 全ての第二極体放出卵数 1,288 個あたり。

表3 第二極体放出時間と患者年齢が正常受精の成立に及ぼす影響

	係数	標準誤差	Odds比	95%信頼区間	P値
第二極体放出時間(分)	-0.003	0.001	0.997	0.994-0.999	0.014
患者年齢	-0.025	0.019	0.975	0.940-1.010	0.172

サンプルサイズ：正常受精胚 1,043 個 / 非正常受精胚 245 個。

表4 第二極体放出時間と患者年齢が胚盤胞発生に及ぼす影響

	係数	標準誤差	Odds比	95%信頼区間	P値
第二極体放出時間(分)	-0.004	0.002	0.996	0.992-1.00	0.093
患者年齢	-0.047	0.018	0.955	0.922-0.989	0.009

サンプルサイズ：胚盤胞発生胚 594 個 / 非発生胚 323 個。

表5 様々な適応基準の下で抽出した rescue ICSI 対象卵子の rescue ICSI 非推奨卵率^{**}

rescue ICSIの適応基準	極体観察時間				
	4時間目	5時間目	6時間目	7時間目	8時間目
第二極体放出卵の割合					
0%	38.9% ^a (51/131) 59周期	18.2% ^b (14/77) 35周期	8.2% ^{bc} (4/49) 23周期	4.3% ^{bc} (2/46) 21周期	0% ^c (0/41) 19周期
0～30%	37.4% ^a (68/182) 72周期	15.0% ^b (15/100) 40周期	6.3% ^{bc} (5/79) 30周期	2.8% ^c (2/72) 27周期	0% ^c (0/70) 26周期
100%未満	40.8% ^a (159/390) 223周期	25.8% ^b (74/287) 178周期	8.9% ^c (20/224) 143周期	2.0% ^d (4/204) 127周期	1.0% ^d (2/200) 125周期

^{a-d} 第二極体放出卵の割合別に、異符号間に有意差あり ($P < 0.05$)。

^{**} rescue ICSI 非推奨卵率；rescue ICSI 対象卵子として抽出した卵子のうち cIVF で正常受精した卵子の割合。上段は rescue ICSI 非推奨卵率 (cIVF で正常受精した卵子数 / rescue ICSI 対象卵子数)、下段は rescue ICSI 対象卵を含む周期の数。

まで至っている。

また、今回の対象卵のうち、第二極体の放出が認められず 1 個の極体と 2 個の前核を有する卵子は 3 個観察された。

ロジスティック回帰分析を用いて、第二極体放出時間と患者年齢が正常受精の成否と胚盤胞への発生に及ぼす影響について調べたところ、正常受精の成否については第二極体放出時間 ($P=0.014$) が有意に影響を及ぼす因子であった

(表3)。一方、胚盤胞への発生については患者年齢 ($P=0.009$) が有意に影響を及ぼす因子であった (表4)。

検討2

様々な適応基準の下で抽出した rescue ICSI 対象卵子の rescue ICSI 非推奨卵率を表5に示した。

適応基準のうち、第二極体放出卵の割合を 0% に設定した

時、極体観察時間別のrescue ICSI非推奨卵率は、4時間目が38.9%、5時間目が18.2%、6時間目が8.2%、7時間目が4.3%、8時間目が0%であり、4時間目は5、6、7、8時間目と比較して、5時間目は8時間目と比較してそれぞれ有意に高かった ($P < 0.05$)。

第二極体放出卵の割合を0～30%に設定した時、極体観察時間別のrescue ICSI非推奨卵率は、4時間目が37.4%、5時間目が15.0%、6時間目が6.3%、7時間目が2.8%、8時間目が0%であり、4時間目は5、6、7、8時間目と比較して、5時間目は7、8時間目と比較してそれぞれ有意に高かった ($P < 0.05$)。

第二極体放出卵の割合を100%未満に設定した時、極体観察時間別のrescue ICSI非推奨卵率は、4時間目が40.8%、5時間目が25.8%、6時間目が8.9%、7時間目が2.0%、8時間目が1.0%であり、4時間目は5、6、7、8時間目と比較して、5時間目は6、7、8時間目と比較して、6時間目は7、8時間目と比較してそれぞれ有意に高かった ($P < 0.05$)。

