

第29回

2023/6/24

両角レディースクリニック オンライン治療説明会

採卵：当院の工夫を紹介します

両角レディースクリニック院長
両角和人



- ・ 今回の内容は**編集**して後日YouTubeにアップします。
- ・ 過去の説明会の動画は全てYouTubeで見ることができます。

注意事項：

カメラ、音声をオフにしていない方はオフにして下さい。

録画、録音、スクリーンショットはご遠慮ください。

本日の予定

- 成功例から学ぶ: 今月の注目すべき2症例(25分)
ここはライブでしか見れません
- 採卵: 当院の工夫を紹介します(10分)
- 質問時間(30分)
- 最新の注目論文(10分)
- まとめ、次回の案内(5分)

17時20分には終了します

注目すべき症例：ここから学ぶ事

- 8年をかけて治療して授かった方の治療方法
- 6年治療し授からず転院後初回の移植で授かった方の治療方法

ただ成功した、良かったではなく
ここから「どういう事が良かったのか」
今後の方に同じことができないか
成功した要因を見逃さない
勝つ法則を見つけ出すこと

深く掘り下げて解説

- ・ 今回説明会で採卵の極意を詳しく説明しようと企画しましたが、この2症例の成功した要因が非常に参考になるため、採卵に関しては要点を述べ、この2症例を深く掘り下げて説明します。
- ・ 成功は決して偶然ではなく必然。
- ・ そしてそれを次に繋げることがすべきこと。

症例1

- ・ 8年をかけて治療して授かった方の治療方法
- ・ 個人情報なので細かい点は省かなければいけないのですが、治療の流れを是非紹介したいのでまとめました。

キーワード: 諦めない、最後の胚盤胞

症例1

- ・前医で2年治療して結果出ず当院へ転院
- ・2012年34歳で当院初診
- ・初診3ヶ月後に採卵1回目
- ・この時の刺激方法はクロミッド+HMG
- ・5個採卵したものの胚盤胞1個のみ凍結。
- ・年齢を踏まえると、刺激が弱かった。もう少し強くすべき。

症例1

- 2013年 採卵2回目施行
- 刺激方法:アンタゴニスト法
- 9個採卵し初期胚2個、胚盤胞1個凍結。
- 年齢を踏まえ凍結胚が合計4個のため移植に以降する方針とした。

症例1

- 2014年初期胚凍結胚移植①: 着床せず
- 2015年初期胚凍結胚移植②: 妊娠⇒流産①
- 凍結胚が2個となったので再度採卵を提案

症例1

- 2015年3回目の採卵
- 刺激方法: アンタゴニスト法
- 胚盤胞5個(4ABが3個、4BBが2個)、初期胚3個凍結
- 採卵3回目で様々改善策をとり、今回が1番良い結果。特にグレードの良い胚盤胞が多数できかなり良い結果と言える

出産した胚が出来た実際の刺激方法

生理	HMG製剤	アンタゴ	トリガー
D1			
D2	HMG 300		
D3	HMG 300		
D4	HMG 300		
D5	HMG 300		
D6	HMG 300		
D7	HMG 450	17時 1/2A	
D8	HMG 450	23時 1/2A	
D9	HMG 300	am	HCG10000
D10			
D11	採卵		

HMG300としてかなり
強気に押していった

アンタゴニストは最小限

半量にして、
この2回しか
使わない

症例1

- 2016年凍結胚移植③: 妊娠⇨流産②
- 2017年凍結胚移植④: 妊娠⇨流産③
- 2018年凍結胚移植⑤: 妊娠⇨流産④
- 3回連續で流産となる(年1回移植)

症例1

- ・ 2年ぶりに治療を再開
- ・ 2020年凍結胚移植⑥: 着床せず
- ・ 凍結胚はあと一つ。
- ・ 凍結してある最後の胚の移植をして授からなければ終了とすると。

症例1

- 2020年凍結胚移植⑦: 妊娠⇒出産

当院で8年間かけて

- ・採卵3回
- ・陰性2回
- ・流産4回
- ・7回目の移植で出産

子宮サイドに問題があった

- ・ 反復流産をしたのは子宮側に問題があった
- ・ 当院、大学病院で何度も何度も子宮の手術を受け改善して治療に臨んだ。
- ・ 内膜が厚くなりすぎる問題があった
- ・ 内膜を作成する際再三に渡り工夫を重ねた
- ・ この辺りが治療する施設としての工夫が効果を発揮した。

結婚してからヨリヨリを開始して、10年。

ネットで色々調べて両角レディースクリニックに来ました。

約8年間お休みも何度もしてやと卒業ある事が
できました。

転院は考えず先生達を信じて通いました。

何度もくじけて悩みましたか先生達の医療士があり
がトロトロました。

看護士達さん達いつも笑顔で対応してくれた事。
ハガハガ又ゆゆました。

ありがとうございます。

出来たら両角レディースクリニックに産科があの中はと思いま
他院に行ったらな人とたくさん会う?と思つてほう程
こちらの皆さん優しいです。

まだまだ書き足りたのであが感謝しております。

本当にありがとうございます。

大変遅く参りました。この度 男の子が
生まれました。早産で予定日より2ヶ月弱早かったのですが
元気に育っています。

長年治療をして最後の受精印で出産までたどり
ついてうれしく思います。何度も流産をして辛かった
治療ですが、わが子が元気に産まれたのを今は大変
うれしく幸せです。

西角先生をはじめ大変お世話を参りました。

最後までがんばったのは先生達のおかげです。

ありがとうございました。

2回目は年齢的にまだいいので出来ませんが

コロナが落ち着いたら先生に見て子を会わせたいです。

本当にありがとうございました。

お子さんを見せに来てくれた

- 遠方に住まれている方でしたが、生まれたお子さんをわざわざ銀座まで連れてきて見せに来てくれた。

症例1の成功した要因

- ①flexible アンタゴニスト法
- ②MVAキットで内膜オペ
- ③ひとえに諦めなかつたこと

①アンタゴニスト法

アンタゴニストは最強の刺激方法

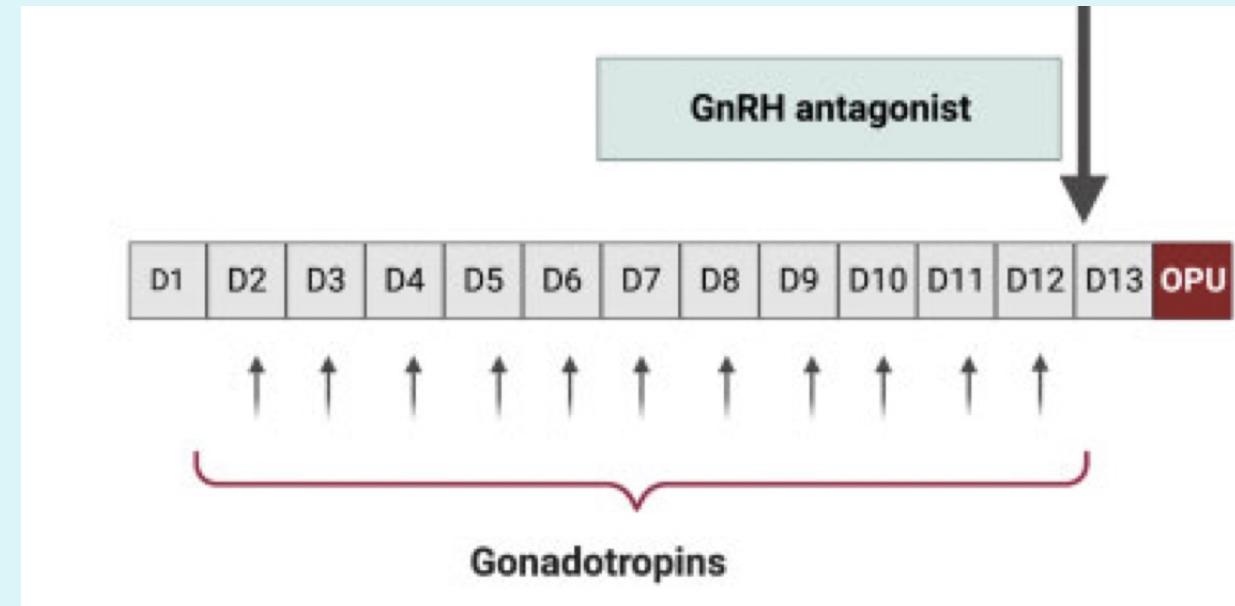
ただそれと同時に最も難しい方法

ブレーキはなるべくかけない

- ・ アンタゴニスト法では排卵を抑制するためアンタゴニストでブレーキをかけますが、当院ではなるべく用いません。
- ・ 排卵を恐れてアンタゴニストを早く用いると育てられる卵胞も育たなくなります。
- ・ 検査もしないで機械的に刺激注射開始5日からアンタゴニストを入れていく様な方法は難治症例や高齢の方には向いていません。

アンタゴニストは最小限

- ・アンタゴニストは卵胞の発育を抑制するため高齢の方には相反している。
- ・アンタゴニスト $\frac{1}{2}$ Aが当院のスタンダード。
- ・使い始める時期も個別に周期毎に微調整。
- ・なるべく使わないようにする。
- ・トリガーの日も用いない。
- ・アンタゴニストは1周期に1回～2回。



通常

アンタゴニストによる抑制

採卵

当院

アンタゴニストによる抑制

½しか使わない

一般的なアンタゴニスト法

当院のアンタゴニスト法

生理	HMG製剤	アンタゴ	トリガー		生理	HMG製剤	アンタゴ	トリガー
D1					D1			
D2	HMG150				D2	HMG150		
D3	HMG150				D3	HMG150		
D4	HMG150				D4	HMG150		
D5	HMG150				D5	HMG150		
D6	HMG150	1 A			D6	HMG150		ここで用 いない
D7	HMG150	1 A			D7	HMG150		
D8	HMG150	1 A			D8	HMG150		
D9	HMG150	1 A			D9	HMG150	1/2A	
D10	HMG150	1 A			D10	HMG150	1/2A	
D11	HMG150	1 A			D11	HMG150	1/2A	
D12	HMG150	1 A	スプレー		D12	HMG150		スプレー HCG10000
D13					D13			
D14			採卵		D14			採卵

アンタゴニストを減らすメリット

育ちが良くなる

一番はここ。ブレーキを踏まないほうが育つことは明白

費用が安い

アンタゴニストは1本1万円もします。

当院の場合半量なので5000円。

費用にして通常法だとアンタゴニストだけで5~7万

当院の場合5000円~15000円。

痛みが少ない

注射を打たないと痛みを減らすことができる

アンタゴニスト法のポイント

- 使い時期をできるだけ遅らせる(育ち具合で)
- 使う量をできるだけ減らす(1/2が基本)
- 使う期間をできるだけ減らす(1から3日)
- トリガーの日は用いない(ブレーキを踏まない)
- アンタゴの間隔は24時間ではなく30時間

トリガー前日の17時にアンタゴニストを1回だけ半量用いるのが最も好ましい

生理	HMG製剤	アンタゴ	トリガー
D1			
D2	HMG150		
D3	HMG150		
D4	HMG150		
D5	HMG150		
D6	HMG150		
D7	HMG150		
D8	HMG150		
D9	HMG150		
D10	HMG150		
D11	HMG150	17時 1/2A	
D12	HMG150		HCG10000
D13			
D14	採卵		

理想的な刺激

ここしか使わない

症例1の成功した要因

- ①flexible アンタゴニスト法
- ②MVAキットで内膜オペ
- ③ひとえに諦めなかつたこと

内膜ポリープ、内膜肥厚

- ・ 内膜が厚い場合やポリープがある場合に当院では内膜に負担をかけない方法でオペをしている。
- ・ MVAキットを用いて吸引しながらオペをしている。
- ・ 内膜が薄くならず癒着もできにくく局所麻酔ができる優れた方法。

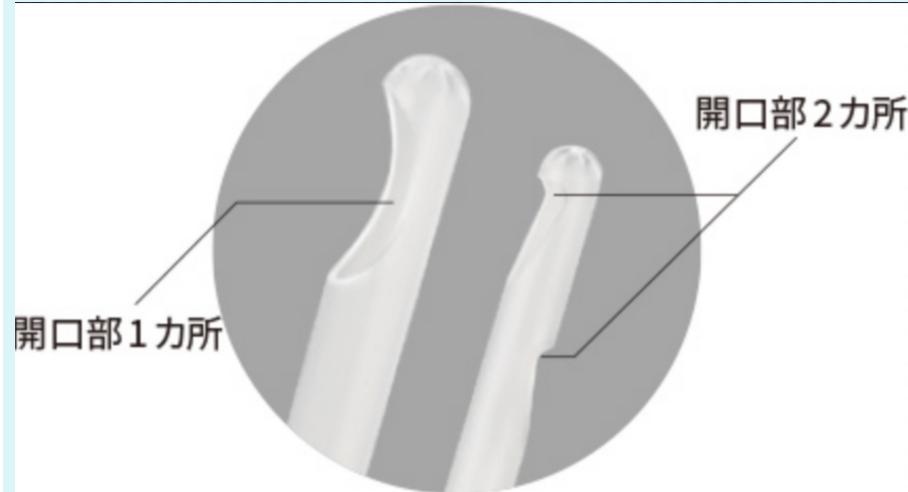
手動真空吸引法
Women's MVA システム

手動で真空状態を作り、
子宮内容物・子宮内膜組織を吸引、
除去又は採取します

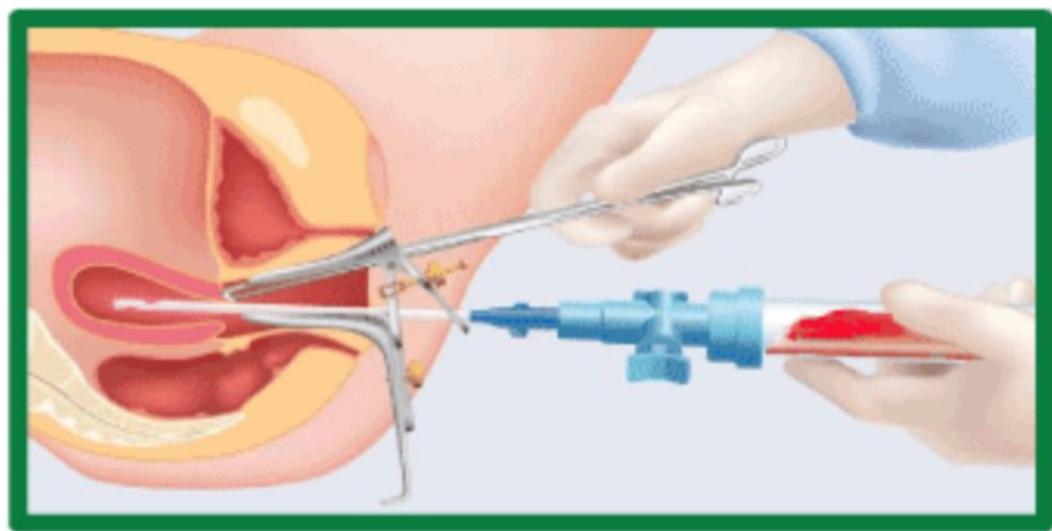
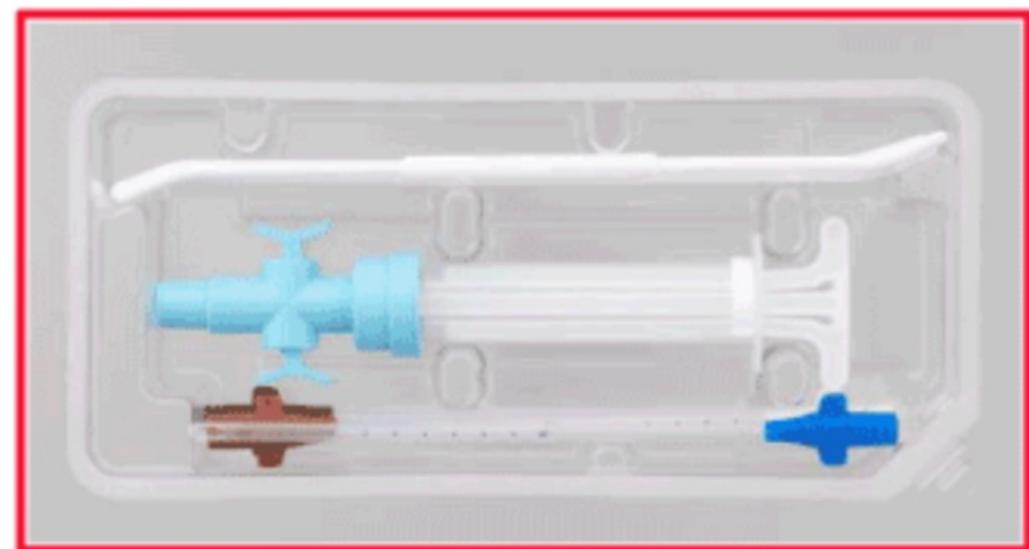


Ipas MVA Technology

持続する陰圧(真空)で、連続的に組織を吸引・採取します
カニューレやわらかい4mmを使用します。
局所麻酔でオペが可能です。大体10分程度のオペです。



先端がソフト
吸引圧も計算されている

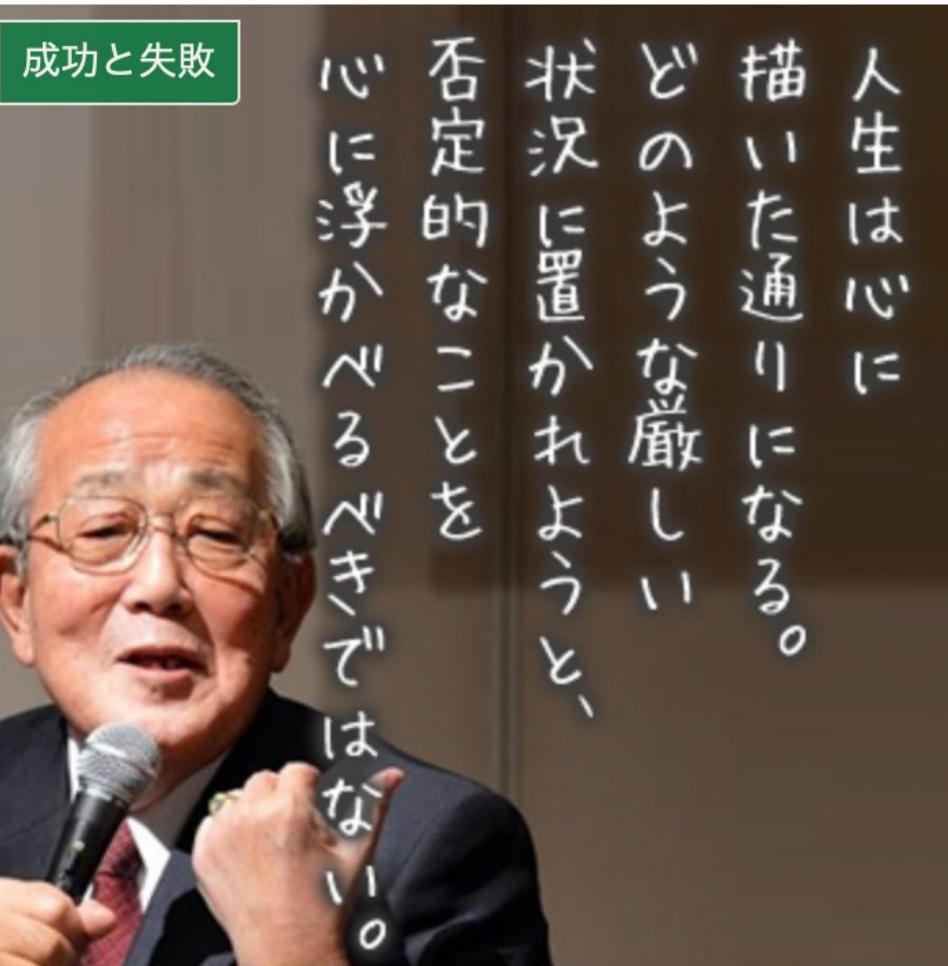


症例1の成功した要因

- ①flexible アンタゴニスト法
- ②MVAキットで内膜オペ
- ③ひとえに諦めなかつたこと

稻盛和夫の名言

世の中に失敗というものはない。チャレンジしているうちは失敗はない。あきらめた時が失敗である。



神さまが、

こいつはこれだけ

努力してるんだから

何とかしてやらなくては

と思つていただけるくらい、

努力しなきやいかん

京セラ名誉会長

致知
CHICHI

稻盛和夫

『致知』二〇一五年三月号 特集「成功の要諦」

思いは必ず実現する。

漠然と思うのではなく、「何がなんでもこうありたい」

「必ずこうで

なくてはならない」といつた、
強い思いに

裏打ちされた願望、

夢でなければ実現しない

京セラ名譽会長

稻盛和夫

『稻盛和夫一日一言』より
予約販売



稻盛和夫一日一言

稻盛語録の決定版

京セラ、KDDI、JAL。
3つの世界的企業を率いた稻盛の
名経営者による珠玉の名言集

心の底から出た言葉は、
聞き手の感動を呼び起す

稻盛和夫著

扶桑出版社

稻盛一日一言
シリーズ2

運命を高める言葉

生き方

人間として
一番大切な
こと

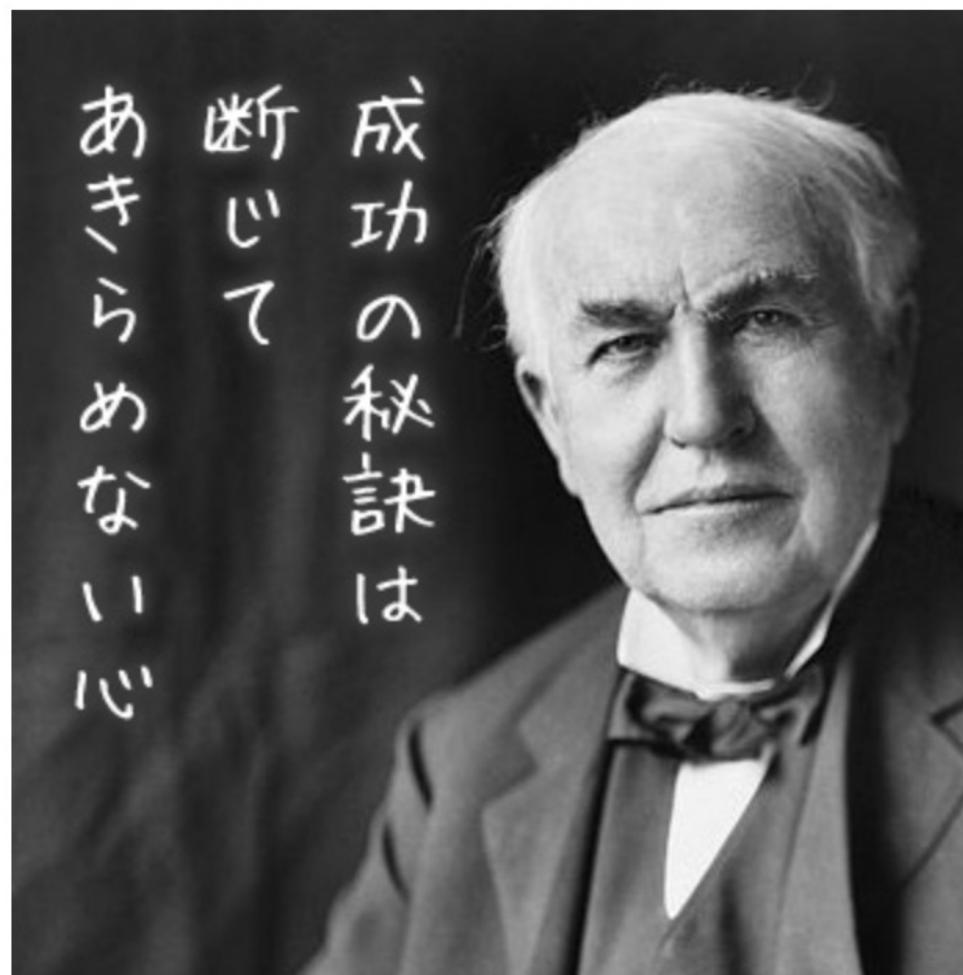
稻盛和夫

刊行10年目にして100万部を突破した、不朽のロング・ミリオンセラー！

二つの世界的大企業・京セラとKDDIを創業し、JALを再生に導いた「経営のカリスマ」が、その成功の礎となった「人生哲学」をあますところなく語りつくした一冊。

夢をどう描き、どう実現していくか？ 人間としてもっとも大切なこととは何か？

＜トーマス・エジソン＞



症例2

二つのクリニックで7年治療し授からず、当院に転院後、初回の胚盤胞移植で授かった方の治療方法

キーワード：クラミジア感染、卵管水腫、初回移植

症例2

- ・ 結婚後近医で5年間タイミング療法。
授からずARTを行うため転院。
- ・ 次のクリニックでは2年間、採卵4回、移植2回
するも結果が出ず当院へ転院。
- ・ クラミジア感染歴があり抗生素で加療歴あり
- ・ 前医の卵管造影では左卵管水腫、右卵管閉塞

