

ICSIの適応

濱田由香里・藤原 睦子・竹林 浩一・高橋健太郎・野田 洋一

滋賀医科大学産婦人科 大津市 〒520-2192

要旨: ICSIの適応は精液所見からと既往治療歴から予測される受精障害とに大別される。まず、精液所見から客観的にICSIの適応を検討するために、精子の前進運動を評価できるとされている Sperm Quality Analyzer (SQA) で得られる Sperm Motility Index (SMI) の有用性を評価した。また、Split cycleの成績を解析して、受精障害の予測を検討した。Poor群 ($0 \leq \text{SMI} < 80$)、Medium群 ($80 \leq \text{SMI} < 160$)、Good群 ($160 \leq \text{SMI}$) とし、SMIと受精率、妊娠率との関係を検討したところ、Poor群 ($n=10$)、Medium群 ($n=9$)、Good群 ($n=43$) で受精率56.4%、69.6%、71.1%、妊娠率20.0%、33.3%、48.8%であり、各群間において有意差は認められず、SMIのみによってICSIの適応を決定することは困難であった。Split cycleについては、conventional IVF周期 ($n=188$)、Split周期 ($n=14$)、ICSI周期 ($n=72$) の受精率は、64.8%、63.0%、56.0%であり、妊娠率は46.6%、57.1%、31.7%であり、各群間に有意差は認められなかったが、Split cycleの適応別に比較すると、前回受精障害の受精率はconventional IVFとICSIで差を認めず、ICSIの適応とするには慎重であるべきと考えられた。キーワード: ICSI, Split cycle, Sperm Quality Analyzer, Sperm Motility Index

はじめに

近年、ICSIの技術確立により男性不妊患者に対する治療は飛躍的に向上し、2001年までに25,704人もの児がICSIで得られている。顕微授精の適応は日本産科婦人科学会の会告¹⁾によると、難治性の受精障害で、それ以外の治療により妊娠の見込みがないか、極めて少ないと判断される夫婦に限定されている。しかし、臨床的には受精卵を得られないことをさけるために最初からICSIを選択することも多く、その適応は各施設の判断にまかされているのが現状である。1976年にTiepoloとZuffardi²⁾がY染色体上の造精機能に関連した遺伝子の欠失について報告し、1996年にはKent-Firstら³⁾はY染色体微小欠失がICSI児に存在すると報告し、1999年にはPerry⁴⁾らがICSI操作によりウイルスなどの未知のDNAを細胞内に持ち込む可能性があることと報告していること

(受付 2004年9月10日/受理 2004年10月5日)

別刷請求先: 〒520-2192 大津市瀬田月輪町

滋賀医科大学産婦人科

e-mail: hyukari@belle.shiga-med.ac.jp

から、ICSIには不妊原因となる遺伝子の伝搬や未知のウイルスの混入などの可能性があり、次世代への影響がはっきりしないためICSIの適応について慎重に対応すべきであると考えられる。

ICSIの適応は精液所見からと既往治療歴から予測される受精障害とに大別される。当科では精液所見は従来、Makler計算盤を用いたマニュアルカウントによるもののみで行っていたが、客観性に欠けるため、2003年より精子特性分析機 (Sperm Quality Analyzer; SQA) を導入した。SQAにより算定される精子運動性指数 (Sperm Motility Index; SMI) は運動精子濃度に精子運動速度も考慮して数値化されたものである。使用機種によってSMIの判定基準は異なるが、SMIが受精率と相関すると報告されている⁵⁾。SMI50以下をICSIの適応としているものもある⁶⁾。

また受精障害が予測される症例に対して、すべての採取卵を媒精に供した結果、胚移植がキャンセルとなることがないように、ICSIの絶対的適応以外に、conventional IVFとICSIを併用するSplit cycleの適応基準が提唱され⁷⁾、当科でも積極的にSplit cycleを導入している。Split cycleの適応とは、最初のIVFで受精卵が得られない。もしくは、受精率15%未満だった場合、調整後の運動精子数80万/ml以下の場合、正常形態精子5%以下、抗精子抗体陽性の場合であり、現実にはSplit cycleに対する既往治療歴や当日の精液所見を加味して適応を決定している。

