

—原著—

細胞膜破膜方法がICSIの受精と胚発生に及ぼす影響 —吸引とPIEZO刺激による細胞膜破膜方法の比較—

Effects of membrane rupture technique in intracytoplasmic sperm injection on fertilization and embryonic development: A comparison of membrane rupture via aspiration and piezo-actuated stimulation

林 奈穂子^{1*}・芝原 隆司¹・深作 悠¹・宮崎 望¹・箕浦 博之¹・川戸 浩明²
Naoko Hayashi^{1*}, Takashi Shibahara¹, Yuu Fukasaku¹, Nozomi Miyazaki¹, Hiroyuki Minoura¹ and Hiroaki Kawato²

¹みのうらレディースクリニック 〒510-0256 鈴鹿市

²川戸レディースクリニック 〒510-0007 四日市市

¹Minoura Ladies Clinic, 3-9-17 Isoyama, Suzuka, Mie 510-0256, Japan

²Kawato Ladies Clinic, 1-16-11 Betumei, Yokkaichi, Mie 510-0007, Japan

要旨：PIEZO-ICSI法は、透明帯貫通時の卵への負荷が軽減し、受精率は向上するとされる。しかし、細胞膜破膜時のPIEZO使用の効果に言及した報告は少ない。そこで、透明帯貫通はPIEZOを使用し、細胞膜破膜を吸引（P-吸引法）あるいはPIEZO刺激（PIEZO法）で行い、受精率と胚発生と着床率および流産率を検討した。胚発生はPIEZO法で優位に良好であった。受精率と着床率、流産率には差を認めなかった。ICSI全症例での透明帯貫通後の手技行程（細胞膜破膜までに針を進めた距離・細胞質吸引量・精子排出の難容・精子排出時の針の動き）がICSIの成績に及ぼす影響においても検討した。細胞質吸引量が胚発生に最も強く影響した。PIEZO法は、P-吸引法より細胞膜破膜の際の細胞質吸引量が少なく、それが胚発生の向上につながったと考えられた。したがって、透明帯貫通と細胞膜破膜にPIEZOを使用するPIEZO-ICSIは良好な成績を得られる方法である。

キーワード：ICSI, PIEZO-ICSI, 細胞膜破膜

Abstract: The piezo-actuated intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique is thought to minimize damage to the oocyte during zona pellucida penetration and to improve fertilization rates. However, only a few studies have described the effects of using a piezo micromanipulator during cell membrane rupture. Therefore, in this study, zona pellucida penetration was performed using a piezo micromanipulator, and cell membrane rupture was performed via aspiration (P-aspiration group) or piezo-actuated stimulation (Piezo group). The blastocyst formation rate was significantly higher in the Piezo group than in the P-aspiration group. Fertilization rates, implantation rates, and miscarriage rates were not different between the two groups. The effects of the procedure after zona pellucida penetration for all cases undergoing ICSI (the distance that the needle was advanced to elicit cell membrane rupture, aspirated volume of cytoplasm, difficulty in sperm discharge and the movement of the needle during sperm discharge) were also evaluated. The aspirated volume of cytoplasm had the strongest effect on embryo development and was significantly smaller in the Piezo group than in the P-aspiration group, resulting in improved embryo development. Thus, our study showed that the piezo-actuated ICSI technique using a piezo micromanipulator for zona pellucida penetration and cell membrane rupture is associated with favorable results.

Key words: ICSI, piezo-ICSI, Cell membrane rupture

（受付 2020年3月22日／受理 2020年6月3日）

別刷請求先：〒510-0256 三重県鈴鹿市磯山3-9-17 みのうらレディースクリニック

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: support@minouralc.com

はじめに

1992年にPalermoらによって、人での妊娠例が報告されて以来¹⁾、ICSI (卵細胞質内精子注入法)は現在では不妊治療において重要な技術となっている。しかし、conventional-IVF (c-IVF) に比べ、ICSIは卵細胞質に物理的負荷をかける。現在主流となっているconventional-ICSI (c-ICSI)法は、精子をInjection針に吸引し、透明帯の外側から針を押し進めて貫通させた後、卵細胞質を吸引して破膜させ、精子を注入する。この方法は、透明帯貫通時に卵を大きく変形させることから卵に負荷がかかることとなり、細胞膜の脆弱な卵ではこの時点で破膜してしまい、後に変性の原因ともなる²⁻⁴⁾。