症例2

- ・当院へ転院
- ・初回の採卵で6個採卵し2個胚盤胞凍結
- ・刺激方法:クロミッドHMGアンタゴニスト法
- ・当院で最も行なっている刺激方法。
- ・注射は必要最小限で費用的な負担もない。

症例2の刺激法 クロミッド-HMG アンタゴニスト法

生理	HMG製剤	アンタゴ	トリガー
D1			
D2			
D3			
D4	ゴナール150		
D5			
D6	ゴナール150		
D7			
D8	ゴナール150		
D9	HMG 300	17時 1/2A	←
D10			スプレキュア
D11			
D12	採卵		

クロミッドはD3から朝夕で
7日間内服

ここしか使わない

症例2

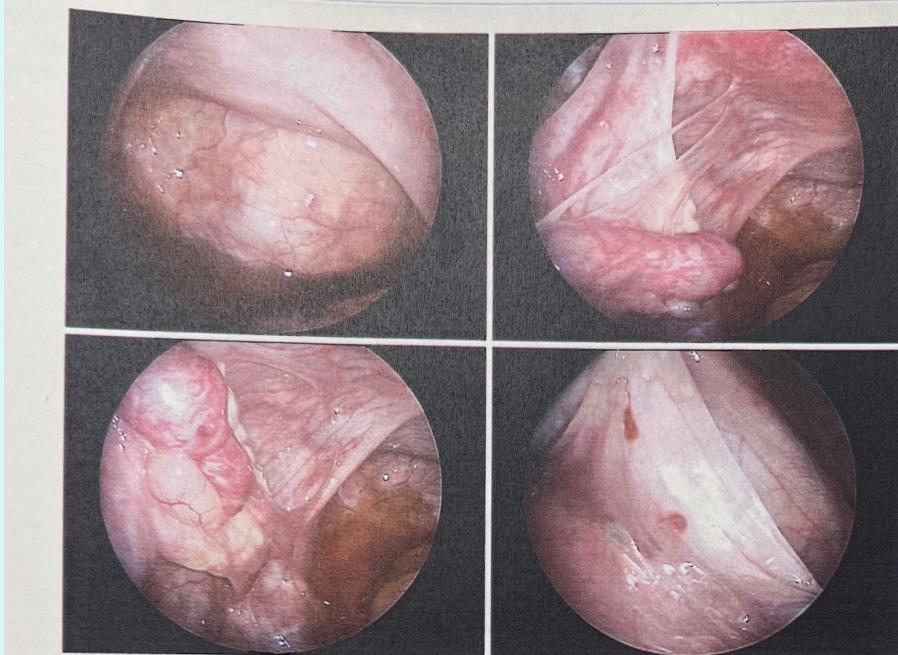
- ・移植周期に入ろうとしたが、直前のエコーで卵管水腫が疑われるため移植は中止
- ・ここで移植しても着床しないことになると説明し腹腔鏡手術を勧めた。



よく見ないとわからない。
卵管水腫が疑われる所見

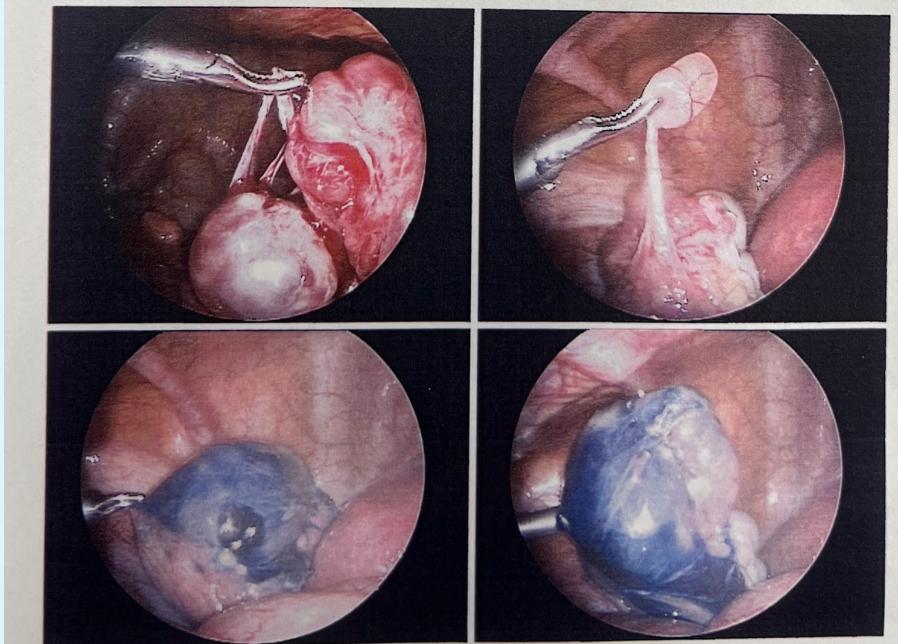


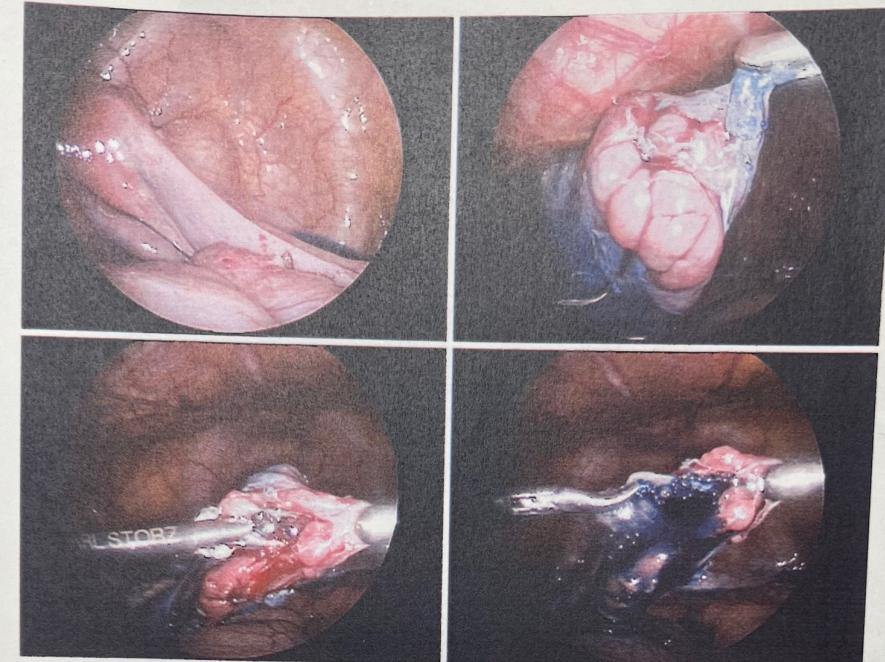
エコーで黒く見えて内部に水が貯留している



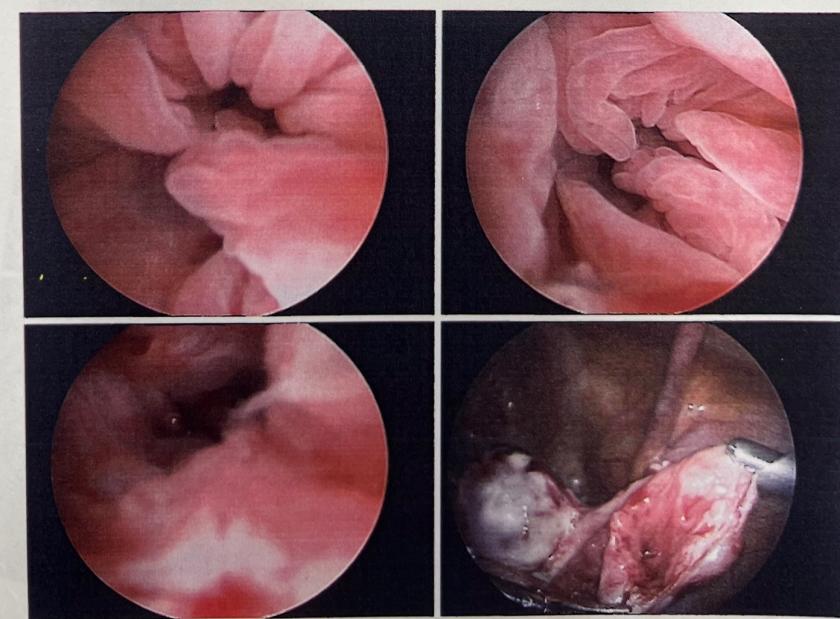
実際この方の腹腔鏡の所見

両方の卵管が水腫であり癒着
もかなりひどい状態





卵管を開口し形成して修復

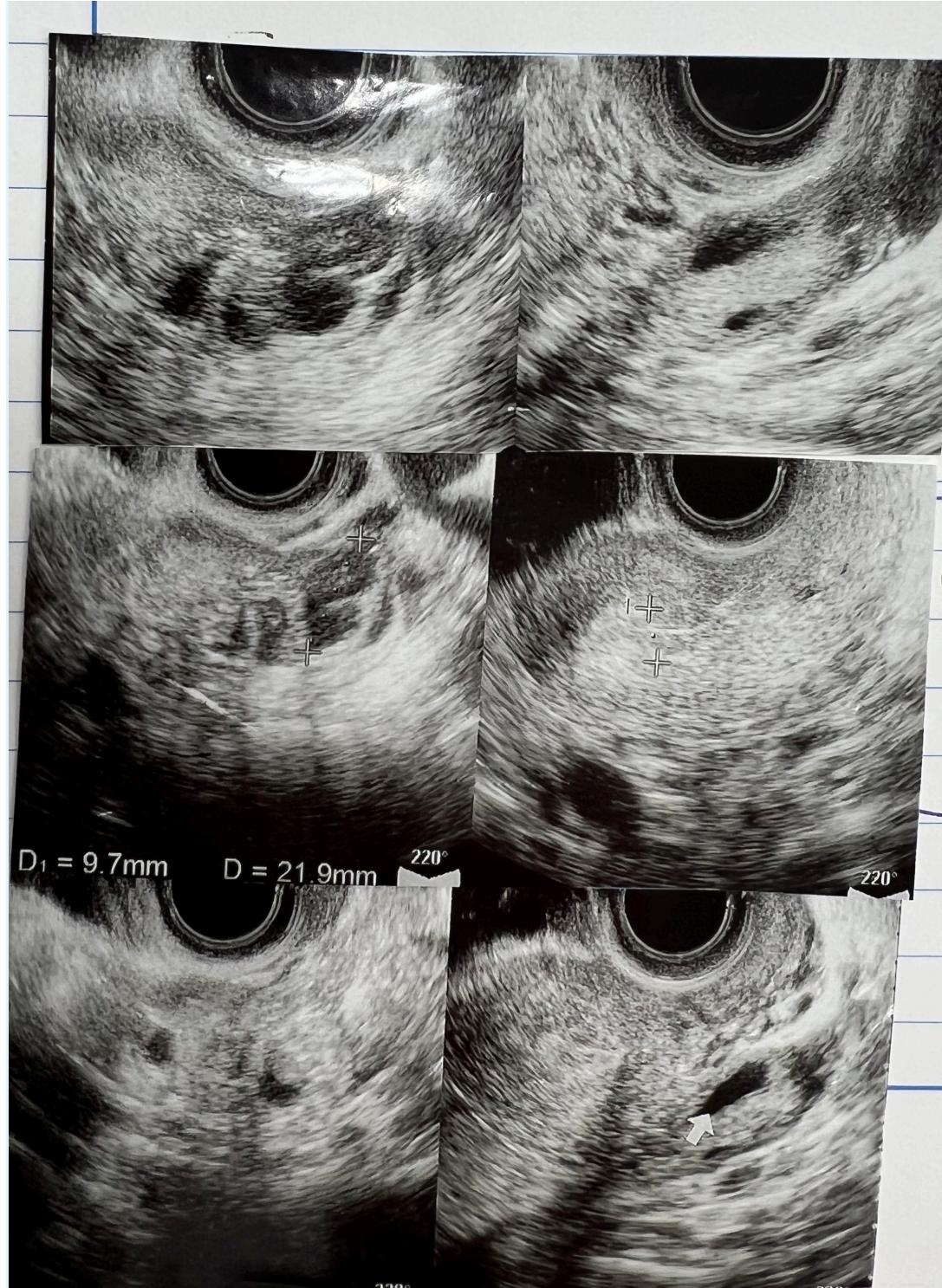


症例2

- ・ オペ後初回の移植で出産
- ・ この様なケースは決して珍しくない

クラミジアの治療はしましたが

- 良くある間違いとして「クラミジアの治療をしましたがそれでもまだ何かあるのですか」
- クラミジアは抗生素で死滅しますが、癒着や卵管水腫は抗生素では治りません。
- 腹腔鏡手術による外科的な方法以外は治りません。
- 卵管水腫があるとどんなに良い胚盤胞を移植しても妊娠しません。



典型的な卵管水腫はエコーで見抜くのは容易。

しかし初期の卵管水腫をエコーで見つけるのは結構難しい。

かなりの経験がないと見逃すことになる。
コツは無く、とにかく経験。
卵巣の場所、卵管の場所を知らないといけない。

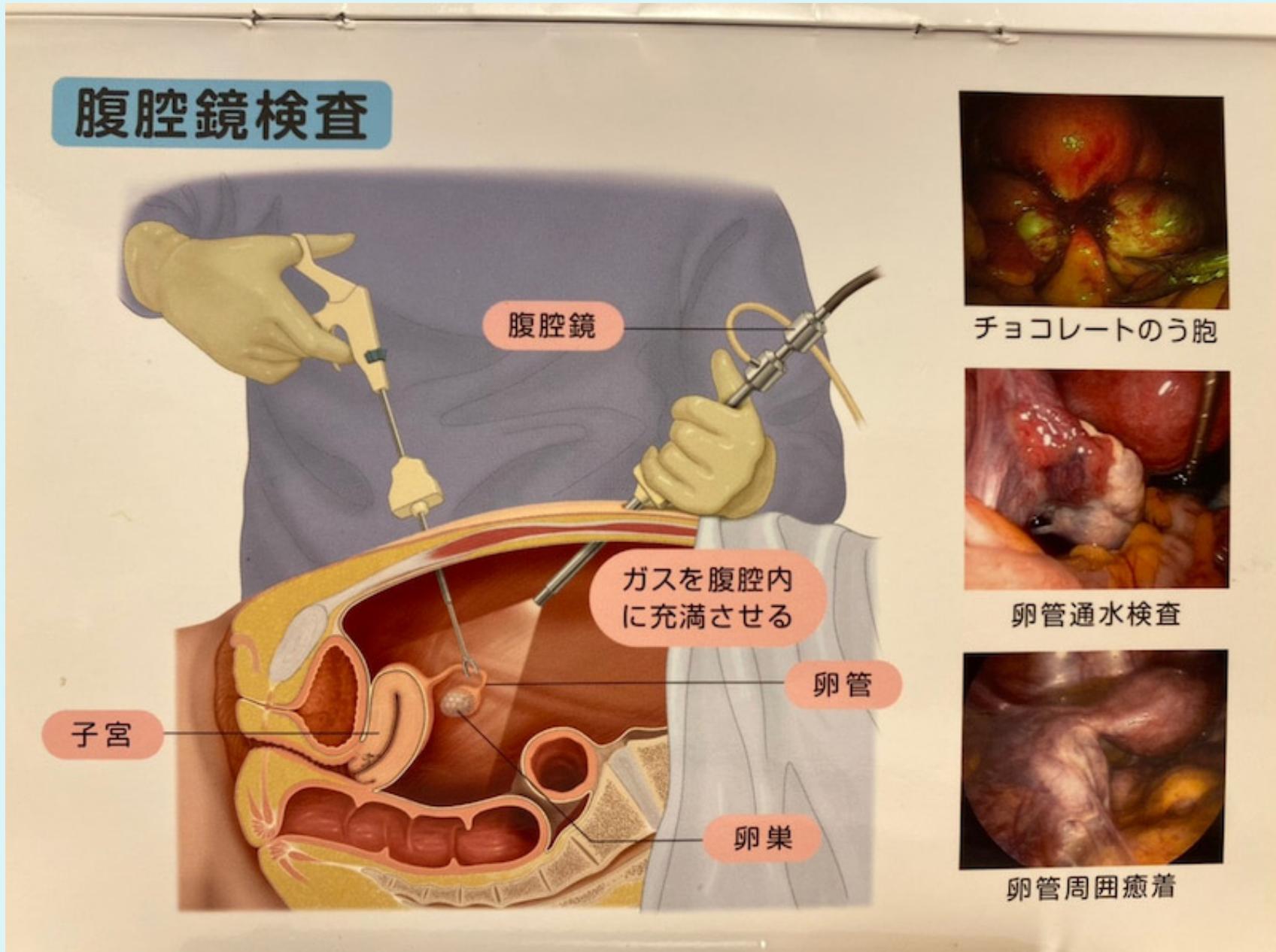
ラバ口：腹腔鏡手術

できた胚を着床させるための神技技術

妊娠しないのには必ず原因があります



原因を見つけて治すことが必要

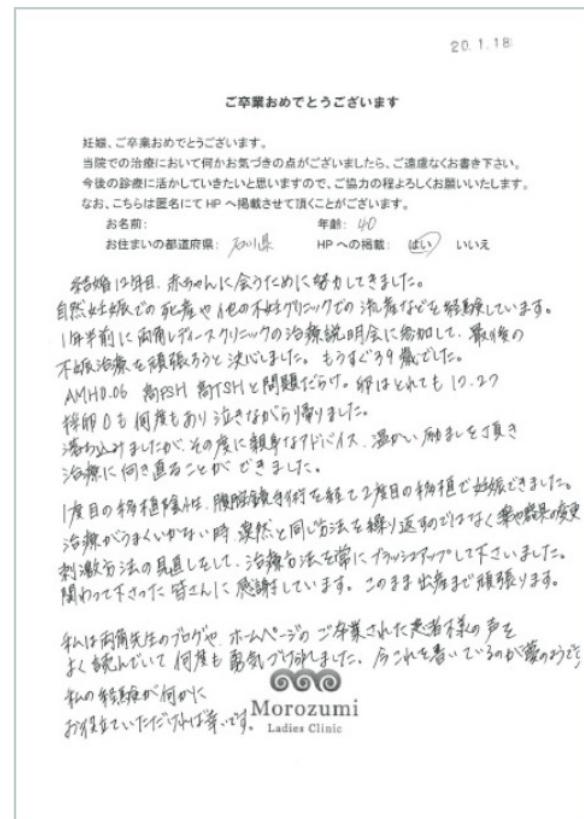


卵管水腫は手術すべきでしょうか？

- ・ 卵管水腫は着床率が有意に下がるため絶対にオペすべきです。
- ・ どんなに良好胚を移植しても妊娠しません。

卵管水腫のオペ





【1月分】石川県（40歳）

結婚12年目、赤ちゃんに会うために努力してきました。

自然妊娠での死産や他の不妊クリニックでの流産などを経験しています。

1年半前に両角レディースクリニックの治療説明会に参加して、最後の不妊治療を頑張ろうと決心しました。

もうすぐ39歳でした。

AMH 0.0 6 高FSH 高TSH と問題だらけ。

卵はそれでも1つ、2つ、採卵0もあり泣きながら帰りました。

落ち込みましたが、その度に親身なアドバイス、温かい励ましを頂き治療に向き直ることができました。

1度目の移植陰性、腹腔鏡手術を経て2度目の移植で妊娠できました。

治療がうまくいかない時、漠然と同じ方法を繰り返すのではなく薬や器具の変更、刺激方法の見直しをして、治療方法を常にブラッシュアップして下さいました。

関わって下さった皆さんに感謝しています。

このまま出産まで頑張ります。

私は両角先生のブログやホームページのご卒業された患者様の声をよく読んでいて何度も勇気づけられました。

今これを書いているのが夢のようです。

私の経験が何かにお役立ていただければ幸いです

27.12.1

ご卒業おめでとうございます

妊娠、ご卒業おめでとうございます。
当院での治療において何かお気づきの点がございましたら、ご遠慮なくお書き下さい。
今後の診療に活かしていきたいと思いますので、ご協力の程よろしくお願ひいたします。
なお、こちらは匿名にてHPへ掲載させて頂くことがございます。

お名前: 年齢: 39
お住まいの都道府県: 千葉県 HPへの掲載: いいえ

両角先生、鈴木先生、スタッフの皆様、大変お世話になりました。
2度目の移植が陰性だった時に、先生から腹腔鏡手術を勧められました。
結果、いくつかの問題が見つかり、術後の移植で陽性判定を頂く事ができました。早い段階で
手術をご提案くださいましたおかげと感謝しております。
今回、判定日のhcg値が一桁で、一度諦めたところからのまさかの卒業でしたが、先生、看護
師さんとも、一緒に喜んでくださってとても感動しました。
本当にありがとうございました。

◎◎◎
Morozumi
Ladies Clinic

 【12月分】千葉県 (39歳)

両角先生、鈴木先生、スタッフの皆様、大変お世話になりました。

2度目の移植が陰性だった時に、先生から腹腔鏡手術を勧められました。

結果、いくつかの問題が見つかり、術後の移植で陽性判定を頂く事ができました。早い段階で
手術をご提案くださいましたおかげと感謝しております。

今回、判定日のhcg値が一桁で、一度諦めたところからのまさかの卒業でしたが、先生、看護
師さんとも、一緒に喜んでくださってとても感動しました。

本当にありがとうございました。

 【5月分】 東京都（40歳）

二人目で再びお世話になりました。

ご卒業おめでとうございます

妊娠、ご卒業おめでとうございます。
当院での治療において何かお気づきの点がございましたら、ご遠慮なくお書き下さい。
今後の診療に活かしてきたいと思いますので、ご協力の程よろしくお願ひいたします。
なお、こちらは匿名にてHPへ掲載させて頂くことがございます。

お名前： 年齢： 40
お住まいの都道府県： 東京都 HPへの掲載： いいえ

二ト目で再びお世話になりました。育児でバタバタしていて、薬の飲み忘れがったり、移植当日、腫瘍牽引を入れ忘れてしまったりと色々ありました。なかなか結果が出て一年が過ぎ、疲れが出てきた時に腹腔鏡手術を勧められました。手術前は合併症などの説明を聞くと、手術を受けるとは決めていましたが、気持ち的に落ち込むこともありました。

育児でバタバタしていて、薬の飲み忘れがったり、移植当日、腫瘍牽引を入れ忘れてしまったりと色々ありました。なかなか結果が出ず一年が経過し、疲れが出てきた時に腹腔鏡手術を勧められました。手術前は合併症などの説明を聞くと、手術を受けるとは決めていましたが、気持ち的に落ち込むこともありました。

しかし、思いもよらない腹腔内の状態が色々分かり、うけてよかったです。そして、
今回、手術後に自然妊娠までして本当にびっくりしています。高齢出産でまだ安心はできませんが、皆様から授けていただいた小さな命をこれから大切に育てていきたいと思います。