SMIからの受精予測の有用性とSplit cycleの成績を解析してICSIの適応について検討したので報告する。

対象および方法

対象

1) SMIの解析

SQA導入後、2003年3月～2004年4月に当科でIVF-ETを行った101周期のうち、検査施行可能であった62周期を対象とし、SMIと採卵周期当たりの受精率、SMIと妊娠率との関係を調べた。患者(妻)の平均年齢は 34.1 ± 3.9 歳、内訳はconventional周期が57周期、Split周期が5周期となっている。これは、conventionalで行ったもののみの結果である。

2) Split cycleの成績からの検討

2000年～2004年4月に当科でIVF-ETを行った281周期のうち、当科で参考に行っているHambergerらの適応(表1)

表1 Split cycleとICSIの適応

IVF	IVFとICSIの併用 (Split cycle)	ICSIが第一選択
<ul style="list-style-type: none"> 調整後の運動精子数 80万/ml以上 正常形態精子 5%以上 	<ul style="list-style-type: none"> 最初のIVFで受精卵が得られない。(受精率15%未満) 調整後の運動精子数 80万/ml以下 正常形態精子 5%以下 抗精子抗体陽性 	<ul style="list-style-type: none"> 2回目のIVFで受精卵が得られない。 精巣上体精子, 精巣精子 不動精子 生存性不良の凍結融解精子

(L. Hambergerら, Hum Reprod, 1998)

をみだしている Split cycle を行った 14 周期を対象とした。当科で適応された症例の内訳は前回受精障害4周期, 抗精子抗体陽性8周期, 精子所見不良2周期であった。Hambergerらの基準に従って行った Split cycle の成績を同時期の conventional IVF および ICSI と比較検討した。受精率, 妊娠率に関しては, Split cycle の適応別に検討した。

方法

1) 精液検査

IVF を施行当日, 患者より採取された精液を 37°C にて約 30 分静置して液化したのち, Makler 計算盤を用いて精液量, 精子濃度, 運動率, 精子グレード, 奇形率を測定した。

2) SQA V による SMI の測定

Sperm Quality Analyzer (SQA, 輸入発売元: 株式会社ジャフコ, 東京) の upgrade version である SQA V を使用し, Sperm Motility Index (SMI) を測定した。十分に液化した精液を精液検体吸引専用キャピラリーに約 0.6 ml 吸引し, キャピラリーを検査コンパートメントに挿入すると, 液晶ディスプレイに精子パラメーター測定値が 75 秒で表示される。測定原理としては, 読み取り孔に 10 秒間光を照射し続ける間にこの光を遮断する精子の影を波動の変化としてとらえ, それをデジタル化して結果を表示する。SMI 0 以上 80 未満を Poor 群, 80 以上 160 未満を Medium 群, Good 群を 160 以上とした⁵⁾。

3) IVF-ET

固定日採卵法を用い, 採卵前周期の高温期 7 日目より GnRH アゴニスト (スプレキュア®, モチダ) を 1 日量 600 μ g を 4 回に分けて投与開始する。月経開始後, 採卵日の 11 日前より FSH (フェルティノーム P®, セローノジャパン) 225 単位を 4 日間, 引き続き hMG (パーゴグリーン®, セローノジャパン) 150 単位を 5 日間連日投与するのを基本プロトコールとし, 適宜増量した。長径×短径が 35 mm 以上の卵胞が 2 個以上認められた時点で hCG (hCG®, モチダ) 5,000 単位の投与に切り替え, hCG 投与 35~36 時間後に経膈超音波ガイド下に採卵を行った。得られた卵は Universal IVF Medium® (MediCult, 輸入発売元; 日本農産工業株式会社) で充分洗浄し, 約 2 時間の前培養後に媒精 (運動精子濃度 20 万/ml) または ICSI を行う。媒精に用いた精子は, 手法で

採取した精液を充分液化したのち, Pure ception® (SAGE, 輸入販売元; 株式会社ナカメディカル) と Universal IVF Medium® で遠心洗浄し, Swim up 法により運動精子を回収した。培養液は day2 までは BlastAssist System® Vial.1 (MediCult, 輸入販売元; 日本農産工業株式会社) を用い, day3 以降は BlastAssist System® Vial.2 (MediCult, 輸入販売元; 日本農産工業株式会社) を用いた。胚移植法は採卵後 2~3 日目に 4 個以上の胚が得られた場合は二段階胚移植または胚盤胞移植を施行し, 3 個以下の場合は採卵後 2~3 日目に初期胚を最大 3 個まで子宮腔内に移植した。