一方、それぞれの極体観察時間別に、第二極体放出卵の割合 (0% / 0～30% / 100% 未満) でrescue ICSI非推奨卵率を比較すると、それぞれの割合に有意な差は認められなかった。

考 察

今回我々は、第二極体が放出される時間についてタイムラプスインキュベーターを用いて観察し、そのデータを基に、人為的な多精子受精胚作出のリスクが少ないrescue ICSIの適応基準を設定すべく検討を行った。

一般的に、第二極体の放出を受精の兆候ととらえ、rescue ICSIを実施するかどうか判断している。そのため、rescue ICSIを実施するタイミングを決めるうえで、cIVFで媒精した卵子が何時間後に第二極体を放出するか把握することが重要であるが、それについての報告は少ない。鈴木ら¹⁰⁾は媒精開始4時間目から6時間目まで1時間おきに第二極体の有無を観察し、媒精開始4時間目の時点で成熟していた卵子の68.1%が、媒精開始6時間目までに第二極体を放出すると報告している。一方で、媒精開始6時間目の時点で第二極体を放出していない卵子でも、その後正常受精を確認できた卵子があることも報告している¹⁰⁾。このことから今回我々は、人為的な多精子受精のリスクを減らすためには、媒精開始6時間目以降も観察を続け、さらに詳細な第二極体放出時間のデータを作成する必要があると考えた。今回の結果から、媒精開始から20時間目までに第二極体を放出した卵子のうち、97.6%の卵子が媒精6時間以内に第二極体を放出しており、残りの2.4%は6時間目以降に第二極体を放出していた (表2)。さらに、今回の対象卵子のなかで、媒精から7時間45分後に第二極体を放出した卵子が、胚盤胞まで成長し、胚移植後に妊娠、出産まで至っている。一方で、媒精8時間目以降に第二極体を放出した卵子は、媒精8時間目までに第二極体を放出した卵子と比較して、有意差はないものの受精率や分割率が低く、胚盤胞まで発生した胚はなかった (表2)。これらの結果から、媒精8時間目ごろまでに第二極体を放出した

卵子は、胚盤胞への発生能があり、妊孕能を有する卵子が存在することが判明した。そのため、rescue ICSIの実施時間を早めることで、このような卵子に対してrescue ICSIを実施してしまう可能性があり、慎重にrescue ICSIの適応基準を設定する必要があると考える。

通常のICSIと比較してrescue ICSIでは、3前核形成率が有意に上昇する可能性があることが報告されており¹¹⁾、人為的に多精子受精胚を作出している可能性が考えられる。人為的な多精子受精を引き起こす主な原因として、以下のような事象が考えられる。第一番目には第二極体の存在を見逃し、未受精卵と判断してrescue ICSIを実施する場合である。これについては、タイムラプスインキュベーターを用い、第二極体が放出される時期を連続的に観察することで、極体の放出を見逃す可能性はかなり低く抑えられると考える。しかし、今回の研究では、媒精終了時点 (媒精開始4時間目の時点) ですでに多くの卵子が第二極体の放出を完了しており、第二極体放出の瞬間を確認できた卵子は15%程度であった。Mio¹²⁾は、cIVF実施から平均2.7時間後に第二極体が放出されると報告しており、媒精時間を2時間程度に短縮することで、多くの卵子で第二極体の放出が観察できると推測する。また、多くの卵子の第二極体放出を観察できることは、培養中に第一極体が分裂、あるいはフラグメント化するような、極体の数を誤判定してしまう可能性が高い卵子の受精判定も容易になるかもしれない。今回の結果では、媒精終了時点で既に極体放出が完了していた1,091個の卵子のうち、1,036個 (95.0%) が1個以上の前核を有していたが、残りの55個 (5.0%) のなかには極体数を誤って多く判定した卵子が存在した可能性も考えられる。媒精時間を短縮することで、このような極体数を多く誤判定してしまう卵子も減るのではないかと推測する。ただし、媒精時間を短縮することは、胚発生能や妊娠率を改善するという報告がある^{13,14)}一方で、受精率や胚盤胞発生率が低下するという報告もある¹⁵⁾ため、媒精時間を短縮する際は十分な注意が必要である。