両角先生、熊耳先生、町田先生、他諸先生方、スタッフの方々に感謝いたします。ありがとうございました。

いたしま。ありがとうございました。

Morozumi
Ladies Clinic

20.6.17

ご卒業おめでとうございます

妊娠、ご卒業おめでとうございます。
当院での治療において何かお気づきの点がございましたら、ご遠慮なくお書き下さい。
今後の診療に活かしていきたいと思いますので、ご協力の程よろしくお願いいたします。
なお、こちらは匿名にてHPへ掲載させて頂くことがございます。

お名前： 年齢：36
お住まいの都道府県：千葉県 HPへの掲載：(はい) いいえ

他院でタイミング3回、人工授精5回、移植6回するも授かることができず、そのうち一度は稽留流産を経験し、あらゆる検査を受けても不妊の原因はわからず、移植をくり返すしかないと言われ途方に暮れていきました。

こちらにはEMMA検査を受け目的で来院しましたが、初診で腹腔鏡手術を提案され、その提案通りに手術を受けた結果、手術後1回目の移植で妊娠することができました。

腹腔鏡手術の提案はどこか病院でもされたことがなく、ものすごい自信で絶対妊娠できます！と院長先生からすすめられ、正直疑う気持ちもありましたが、今となっては本当に受けた良かったと思います。

最初は検査目的でたまたまMLCに来ましたが、このMLCとの出会いが私の人生を変えてくれました。MLCに来なければ私は妊娠することもなかっただと思います。

3年強という長く辛い不妊治療生活を絶えさせました。ありがとうございました。

これからも私のように悩む方々の救世主としてご活躍されることを心より祈念致します。

本当にありがとうございました。

【6月分】千葉県（36歳）

他院でタイミング3回、人工授精5回、移植6回するも授かることができず、そのうち一度は稽留流産を経験し、あらゆる検査を受けても不妊の原因はわからず、移植を繰り返すしかないと言われ途方に暮れていました。

こちらにはEMMA検査を受ける目的で来院しましたが、初診で腹腔鏡手術を提案され、その提案通りに手術を受けた結果、手術後1回目の移植で妊娠することができました。

腹腔鏡手術の提案はどこか病院でもされたことがなく、ものすごい自信で絶対妊娠できます！と院長先生からすすめられ、正直疑う気持ちもありましたが、今となっては本当に受けたよかったです。

最初は検査目的でたまたまMLCに来ましたが、このMLCとの出会いが私の人生を変えてくれました。

MLCに来なければ私は妊娠することもなかったと思います。

3年強という長く辛い不妊治療生活を終わらせていただき、ありがとうございました。

これからも私のように悩む方々の救世主としてご活躍されることを心より祈念致します。

本当にありがとうございました。

今年の生殖医学会に提出した内容

タイトル: 体外受精反復不成功例に対して腹腔鏡手術は出産率を向上させる

体外受精反復不成功例に対して2017年3月から2019年11月までに杉山産婦人科丸の内で腹腔鏡手術を受けた156名に対しその後両角レディースクリニックにて凍結融解胚移植をした142名を対象に後方視的に検討した。体外受精反復不成功の定義としては2回以上良好胚の移植を行っていることとした。

腹腔鏡手術を受けた156名のうち142名が凍結胚移植を行い71名が妊娠し53名が出産に至った。術後に凍結胚移植を行わなかつた14名のうち6名が自然妊娠し4名が出産に至つた。



スタバと福砂屋のコラボ



どこかにMLCのロゴを入れたい

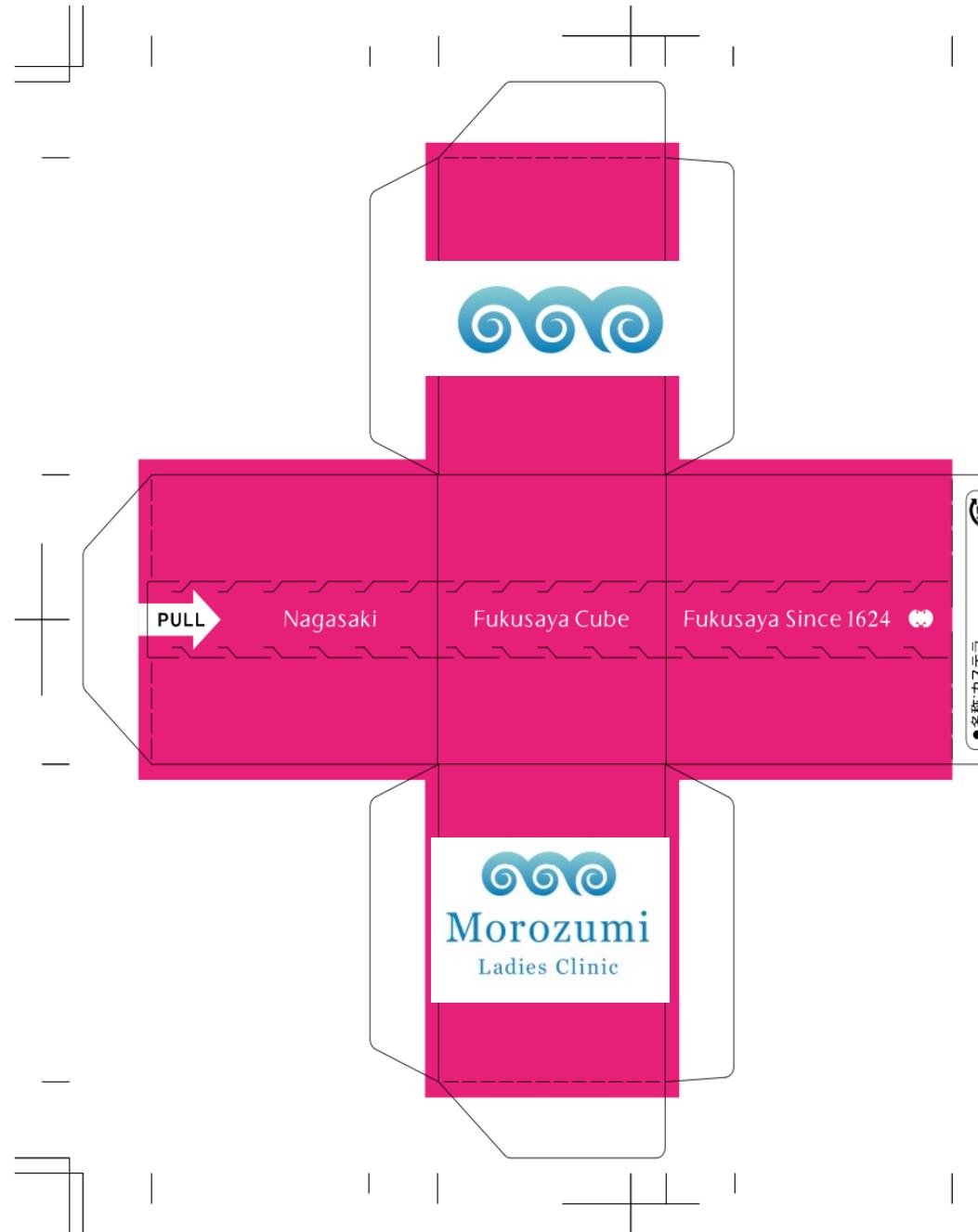
医療法人社団真高会
両角レディースクリニック 様

FUKUSAYA CUBE
オリジナルパッケージ

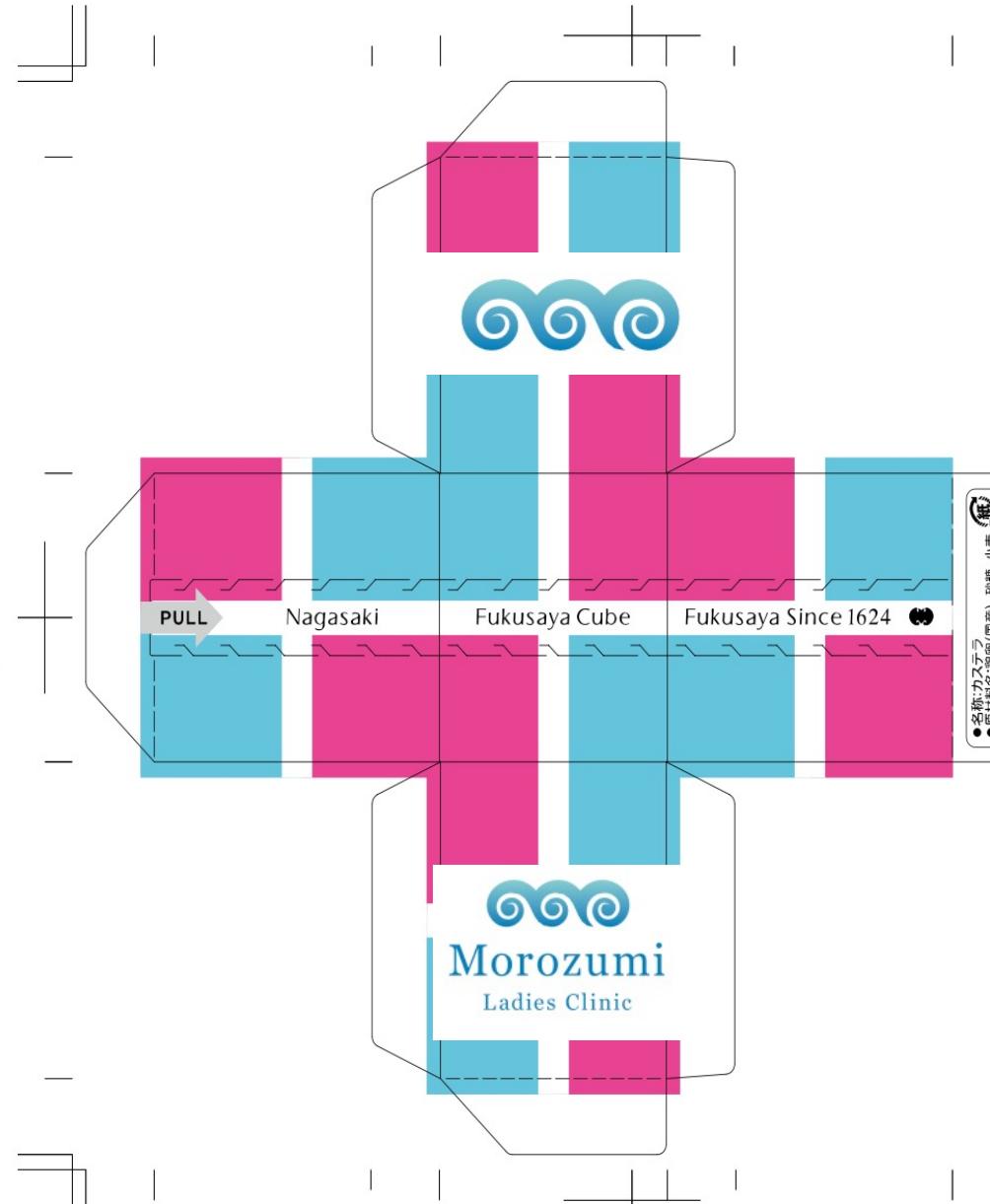


FUKUSAYA CO., LTD.

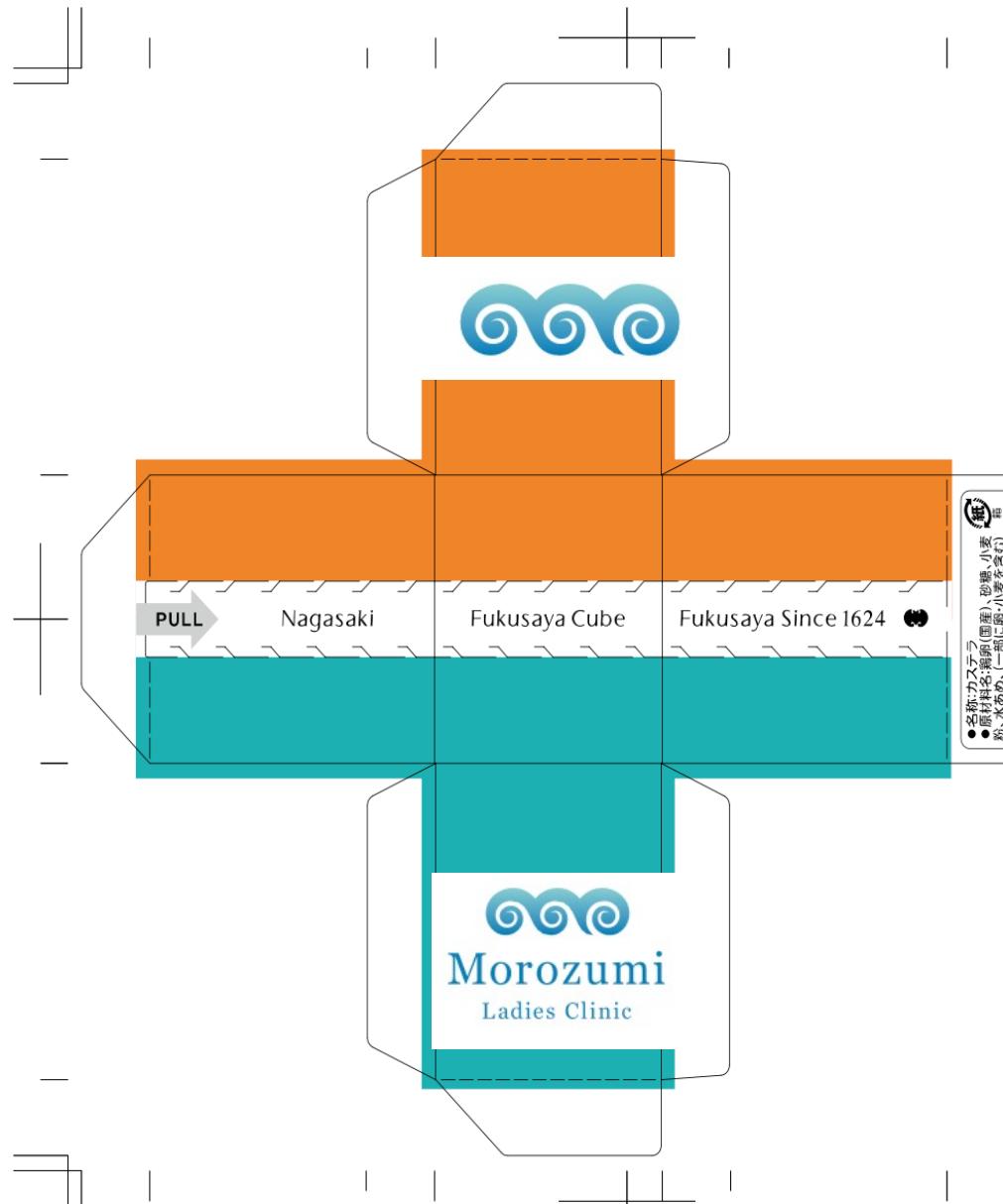
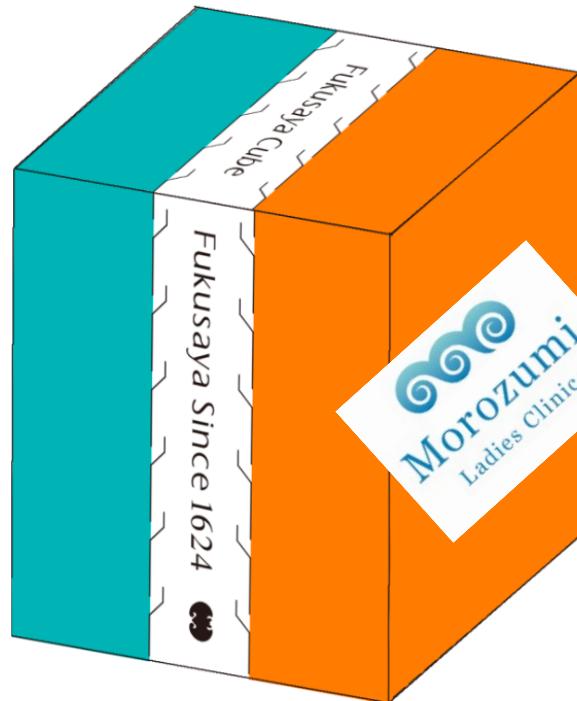
type1



type2

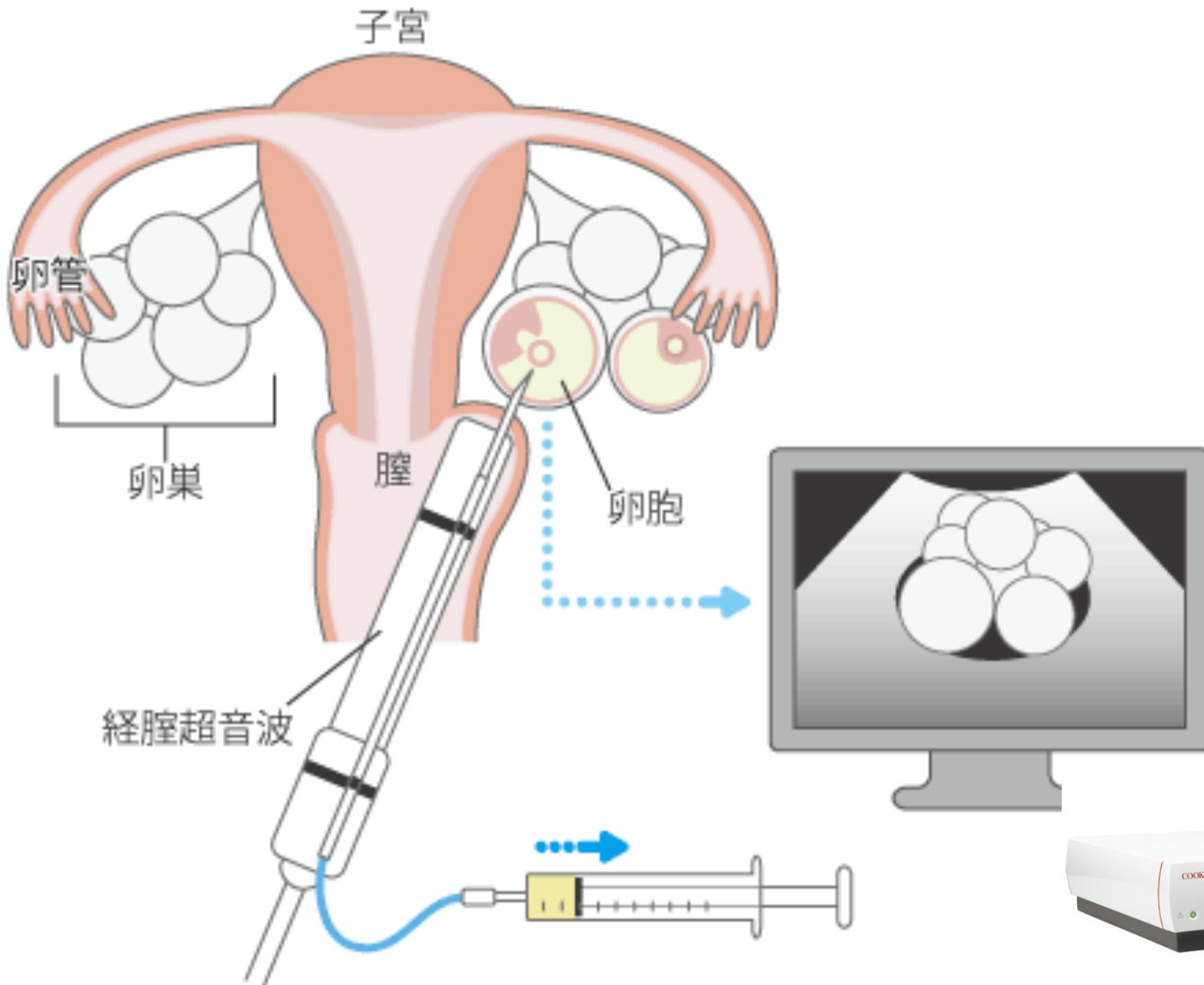


type3



採卵

- ・ 卵子をできるだけ多く取ること
- ・ 卵子の質を下げない様にすること
- ・ できるだけ痛くなくすること



採卵：痛みを減らすために

- ・ボルタレンの座薬を来院後すぐに入れます。
- ・膣壁と子宮に局所麻酔をしっかり行います。
- ・刺す回数を極力減らします。
- ・どのラインで刺すと1回で刺せるか、ここを重視
- ・痛みが出ない採卵の針の進め方はエコーを回すこと。針先をなるべく動かさないこと。

採卵：痛みを減らすために

- ・ 最短距離で刺します。
- ・ なるべく針を中に入れない様にする。
- ・ 局所麻酔でも全然可能。

局所麻酔のメリット

- ①短時間で帰れる
- ②麻酔のトラブル(アレルギー、呼吸停止など)を無くせる
- ③午後の仕事に影響しない
- ④費用が安い
- ⑤採卵中動かすにいられるので医師は安心して多数の卵胞を採卵できる
- ⑥採卵中の医師とのコミュニケーションがとれるので患者さんは安心できる
- ⑦体位を変換できるので深い場所の採卵なども刺さる
- ⑧痛みがある場合でも動かないでいられるので血管に近い場所や小さい卵胞も刺す事ができる

採卵方法



- ・ 経腔エコ一下に針を刺して卵巣内の卵子を採取します。
- ・ 17、18、19、20、21ゲージの採卵針を用います。
- ・ 17ゲージの場合は針の内部が2層構造となつております(ダブルルーメン)卵胞内を洗浄できます。



空胞、変性卵

- ・ 採卵をして取れる可能性は80%です。
- ・ 取れない場合医師は空胞と言いますが正確に卵子があったものの取れなかつたと説明すべきです。
- ・ 取れない理由は卵胞の壁から卵子がはがれないことが大きな理由です。
- ・ 剥がれない理由は卵子が未熟のことが多いです。
- ・ 未熟の原因はトリガーである注射、スプレーが効いていないことが原因。
- ・ 青い果物は茎が硬いことに似ている。

空胞、変性卵

- ・ 採卵数をなるべく多くする、この確実性を増していく努力をする事が大切です。特に卵胞数が少ない場合にはフラッシュを行い確実に採卵出来るように工夫をします。
- ・ 採卵針も大切で、ある程度太い針でしっかりと採卵することで変性や空胞を避けることができる事も事実です。過去の変性率、空胞率を考え最適な採卵針を用いることが正解だと思います。



看護師が隣に一人つきます。必要なら両脇からサポートします。



静脈麻酔のメリット

静脈麻酔をかけても採卵中は多くの方が動きます。麻酔をかけて動くことが不思議だと思うかもしれません、例えば寝ている方の腕をつねると痛くて動くことと同じです。医師は動かれると思うと慎重になり採卵をしっかりと行うことができなくなることがあります。

静脈麻酔のメリット

- ①意識がなくなる。

採卵を最適化する

- ・採卵針、吸引圧を最適化する
- ・手引きはだめ
- ・変性や空胞は医師の努力で減る
- ・採卵した卵子を速やかに培養室へ渡す
- ・試験管を立てる場所の温度管理

高齢なので優しく圧をかけないで丁寧に吸引すること

難しい場合の対応

- 看護師がお腹を押して卵巣の位置を下げる。これにより刺す距離が短くなる。また卵巣が動かなくなるため刺しやすくなる。
- エコーの入れ方を工夫する: エコーのプローブを子宮頸部を避けて入れる。
- 経腹採卵: 卵巣が深い方にとっては経腔よりも経腹の方が痛みが少ない。

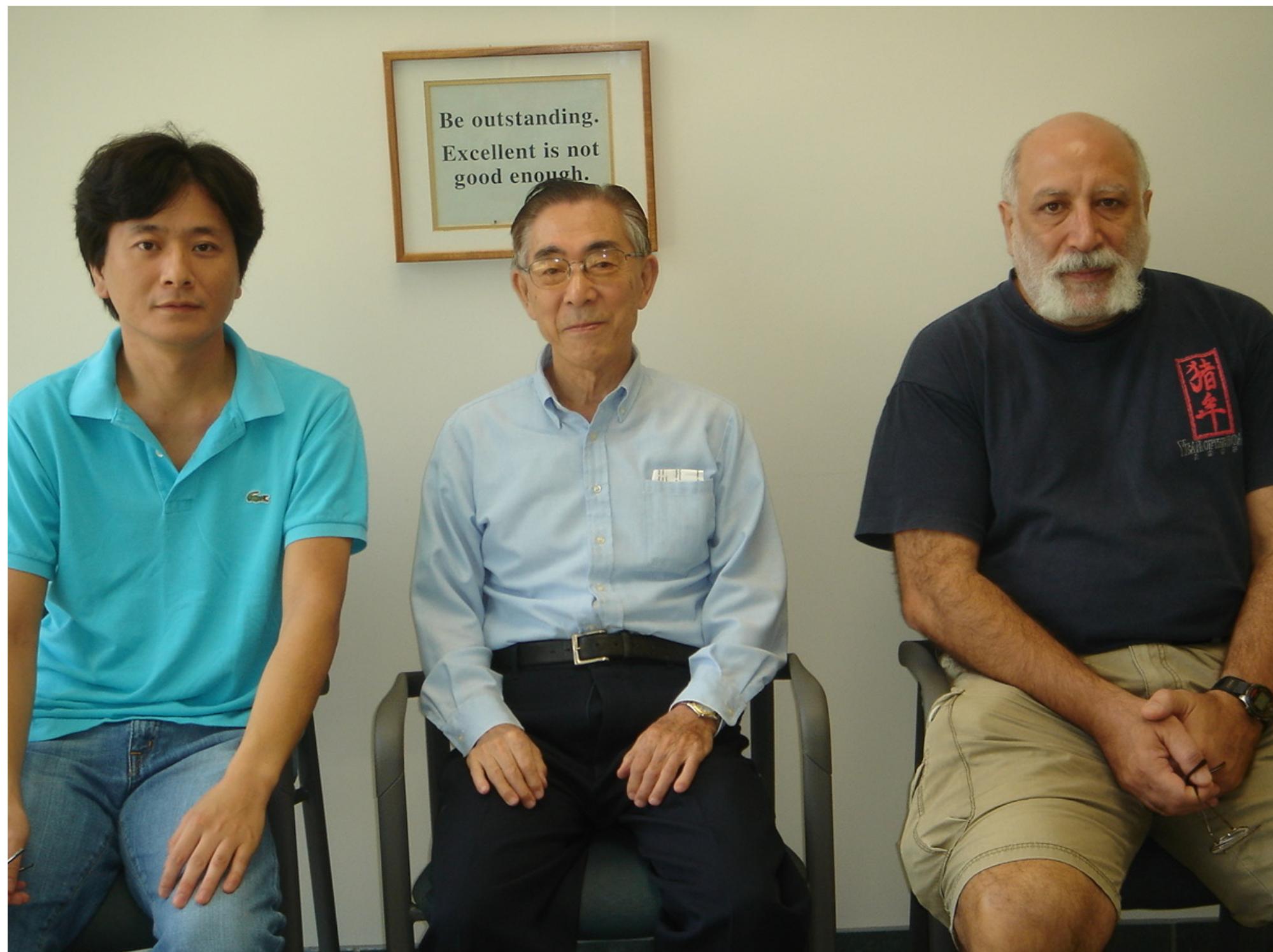
質問を受け付けます

この後はチャットを使用してご質問をお送りください。以前お話しした刺激方法、腹腔鏡、着床障害、不育症、男性不妊、PGT-Aなどどんな質問でもお答えします。

その前に雑談を少々

2004年9月～2006年12月





Be outstanding.
Excellent is not
good enough.