4) 統計学的解析

Fisher のカイ 2 乗検定を用い, $P < 0.05$ を統計学的に有意と判定した。

結果

1)-1 SMI と採卵周期当たりの受精率の関係

IVF-ET を行った検査施行可能であった 79 周期のうち SMI 0 以上 80 未満を Poor 群 ($n=10$), 80 以上 160 未満を Medium 群 ($n=9$), 160 以上を Good 群 ($n=43$) と分類し, 採卵周期当たりの平均受精率は, Poor 群 56.4%, Medium 群 69.6%, Good 群 71.1% であった。SMI が上昇するにつれ, 受精率も上昇する傾向はみられたものの各群間において有意差はみとめられなかった (図 1)。

1)-2 SMI と採卵周期当たりの妊娠率の関係

Poor 群 20.0% (2/10), Medium 群 33.3% (3/9), Good 群 48.8% (21/43) と, 受精率と同様に SMI が上昇するにつれ妊娠率も上昇傾向であったが, 各群間において有意差はなかった (図 2)。

2)-1 Split cycle と conventional IVF・ICSI 周期の比較

各群間の平均年齢, 平均採卵数に有意差はなかった。Split cycle の受精率は 63.0% (109/173) でそのうち conventional IVF 58.0% (51/88), ICSI 68.2% (58/85) で, 他群の conventional IVF 周期 64.8% (1001/1545), ICSI 周期 56.0% (313/559) と差は認められなかった。妊娠率に関しては conventional IVF 46.6% (75/161), Split 57.1% (8/14), ICSI 31.7% (20/63) と各群間に有意差は認められなかった (表 2)。

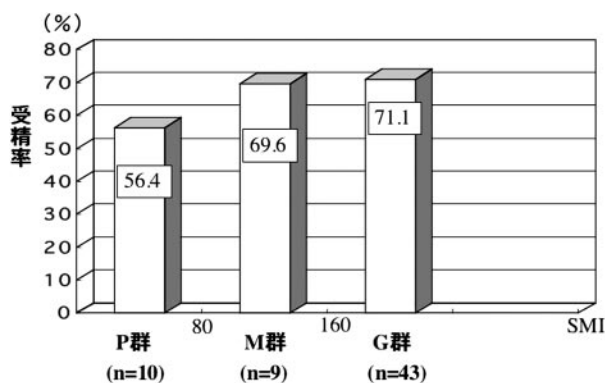


図1 採卵周期当たりのSMIと受精率との関係(ICSIは除く)

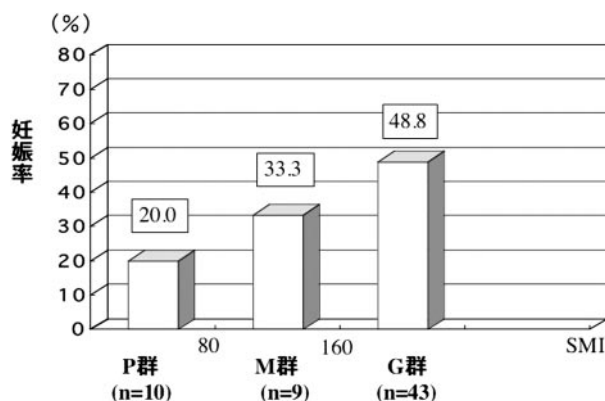


図2 採卵周期当たりのSMIと妊娠率との関係(ICSIは除く)

2)-2 Split cycle の適応別の成績

Split cycle の適応別にみた受精率，妊娠率については，前回受精障害症例，調整後の運動精子数 80 万/ml 以下の精子所見不良症例，抗精子抗体陽性症例で，全体の受精率 53.2% (25/47)，30.4% (7/23)，74.8% (77/103) であり，conventional IVF と ICSI に分けた受精率は，conventional IVF 受精率 43.5% (10/23)，0% (0/11)，75.9% (41/54) で，ICSI 受精率 62.5% (15/24)，58.3% (7/12)，73.5% (36/49) であった。前回受精障害症例では conventional IVF の受精率は ICSI と差がなく，良好な受精率が得られたのに対し，