哺乳類では、ウサギ⁵⁾、牛⁶⁾でのc-ICSI法によるICSIでの産仔獲得の成功につづき、1992年にはPalermoらにより人での挙児に成功した¹⁾。しかし、マウスのc-ICSI法によるICSIは非常に困難であったが、1995年にKimuraとYanagimachiは、PIEZO刺激を使用したPIEZO-ICSI法にてICSIによる産仔を成功させた⁷⁾。PIEZO-ICSI法とは、PIEZO (圧電素子)の急速な変化にともなう慣性力を利用してInjection針を振動させることにより、卵を変形させずに透明帯を貫通させた後、細胞質を吸引せずに細胞膜破膜を行う方法である。牛では受精において⁸⁾、馬では受精や胚盤胞の質において⁹⁾、PIEZO-ICSI法がc-ICSI法より良好であるとの報告があるなど、マウスのみならず多くの哺乳動物のICSIや基礎研究に應用されている。また、人でも應用されており、Katayoseら¹⁰⁾やYanagidaら¹¹⁾により、PIEZO-ICSI法ではc-ICSI法よりも、生存率、受精率、妊娠率は良好であり、胚発生 (Day3) においては、差はなかったと報告されている。よって、c-ICSI法よりPIEZO-ICSI法のほうが、透明帯貫通時の卵への物理的負荷を軽減させることにより、良好な結果を得られると考えられた。

また、レーザーによる透明帯菲薄、または透明帯に微小な穴をあけることにより、卵を変形させずに透明帯を貫通させ、c-ICSI法と同様に卵細胞質を吸引して破膜を行うレーザーアシストハッチングシステムを用いたICSI (LA-ICSI法)では、生存率、受精率、胚発生においてc-ICSI法に比べ有意に良好であった、あるいは良好な傾向にあったと報告されている^{2,3,12-15)}。妊娠率においては、良好^{14,15)}と差はない¹²⁾との報告があり、議論が分かれるところである。

また、TakeuchiらはPIEZO刺激を用いて透明帯を貫通させたのち、卵細胞質を吸引して破膜を行う方法でも、透明帯貫通時の卵への負荷を軽減した状態で精子を挿入することが可能となり、c-ICSI法よりも良好な受精や分割卵を得ることができたと報告している¹⁶⁾。

これらのことから、透明帯貫通による卵への負荷の軽減は、卵の生存率や受精や発生に良好な結果をもたらすと考えられ、特に卵の細胞膜が弱い症例においては非常に有効な手段であると思われる。しかし、透明帯貫通の影響をのぞいた、細胞膜破膜時における吸引とPIEZO刺激との比較検討はなされていない。そこで今回、PIEZO刺激により透明

帯を貫通させた後に、卵細胞質を吸引して破膜させる方法 (P-吸引法) と、PIEZO-ICSI法 (PIEZO法) を行い、細胞膜破膜法の違いによる受精率と胚発生および着床率と流産率を比較検討した。また、透明帯貫通後のICSI手技のどの行程が、受精率と胚発生および着床率と流産率に影響を及ぼすかをも合わせて検討した。

対象と方法

P-吸引法は2016年10月～2017年10月の312周期1,013個、PIEZO法は2017年11月～2018年12月の300周期999個のMII卵を対象とし、受精率と胚盤胞到達率および着床率、流産率を比較した。2期間は、37°C、O₂濃度5%、CO₂濃度5%のインキュベーターと一部期間タイムラプスを使用し、同条件にて培養を行った。培養環境による発生への影響がないことを確認するために、c-IVFの同期間での胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率をも比較した。さらに、2期間に施行した採卵周期の条件に差がないことを確認するため、2期間での採卵周期全体の採卵時妻年齢、採卵既往回数、有効採卵数、卵巣刺激方法 (自然周期、低刺激周期と調節卵巣刺激周期) を比較した。

ICSIは技術的な誤差を考慮し、熟練した1名の技師が施行した症例のみを対象とした。破膜の際の卵細胞質吸引量は、破膜の際にInjection針に吸引された卵細胞質の距離で表現した。

Injection針は、ガラス管をプラーで引き延ばした後に外径は約4～4.5 μmの部分で折り、フッ化水素酸で針の先端部分の管壁を薄くして作製し、使用時に外径約4～4.5 μm程度、先端は平坦な状態になるようにHolding針を使用して折った。P-吸引法、PIEZO法ともに同じ仕様の針を使用した。