第38回(2023)京都賞の受賞者が決まりました！

2023.06.16

京都賞 # 受賞者発表



KYOTO PRIZE 2023



先端技術部門
柳町 隆造



基礎科学部門
エリオット・H・リーブ



思想・芸術部門
ナリニ・マラニ

先端技術部門



柳町 隆造
Ryuzo Yanagimachi

生殖生物学者
ハワイ大学 名誉教授

受精メカニズムの解明と顕微授精技術確立への貢献

哺乳動物において、体外受精の方法を確立して受精現象の詳細な解析を進め、さらに精子を卵細胞質に直接顕微注入する卵細胞質内精子注入法の開発と技術革新を行って顕微授精技術を確立し、現代社会において重要な生殖補助技術の展開に基礎研究と技術開発の両面で大きく貢献した。

京都賞



- 京都賞は、科学や文明の発展、また人類の精神的深化・高揚に著しく貢献した方々を讃える国際賞です。
- 授賞式は11月10日、国立京都国際会館で行われ、受賞者にはそれぞれディプロマ、京都賞メダル、賞金1億円が贈られます。

京都賞

- 京都賞は、1984年に稻盛和夫設立による公益財団法人稻盛財団の創設した日本の国際賞。京都賞を受賞後にノーベル賞を受賞する人物も増えており、現在8名の受賞者が後にノーベル賞を受賞している。
- 柳町先生も過去に何回もノーベル賞にノミネートされてきました。

柳町隆造は、受精現象の基礎的な研究を進め、さまざまな哺乳動物の受精過程を詳細に解析し、受精が成立するための条件を導き出して、人工授精による畜産業やヒトの生殖補助医療技術の発展に大きく貢献した。中でも、哺乳動物の体外受精が可能であることを実証したこと、顕微鏡下で精子を卵細胞質に直接注入する顕微授精技術、卵細胞質内精子注入法 (ICSI: Intracytoplasmic Sperm Injection) を開発し、技術革新を重ねてその効率を改善したことは特筆され、柳町の成し遂げた基礎研究と技術開発は、産科医療と少子化に向かう現代社会に対する大きな貢献である。

柳町が研究を開始する以前もいろいろな哺乳動物の体外受精の報告はあったものの、実践的な体外受精の方法は存在しなかった。柳町は1963年に培養液中のハムスターの受精に成功して、再現可能な哺乳類の体外受精を確立した。この方法を用いて受精現象の解析を進め、精子の受精能獲得や先体反応、卵子の透明帯反応などの受精過程の理解を深めた。こうした哺乳類の受精メカニズム研究は、ヒトにおける体外受精の成功にも大きく貢献した。

柳町はさらに、精子を卵細胞質に顕微注入することによって受精させる、ICSIを確立した。精子を顕微注入する際には、マイクロインジェクタで卵細胞の透明帯と細胞膜を突き抜く必要があるが、通常の手法ではこの過程は困難であった。柳町は、Piezoマニピュレータを用いることで、この課題を克服できることを発見し、**Piezo-ICSIの基盤技術を開発した**。これらの基盤に立って、Piezo-ICSIは高い受精率と着床率が達成されて、従来の体外受精法では受精が困難であった男性不妊症に対する生殖補助医療技術として定着し、不妊症に悩む人々に大きな福音をもたらしている。

このように、柳町の受精現象の基礎的な研究と生殖補助技術の開発は、ヒト生殖医療のみならず、畜産業や希少動物種の保護にも応用されており、柳町隆造は現代社会の発展に大きく貢献したと結論される。

柳町先生とのやりとりは英語のみ 受賞おめでとうとメールしたら

- Congratulations on receiving the Kyoto Prize.
I am very happy to hear the news.
- **Thanks.** It is very interesting that older women may be more affected by acrosomal enzymes which never enter the egg during normal fertilization. Yana

実験の話ですね、...

Incorporation of the acrosome into the oocyte during intracytoplasmic sperm injection could be potentially hazardous to embryo development

Kazuto Morozumi and Ryuzo Yanagimachi*

Institute for Biogenesis Research, University of Hawaii School of Medicine, Honolulu, HI 96822

Contributed by Ryuzo Yanagimachi, August 12, 2005

In mice and humans, a normal offspring can be obtained by injecting a single spermatozoon into an oocyte, the process called intracytoplasmic sperm injection (ICSI). When three or more mouse spermatozoa with intact acrosomes were injected into individual mouse oocytes, an increasing proportion of oocytes became deformed and lysed. Oocytes did not deform and lyse when acrosome-less spermatozoa were injected, regardless of the number of spermatozoa injected. Injection of more than four human spermatozoa into a mouse oocyte produced vacuole-like structures in each oocyte. This vacuolation did not happen when spermatozoa were freed from acrosomes before injection. Humans, cattle, and pigs have much larger acrosomes than the mouse or human. Injection of a single acrosome-intact hamster, bovine, and porcine spermatozoa deformed and lysed many or all mouse oocytes. This deformation did not happen when these spermatozoa were freed from acrosomes before ICSI, regardless of the number of spermatozoa injected. Because trypsin and hyaluronidase mimicked the action of acrosome-intact spermatozoa, it is likely that the acrosomal enzymes deform and lyse the oocytes. Injection of small amounts of trypsin and hyaluronidase into normally fertilized mouse eggs disturbed their pre- and postimplantation development. In view of potentially harmful effects of acrosomal enzymes on embryo development, the removal of acrosomes before ICSI is recommended for animals with large sperm acrosomes. The removal of acrosomes may increase the efficiency of ICSI in these animals. Although human and mouse spermatozoa do not need to be freed from acrosomes, the removal of acrosomes before ICSI is theoretically preferable.

assisted fertilization | bovine | human | mouse | porcine

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) has become the method of choice to treat human male infertility when all other forms of assisted fertilization have failed (1). Many childless couples who are unable to conceive by conventional *in vitro* fertilization and other treatments now have a fairly good chance to have their own children by ICSI. Animals in which ICSI has been successfully used to produce live offspring include mice (2), golden hamsters (3), rats (4), rabbits (5), cattle (6), sheep (7), horses (8), cats (9), pigs (10), and monkeys (11).

The acrosome is a cap-like structure covering the anterior portion of the sperm head (12). It contains an array of hydrolyzing enzymes (12, 13). Immediately before normal fertilization, both the sperm plasma membrane covering the acrosome and the contents of the acrosome are shed as a result of the acrosome reaction (12). That is, the acrosome and its contents never enter the oocyte under normal conditions. Therefore, it is rather surprising that ICSI can produce apparently normal offspring because it usually introduces the entire acrosome into the ooplasm. In the hamster, prior removal of the acrosome from the spermatozoa is essential for successful ICSI. Injection of an acrosome-intact spermatozoon results in the death of the oocyte (3). Although injection of acrosome-intact spermatozoa of other species (e.g., mouse and human) does not kill the oocytes, we cannot rule out the possibility that the contents of

the acrosome may have some effects on the development of embryos.

In this study, we investigated how mouse oocytes respond to injection of a single or multiple spermatozoa with or without their acrosomes. The effects of the injection of hydrolyzing enzymes (trypsin and hyaluronidase) on oocytes and embryos were also examined.

Materials and Methods

Agents and Media. All inorganic and organic reagents were purchased from Sigma unless otherwise stated. The medium used for culturing oocytes after ICSI was bicarbonate-buffered Chatot-Zanett and Baustier (CZB) medium supplemented with 5.56 mM D-glucose and 4 mg/ml BSA (14). The medium used for oocyte collection and ICSI was modified CZB with 20 mM Hepes-Na, 5 mM NaHCO₃, and 0.1 mg/ml polyvinyl alcohol (PVA; cold water-soluble) instead of CZB. CZB was used under 5% CO₂ in air, and Hepes-CZB under 100% air. The pH value of these media was ~7.4. The reason for using CZB medium instead of the currently popular potassium simplex optimized medium (KSOM) medium is that the 10 mM NaCl we used to activate mouse oocytes tends to precipitate in KSOM medium. As long as we use hybrid mice, we do not see any difference between these two media in their ability to support *in vitro* development of fertilized eggs.

Animals. Mice and Syrian (golden) hamsters were maintained in accordance with the guidelines of the Laboratory Animal Service at the University of Hawaii and those prepared by the Committee on Care and Use of Laboratory Animals of the Institute of Laboratory Resources National Research Council (Department of Health, Education, and Welfare publication (National Institutes of Health) 80-23, revised 1985). The protocol describing our animal handling and treatment procedures was reviewed and approved by the Animal Care and Use Committee at the University of Hawaii.

Preparation of Mouse Oocytes. Female B6D2F1 mice, 8–12 weeks of age, were induced to superovulate by i.p. injection of 7.5 units of equine chorionic gonadotropin (eCG) followed 48 h later by i.p. injection of 7.5 units of human chorionic gonadotropin (hCG). Mature oocytes were collected from the ovaries 14–15 h after hCG injection. They were freed from the cumulus cells by 3-min treatment with 0.1% (wt/vol) bovine trypsin hyaluronidase (300 USP units/mg; ICN) in Hepes-CZB. The cumulus-free oocytes were thoroughly rinsed and kept in CZB medium before ICSI for up to 3 h at 37°C. Only the oocytes with disintegrated first polar bodies were used for ICSI to make later identification of activated and unactivated oocytes easier by the presence or absence of the second polar body.

Acknowledgments. ICSI, intracytoplasmic sperm injection; CZB, Chatot, Zanett, and Baustier medium; PVA, polyvinyl alcohol; IVF, *in vitro* fertilization; PVP, polyvinyl pyrrolidone.

*Authors contributed equally to this work. ■■■■■

© 2005 by The National Academy of Sciences of the USA

PNAS | October 4, 2005 | vol. 102 | no. 40 | 14209–14214

Preparation of Spermatozoa, ICSI, and Examination of ICSI Oocytes. A dense sperm mass from the cauda epididymides of the mouse or hamster was placed at the bottom of a 1.5-ml centrifuge tube containing 300 µl of CZB medium. The spermatozoa were allowed to swim up into the medium for 3–15 min at 37°C. The supernatant containing actively motile spermatozoa was then transferred to 500-µl microtubes. A straw (0.5 ml) of frozen bull spermatozoa was thawed in a 37°C water bath for 1 min. Thawed bull semen was placed at the bottom of a 1.5-ml centrifuge tube containing 500 µl of CZB to allow the spermatozoa to swim into the medium for 20 min at 37°C. Boar spermatozoa were isolated from ejaculated semen of fertile males. A 500-µl aliquot of the semen was placed at the bottom of a 1.5-ml centrifuge tube containing 500 µl of CZB to allow spermatozoa to swim up for 20 min at 37°C. For human spermatozoa, 15 ml of liquid human semen was placed at the bottom of a 5-ml centrifuge tube containing 3 ml of CZB. The spermatozoa were allowed to swim up for 60 min at 37°C. ICSI was carried out according to Kimura and Yanagimachi (2) with some modifications. A small amount (25 µl) of the swim-up sperm suspension was mixed thoroughly with 50 µl of Hepes-CZB containing 8–12% (wt/vol) poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) (M_w 360,000). A drop of this suspension was transferred under mineral oil (Squibb) in a plastic dish (100 mm in diameter and 10 mm in depth) previously placed on the stage of an inverted microscope equipped with a micromanipulator. A single spermatozoon of the mouse or hamster was drawn tail first into an injection pipette, and the head was separated from the tail by applying a few piezo pulses to the neck region. The isolated sperm head was injected immediately into an oocyte. Only the sperm head is needed to obtain offspring by ICSI (15). A single human, bull, or boar spermatozoa, drawn into the pipette, was immobilized by applying a few piezo pulses to its midpiece region before the entire body of the spermatozoon was injected into a mouse oocyte. When more than two spermatozoa were injected into a single oocyte, care was taken to minimize the volume of the medium injected. Approximately 30 oocytes in a group were operated on within 15 min. ICSI was completed within 2 h after collection of the oocytes from oviducts. In some experiments, acrosomes were removed before ICSI by vortexing mouse, bull, boar, or human spermatozoa for 1 min in Hepes-CZB containing 1% Triton X-100 (16). Some porcine spermatozoa were sonicated for 1 min (four 15-s bursts at 10-s

intervals) by using 50% power output at 0°C in Hepes-CZB containing 2 mg/ml lysolecithin. After washing with Triton-free Hepes-CZB by centrifugation (2,000 × g, 3 min), two or more acrosome-less sperm heads were injected into each oocyte. ICSI oocytes were examined 5–7 h later with an interference-contrast microscope for the presence or absence of pronuclei and the second polar body. The oocytes with second polar bodies were recorded activated. Some oocytes were compressed between a slide and coverslip, fixed briefly with 2% glutaraldehyde, stained with aceto-carmine, and mounted in acetic glycerol to reconfirm the number and state of pronuclei (17). Some other oocytes were cultured *in vitro* for 3 or more days to see whether they continue to survive. The LIVE/DEAD Cell Viability Test Kit (L-7013, Molecular Probes) was used to distinguish live and dead oocytes/embryos.

Examination of the Effects of Enzymes Injected into Oocytes. We chose trypsin and hyaluronidase as enzymes to be tested because trypsin is similar to acrosin in its substrate cleavage specificity and hyaluronidase is commonly extracted from mammalian testes (spermatozoa). Trypsin (trypsin 2.5% liquid, Invitrogen) and hyaluronidase (300 USP units/mg; ICN) were separately injected into mouse oocytes. The amounts of trypsin and hyaluronidase injected into each oocyte were 1–40 pg and 80–500 pg, respectively. BSA was also injected into mouse oocytes as a control. The amount of BSA injected into each oocyte was ~550 pg. Oocytes were examined 5–7 h after injection as described.

Immunolocalization of Microtubules and Microfilaments in Oocytes After ICSI and Enzyme Injection. Immunostaining of microtubules and microfilaments was performed as described (18–21) with some modifications. In brief, the oocytes were fixed at room temperature for 40 min with 2% (wt/vol) formaldehyde in Dulbecco's PBS containing both 0.1% PVA and 0.2% Triton X-100. After washing three times in PBS with PVA (PBS-PVA), they were stored in PBS-PVA containing 1% BSA (PBS-PVA-BSA) for up to 4 days at 4°C. For immunodetection of microtubules and microfilaments, the oocytes were incubated for 30 min at room temperature with monoclonal anti- α -tubulin antibody produced in mouse (T-9026, Sigma), which was diluted 1:500 with PBS-PVA-BSA. After three washings with PBS-PVA-BSA containing 0.5% Triton X-100, oocytes were incubated with

Table 1. Response of mouse oocytes to the injection of a single and multiple mouse spermatozoa

Exp.	No. of sperm heads injected into a single oocyte	Total no. of oocytes injected (no. of reps.)	No. of oocytes activated (%)	No. of oocytes deformed extensively 7 h after ICSI (%)	No. of eggs developed to	
					2-cell (%)	Blastocyst (%)
Acrosome-intact						
A	1	197 (9)	168 (85)	0 (0)	160 (95)*	136 (81)*
B	2	94 (11)	83 (88)	0 (0)	71 (86)*	41 (49)*
C	3	59 (10)	49 (83)	16 (33)	19 (39)*	1 (2)*
D	4–7	90 (12)	66 (73)	37 (56)	0 (0)	0 (0)
E	8–12	21 (7)	14 (67)	14 (100)	0 (0)	0 (0)
Acrosome-less						
F	1	49 (9)	39 (80)	0 (0)	35 (90)	24 (62)
G	2	42 (8)	29 (69)	0 (0)	27 (93)	19 (66)
H	3	18 (8)	10 (56)	0 (0)	6 (60)	3 (30)
I	4–7	37 (9)	25 (68)	0 (0)	10 (40)	2 (8)
J	>8*	—	—	—	—	—
K	0*	57 (7)	—	0 (0)	0 (0)	0 (0)
L	1*	90 (7)	75 (83)	0 (0)	61 (81)	46 (61)

Superscript letters: P < 0.01 for a vs. c, a vs. s, and b vs. d; P < 0.001 for bvs. f.

*Acrosome-less sperm heads were so "sticky" to each other that injection of more than seven sperm heads was technically impossible.

*Sham operation: 2 × 10⁻⁵ µl of Hepes-CZB containing PVP (100 mg/ml) was injected into each oocyte. This volume of the medium corresponded roughly to that of the medium injected with 2–12 sperm heads.

†Fifty-two (91%) oocytes survived, but all of the surviving oocytes did not activate.

*A single sperm head in 2 × 10⁻⁵ µl of Hepes-CZB containing PVP (100 mg/ml) was injected into each oocyte.

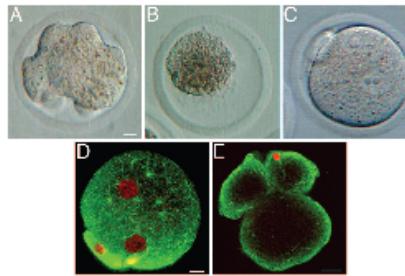


Fig. 1. Mouse oocytes each injected with a single or multiple mouse sperm heads. (A) A deformed oocyte 7 h after injection of four acrosome-intact sperm heads. (B) An oocyte cytolyzed after injection of 10 acrosome-intact sperm heads. (C) An oocyte injected with 4 acrosome-less sperm heads. (D) Confocal image of an oocyte 7 h after normal IVF. Note many astrotropes tubules in the ooplasm. Pronuclei are shown as large red spherical structures. (E) Confocal image of an oocyte injected with six acrosome-intact sperm heads. Note that microtubules are lying near the cortex of the deformed oocyte and are absent in the interior part of the oocyte. Pronuclei are not in this optical section. [Scale bars: 10 μ m (A–C), 10 μ m (D), and 10 μ m (E).]

Alexa Fluor 488-labeled goat anti-mouse IgG (A-11029, Molecular Probes), at a dilution of 1:200, in PBS-PVA-BSA for 20 min at room temperature or Cy5-labeled goat anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch) at a dilution of 1:200 in PBS-PVA-BSA for 20 min at room temperature. After three washings with PBS-PVA-BSA containing 0.5% Triton X-100, actin distribution was analyzed by using phalloidin-fluorescein isothiocyanate (P-5282, Sigma). Oocytes were incubated for 60 min at room temperature with antibody diluted 1:250 in PBS. After three washings with PBS-PVA-BSA, oocyte nuclei were labeled with 10 mg/ml propidium iodide (PI) (P-4170, Sigma) in PBS for 90 min at room temperature. After three washings with PBS-PVA-

BSA, they were mounted between a slide and coverslip. Alexa Fluor 488 and PI emitted green and red fluorescence, respectively. Cy5 originally generated a red fluorescence signal (670 nm), but this red fluorescence was converted to blue in images. This conversion allowed us to distinguish between Cy5 and PI. Preparations were viewed by using a Bio-Rad MRC-1024 confocal scanning laser microscope. At least 25 oocytes from more than four animals were used for each experiment.

In Vitro Fertilization (IVF). Cumulus-enclosed oocytes, collected from oviducts ~15 h after human chorionic gonadotropin injection, were inseminated in Toyoda, Yokoyama and Hoshi (TYH) medium (22). Sperm concentration at insemination was $2-4 \times 10^6$ /ml. Oocytes were examined for evidence of fertilization 2 h later as already described for ICSI oocytes. The conditions we used resulted in normal fertilization in 73.3% (151 of 206) of the oocytes. In a separate series of experiments, 1.4 pg of trypsin or 100 μ g of hyaluronidase was injected into the cytoplasm of a fertilized egg at the early pronuclear stage (~6 h after IVF).

Embryo Transfer After ICSI. Two-cell embryos developed from normally fertilized oocytes were transferred into oviducts of pseudopregnant CD1 (albino) females that had been mated during the previous night with vasectomized males of the same strain. After embryo transfer, the surrogate females were killed on day 19 of pregnancy, and their uteri were examined for the presence of live fetuses. Live fetuses, if any, were collected by Caesarian section and raised by lactating CD1 foster mothers. [Scale bars: 10 μ m (A–C), 10 μ m (D), and 10 μ m (E).]

Statistical Analysis. The difference between the experimental group and matched control group was compared by using Fisher's exact probability test. Differences were considered significant at the $P < 0.05$ level.