調整後の運動精子数 80 万/ml 以下の精子所見不良症例に対しては，conventional IVF にて受精率が 0% であった (表3)。

考 察

当科において，これまでは conventional IVF で受精卵が得られた最低原精液所見は精子濃度 1,500 万/ml，運動率 15%，運動精子濃度 225 万/ml であった。運動精子濃度 225 万/ml 以下で，conventional IVF を行ったこともあるが，受精卵は得られていないので，運動精子濃度 225 万/ml 以下を当科の ICSI の適応の参考値としていた。今回，客観的な精液所見の評価より ICSI の適応の検討を行うため，SQA を用いた SMI の解析を行ったが，採卵周期当たりの SMI と受精率，妊娠率は，Poor 群 56.4%，Medium 群 69.6%，Good 群 71.1% であり，各群間において有意差はなかった。一般的に SMI と受精率，妊娠率は相関すると言われている^{5,6)}が，本検討では SMI の低い症例でも，受精が成立したことから SMI 低値を ICSI の適応とすることはできなかった。採卵周期当たりの SMI と妊娠率についても，Poor 群 20.0%，Medium 群 33.3%，Good 群 48.8% で各群間において有意差はなかった。したがって，SMI のみによって ICSI の適応を決定することは困難であると考えられる。今回の検討で，SMI が直接受精率，妊娠率を反映しなかった理由として，SMI には精子の形態評価が含まれていないことなどが考えられた。しかし，SMI が低くなるにつれ，妊娠率が低い傾向があり，特に当科の全体の妊娠率 42.9% (105/245；2000 年～2003 年移植当

表2 Split cycle と IVF・ICSI 周期の比較

	Conv IVF	Split	ICSI
患者数 (人)	130	12	44
治療周期数 (周期)	188	14	72
平均年齢 (歳)	33.9	32.5	34.1
平均採卵数 (個)	8.2	13.6	7.8
受精率 (%)	64.8	63.0	56.0
		58.0 (conv.)	
		68.2 (ICSI)	
移植周期数 (周期)	161	14	63
妊娠率 (%)	46.6	57.1	31.7
流産率 (%)	21.3	12.5	40.0
多胎率 (%)	25.3	50.0	15.0

表3 Split cycle の適応別の成績

	周期数	受精率			妊娠率
		全体	conv IVF	ICSI	
受精障害 (1回目IVFで受精率15%未満)	4	53.2	43.5	62.5	75.0
調整後の運動精子数 80万/ml以下	2	30.4	0	58.3	100.0
抗精子抗体陽性	8	74.8	75.9	73.5	37.5

たり妊娠率 $n=215$)と比べてPoor群の20%は低いと考えられる。SMI 0はICSIにても妊娠予後不良という報告もあり⁵⁾、今後症例を増やして検討していきたい。

Split cycleの成績では、受精率63.0%でそのうちconventional IVFが58.0%、ICSIが68.2%で、他群と差は認められなかった。妊娠率に関しても各群間に有意差は認められなかった。Split cycleの適応別に見た受精率より、前回受精障害症例や抗精子抗体陽性症例では、conventional IVFの受精率はICSIと差がなく、良好な受精率が得られたのに対し、調整後の運動精子数80万/ml以下の精子所見不良症例に対しては、conventional IVFにての受精率が0%であった。このことは、前回受精障害症例や抗精子抗体陽性症例は安易にICSIの適応とならないことを示唆している。また、精子所見不良症例は、ICSIによって受精卵を得て、妊娠に至ることができた。つまり、Split cycleによって、conventional IVFでできるものと、ICSIした方がよい症例を1回のトライアルで見分けることができ、良好な妊娠予後を得ることができたと考えられる。症例数は非常に少ないので、断定的なことは言えないが、今回の検討からHambergerら⁷⁾のSplit cycleの4つの適応の中でも、特に調整後の運動精子数80万/ml以下の適応に対してsplit cycleの有用性が示唆された。Split cycleの利点として、ICSIしなくても妊娠できる症例に対してはICSIを回避できること、また、1回のIVFにおいて効率の良い妊娠率が得られる可能性があるということが言える。