P-吸引法は、PIEZO刺激を使用して透明帯を貫通した後、Injection針の先端に精子を移動させ、針の先端を細胞膜にあて、ゆっくりとInjection針の先端を卵の直径の中心よりもやや前方に進め、破膜するまで吸引した。吸引位置に針を進めるまでに破膜した場合は、吸引せず破膜した位置から精子を排出した。破膜が確認出来たら、卵細胞質と精子を排出し針を抜くが、精子がスムーズに排出されない場合は、そのまま針を引いて精子を排出するか、5～10 μm程度針を進めてから排出し、針を抜いた。

PIEZO法は、透明帯貫通、Injection針の進め方、精子の排出の行程はP-吸引法と同様であるが、細胞膜破膜の行程が異なり、針を卵の中心よりもやや進めた位置から卵細胞質を5 μm程度吸引し、PIEZO刺激を1回掛けて破膜した。

P-吸引法 (2016/10～2017/10) とPIEZO法 (2017/11～2018/12) の検討期間における採卵周期の採卵時妻年齢、採卵既往回数、有効採卵数、卵巣刺激方法はMann-Whitney検定にて比較した。

P-吸引法とPIEZO法の正常受精率、胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率、着床率、流産率の採卵時妻年齢はMann-Whitney検定にて比較し、正常受精率、胚盤胞到達率、良好

表1 透明帯貫通後のICSIの手技行程での分類

進	破膜までに細胞膜の外側からInjection針を進めた距離	短 長	Injection針を卵の直径の中心に進めるまでに破膜 Injection針を卵の直径の中心よりも進めたところで細胞質を吸引し破膜
吸引量	細胞膜破膜の際の卵細胞質の吸引量	少 多	卵細胞質吸引距離がInjection針先端から15 μm未満 卵細胞質吸引距離がInjection針先端から15 μm以上
排出	細胞膜破膜後精子がInjection針からスムーズに排出されたか否か	易 難	精子の体長の半分以上排出 精子の体長の半分未満排出
針動	精子排出時にInjection針を進めたか否か	無 動	Injection針を動かさずに排出 Injection針を5-10 μ程度進めてから排出

表2 2016/10-2017/10 (P-吸引法検討期間)と2017/11-2018/12 (PIEZO法検討期間)採卵周期の比較

	2016/10-2017/10 (P-吸引法検討期間)	2017/11-2018/12 (PIEZO法検討期間)	P値
採卵周期数	960	940	
採卵時妻平均年齢	36.9	36.6	P=0.10
平均既往採卵回数	3.48	3.42	P=0.88
平均有効採卵数	5.89	5.68	P=0.44
卵巣刺激方法	自然周期, 低刺激周期		
	調節卵巣刺激周期		P=0.06
	242	274	
	718	666	

表3 P-吸引法とPIEZO法で細胞膜破膜を施行した卵の正常受精率と変性率

	ICSI方法		P値
	P-吸引法	PIEZO法	
検討卵数 (ICSI施行卵数)	1,013	999	
採卵時妻平均年齢	35.5	36.1	P=0.001
正常受精率 (%)	81.5 (826/1,013)	83.1 (830/999)	P=0.23
変性率 (%)	2.4 (24/1,013)	2.7 (27/999)	P=0.81

胚盤胞到達率, 着床率, 流産率の比較は, 採卵時妻年齢を説明変数に加えてロジスティック回帰分析にて比較した。着床率, 流産率は, 単一胚盤胞移植を行った症例で検討した。

さらに, 透明帯貫通後のICSIの手技行程を, 細胞膜破膜までにInjection針を進めた距離(進), 細胞膜破膜の際に吸引した卵細胞質の量(吸引量), 細胞膜破膜後にInjection針から卵細胞質内に精子がスムーズに排出されたか否か(排出), 精子排出時にInjection針を進めたか否か(針動)の4つに分け, それぞれを2つの群に分類した(表1)。4つの行程および採卵時妻年齢を説明変数として, ICSI症例全体においてのICSI手技各行程と正常受精率, 胚盤胞到達率, 良好胚盤胞到達率, 着床率との関係をロジスティック回帰分析で検討した。流産率においては, 症例数が少なく, データが分散してしまったため, 検討は行わなかった。