Results

Response of Mouse Oocytes to the Injection of a Single or Multiple Mouse Spermatozoa. Ordinarily for mouse ICSI, a single spermatozoon (2) or single isolated sperm head (15) is injected into each oocyte. In this study, the majority of mouse oocytes injected with a single sperm head were activated normally and developed into blastocysts (Table 1, Exp. A). When 2 acrosome-intact sperm heads

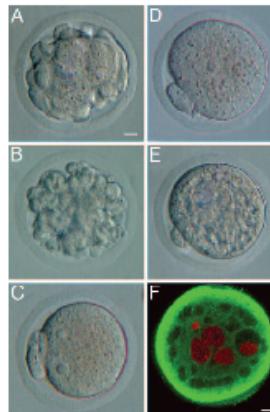


Fig. 2. Mouse oocytes injected with hamster or human spermatozoa. (A) An oocyte injected with a single acrosome-intact hamster sperm head, 4 h after ICSI, with extensive deformation. (B) An oocyte injected with a single acrosome-intact hamster sperm head, 24 h after ICSI, with extensive deformation. (C) An oocyte injected with a single acrosome-less hamster sperm head, 4 h after ICSI, without deformation. (D) An oocyte injected with a single acrosome-intact human spermatozoon, 6 h after ICSI, without deformation. (E) An oocyte injected with six acrosome-intact human spermatozoa, 20 h after ICSI, with irregular appearance of the cytoplasm. (F) Confocal section of an oocyte injected with six acrosome-intact human spermatozoa, 20 h after ICSI, showing many "vacuoles" within the cytoplasm. Sperm pronuclei are shown as red spherical structures. (A–E) Interference-contrast microscopy. (F) Confocal scanning laser microscopy. [Scale bars: 10 μ m (A–E) and 10 μ m (F).]

were injected into each oocyte, the proportion of the oocytes reaching the blastocyst stage was drastically reduced (Table 1, Exp. B). When three or more acrosome-intact sperm heads were injected, increasing proportions of the oocytes became deformed (Table 1, Exps. C–E, and Fig. 1A) starting from several hours after ICSI. Although deformed oocytes were alive (determined by the cell viability test), a few or none reached the blastocyst stage. When

8 or more acrosome-intact sperm heads were injected into each oocyte, all oocytes became deformed and remained in the same state for 3 days. Injection of 10 or more acrosome-intact sperm heads resulted in oocyte deformation, edema, and eventual cytolysis of all oocytes (Fig. 1B). None of the oocytes became deformed when acrosome-less sperm heads were injected, irrespective of the number of the heads injected (Table 1, Exps. F–I, and Fig. 1C). Deformation of the ooplasm after injection of multiple sperm heads was not due to the introduction of an excess volume of the medium injected because the introduction of a large volume of the medium itself did not deform oocytes (Table 1, Exps. K and L). In normally fertilized oocytes, many astral microtubules were distributed throughout the ooplasm (Fig. 1D). In the oocytes that became deformed after injection of several acrosome-intact sperm heads, fibrous microtubules were lying near the oocyte cortex (Fig. 1E). Distribution of actins in the oocyte was the same in both single-sperm-injected and multiple-sperm-injected oocytes (data not shown).

Response of Mouse Oocytes to the Injection of Hamster, Bovine, and Porcine Spermatozoa With or Without Acrosomes. The observation that the injection of a single acrosome-intact hamster sperm head causes a drastic deformation of a mouse oocyte (16) was confirmed by the present study (Table 2, Exp. A, and Fig. 2A and B). In deformed oocytes, microtubules were heavily concentrated in the cortex of the oocyte. Oocytes did not deform when an acrosome-less hamster sperm head was injected (Fig. 2C and Table 2, Exp. C). Similar results were obtained after injection of bovine and porcine spermatozoa. Injection of a single acrosome-intact spermatozoon deformed nearly half or more of the oocytes (Table 2, Exps. D and J). Three or more acrosome-intact spermatozoa cytolyed one-third or all of the oocytes (Table 2, Exps. F and K), whereas acrosome-less spermatozoa did not (Table 2, Exp. I and L).

Response of Mouse Oocytes to the Injection of Human Spermatozoa. Unlike other spermatozoa, a single human spermatozoon injected into an oocyte did not deform the oocyte (Figs. 2D). However, injection of four or more human spermatozoa produced "vacuole-like" structures within the ooplasm (Table 3, Exps. B–D, and Fig. 2E and F). No vacuoles were formed when acrosome-less spermatozoa were injected (Table 3, Exp. E). None of the mouse oocytes injected with a single or multiple human spermatozoa developed beyond the two-cell stage.

Response of Mouse Oocytes to the Injection of Enzymes. Reactions of mouse oocytes to the injection of various enzymes are summarized

Table 2. Response of mouse oocytes to the injection of a single and multiple hamster, bovine, and porcine spermatozoa

Species	Exp.	No. of sperm injected into each oocyte	Status of acrosome	Total no. of oocytes injected (no. of reps.)	No. of oocytes survived ICSI and activated (%)	No. of oocytes deformed extensively (%)		No. of oocytes cytolyzed (%)	No. of eggs developed to 2-cell (%)
						7 h after ICSI	24 h after ICSI		
Hamster	A	1	Acrosome-intact	47 (6)	30 (64)	30 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	B	3	Acrosome-intact	10 (3)	4 (40)	4 (100)	4 (100)	4 (100)	0 (0)
	C	1	Acrosome-less	50 (5)	38 (76)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	38 (100)
Bovine	D	1	Acrosome-intact	100 (5)	65 (65)	18 (28)	30 (46)	0 (0)	1 (2) ^a
	E	2	Acrosome-intact	31 (4)	15 (48)	5 (33)	11 (73)	1 (7)	1 (7)
	F	3–7	Acrosome-intact	17 (4)	9 (53)	9 (100)	9 (100)	3 (33)	4 (44) ^b
	G	1	Acrosome-less	51 (4)	17 (33)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (12)
	H	2	Acrosome-less	21 (5)	11 (52)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (6)
Porcine	I	3–7*	Acrosome-less	7 (3)	3 (43)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	J	1	Acrosome-intact	109 (4)	50 (46)	44 (88)	44 (88) ^c	1 (2)	33 (66)
	K	3	Acrosome-intact	18 (3)	15 (83)	15 (100)	15 (100)	15 (100)	0 (0)
	L	1	Acrosome-less ^d	79 (4)	35 (44)	0 (0)	4 (11)*	0 (0)	27 (77) ^f

Superscript letters: $P < 0.001$ for c vs. e, a vs. b, and d vs. f.

*Injection of more than three acrosome-less spermatozoa was difficult due to adhesion of spermatozoa.

^aTriton X-100 (1%) was used to remove acrosomes of hamster and bovine spermatozoa. This was not strong enough to remove acrosomes from all porcine spermatozoa, and therefore we used lysocellithin instead (see Materials and Methods). It was possible that, even with lysocellithin, acrosomes were not removed completely in some spermatozoa as suggested by deformation of some oocytes 24 h after ICSI.

Morozumi and Yanagimachi

PNAS | October 4, 2005 | vol. 102 | no. 40 | 14211

Table 3. Response of mouse oocytes to the injection of a single or multiple human spermatozoa

Exp.	No. of human sperm injected into a single mouse oocyte	Status of acrosome	Total no. of oocytes injected (no. of reps.)	No. of oocytes survived ICSI and activated (%)	No. of oocytes with many vacuole-like structures 30 h after ICSI (%)		No. of eggs developed (%)
					To 2-cell	Beyond 2-cell	
A	1–3	Acrosome-intact	103 (6)	62 (60)	0 (0)	51 (82) ^a	0 (0)
B	4	Acrosome-intact	35 (5)	17 (49)	4 (24) ^b	10 (59)	0 (0)
C	5–6	Acrosome-intact	25 (6)	16 (64)	11 (69) ^c	5 (31) ^d	0 (0)
D	7–8	Acrosome-intact	11 (6)	7 (64)	7 (100)	0 (0)	0 (0)
E	7–8*	Acrosome-less	10 (2)	5 (50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
F	0 ^e	—	40 (4)	— ^f	0 (0)	0 (0)	0 (0)
G	1 ^f	Acrosome-intact	50 (4)	34 (68)	0 (0)	27 (79)	0 (0)

Superscript letters: $P < 0.05$ for b vs. c; $P < 0.001$ for a vs. d.

*Seven to eight acrosome-less sperm were injected into each oocyte.

^aSham operation. A total of 2×10^{-6} μ l of HEPES-C2B containing PVP (100 mg/ml) was injected into each oocyte. This volume of the medium corresponded roughly to that of the medium injected with two to eight spermatozoa.

^bForty (100%) oocytes survived, but all surviving oocytes did not activate.

^cA single spermatozoon in 2×10^{-6} μ l of HEPES-C2B containing PVP (100 mg/ml) was injected into each oocyte.

14212 | www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0507005102

Morozumi and Yanagimachi

Table 4. Response of mouse oocytes to the injection of trypsin or hyaluronidase

Amounts injected into each oocyte	Exp.	Total no. of oocytes injected (no. of reps.)	State of oocytes, examined 5–7 h after injection		
			No. survived (%)	No. activated* (%)	No. deformed (%)
Trypsin					
1.4 pg	A	25 (3)	24 (96)	0 (0)	0 (0)
1.4–40 pg	B	81 (6)	0 (0)	0 (0)	75 (100)
30 pg (heated)*	C	23 (2)	20 (87)	0 (0)	0 (0)
Hyaluronidase					
30–250 pg	D	34 (3)	33 (97)	0 (0)	0 (0)
250–500 pg	E	55 (3)	50 (90)	50 (100)	40 (80)
BSA					
~550 pg	F	25 (2)	20 (80)	0 (0)	0 (0)

*Oocytes with one pronucleus and the second polar body.

*Heated at 100°C for 2 min.

In Table 4, the oocytes each injected with >1.4 pg of trypsin deformed within 5 min and then cytolysed (Table 4, Exp. B). Microtubules were accumulated extensively in the oocyte cortex of these deformed oocytes. Heated trypsin did not deform the oocytes (Table 4, Exp. C). Oocytes injected with >250 pg of hyaluronidase activated within 2 h and then deformed within 5 h (Table 4, Exp. E). Injection of BSA (>550 pg) had no effects (Table 4, Exp. F).

Development of IVF-Fertilized Eggs Injected with Trypsin or Hyaluronidase. Sperm acrosome extract (1.2–3.6 pg) and Hepes-C2B medium injected into the cytoplasm of normally fertilized eggs did not disturb pre- and postimplantation development of embryos (Table 5, Exps. A and D), but trypsin (1.4 pg) and hyaluronidase (100 pg) significantly affected both pre- and postimplantation development of embryos (Table 5, Exps. B and C).

Discussion

In the human and mouse, injection of a single spermatozoon into an oocyte can result in the birth of a healthy offspring (1, 2, 23). This is not the case for the Syrian hamster. Injection of a single acrosome-intact spermatozoon into each oocyte inevitably causes lysis of all oocytes within 2 h (3). Removal of acrosomes is a key to success of hamster ICSI. Although ICSI has been successful for many other species (24), no systematic study has been conducted to determine whether the presence or absence of the acrosome in spermatozoa affects the outcome of ICSI.

Here, we report that mouse oocytes became deformed and cytolysed when three or more acrosome-intact mouse spermatozoa were injected into each oocyte. However, they did not deform when injected spermatozoa (sperm heads) were free of acrosomes (Table 1). Abnormal accumulation of microtubules in the cortex of oocyte (Fig. 1E) could be a cause of the deformation and subsequent cytolysis of oocytes. Because acrosome-intact bovine and porcine spermatozoa cytolysed mouse oocytes, whereas acrosome-less spermatozoa did not (Table 2), it must be the acrosome, not spermatozoa *per se*, that caused the problem. The minimum number of acrosome-intact spermatozoa (or sperm heads) that deformed 100% of mouse oocytes by ICSI were as follows: one (hamster), two (porcine), three (bovine), seven (human), and eight (mouse). This order (hamster, porcine, bovine, human, and mouse) seems to be correlated to the volume of the acrosome, with that in hamster spermatozoa being the largest. The components of the acrosome harmful to the oocyte are likely to be acrosomal enzymes such as trypsin-like acrosin and hyaluronidase because injection of commercially available trypsin and hyaluronidase mimicked the effects of supernumerary acrosome-intact spermatozoa (Table 4). We preliminarily tested mouse sperm acrosome extracts prepared according to Baba *et al.* (25) and found that they induce oocyte activation without deforming the oocytes (data not shown). We

suspect that the concentration of acrosin in the sperm extracts was too low to deform the oocytes. Oocyte activation could be due to either acrosomal hyaluronidase or contamination of calcium ionophore used for the induction of the sperm acrosome reaction. Molecular mechanisms by which acrosomal materials and exogenous enzymes damage the oocyte's cytoskeletal system and disturb embryo development must be the subject of future investigation.

Because a single spermatozoon is injected during human and mouse ICSI, its acrosomal enzymes released into the oocyte would not impose a serious problem. Fortune has smiled on human and mouse ICSI because the acrosomes of these species happen to be rather small (24). If human sperm acrosomes were as large as hamster or bull sperm acrosomes and if human oocytes ($\sim 7 \times 10^5 \mu\text{m}^3$) were as small as mouse oocytes ($\sim 2.7 \times 10^5 \mu\text{m}^3$), human ICSI could have been problematic from its inception. Even though removal of the acrosome from an individual spermatozoon before ICSI is not essential in the human or the mouse, it is theoretically preferable because the acrosome and its contents never enter the oocyte under natural conditions. It is expected that spermatozoa of infertile men have either normal or below normal levels of acrosomal enzymes such as acrosin (26–28). However, spermatozoa of some infertile men may have excess amounts of acrosomal enzymes. It is possible that oocytes of some infertile women have cytoplasm extremely vulnerable to the damage caused by exogenous hydrolyzing enzymes. In such cases, ICSI may result in abnormal development or even death of embryos. Such abnormal development could be avoided by selecting a few normal-looking motile spermatozoa, removing their acrosomes by a brief treatment with a membrane-disrupting agent (such as nonionic detergent or lysis-citinin), followed by thorough rinsing and immediate ICSI. The report that embryo development and pregnancy are better after the injection of acrosome-reacted human spermatozoa than acrosome-intact spermatozoa¹ is consistent with the notion described in this paper and deserves reconfirmation.

The efficiency of ICSI (the proportion of live offspring developed from all ICSI oocytes) in species other than humans and mice is rather low: $\sim 15\%$ at best (24). The removal of acrosomes before ICSI may increase its efficiency. It is very important to keep sperm nuclei undamaged during or after the removal of the acrosomes. Excess exposure of demembranated (acrosome-less) spermatozoa to harsh reagents or prolonged maintenance of demembranated spermatozoa in an inappropriate medium may damage sperm nuclei, thus resulting in the failure, rather than the improvement, of ICSI.

¹Lee, D. R., Lin, Y. L., Lee, J. E., Kim, H. J., Joon, H. S. & Roh, S. I. 52nd Annual Meeting of the American Society of Reproductive Medicine, Nov. 2–6, 1996, Boston, abstr. p.006.

Table 5. Effects of trypsin, hyaluronidase, and sperm acrosome extract (SPA) Injected into IVF-fertilized pronuclear eggs on embryo development

Exp.	Material injected into each zygote	Total no. of zygotes cultured (no. of reps.)	No. of zygotes developed to		No. of 2-cell transferred (no. of recipients)	No. of live offspring (%)
			2-cell (%)	Blastocyst (%)		
A	Mouse SPA (1.2–3.6 pg)	30 (2)	29 (97)	29 (97)	58 (5)	40 (69)
B	Trypsin (1.4 pg)	87 (5)	39 (44)	23 (26)*	72 (5)	24 (33) ^b
C	Hyaluronidase (100 pg)	55 (2)	31 (56)	21 (38) ^c	36 (2)	6 (17) ^d
D	HEPES-C2B*	20 (2)	20 (100)	18 (90)	26 (2)	20 (77)
E	None (control)	143 (6)	140 (98)	126 (88)*	27 (2)	21 (78) ^e

*Superscript letters: ^a $p < 0.001$ for a vs. a, c, vs. a, b vs. f, and d vs. f.*sham operation: $2 \times 10^{-5} \mu\text{l}$ of HEPES-C2B was injected into each IVF-fertilized zygote.

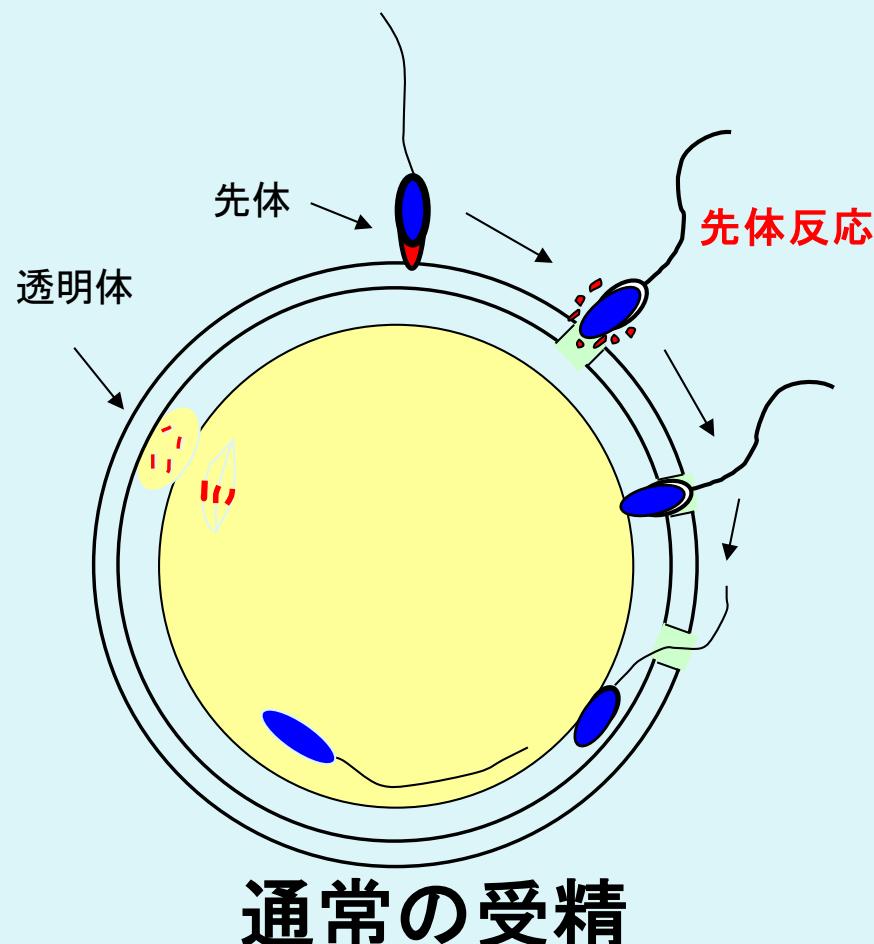
We thank Professor Eimee Sato, Dr. Hiromichi Matsumoto, and Ms. Yumi Hoshino of Tohoku University for teaching K.M. the methods of immunostaining cytoskeletons and providing us with valuable information. We thank Professor Tadashi Baba and Dr. Ekyune Kim for the preparation of mouse sperm extracts. We thank Dr. Chin N. Lee and Dr. Halina Zaleski of the University of Hawaii College of Agriculture for supplying bovine and porcine spermatozoa and Dr. Steven Ward and Mrs. Renata Pruszki of the Institute for Biogenesis Research for supplying hamster spermatozoa. We thank Mrs. Tina Carvalho for her valuable advice on confocal microscopy. We thank Dr. Stanley Meizel

(University of California, Davis) and Dr. George Gerton (University of Pennsylvania) for information about acrosomal enzymes. We are indebted to Dr. John R. McCarrey (University of Texas, San Antonio), Dr. George Seidel (Colorado State University), and Dr. Vincent De Leo and Mrs. Charlotte Oser (University of Hawaii) for reading the original manuscript. We also thank Dr. Stefan Moisyadi and Mr. Boris Umyhyi for their assistance in the preparation of the original manuscript. This study was supported by Grants from the Harold Castle Foundation and University of Hawaii Research Training and Revolving Funds (RTRF).

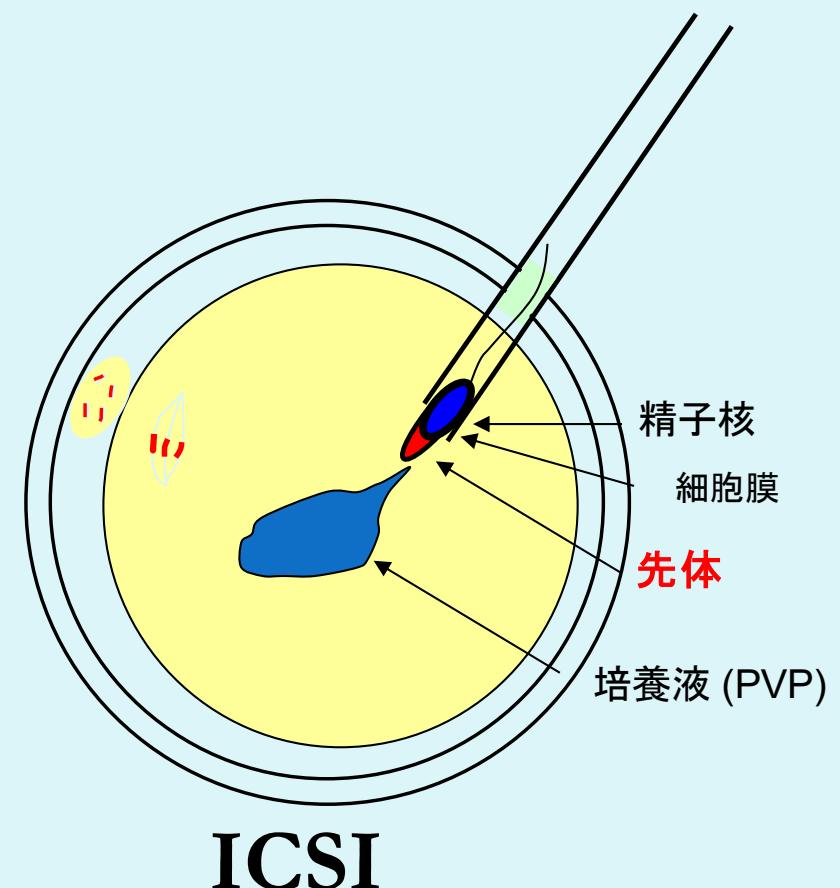
- Van Steirteghem, A. C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., Wilsman, A. & Devroey, P. (1993) *Hum. Reprod.* 8, 1061–1066.
- Kimura, Y. & Yanagimachi, R. (1995) *Biol. Reprod.* 52, 709–720.
- Yamuchi, Y., Yanagimachi, R. & Hoshimi, T. (2002) *Biol. Reprod.* 67, 534–539.
- Sait, S., Han, M. S. & Niwa, K. (2003) *Theriogenology* 60, 359–369.
- Deng, M. & Yang, X. J. (2001) *Mol. Reprod. Dev.* 59, 38–43.
- Goto, K., Kinoshita, A., Takumi, Y. & Ogawa, K. (1990) *Ver. Rec.* 127, 517–520.
- Cart, S. L., Cart, J. W., Gomez, M. C., Maxwell, W. M. & Evans, G. (1996) *Ver. Rec.* 139, 494–495.
- Ji, X., Morris, L. H. & Allen, W. R. (2001) *Reproduction* 121, 925–932.
- Pope, C. E., Johnson, C. A., McRae, M. A., Keller, G. L. & Dremer, B. L. (1998) *Anim. Reprod. Sci.* 53, 221–236.
- Martin, M. J. (2000) *Biol. Reprod.* 63, 109–112.
- Hewittson, L., Dominko, T., Takashashi, D., Martinovic, C., Ramalho-Santos, J., Surovsky, P., Fanton, J., Jacob, D., Monneith, D., Neunerger, M., et al. (1999) *Nat. Med.* 5, 431–433.
- Yanagimachi, R. (1994) *The Physiology of Reproduction* (Raven, New York), 2nd Ed., pp. 189–317.
- Zaniewski, L. & De Jonge, C. (1991) In *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*, eds. Dunbar, B. S. & O'Rand, M. G. (Plenum, New York), pp. 63–79.
- Chatot, C. L., Ziomek, C. A., Bawister, B. D., Lewis, J. L. & Torres, I. (1989) *J. Reprod. Fertil.* 86, 679–688.
- Kuretake, S., Kimura, Y., Hoshi, K. & Yanagimachi, R. (1996) *Biol. Reprod.* 55, 789–795.
- Kimura, Y., Yanagimachi, R., Kuretake, S., Bortkiewicz, H., Perry, A. C. & Yanagimachi, R. (1998) *Biol. Reprod.* 58, 1407–1415.
- Yanagimachi, R., Yanagimachi, R., Perreault, S. D. & Kleinfeld, R. G. (1991) *Biol. Reprod.* 44, 440–447.
- Matsumoto, H., Yukio, M., Yoshida, N., Sasaki, H., Matsumoto, H. & Sato, E. (2002) *J. Exp. Zool.* 293, 641–648.
- Matsumoto, H., Shoji, N., Umezawa, M. & Sato, E. (1998) *J. Exp. Zool.* 281, 149–153.
- Shimazaki, T., Mizutani, E., Tomikawa, I., Kawahara, M., Sasaki, H., Matsumoto, H. & Sato, E. (2004) *Mol. Reprod. Dev.* 68, 313–318.
- Toyonaka, Y., Yokoyama, M. & Hoshi, T. (1971) *Jpn. J. Anim. Reprod.* 16, 147–151.
- Palermo, G., Joris, H., Devroey, P. & Van Steirteghem, A. C. (1992) *Lancet* 340, 17–18.
- Yanagimachi, R. (2005) *Reprod. Biomed. Online* 10, 247–288.
- Baba, D., Kashiwabara, S., Honda, A., Yamagata, K., Wu, Q., Iwasa, M., Okabe, M. & Baba, T. (2001) *J. Biol. Chem.* 277, 30310–30314.
- Agarwal, A. & Loughlin, K. R. (1991) *Arch. Androl.* 27, 97–101.
- Bartovics, B., Rekhart, M., Ekes, F., Lederman, H. & Kedem, P. (1994) *Andrologia* 26, 9–15.
- Langlois, M. R., Oorfink, L., Vandekerkhove, F., Criel, A., Bernard, D. & Elion, V. (2005) *Clin. Chim. Acta* 351, 121–129.