近年、ICSIはますます増加しており、しかも施設数も増加の一途をたどっている。しかし、1999年のPerryら⁴⁾の報告はICSIの際にウイルスや細菌、DNA断片の持ち込みがあれば、これらのDNAが容易に宿主ゲノムDNAに組み込まれ、トランスジェニックヒトを作成してしまう危険性を示した。この報告以降、ICSI用ヒト精子の調整にはコンタミなどに十分配慮するのはもちろんのこと、当科ではICSIを極力行わない姿勢で治療をすすめており、前医において過去にICSIの経験のある症例でも可能な限りconventional IVFに取り組んできた。Hambergerら⁷⁾の適応に従い、絶対

的適応ではないが、受精率が低いことが予測される症例に対してSplit cycleを行ない、症例数は少ないながら良好な受精率、妊娠率を得ることができた。また、conventional IVFによって受精できる症例にはconventional IVFで、ICSIが本当に必要と思われる症例にはICSIによる妊娠を提供していったのではないかと考えられる。以上の事から、ICSIの絶対適応以外の症例に対しては、ともすれば安易となりがちなPrimary ICSIを施行する前にSplit cycleも考慮し、慎重にICSIの適応を決定すべきものと思われ、今後更に症例を増やして検討していきたい。

文 献

- 1) 日本産科婦人科学会会告(1992):顕微授精法の臨床実施に関する見解. 日本産科婦人科学会雑誌, 44, 129-130.
- 2) Tiepolo, L. and Zuffardi, O. (1976): Localization of factors controlling spermatogenesis in nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum. Genet.*, 79, 1-20.
- 3) Kent-First, M.G., Kol, S., Muallem, A., Ofir, R., Manor, D., Blazer, S., First, N. and Itskovitz-Eldor, J. (1996): The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Mol. Hum. Reprod.*, 2, 943-950.
- 4) Perry, A.C.F., Wakayama, T., Kishikawa, H., Kasai, T., Okabe, M., Toyoda, Y. and Yanagimachi, R. (1999): Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *SCIENCE*, 284, 1180-1183.
- 5) 柴原浩章, 平野由紀, 島田和彦, 鈴木達也, 高見澤聡, 角田啓道, 本山光博, 鈴木光明, 佐藤郁夫 (2003): Sperm Quality Analyzer (SQA) の upgrade version ; SQA V の特徴. 産婦人科の実際, 52, 109-113.
- 6) 島田知代, 野尻恵子, 原田真木子, 浜井晴喜, 加藤浩志, 半田雅文, 小林真一郎, 磯島晋三 (2000): ヒト精子の運動能力と形態異常がIVF-ETにおける受精率および妊娠率に与える影響について. 日不妊会誌, 45, 95-100.
- 7) Hamberger, L., Lundin, K., Sjögren, A. and Söderlund, B. (1998): Indications for intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 13 (Suppl. 1), 128-133.

The Indication of ICSI

Yukari Hamada, Mutsuko Fujiwara, Koichi Takebayashi, Kentaro Takahashi and Yoichi Noda

Department of Obstetrics and Gynecology, Shiga University of Medical Science, Seta Tsukinowa-cho, Otsu, Shiga 520-2192, Japan

The indication of ICSI is generally based on sperm analysis, past therapeutic history, and prediction of fertilization failure. In this study, we attempted to evaluate the usefulness of SMI (Sperm Motility Index) and "split cycle" procedure on ICSI indication. According to SMI score, patients were separated into three groups: I) Poor ($0 \leq \text{SMI} < 80$, $n=10$), II) Medium ($80 \leq \text{SMI} < 160$, $n=9$), III) Good ($160 \leq \text{SMI}$, $n=43$). Among these, no significant difference was observed in fertilization rates (Poor 56.4%, Medium 69.6%, and Good 71.1%) or in pregnancy rates (20.0%, 33.3%, and 48.8%, respectively). On the other hand, patients were separated into three groups: I) conventional IVF ($n=188$),

II) split cycle ($n=14$), III) ICSI ($n=72$). Among these, no significant difference was observed in fertilization rates (conventional IVF 64.8%, split cycle 63.0%, and ICSI 56.0%) or in pregnancy rates (46.6%, 57.1%, and 31.7%, respectively). Surprisingly, among those in split cycle who had had fertilization failure on previous conventional IVF trial, no significant difference was found in fertilization rates between conventional IVF eggs and ICSI eggs. In such cases, split cycle might be a better choice.

Key words: ICSI, Split cycle, Sperm Quality Analyzer, Sperm Motility Index