胚盤胞はGardnerの分類により評価しており, 3BB以上と評価した胚を良好胚盤胞とした。

統計学的解析による有意差は, $P < 0.05$ をもって有意差ありとした。

倫理的配慮として, 対象となったすべてのご夫婦に体外

受精—胚移植の実施により得られた知見は論文などで発表されることがあることを口頭および文書で説明し, 同意を得た。なお, 本研究は, みのうらレディースクリニック倫理委員会の承認を得て実施した。

結 果

P-吸引法(2016/10~2017/10)とPIEZO法(2017/11~2018/12)検討期間の採卵時妻年齢, 採卵既往回数, 有効採卵数, 卵巣刺激方法に差は認めなかった(表2)。

P-吸引法とPIEZO法の受精と発生および着床における差

正常受精率において, P-吸引法は81.5% (826/1,013), PIEZO法は83.1% (830/999)となり, 変性率においては, P-吸引法は2.4% (24/1,013), PIEZO法は2.7% (27/999)となった。正常受精率と変性率では, 破膜方法による差はなかった(表3)。

胚盤胞到達率において, P-吸引法は63.0% (520/826), PIEZO法は67.8% (563/830)となり, 良好胚盤胞到達率においては, P-吸引法は32.4% (268/826), PIEZO法は

表4 P-吸引法とPIEZO法で細胞膜破膜を施行した卵の胚盤胞到達率と良好胚盤胞到達率

	ICSI方法		P値
	P-吸引法	PIEZO法	
検討卵数 (2PN卵)	826	830	
採卵時妻平均年齢	35.4	35.9	P=0.02
胚盤胞到達率 (%)	63.0 (520/826)	67.8 (563/830)	P=0.02
良好胚盤胞到達率 (%)	32.4 (268/826)	38.8 (322/830)	P=0.01

表5 c-IVFの2016/10–2017/10と2017/11–2018/12での胚盤胞到達率と良好胚盤胞到達率

	c-IVF方法		P値
	2016/10–2017/10 (P-吸引法検討期間)	2017/11–2018/12 (PIEZO法検討期間)	
検討卵数 (2PN卵)	2,195	2,516	
採卵時妻平均年齢	35.6	35.5	P=0.05
胚盤胞到達率 (%)	73.4 (1,611/2,195)	72.1 (1,814/2,516)	P=0.31
良好胚盤胞到達率 (%)	47.7 (1,047/2,195)	46.9 (1,180/2,516)	P=0.59

表6 P-吸引法とPIEZO法で細胞膜破膜を施行した卵を胚盤胞移植した場合の着床率と流産率

	ICSI方法		P値
	P-吸引法	PIEZO法	
胚盤胞移植数	142	70	
採卵時妻平均年齢	35.4	36.6	P=0.13
着床率 (%)	42.3 (60/142)	38.6 (27/70)	P=0.87
流産率 (%)	16.7 (10/60)	18.5 (5/27)	P=0.86

表7 P-吸引法とPIEZO法で細胞膜破膜を施行した卵を良好胚盤胞移植した場合の着床率と流産率

	ICSI方法		P値
	P-吸引法	PIEZO法	
良好胚盤胞移植数	96	48	
採卵時妻平均年齢	34.7	36.5	P=0.03
着床率 (%)	51.0 (49/96)	43.8 (21/48)	P=0.69
流産率 (%)	14.3 (7/49)	9.5 (2/21)	P=0.40

38.8% (322/830) となり、胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率は、PIEZO法が有意に高かった ($P=0.02$, $P=0.01$) (表4)。胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率を比較するにあたり、P-吸引法 (2016/10 ~ 2017/10) と PIEZO 法 (2017/11 ~ 2018/12) 検討期間の培養環境による胚発生への影響がないことを確認するため、2期間でのc-IVFの胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率をも比較した。胚盤胞到達率において、P-吸引法検討期間は73.4% (1,611/2,195)、PIEZO法検討期間は72.1% (1,814/2,516)、良好胚盤胞到達率においては、P-吸引法検討期間は47.7% (1,047/2,195)、PIEZO法検討期間は46.9% (1,180/2,516) となり、差はなかった (表5)。

着床率において、胚盤胞移植ではP-吸引法42.3% (60/142)、PIEZO法は38.6% (27/70) となり、良好胚盤胞移植においては、P-吸引法は51.0% (49/96)、PIEZO法は43.8% (21/48) となった。流産率においては、胚盤胞移植はP-吸引法16.7% (10/60)、PIEZO法は18.5% (5/27) となり、良好胚盤胞移植ではP-吸引法は14.3% (7/49)、PIEZO法は9.5% (2/21) となった。着床率、流産率ともに破膜方法による差は認めなかった (表6, 7)。