第二番目には、cIVFにより精子は卵子内に侵入したが、第二極体放出前に発生停止した卵子にrescue ICSIを実施することで、卵子の活性化が起こり、cIVF由来精子とrescue ICSI由来精子の前核が形成されることが考えられる。Raweら¹⁶⁾はcIVF後の未受精卵のうち、およそ35%の卵子に精子侵入が認められたと報告しており、このような卵子にrescue ICSIを行うことで、多精子受精となってしまうことが予想される。しかし、第二極体放出前に発生停止した場合、卵子の外見から精子の侵入を判断することは困難であり、現段階でこの原因に起因する多精子受精を回避するのは難しいと考える。

第三番目には、受精の進行が遅れている卵子に対して、第二極体の放出前にrescue ICSIを実施することで生じることがあげられる。これについてはrescue ICSIの適応基準を調整することで人為的な多精子受精のリスクを低下させることが可能と考える。今回の研究ではrescue ICSIの適応基準と

して、極体を観察する時間と、その時点での第二極体放出卵の割合に焦点を絞り、人為的多精子受精のリスクが少ない適応基準の設定を試みた。

極体を観察する時間について今回の結果から、cIVF開始4時間目に極体観察を行った場合、第二極体放出卵の割合に関係なく、rescue ICSI対象卵子として抽出した卵子の約40%はcIVFで正常受精しており、人為的多精子受精のリスクが高いことが分かった。また、rescue ICSI非推奨卵率は極体観察時間を遅らせると減少し、8時間目に極体観察を行い、第二極体放出卵の割合を0～30%または0%に設定した場合に初めて0%となることも分かった。このことから、cIVF開始から7時間目までにrescue ICSIを行うと、通常のICSIと比較して3前核形成率が上昇することが予測される。しかし、Jinら³⁾はcIVF開始から4時間後に、第二極体の放出が全く見られず完全受精障害を疑われる症例(第二極体放出卵の割合が0%の症例)に対しrescue ICSIを実施し、3前核形成率が通常のICSIと比較して有意に上昇しないことを報告している。今回の結果から、考えられた予測と彼らの結果との相違の理由は明らかではないが、症例あたりの卵子数(本研究; 3.4個, Jinらの報告; 12.2個)のような、症例の背景に起因しているのではないかと推測する。

清水ら⁸⁾は、rescue ICSIの適応基準の第二極体放出卵の割合を50%未満から30%未満に変更することで、3前核形成率が通常ICSIと同程度まで低下することを示し、適応基準を狭めることが人為的多精子受精胚の減少につながる可能性を報告している。Caoら⁹⁾も同様の結果を報告しており、第二極体放出卵の割合が0%のグループと、25～50%のグループにrescue ICSIを行った場合、25～50%のグループの方が3前核形成率が有意に高かったとしている。しかし、今回の結果では、第二極体放出卵の割合でrescue ICSI非推奨卵率に差はなかった。これらのことから、第二極体放出卵の割合が比較的高い症例の方が、第二極体放出の見逃しや、受精の過程が卵子内へ精子侵入後、第二極体放出前に停止している卵子が多いことが推察される。一方で今回の結果では、第二極体放出卵の割合について適応基準を上げると、人為的多精子受精の危険性のある卵子の“割合”に差はないものの、rescue ICSI実施数が増えるため人為的多精子受精の危険性のある卵子の“数”は増加する。そのため、人為的多精子受精胚作出のリスクを減らすには、第二極体放出卵の割合は低く設定し、適応基準を狭めた方が良く考える。

今回の検討では、(1)第二極体を放出する卵子のうち、99.5%の卵子がcIVF開始8時間目までに第二極体を放出すること、(2)cIVF開始8時間目までに第二極体を放出した卵子には、胚盤胞への発生能や妊娠能を有している卵子が存在すること、(3)rescue ICSIによる人為的多精子受精作出のリスクをなくすには、cIVF開始8時間目以降に第二極体放出卵の割合が30%以下の症例に実施する必要があること、という3点が判明した。しかしながら、受精のタイミングを遅らせることで卵質の低下による胚発生能の低下が懸

念される¹⁷⁾ため、如何に早く受精兆候を捉え、rescue ICSIを実施するかが重要である。また、実際にrescue ICSIを実施する際には、得られた成熟卵子数で実施制限をかけたり、polscopeで紡錘体の有無を確認することで受精兆候の判定精度を向上させる^{5,7)}など、さらなる工夫と検討が必要と考える。