通常の受精とICSIの相違

通常の受精では先体反応により先体酵素で透明体に穴を開け、精子が通過し、精子核のみが卵内に入る。



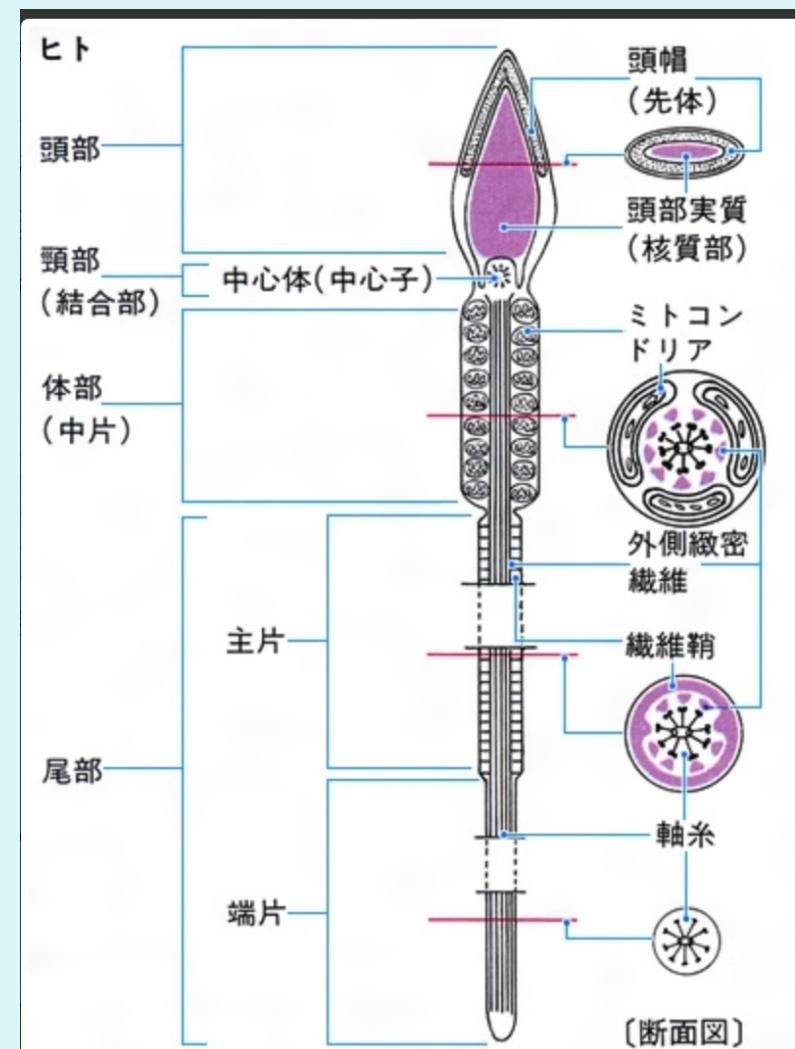
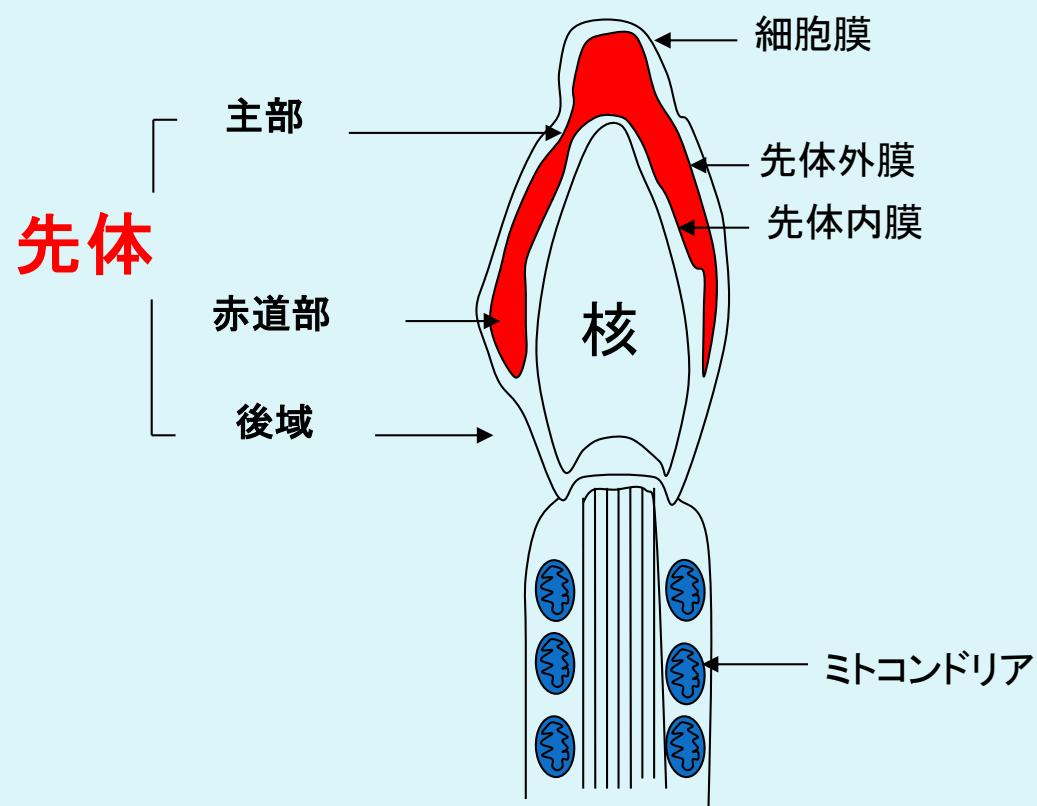
ICSIでは精子そのものが卵内に持ち込まれるため先体酵素、細胞膜、PVPも卵内に入る。



先体の構造

先体は精子頭部を覆うキャップ様構造。この中には精子が透明体を通過するのを助ける一連の加水分解酵素が含まれている

Zaneveld and De Jonge (1991)

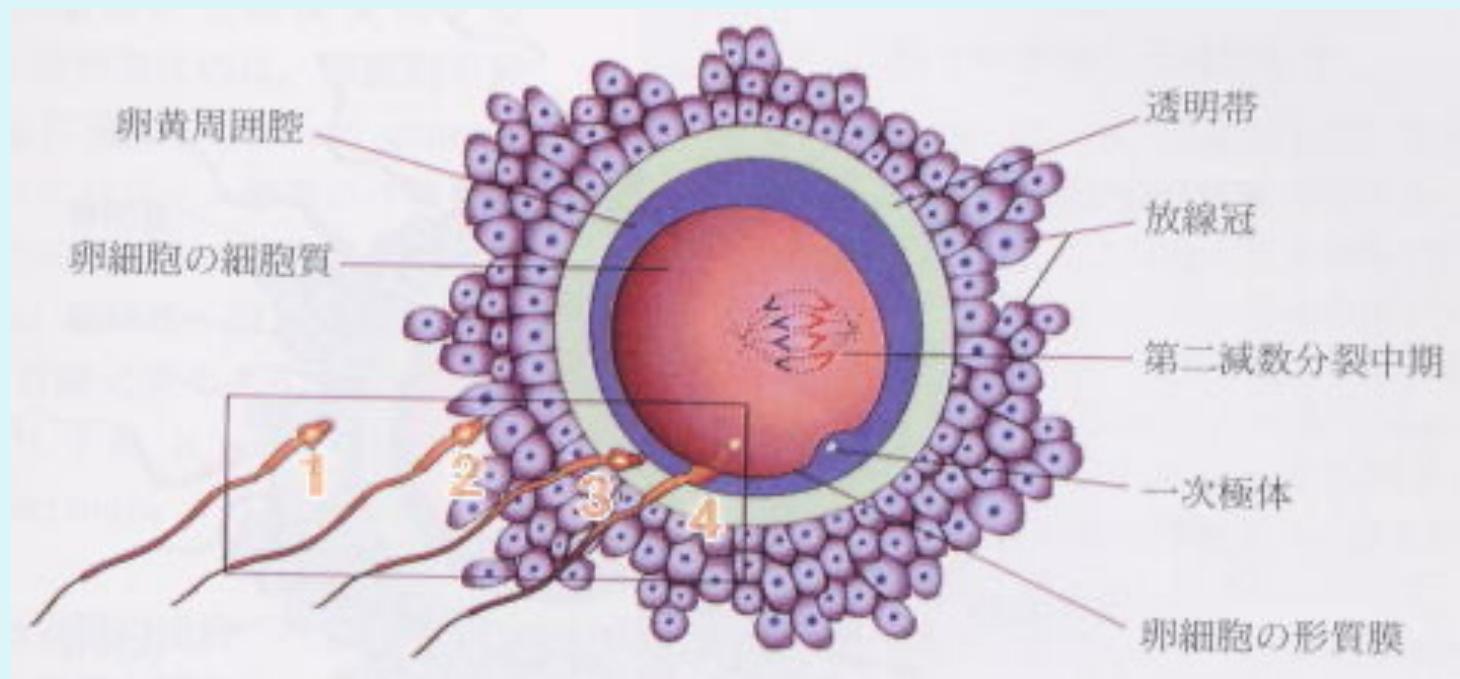


- ICSIと正常の受精の違いはたくさんある。
- 先体酵素を持ち込む
- 細胞膜がそのまま
- そのため人等において、ICSIで正常に発生して子供が生まれること自体非常に驚くべきこと。
- 人とマウス以外の種ではICSIの効率が極めて低い。

- ・ それにもかかわらず人のICSIがここまで普及し成功してきたのは、幸運にもたまたま人の精子と卵がICSIに適していたから。
- ・ 人の精子先体酵素(アクロソーム)は少ない。
- ・ 人の精子細胞膜は硬くない。

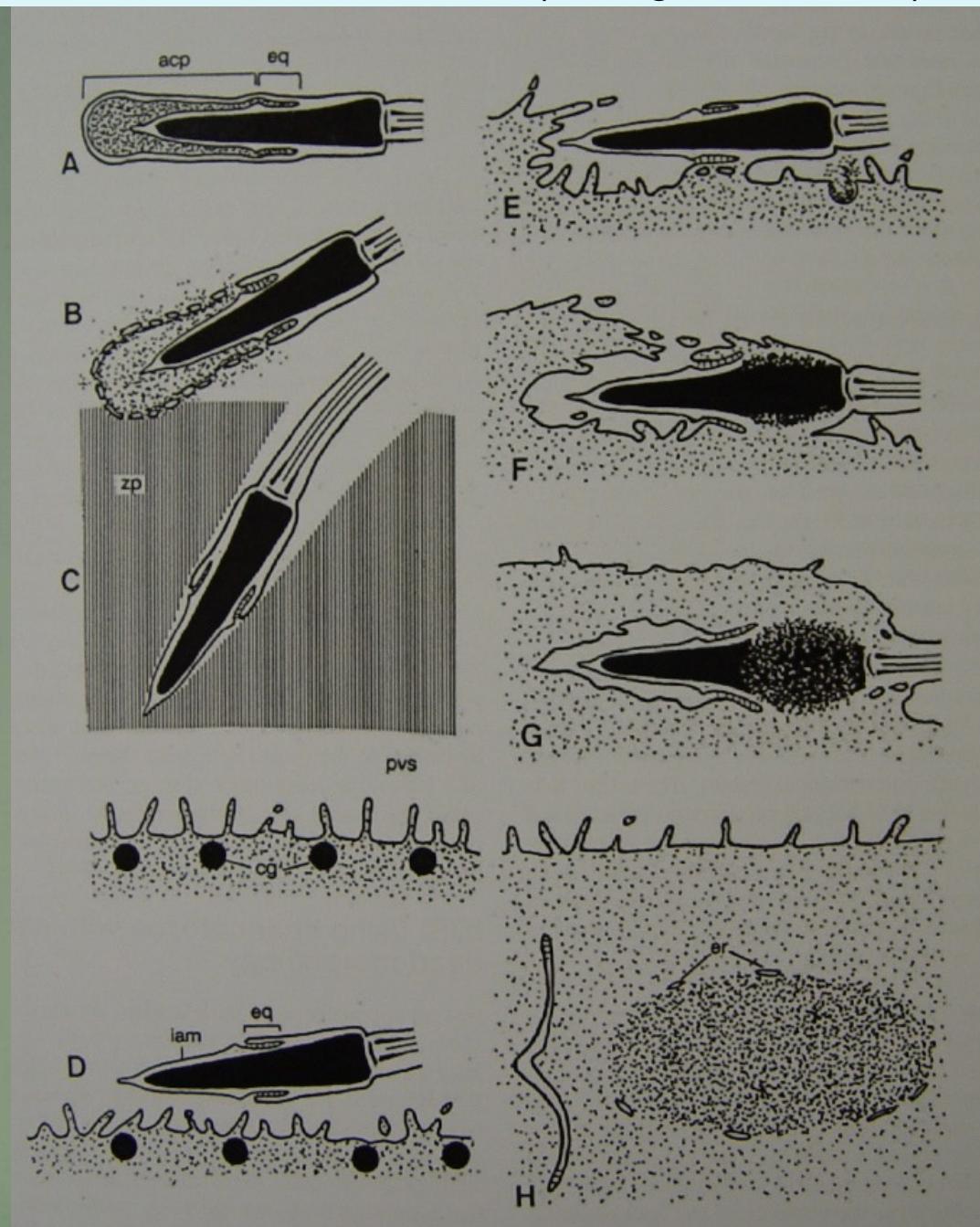
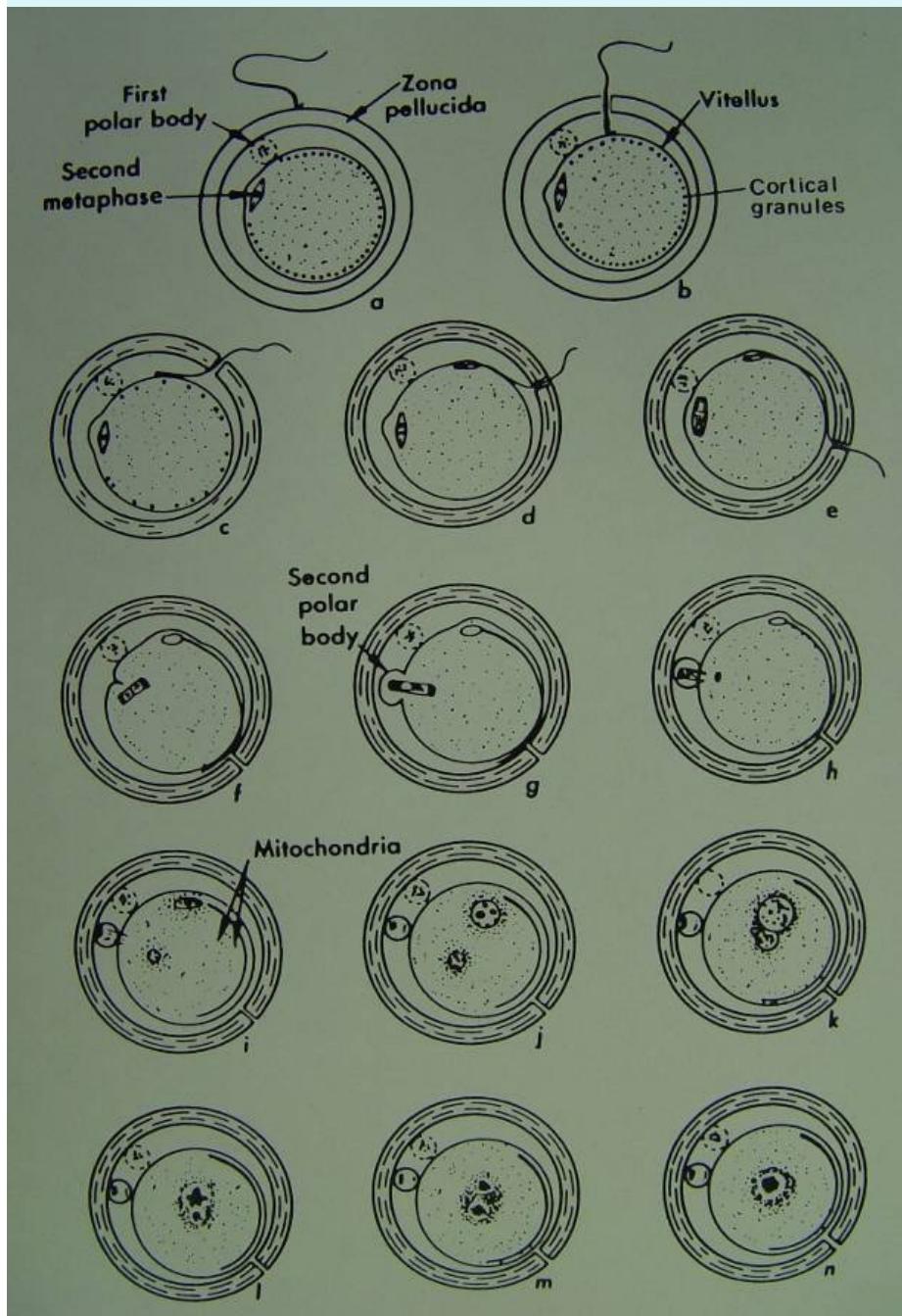
様々な種におけるICSIの効率の比較

種	産仔効率 (%)	参照文献
ハムスター	9	Yamauchi et al. (2002)
ラット	11	Miyata et al. (2000)
ウサギ	4	Deng and Yang (2001)
ネコ	2	Pope et al. (1998)
ウシ	11	Wei and Fukui (2002)
ブタ	2	Probst and Rath (2003)
ヒツジ	0.3	Catt et al. (1996)
ウマ	5	Cochran et al. (1998)
サル	5	Chan et al. (2001)
マウス	58	Morozumi et al. (2006)
ヒト	正常な夫婦間でのデーターがないが、高いと予想される。7割程度か。	Yanagimachi (2005)



Normal fertilization

(Yanagimachi 1994)