ICSI手技行程が受精と発生および妊娠に及ぼす影響

P-吸引法とPIEZO法の透明帯貫通後のICSI手技行程を4

表8 ICSI手技4行程での各項目のP-吸引法とPIEZO法で細胞膜破膜を施行した卵の割合の比較

		P-吸引法での施行率 (%)	PIEZO法での施行率 (%)	P値
進	短	8.1 (82/1,013)	5.7 (57/999)	P=0.24
	長	91.9 (931/1,013)	94.3 (942/999)	
吸引量	少	14.5 (147/1,013)	96.4 (963/999)	P<0.001
	多	85.5 (866/1,013)	3.6 (36/999)	
排出	易	79.3 (803/1,013)	79.6 (795/999)	P=0.86
	難	20.7 (210/1,013)	20.4 (204/999)	
針動	無	86.0 (871/1,013)	84.4 (843/999)	P=0.31
	動	14.0 (142/1,013)	15.6 (156/999)	

表9 ICSI手技行程と正常受精率のロジスティック回帰分析

			正常受精率 (%)	オッズ比	P値
採卵時 妻年齢	P-吸引法	35歳未満	83.3 (325/390)	0.95 (0.93-0.98)	P<0.001
		35歳以上40歳未満	82.1 (316/385)		
		40歳以上	77.7 (185/238)		
	PIEZO法	35歳未満	88.4 (305/345)		
		35歳以上40歳未満	81.8 (297/363)		
		40歳以上	78.4 (228/291)		
進	P-吸引法	短	74.4 (61/82)	2.51 (1.65-3.83)	P<0.001
		長	82.2 (765/931)		
	PIEZO法	短	56.1 (32/57)		
		長	84.7 (798/942)		
吸引量	P-吸引法	少	83.7 (123/147)	0.72 (0.56-0.92)	P=0.008
		多	81.2 (703/866)		
	PIEZO法	少	82.0 (801/963)		
		多	80.6 (29/36)		
排出	P-吸引法	易	82.1 (659/803)	0.96 (0.71-1.30)	P=0.81
		難	79.5 (167/210)		
	PIEZO法	易	83.2 (662/795)		
		難	82.3 (168/204)		
針動	P-吸引法	無	82.1 (715/871)	0.71 (0.51-0.99)	P=0.048
		動	78.2 (111/142)		
	PIEZO法	無	85.1 (717/843)		
		動	72.4 (113/156)		

つに分けた場合のそれぞれの群の施行数を比較した。細胞膜破膜の際の卵細胞質吸引の行程での卵細胞質吸引量において、P-吸引法は少ない群が14.5% (147/1,013)、多い群が85.5% (866/1,013)、PIEZO法では少ない群が96.4% (963/999)、多い群が3.6% (36/999)となり、吸引量の少ない群がPIEZO法において有意に多かった ($P<0.001$)。他の行程においては差を認めなかった (表8)。

ISCI手技の各行程と正常受精率のロジスティック回帰分析は、破膜までに細胞質にInjection針を進めた距離の短い場合が長い場合より有意に低く ($P<0.001$)、破膜の際の卵細胞質吸引量の多い場合が少ない場合より有意に低く

($P=0.008$)、精子排出の際にInjection針を動かした場合は動かさなかった場合より有意に低かった ($P=0.048$)。精子の排出については、精子の半分の長さがスムーズに排出された場合もそれ以下の場合でも差はなかった (表9)。

胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率では、破膜の際の卵細胞質吸引量の多い場合が少ない場合より有意に低かった ($P=0.003$, $P=0.007$) が、他の行程では差はなかった (表10, 11)。