文 献

- 1) Barlow, P., Englert, Y., Puissant, F., Lejeune, B., Delvigne, A., Van Rysselberge, M. and Leroy, F. (1990): Fertilization failure in IVF: why and what next? *Hum. Reprod.*, 5, 451–456.
- 2) 山本新吾・西山和加子・有馬 薫・野見山真理・小島加代子 (2014): 媒精7時間後に行うrescue ICSIの有効性。受精着床誌, 31: 5–9.
- 3) Jin, H., Shu, Y., Dai, S., Peng, Z., Shi, S. and Sun, Y. (2014): The value of second polar body detection 4 hours after insemination and early rescue ICSI in preventing complete fertilisation failure in patients with borderline semen. *Reprod. Fertil. Dev.*, 26, 346–350.
- 4) Chen, C. and Kattera, S. (2003): Rescue ICSI of oocytes that failed to extrude the second polar body 6 h post-insemination in conventional IVF. *Hum. Reprod.*, 18, 2118–2121.
- 5) Guo, Y., Liu, W., Wang, Y., Pan, J., Liang, S., Ruan, J. and Teng, X. (2017): Polarization microscopy imaging for the identification of unfertilized oocytes after short-term insemination. *Fertil. Steril.*, 108, 78–83.
- 6) 後藤優介・緒方洋美・古橋孝祐・片田雄也・角本知世・梶原綾乃・十倉陽子・山田 聡・緒方誠司・水澤友利・松本由紀子・岡本恵理・苔口昭次・塩谷雅英 (2014): 受精障害に対するRescue ICSIの臨床的有効性の検討。受精着床誌, 31: 10–14.
- 7) 芝原隆司・川戸浩明・深作 悠・箕浦博之 (2010): rescue ICSIでの3PN率の低減方法 —卵の成熟度とPolscopeを用いて—。受精着床誌, 27: 142–146.
- 8) 清水雅司・長嶋有希子・塔本果奈絵・村田泰隆・金山尚裕 (2010): Rescue ICSI適応基準の検討。受精着床誌, 27: 33–36.
- 9) Cao, S., Wu, X., Zhao, C., Zhou, L., Zhang, J. and Ling, X. (2016): Determining the need for rescue intracytoplasmic sperm injection in partial fertilisation failure during a conventional IVF cycle. *Andrologia*, 48, 1138–1144.
- 10) 鈴木孝明・森本 誠・竹内茂人・高倉哲司・菅谷 健 (2008): 媒精後の経時的極体観察による受精予測。受精着床誌, 25: 77–80.
- 11) 古橋孝祐・矢田桃子・辻 優大・大月純子・岩崎利郎・伊藤宏一・水澤友利・松本由紀子・苔口昭次・塩谷雅英 (2017): 受精障害に対するrescue-ICSIの培養成績及び胚移植成績について。日本IVF学会雑誌, 20: 3–7.
- 12) Mio, Y. (2006): Morphological analysis of human embryonic development using time-lapse cinematography. *J. Mamm. Ova Res.*, 23, 27–35.
- 13) 中村早智子・荒井美佳・森 悟子・森 泰宏 (2010): 体外受精胚発生における媒精時間短縮の影響について。日

- 本臨床エンブリオロジスト学会雑誌, 12: 50–52.
- 14) Zhang, X.D., Liu, J.X., Liu, W.W., Gao, Y., Han, W., Xiong, S., Wu, L.H. and Huang, GN. (2013): Time of insemination culture and outcomes of in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 19, 685–695.
 - 15) 中村忠治・黄木詩麗・萩原千加子・穴久保久誉・倉田由紀・多賀幸希・道場生基・矢内原敦 (2015) : 媒精法における最適な媒精時間の検討. *受精着床誌*, 32: 223–227.
 - 16) Rawe, V.Y., Olmedo, S.B., Nodar, F.N., Doncel, G.D., Acosta, A.A. and Vitullo, A.D. (2000): Cytoskeletal organization defects and abortive activation in human oocytes after IVF and ICSI failure. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 510–516.
 - 17) Yanagida, K., Yazawa, H., Katayose, H., Suzuki, K., Hoshi, K. and Sato, A. (1998): Influence of oocyte preincubation time on fertilization after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 13, 2223–2226.