精子先体に存在が確認された酵素

1980以前に始めて報告されたもの

Hyaluronidase

Acrosin

Proacrosin

Acid proteinase

Esterase

Neuraminidase

Phosphatase

Phospholipase A

N-Acetylglucosaminidase

Arylsulfatase

Arylamidase

Collagenase

1980以後に始めて報告されたもの

N-Acetylxosaminidase

Galactosidase

Glucuronidase

L-Fucosidase

Phospholipase C

Cathepsin D

Cathepsin L

Ornithin decarboxylase

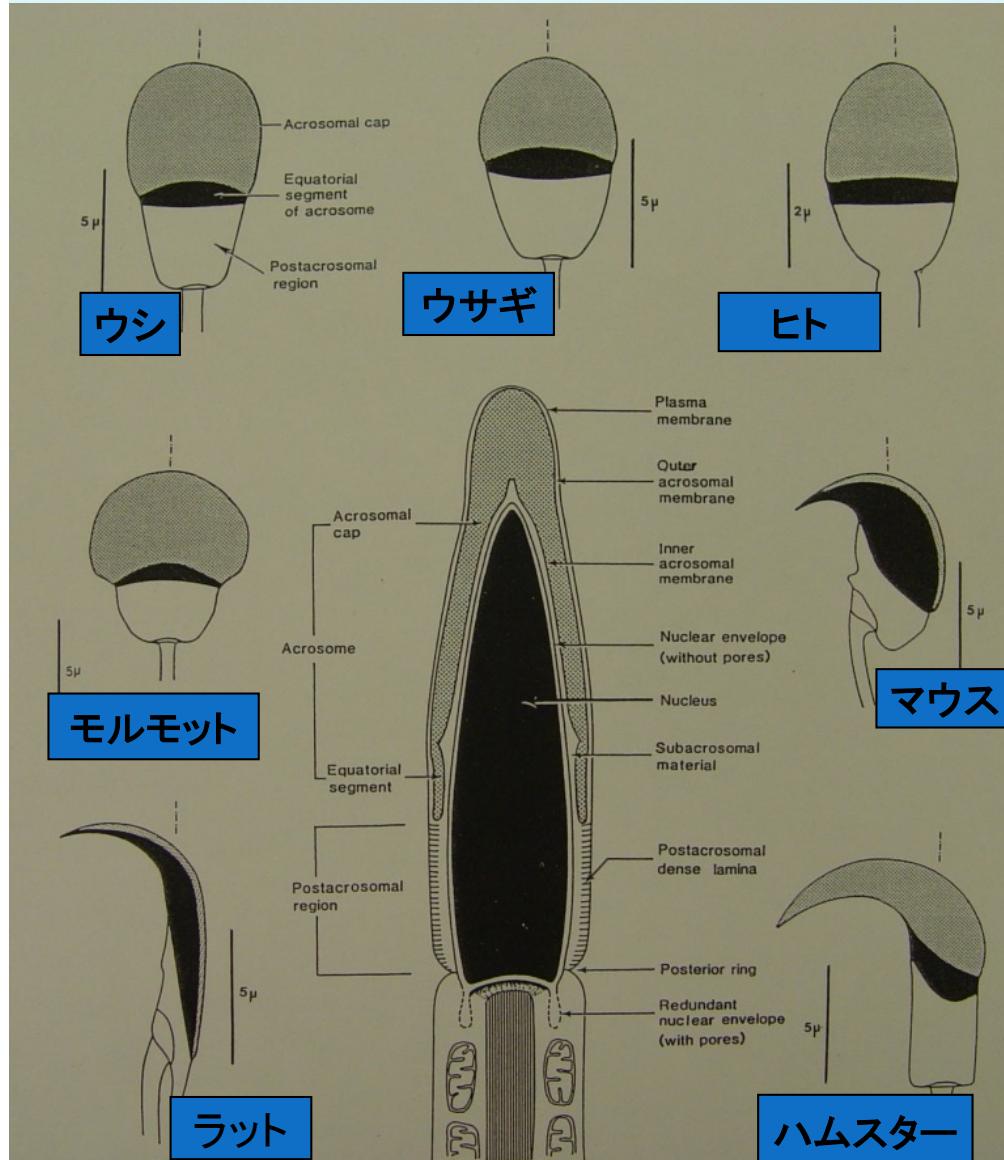
Calpain II

Metalloendoprotease

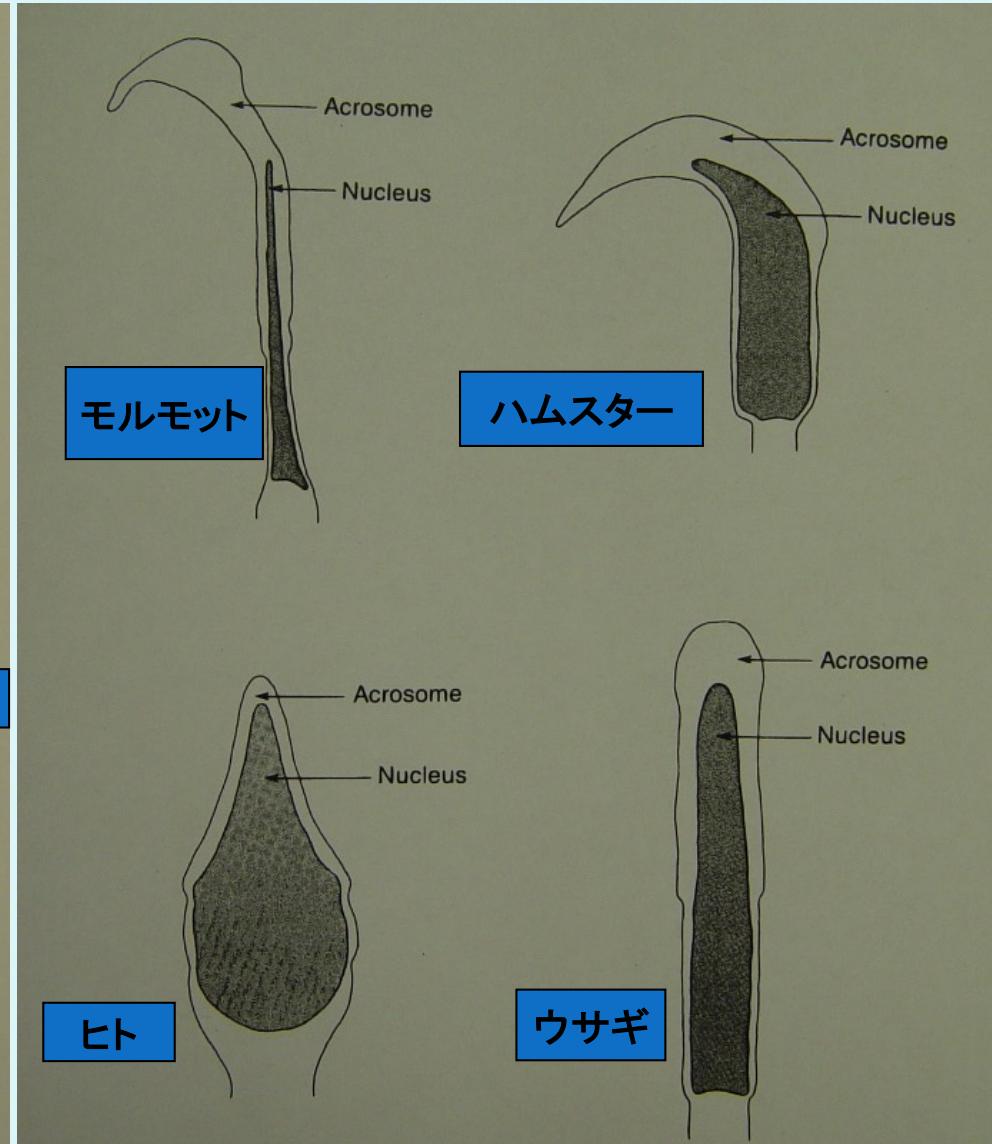
Caproyl esterase

Peptidyl peptidase

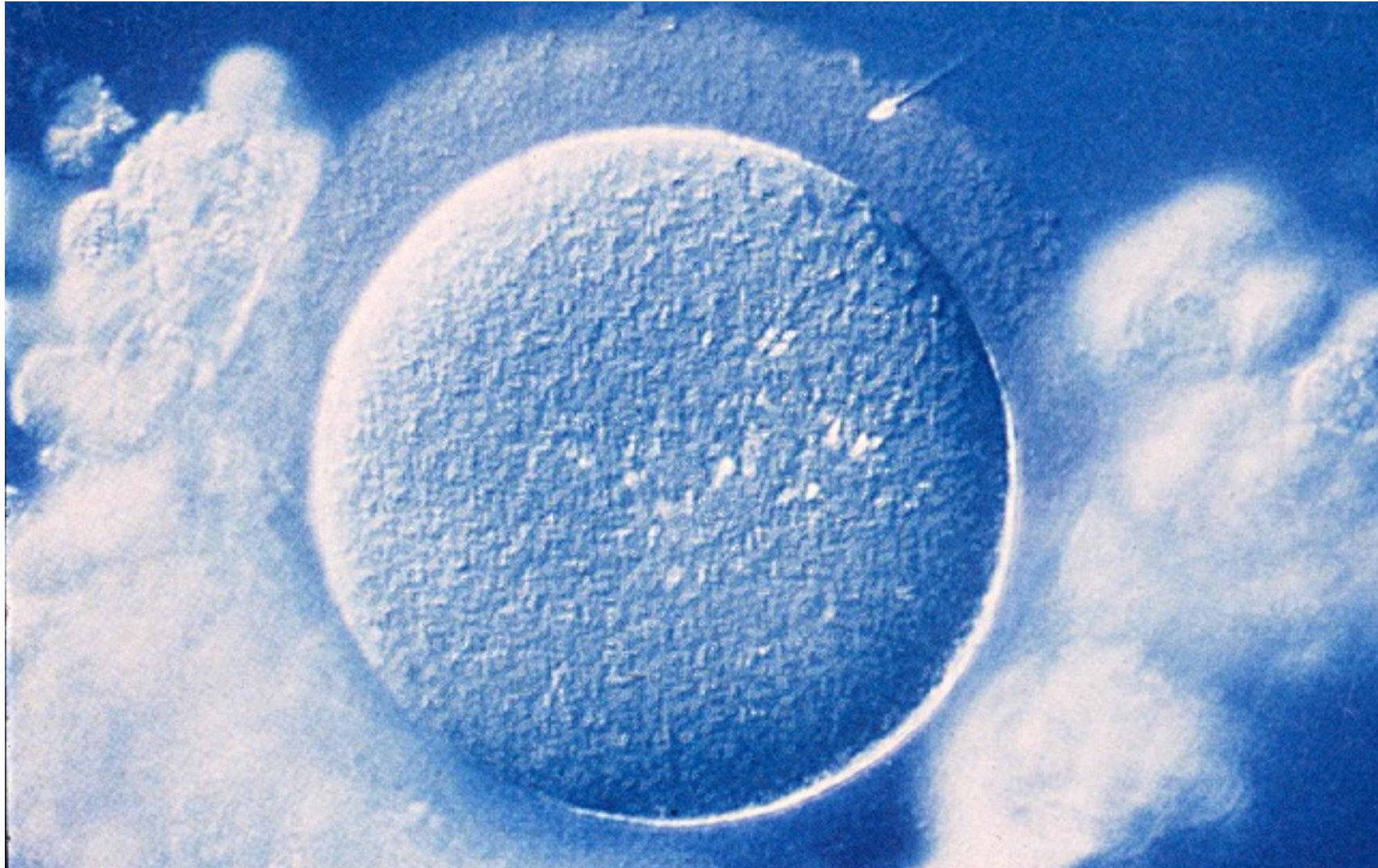
様々な種の精子頭部の構造



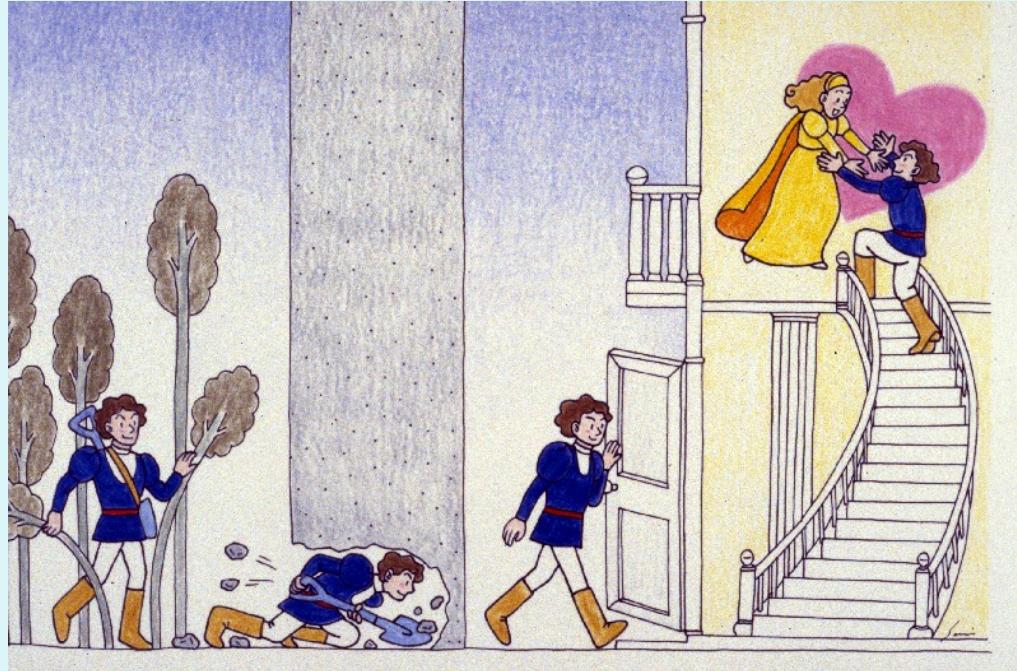
Yanagimachi (1994)



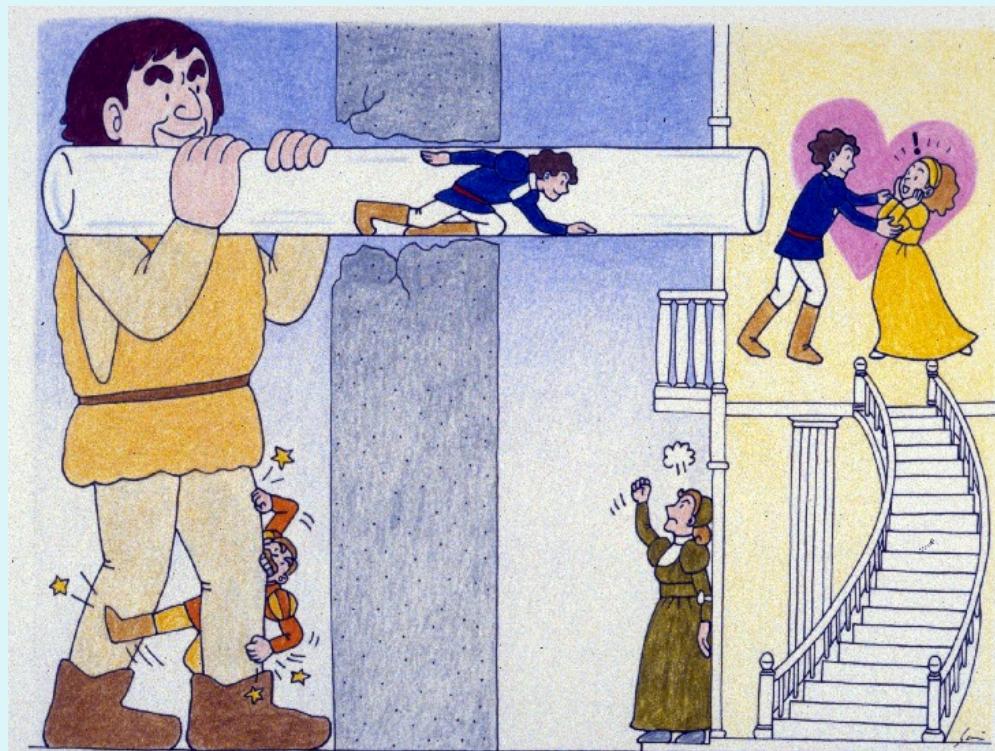
E. M. Eddy and Deborah A. O'Brien (1994)



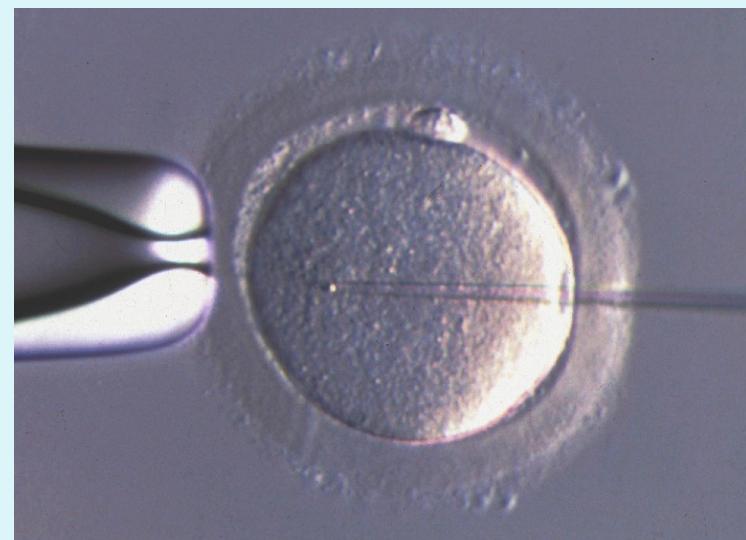
FERTILIZATION



通常の受精



ICSI

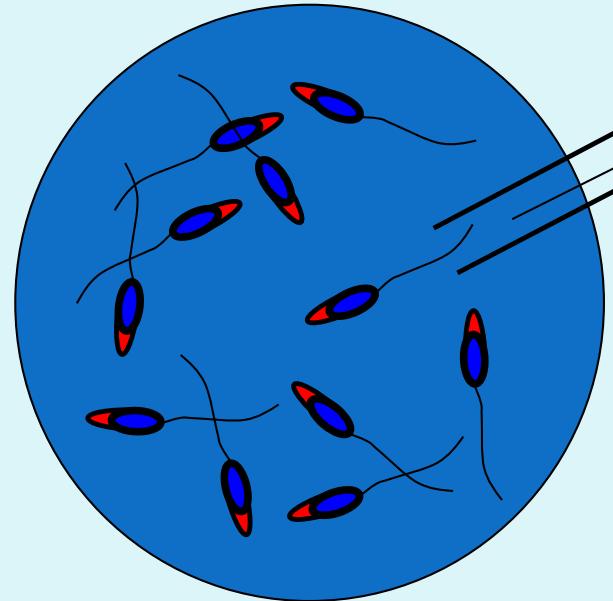


- Thanks. It is very interesting that older women may be more affected by acrosomal enzymes which never enter the egg during normal fertilization. Yana

先体酵素を取り除いてICSIすると胚の発生が良くなると予測

先体酵素を取り除いてICSIしたら苦戦しているケースで成功するかも

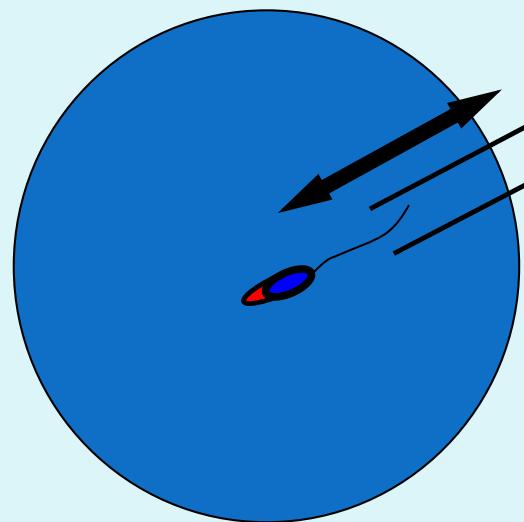
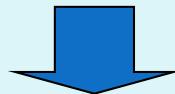
- ①前回のICSIの際に良好胚が得られなかつた症例。培養3日目の段階で6細胞グレード3以上の胚が得られなかつた症例。または培養5日目の段階で3BB以上が得られなかつた症例。
 - ②前回のICSIにて卵活性化障害が疑われた症例。なおここでの卵活性化障害とは受精率が25%以下と定める。
 - ③44歳以上の高齢のケース
- ①、②、③の症例において採卵された卵の半数を未処理のコントロール群とし、残りの半数を研究の対象群とする。この場合は採卵後成熟卵数が4個以上の場合にのみ研究対象可能とする。



精子をライソレシチンで個別に処理する方法

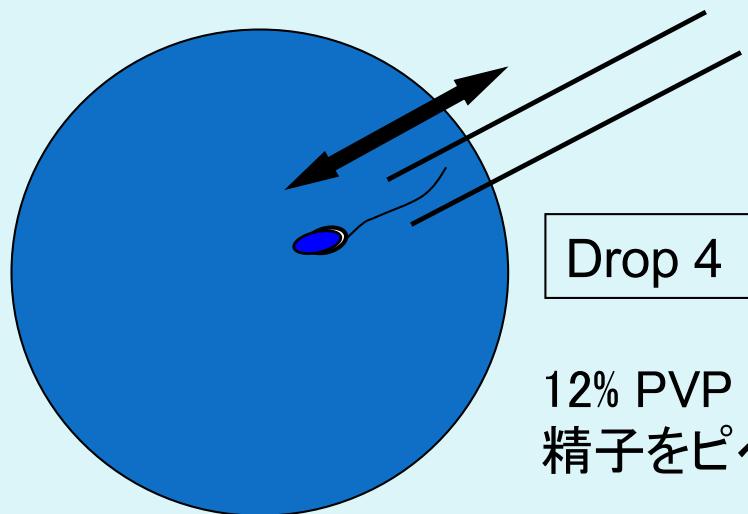
Drop 1 ; 12% PVP

正常形態、運動良好精子を1匹ピックアップする



Drop 2 : 0.2% ライソレシチ
ン

ライソレシチンのドロップにて30秒位か
けて10回程度精子をピッティングす
る。これにより精子は不動化する。



Drop 4 ; 12% PVP

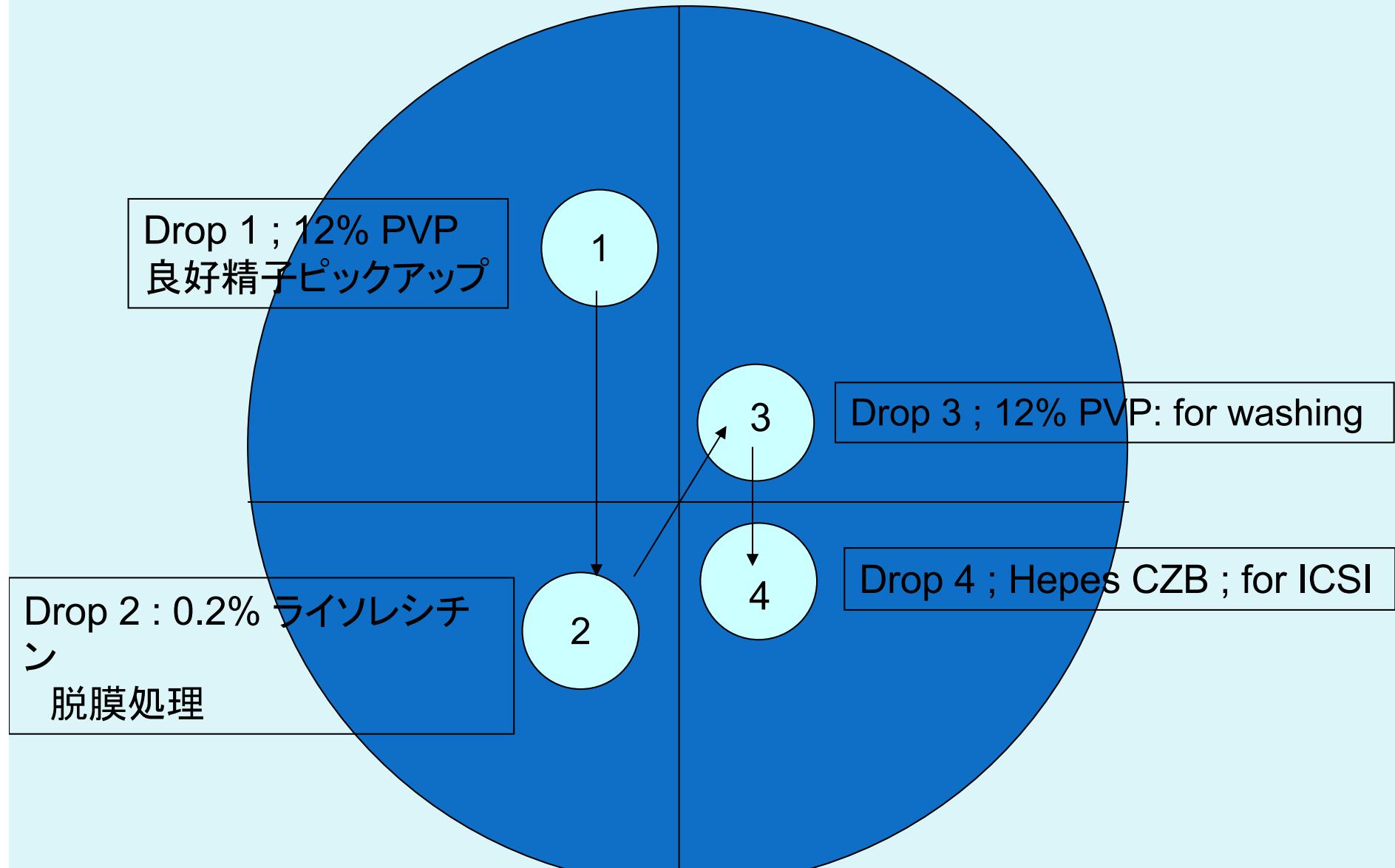
12% PVP drop にて30秒位かけて10回程度
精子をピペットイングし洗浄する。



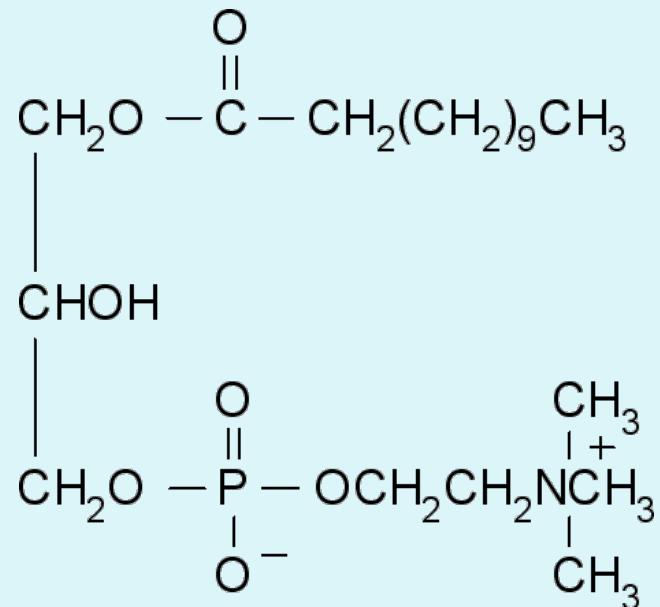
洗浄後すぐにICSIする

Drop 5 ; Hepes CZB

精子をライソレシチンで個別に処理する方法



Lysolecithin: LL



Phospholipases of the A class specifically hydrolyze the fatty acid from the 2 position.

The resulting product is called a lysophosphatide.