着床率においては、胚盤胞移植、良好胚盤胞移植ともに、どの行程においても差は認めなかった (表12, 13)。

表10 ICSI手技行程と胚盤胞到達率のロジスティック回帰分析

			胚盤胞到達率 (%)	オッズ比	P値
採卵時 妻年齢	P-吸引法	35歳未満	62.8 (204/325)	0.96 (0.94–0.98)	P<0.001
		35歳以上40歳未満	66.5 (210/316)		
		40歳以上	57.3 (106/185)		
	PIEZO法	35歳未満	77.7 (237/305)		
		35歳以上40歳未満	62.9 (187/297)		
		40歳以上	61.8 (141/228)		
進	P-吸引法	短	65.6 (40/61)	1.02 (0.64–1.64)	P=0.94
		長	62.7 (480/765)		
	PIEZO法	短	65.6 (21/32)		
		長	68.4 (546/798)		
吸引量	P-吸引法	少	71.5 (88/123)	0.73 (0.59–0.90)	P=0.003
		多	61.7 (434/703)		
	PIEZO法	少	68.0 (545/801)		
		多	69.0 (20/29)		
排出	P-吸引法	易	63.2 (418/659)	0.98 (0.75–1.29)	P=0.90
		難	61.1 (102/167)		
	PIEZO法	易	68.4 (453/662)		
		難	66.7 (112/168)		
針動	P-吸引法	無	63.9 (457/715)	0.73 (0.53–1.01)	P=0.058
		動	56.8 (63/111)		
	PIEZO法	無	68.9 (494/717)		
		動	62.8 (71/113)		

表11 ICSI手技行程と良好胚盤胞到達率のロジスティック回帰分析

			良好胚盤胞到達率 (%)	オッズ比	P値
採卵時 妻年齢	P-吸引法	35歳未満	37.8 (123/325)	0.92 (0.90–0.94)	P<0.001
		35歳以上40歳未満	34.2 (108/316)		
		40歳以上	20.0 (37/185)		
	PIEZO法	35歳未満	53.1 (162/305)		
		35歳以上40歳未満	35.0 (104/297)		
		40歳以上	24.6 (56/228)		
進	P-吸引法	短	41.0 (25/61)	0.78 (0.49–1.24)	P=0.28
		長	31.8 (243/765)		
	PIEZO法	短	50.0 (16/32)		
		長	38.3 (306/798)		
吸引量	P-吸引法	少	36.6 (45/123)	0.75 (0.60–0.93)	P=0.007
		多	31.7 (223/703)		
	PIEZO法	少	38.8 (311/801)		
		多	37.9 (11/29)		
排出	P-吸引法	易	31.4 (207/659)	1.19 (0.91–1.56)	P=0.20
		難	36.5 (61/167)		
	PIEZO法	易	38.1 (252/662)		
		難	41.7 (70/168)		
針動	P-吸引法	無	32.3 (231/715)	0.97 (0.70–1.34)	P=0.84
		動	33.3 (37/111)		
	PIEZO法	無	37.9 (272/717)		
		動	44.2 (50/113)		

表 12 ICSI手技行程と胚盤胞移植の着床率のロジスティック回帰分析

			胚盤胞着床率 (%)	オッズ比	P値
採卵時 妻年齢	P-吸引法	35歳未満	47.2 (26/53)	0.92 (0.88-0.97)	P<0.001
		35歳以上40歳未満	49.1 (27/55)		
		40歳以上	23.5 (8/34)		
	PIEZO法	35歳未満	52.6 (10/19)		
		35歳以上40歳未満	31.0 (9/29)		
		40歳以上	36.4 (8/22)		
進	P-吸引法	短	54.5 (6/11)	0.52 (0.20-1.34)	P=0.18
		長	41.2 (54/131)		
	PIEZO法	短	66.7 (2/3)		
		長	37.3 (25/67)		
吸引量	P-吸引法	少	48.0 (12/25)	1.07 (0.64-1.77)	P=0.80
		多	41.0 (48/117)		
	PIEZO法	少	37.3 (25/67)		
		多	66.7 (2/3)		
排出	P-吸引法	易	42.7 (47/110)	0.84 (0.45-1.54)	P=0.87
		難	40.6 (13/32)		
	PIEZO法	易	36.5 (23/63)		
		難	57.1 (4/7)		
針動	P-吸引法	無	40.5 (49/121)	1.24 (0.61-2.52)	P=0.55
		動	52.4 (11/21)		
	PIEZO法	無	39.3 (24/61)		
		動	33.3 (3/9)		

表 13 ICSI手技行程と良好胚盤胞移植の着床率のロジスティック回帰分析

			良好胚盤胞着床率 (%)	オッズ比	P値
採卵時 妻年齢	P-吸引法	35歳未満	60.0 (24/40)	0.91 (0.85-0.99)	P=0.02
		35歳以上40歳未満	50.0 (20/40)		
		40歳以上	31.3 (5/16)		
	PIEZO法	35歳未満	61.5 (8/13)		
		35歳以上40歳未満	40.0 (8/20)		
		40歳以上	33.3 (5/15)		
進	P-吸引法	短	55.6 (5/9)	0.48 (0.12-1.91)	P=0.30
		長	50.5 (44/87)		
	PIEZO法	短	33.7 (2/3)		
		長	42.2 (19/45)		
吸引量	P-吸引法	少	57.8 (11/19)	1.17 (0.55-2.46)	P=0.68
		多	49.4 (38/77)		
	PIEZO法	少	41.3 (19/46)		
		多	100.0 (2/2)		
排出	P-吸引法	易	56.6 (37/69)	0.90 (0.36-2.23)	P=0.82
		難	44.4 (12/27)		
	PIEZO法	易	40.9 (18/44)		
		難	75.0 (3/4)		
針動	P-吸引法	無	50.6 (40/79)	0.83 (0.28-2.42)	P=0.73
		動	52.9 (9/17)		
	PIEZO法	無	44.2 (19/43)		
		動	40.0 (2/5)		

考 察

PIEZOを使用する効果には、従来言及されてきた透明体貫通時の卵細胞質への物理的負担の軽減のみならず、細胞膜破膜時の負担軽減が関与することが今回の検討により初めて示唆された。また、透明体貫通後のICSI手技行程を4つに分けた検討では、細胞膜破膜にPIEZOを使用することで細胞質吸引量が有意に減少し、それが胚発生率の上昇につながることを示唆された。

受精率では、P-吸引法とPIEZO法において差はなく、細胞膜破膜にPIEZOを使用する効果は認められなかった。透明帯貫通後のICSI手技行程を分けた検討結果では、細胞膜の脆弱な卵に加え、細胞膜破膜の際の細胞質吸引量が多くなった卵や精子排出時にInjection針を細胞質内で動かした卵、すなわちICSI施行時に卵への物理的な負荷がより大きい場合に受精率は低下した。このことから、卵細胞質への物理的な負荷の大きさが受精率に影響を与えるが、多くの報告にあるように、c-ICSI法よりもPIEZO-ICSI法やLA-ICSI法において受精率が良好となる理由は、透明帯貫通時の卵細胞質への負担軽減によるものと予想された。今回の検討では、P-吸引法とPIEZO法ともに先端が平坦な形状のInjection針を使用し細胞膜破膜を行ったが、c-ICSI法では先端が鋭利な形状のInjection針を使用している。P-吸引法と同様にPIEZO刺激により透明帯を貫通させ、卵細胞膜破膜は先端が鋭利な形状のInjection針を使用して吸引にて行ったTakeuchiらも、受精率はc-ICSI法よりも良好となったと報告しており¹⁶⁾、細胞膜破膜において、Injection針の形状は大きく影響しないと考えられた。よって、良好な受精率を得るためには、透明帯貫通時に卵への負荷が少ない方法を選択すべきである。

胚盤胞到達率、良好胚盤胞到達率は細胞膜破膜にPIEZOを使用した場合に良好となった。ICSI手技行程を分けた検討結果から、細胞膜破膜の際の卵細胞質吸引量の多さが胚発生には最も大きく影響すると考えられた。ICSI時に卵に物理的な負荷をよりかけた場合に胚発生は不良となるが、P-吸引法による細胞膜破膜では吸引圧により細胞膜を破膜するため、85.5%の症例がInjection針の先からの細胞質の吸引距離が15 μm 以上となった。対してPIEZO法では、パルス刺激を1回かけて破膜するため、96.4%の症例で吸引量が15 μm 未満となった。よって、胚発生には、少ない吸引量でも細胞膜破膜ができるPIEZO法がP-吸引法よりも有利であると考えられる。前述にあるように、今回検討を行ったP-吸引法は、c-ICSI法と異なる形状のInjection針を使用しているが、細胞質吸引量が多くなるという点でc-ICSI法と同様であり、胚発生において同等の結果が予想された。しかし、Hiraokaらはc-ICSI法において破膜の際の細胞質の吸引量が少ない症例では、多い症例よりも受精において良好となったが、良好胚盤胞への発生において差はなかったと報告している¹⁷⁾。Hiraokaらの検討では、吸引が少ないとした群では破膜の際の細胞質の吸引距離が細胞質吸引位置から

透明帯の外側まで、多いとされた群ではそれ以上の距離とされている。当院の検討で差を認めたのは、細胞質吸引距離が15 μm 未満と15 μm 以上と少ない吸引量で比較を行ったためであり、発生は、細胞質の吸引量が非常に少ない場合のみ良好となる可能性が大きいと考えられた。

着床率、流産率はPIEZO法とP-吸引法との間に差を認めなかった。胚質が同等であれば、細胞膜破膜の手技によらず着床率や流産率は同等であると考えられた。できるだけ形態良好な胚を選択して移植しているため、着床率には手技による差が出ない。PIEZO法においては胚盤胞移行率が高く、対採卵累積妊娠率の比較では差を認める可能性があるが、非継続妊娠例においてもすべての胚を移植しておらず、その検討はできなかった。

今回の検討により、PIEZO-ICSI法は、他のICSI方法と比較し、卵への負荷が少なく、受精および発生により良好な成績を得ることのできる方法であると示唆された。

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) Abdelmassih, S., Cardoso, J., Abdelmassih, V., Dias, J.A., Abdelmassih, R. and Nagy, Z.P. (2002): Laser-assisted ICSI: a novel approach to obtain higher oocyte survival and embryo quality rates. *Hum. Reprod.*, 17, 2694-2699.
- 3) Rienzi, L., Ubaldi, F., Martinez, F., Minasi, M.G., Iacobelli, M., Ferrero, S., Tesarik, J. and Greco, E. (2004): Clinical application of laser-assisted ICSI: a pilot study. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 115, 77-79.
- 4) Rienzi, L., Greco, E., Ubaldi, F., Iacobelli, M., Martinez, F. and Tesarik, J. (2001): Laser-assisted intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*, 76, 1045-1047.
- 5) Hosoi, Y., Miyake, M., Utsumi, K. and Iritani, A. (1998): Development of rabbit oocyte after microinjection of spermatozoa. *Proceedings of 11th International Congress of American Reproduction*, abs. 331.
- 6) Goto, K., Kinoshita, A., Takuma, Y. and Ogawa, K. (1990): Fertilization of bovine oocyte by the injection of immobilised, killed spermatozoa. *Vet. Rec.*, 127, 517-520.
- 7) Kimura, Y. and Yanagimachi, R. (1995): Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 52, 709-720.
- 8) Katayose, H., Yanagida, K., Shinoki, T., Kawahara, T., Horiuchi, T. and Sato, A. (1999): Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a Piezo-driven pipette. *Theriogenology*, 52, 1215-1224.
- 9) Salgado, R.M., Brom-de-Luna, J.G., Resende, H.L., Canesin, H.S. and Hinrichs, K. (2018): Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in

- the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 35, 825–840.
- 10) 片寄治男・榊田 薫・前田康貴・矢沢浩之・木村康之・佐藤 章・星 和彦 (1997) : PIEZO圧電子を応用した卵細胞質内精子注入法の臨床成績. *日本婦人科学会雑誌*, 49 (11): 979–983.
 - 11) 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.
 - 12) Moser, M., Ebner, T., Sommergruber, M., Gaisswinkler, U., Jesacher, K., Puchner, M., Wiesinger, R. and Tews, G. (2004): Laser-assisted zona pellucida thinning prior to routine ICSI. *Hum. Reprod.*, 19, 573–578.
 - 13) Demirel, A., Benkhalifa, M., Sari, T. and Gurgan, T. (2006): Use of laser-assisted intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in patients with a history of poor ICSI outcome and limited metaphase II oocytes. *Fertil. Steril.*, 86, 256–258.
 - 14) Choi, K.H., Lee, J.H., Yang, Y.H., Yoon, T.K., Lee, D.R. and Lee, W.S. (2011): Efficiency of laser-assisted intracytoplasmic sperm injection in a human assisted reproductive techniques program. *Clin. Exp. Reprod.*, 38, 148–152.
 - 15) 高橋郁恵・羽島暁子・中野英之 (2013) : ICSIの成績向上のための工夫—ICSI時におけるレーザーアシストハッチングシステムを用いた透明帯の部分的菲薄化の有用性—. *J. Mamm. Ova Res.*, 30, 49–52.
 - 16) 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.
 - 17) Hiraoka, K., Tamaki, T., Matsumura, Y., Kiriake, C., Uto, H., Yosida, H. and Kitamura, S. (2012): Impact of the volume of cytoplasm aspirated into the injection pipette at the time of oolemma breakage on the fertilization rate after ICSI: a preliminary study. *J. Mamm. Ova Res.*, 29, 82–87.