Lysophosphatides are not normally found in cells and toxic and injurious to membranes

Lysophosphatide=lysophospholipid
lysolecithine

In vitro material

Although Triton and LL equally disrupt sperm plasma membrane very effectively, LL is preferable to use as it is not “alien” to spermatozoa

質問は**チャット**にてお送りください。

説明会の間もどしどしありください。
生殖医療に関してどんな分野の質問でも
わかる限りお答えします。
高齢の方の治療に関してはもちろんです
が、PGTA、胚培養、男性不妊、不育症、腹
腔鏡手術、排卵誘発、最新の治療など

個人情報など、質問の内容によってはお答えしかねることもありますのであらかじめご了承ください。

また患者さんから同意を得られていない個別の案件に関してはお答えすることは出来かねます。

質問が出ても受け付けないことをご了承下さい。

ここから質問のお時間とします

30分時間をとりますのでチャットでお送りください。

個人情報など、質問の内容によってはお答えしかねることもありますのであらかじめご了承ください。

また患者さんから同意を得られていない個別の案件に関してはお答えすることは出来かねます。
質問が出ても受け付けないことをご了承下さい。

両角レディースクリニック

- ・ 医師15名(常勤医5名、非常勤医師10名)
- ・ 胚培養士10名
- ・ 看護師14名
- ・ 受付事務7名
- ・ クラーク3名
- ・ メディカルアシスタント9名
- ・ 保育士3名
- ・ 法人本部4名

総勢65名で診療をおこなっています

2012年に開院し昨年10周年を迎えるました。
スタッフがお祝いしてくれました。



当院の理念

- 1.患者様が言葉にされないニーズを**先読み**しておこたえする
- 2.患者様には自分の**家族の様**に寄り添う
- 3.患者様や仲間に**誠実に**向き合う(嘘や言い逃れはしない)
- 4.互いに教え合い**共に成長**する
- 5.**チームワーク**を大切にする
(同僚や他部門が苦しい時は助け合う)
- 6.患者様や仲間や家族に**感謝**する
- 7.常に**素直**な人間になる
(わからない事は素直に認め教えてもらう)
- 8.現状に満足せず常に**新しい事に挑戦**し続ける
- 9.**笑顔**を忘れない
- 10.**熱く**楽しんで仕事に向き合う

- ・リッツカールトンのクレドが好きです。



THE RITZ-CARLTON®

クレド

リッツ・カールトン・ホテルは
お客様への心のこもったおもてなしと
快適さを提供することを
もっとも大切な使命とこころえています。

私たちは、お客様に心あたたまる、くつろいだ
そして洗練された雰囲気を
常にお楽しみいただくために
最高のパーソナル・サービスと施設を
提供することをお約束します。

リッツ・カールトンでお客様が経験されるもの、
それは、感覚を満たすここちよさ、
満ち足りた幸福感
そしてお客様が言葉にされない
願望やニーズをも先読みしておこたえする
サービスの心です。

クレド

リツツ・カールトンはお客様への心のこもったおもてなしと快適さを提供することをもっとも大切な使命とこころえています。

私たちは、お客様に心あたたまる、くつろいだ、そして洗練された雰囲気を常にお楽しみいただくために最高のパーソナル・サービスと施設を提供することをお約束します。

リツツ・カールトンでお客様が経験されるもの、それは感覚を満たすここちよさ、満ち足りた幸福感そして**お客様が言葉にされない願望やニーズをも先読みしておこたえするサービス**の心です。

東京のリッツカールトン





京都のリッツカールトン



リツツカールトン日光



ハワイのリッツカールトン



1. 患者様が言葉にされないニーズを先読みしておこたえする

リツツ・カールトンでお客様が経験されるもの、それは感覚を満たすここちよさ、満ち足りた幸福感そしてお客様が言葉にされない願望やニーズをも先読みしておこたえするサービスの心です。

言われてからでは遅いです。
言われたら誰でもできます。
言わせてはプロとして失格。
相手を良く見て、相手の気持ちに立たないとできない。

涙を流しそうなら、ティッシュを差し出し隣に寄り添う
痛そうなら肩を摩り声かけをする
寒そうなら言われる前にタオルをかける

2. 患者様には自分の家族の様に寄り添う

目の前にいる患者さんが、自分の家族だったらどうするか、自分の妻だったらどうするか、自分の親だったらどうするか、そう思い、その考えに従い話をして、行動する事、これが一番大切なのだと思います。

たしかに家族のオペは躊躇いますし手も震えます。

所詮医師も人間で、感情や気持ちに左右されます。

家族のオペに入らないことはその様な意味では正しいのかもしれません。

でも、人間だからこそ感情や心を込め話を聞いて、治療法を考えて、共に悩み、共感し、その時のベストの選択をすべきであるし、できるのであると思います。

冷静な判断はもちろん必要ですが、一人の人間として感情を込めて対応することが一番大切なのだと思います。

3. 患者様や仲間に誠実に向き合う(嘘や言い逃れはしない)

私は愚直という言葉が好きです。
誠実さ、愚直な人を一番評価します。
真面目に努力して下さい。
絶対に評価します。

辞書を見ると愚直とは良い言葉でもあり悪い言葉でもあるようで、愚という字が入るため、褒め言葉で言うなら実直や地道や真っ直ぐの方が良いとの事です。
ただ何事も見られていようが見られていまいが直向きに不器用でも一つのことを辛抱強く行うことが必ず力になると信じて生きてきたのでこの愚直という言葉がとても好きです。

4. 互いに教え合い共に成長する

完璧な人などいません。

良いことを教えてもらったら素直に受け入れる。

良い情報に触れたらすぐ取り入れてみる。

上手くいっている人やチームがいたら真似てみる。

良いことは徹底的にパクる！！

教えることで自分が一番勉強になります

5. チームワークを大切にする (同僚や他部門が苦しい時は助け合う)



患者さんに驚きと感動を提供するクリニックを目指す
全員で同じ方向を向き協力して成し遂げる



06. 患者様や仲間や家族に感謝する

来院した患者様、一緒に働いている仲間、そして支えてくれている家族に感謝を毎日伝える。

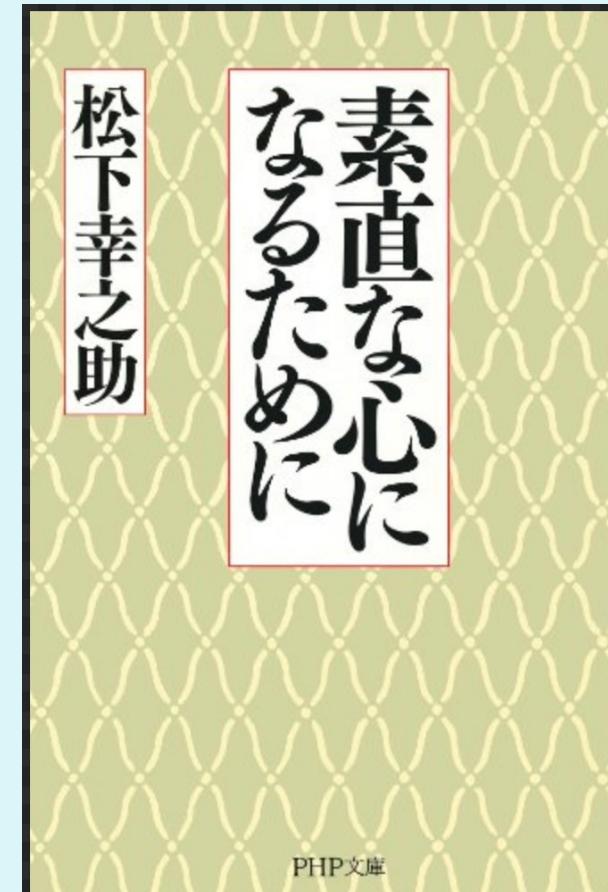


7. 常に素直な人間になる (わからない事は素直に認め教えてもらう)

分からぬ事は素直に認め分からぬと言う。
悪いことをしたら素直に謝る。

「すなわち素直な心になれば謙虚さが生まれ、その謙虚な態度の中から衆知というものもおのずから集まつてくるのではないかと思うのです。」

「素直な心というものは、吸収すべきは何でも吸収する心だからです。日々これ勉強、学びである。」



8. 現状に満足せず常に新しい事に挑戦し続ける

患者様のためになると思い信じることは、失敗を恐れず挑戦し、世の中に新しい価値を生み出す努力をする。

前例がないとか失敗したらとかは言わない。
できない理由を探さない。

最初から完璧を目指さない。
80%できたらやってみる。
スピードが大切。

常に改善。
常に挑戦。

09. 笑顔を忘れない

笑顔の効果

- ①大変な時でも笑顔になると状況が改善して良くなる
- ②信頼関係を築きやすい
- ③健康に良い、免疫力が上がる
- ④笑顔は余波する。循環し増幅する。
- ⑤作業効率が上がる(脳の活性化)
- ⑥他者からの印象が上がる
- ⑦エイジングケア

子供は1日400回笑うが年を取ると笑う回数が減っていき、20代で1日20回ほど、50代で10回未満。

10. 熱く楽しんで仕事に向き合う

「どのようにしたらもっと患者様が喜んでくれるか？」
を毎日楽しみながら考え実行する。

12年前:2011年9月20日 最初に見に来た日







開院1ヶ月前



開院1ヶ月前



開院1ヶ月前



11年前の2012年7月2日に開院しました。
この11年多くの方に支えられここまでくることができました。
私の我儘のため家族や多くのスタッフに多大な負担をかけ申し訳
ないと思うと共に心から感謝しています。



最新の大切な論文紹介

最新の論文紹介

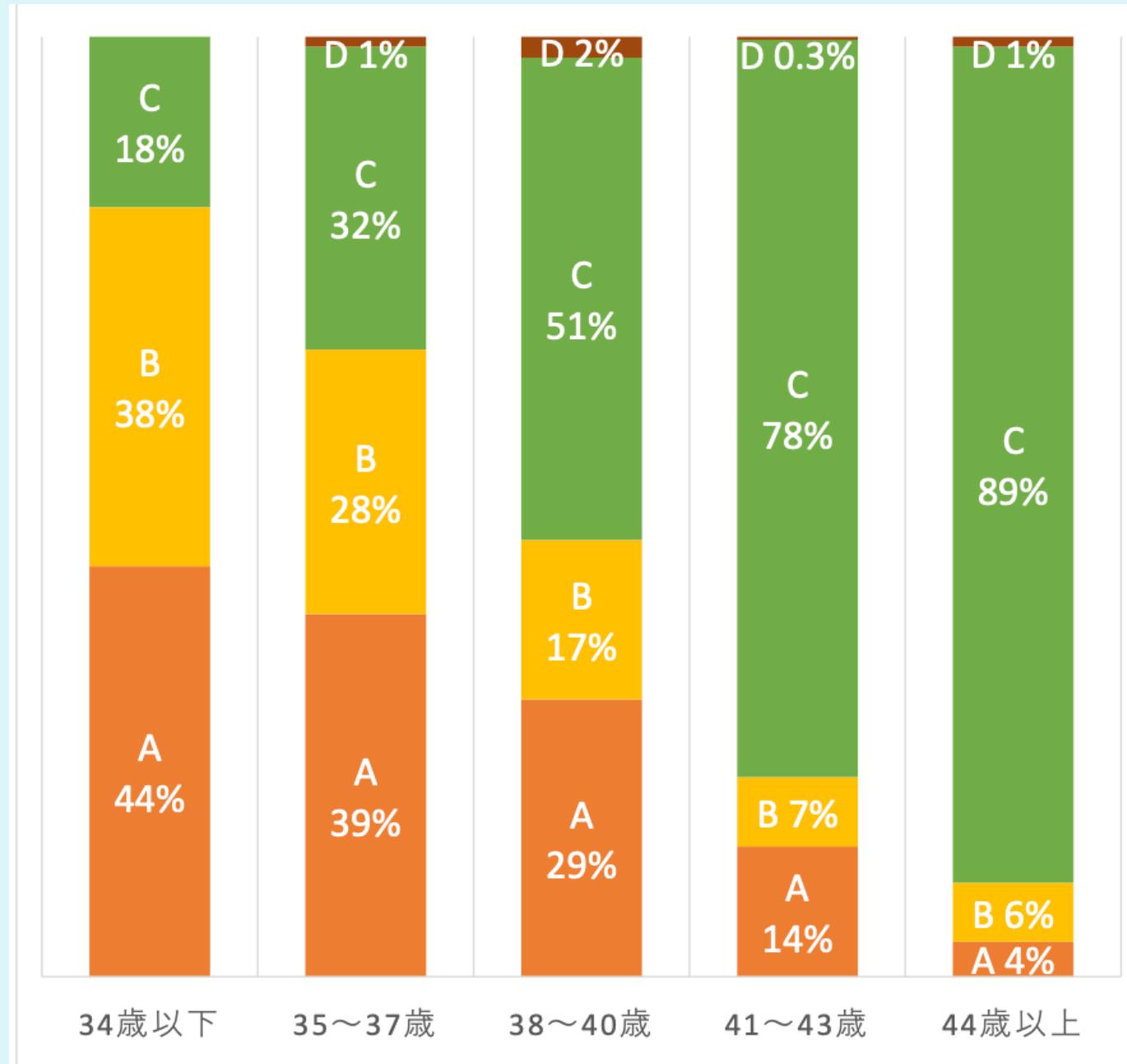
- ・ 今後の説明会でも毎回必ず最新の論文紹介を
続けます。
- ・ どんなに偉い先生が言ったとしても全てはエビ
デンスです。
- ・ しかも最新でないといけない。
- ・ 正解は質の高い最新の英語の論文にあります。

正常胚を移植しても妊娠しない

どうして？？？？

当院のPGT成績

対象期間:2020/1/27～2023/2/8



着床前診断(PGT-A)をして正常胚であるA判定の胚を移植して着床する確率は6割強です。
正常な胚なのにどうしてもっと成績が高くないのか？
またどうして流産するのか？
など疑問は尽きません。

正常胚を移植した場合着床や流産に関係する因子は何かについてレビューしている論文がありましたので紹介します。
多岐に渡り分析しておりかなり大切な結果です。

正常胚を移植した場合結果に影響する因子は何か？？

A review of factors influencing the implantation of euploid blastocysts after in vitro fertilization

Evan A. Reshef, M.D., Alex Robles, M.D., Jenna S. Hynes, M.D., Jenna M. Turocy, M.D., and Eric J. Forman, M.D.

Columbia University Fertility Center, Columbia University Medical Center, New York, New York

Fertil Steril Rev® Vol. 3, No. 2, May 2022

Summary of evidence by subcategory for factors influencing implantation of euploid blastocysts.

Category	Subcategory	Summary statement
Embryonic factors	Blastocyst morphology	There is fair evidence to suggest that an increasing morphological grade of the ICM and trophectoderm has a positive impact on the implantation potential of euploid blastocysts.
	Blastocyst expansion stage	There is fair evidence that nonfully hatched euploid blastocysts have a higher chance of implantation than fully hatched euploid blastocysts.
	Timing of blastocyst formation	There is fair evidence that the implantation rates of euploid day 7 blastocysts are lower than those of day 5 and 6 euploid blastocysts.
	Mitochondrial DNA	There is insufficient evidence to determine whether testing mitochondrial DNA content in euploid blastocysts has an impact on the implantation potential.
Uterine factors	Endometrial appearance	There is insufficient evidence to determine whether endometrial compaction after the start of progesterone in embryo transfer cycles impacts the implantation potential of euploid blastocysts.
	Endometritis	There is fair evidence that the treatment of chronic endometritis can increase the likelihood of successful implantation in patients with a history of recurrent implantation failure, although further studies are needed in euploid blastocysts.
	History of cesarean section	There is fair evidence that a history of a prior cesarean lowers the implantation rate of euploid blastocysts after single embryo transfer.
	Presence of adenomyosis and endometriosis	There is insufficient evidence to suggest whether the presence of adenomyosis or endometriosis impacts the implantation of euploid blastocysts.
	Arcuate uterus	There is fair evidence that a diagnosis of an arcuate uterus does not impact the implantation rate of euploid blastocysts.
	Ease of transfer	There is fair evidence that a difficult embryo transfer does not lower the implantation rate of euploid blastocysts.
	Endometrial disruption	There is fair evidence that endometrial disruption before the transfer of a single euploid embryo does not improve the implantation rates.
IVF protocols	Ovarian stimulation and trigger	There is fair evidence that ovarian stimulation and trigger type do not impact the implantation rate of euploid blastocysts.
	FET protocols	There is good evidence that the type of FET preparation protocol does not impact the implantation rate of euploid blastocysts.
	Timing of transfer	There is insufficient evidence to determine whether adjusting the timing of the embryo transfer based on endometrial receptivity testing impacts the implantation rate of euploid blastocysts.
	Progesterone level	There is fair evidence to suggest that the implantation of euploid blastocysts is improved when the progesterone level is >20 ng/mL on the day of embryo transfer.
	Being from a previously vitrified egg	There is insufficient evidence to determine whether the implantation rates are altered if euploid blastocysts are derived from previously vitrified oocytes.
	Fresh vs. frozen transfer	There is fair evidence to suggest an improvement in the implantation rates of vitrified-warmed blastocysts compared with those of fresh blastocysts.
Patient factors	Maternal age	There is fair evidence that extremes of maternal age can negatively impact the implantation potential of euploid blastocysts.
	Paternal age	There is fair evidence to support that an advanced paternal age of 41–50 years impacts the fertilization rates but not the implantation or clinical pregnancy rates of euploid blastocysts.
	Sperm DNA fragmentation	There is fair evidence to suggest that sperm DNA fragmentation index does not impact the euploidy rates or pregnancy outcomes.
	BMI	There is good evidence that an increased maternal BMI leads to worse pregnancy outcomes after the transfer of euploid blastocysts, including increased miscarriage rates and decreased live birth rates.
	MTHFR gene mutation	There is fair evidence to suggest that MTHFR homozygosity in euploid blastocysts may negatively impact the implantation rates.
	Vitamin D level	There is fair evidence that low vitamin D levels do not negatively impact pregnancy outcomes in patients undergoing euploid blastocyst transfer.
	TSH	There is fair evidence that the TSH levels of <2.5 mIU/L do not impact pregnancy outcomes after a euploid blastocyst transfer.
Embryology protocols	Timing of embryo biopsy	There is good evidence that cleavage-stage biopsy negatively impacts the euploid embryo clinical pregnancy rate, whereas blastocyst-stage biopsy does not appear to have the same negative impact.
	Size of biopsy	There is fair evidence that a larger biopsy size can negatively impact the euploid embryo pregnancy rates.
	Type of culture media	There is good evidence that culturing euploid blastocysts in sequential media over monophasic media does not improve the implantation rates, although blastocyst progression is improved.
	Culture temperature	There is good evidence that lowering the embryo culture temperature to 36°C from 37°C does not improve the embryo implantation rates.
	Dynamic vs. static embryo culture	There is good evidence that dynamic embryo culture does not yield better blastocyst or implantation rates when compared with static embryo culture.
	Number of vitrification cycles	There is fair evidence that double vitrification and double biopsy of a blastocyst can negatively impact the implantation potential of euploid blastocysts.

Note: BMI = body mass index; DNA = deoxyribonucleic acid; FET = frozen-thawed embryo transfer; ICM = inner cell mass; IVF = in vitro fertilization; MTHFR = methylenetetrahydrofolate reductase; TSH = thyroid-stimulating hormone.

Reshef. Implantation of euploid blastocysts. *Fertil Steril Rev* 2022.

Blastocyst morphology	There is fair evidence to suggest that an increasing morphological grade of the ICM and trophectoderm has a positive impact on the implantation potential of euploid blastocysts.
Blastocyst expansion stage	There is fair evidence that nonfully hatched euploid blastocysts have a higher chance of implantation than fully hatched euploid blastocysts.
Timing of blastocyst formation	There is fair evidence that the implantation rates of euploid day 7 blastocysts are lower than those of day 5 and 6 euploid blastocysts.
Mitochondrial DNA	There is insufficient evidence to determine whether testing mitochondrial DNA content in euploid blastocysts has an impact on the implantation potential.

正常胚の移植に影響を与える**胚の因子**

- ①A判定でもグレードの良い方が着床率が高い
- ②完全に脱出した胚盤胞よりも孵化中の方が成績が良い
- ③5日目、6日目の方が7日目よりも成績が良い

Ovarian stimulation and
trigger
FET protocols

There is fair evidence that ovarian stimulation and trigger type do not impact the implantation rate of euploid blastocysts.

Timing of transfer

There is good evidence that the type of FET preparation protocol does not impact the implantation rate of euploid blastocysts.

Progesterone level

There is insufficient evidence to determine whether adjusting the timing of the embryo transfer based on endometrial receptivity testing impacts the implantation rate of euploid blastocysts. There is fair evidence to suggest that the implantation of euploid blastocysts is improved when the progesterone level is >20 ng/mL on the day of embryo transfer.

Being from a previously
vitrified egg

There is insufficient evidence to determine whether the implantation rates are altered if euploid blastocysts are derived from previously vitrified oocytes.

Fresh vs. frozen transfer

There is fair evidence to suggest an improvement in the implantation rates of vitrified-warmed blastocysts compared with those of fresh blastocysts.

正常胚の移植に影響を与えるIVFのプロトコール

- ① 刺激やトリガーはA判定胚の着床率に影響を与えない
- ② HRTや自然周期かは影響を与えない
- ③ ERAは影響を与えない
- ④ 移植日のプロゲステロン濃度が20を超える方が成績が高くなる
- ⑤ 再解凍の場合成績が低下するかは不明
- ⑥ 凍結融解胚の方が新鮮胚よりも成績が良い

Endometrial appearance	There is insufficient evidence to determine whether endometrial compaction after the start of progesterone in embryo transfer cycles impacts the implantation potential of euploid blastocysts.
Endometritis	There is fair evidence that the treatment of chronic endometritis can increase the likelihood of successful implantation in patients with a history of recurrent implantation failure, although further studies are needed in euploid blastocysts.
History of cesarean section	There is fair evidence that a history of a prior cesarean lowers the implantation rate of euploid blastocysts after single embryo transfer.
Presence of adenomyosis and endometriosis	There is insufficient evidence to suggest whether the presence of adenomyosis or endometriosis impacts the implantation of euploid blastocysts.
Arcuate uterus	There is fair evidence that a diagnosis of an arcuate uterus does not impact the implantation rate of euploid blastocysts.
Ease of transfer	There is fair evidence that a difficult embryo transfer does not lower the implantation rate of euploid blastocysts.
Endometrial disruption	There is fair evidence that endometrial disruption before the transfer of a single euploid embryo does not improve the implantation rates.

正常胚の移植に影響を与える子宮因子

- ①内膜が引き締まる現象であるコンパクションが認められなくても問題なし
- ②慢性子宮内膜炎を治療した方が成績が上がる
- ③帝王切開の既往があると成績が下がる
- ④子宮腺筋症や内膜症があると影響するという確かな証拠はない
- ⑤弓状子宮があっても成績に影響する証拠はない
- ⑥移植が困難でも着床には影響しない
- ⑦スクラッチが着床に貢献する証拠はない

Maternal age	There is fair evidence that extremes of maternal age can negatively impact the implantation potential of euploid blastocysts.
Paternal age	There is fair evidence to support that an advanced paternal age of 41–50 years impacts the fertilization rates but not the implantation or clinical pregnancy rates of euploid blastocysts.
Sperm DNA fragmentation	There is fair evidence to suggest that sperm DNA fragmentation index does not impact the euploidy rates or pregnancy outcomes.
BMI	There is good evidence that an increased maternal BMI leads to worse pregnancy outcomes after the transfer of euploid blastocysts, including increased miscarriage rates and decreased live birth rates.
MTHFR gene mutation	There is fair evidence to suggest that MTHFR homozygosity in euploid blastocysts may negatively impact the implantation rates.
Vitamin D level	There is fair evidence that low vitamin D levels do not negatively impact pregnancy outcomes in patients undergoing euploid blastocyst transfer.
TSH	There is fair evidence that the TSH levels of <2.5 mIU/L do not impact pregnancy outcomes after a euploid blastocyst transfer.

正常胚の移植に影響を与える患者因子

- ①母体年齢は極端に高齢になると成績に影響を与える
- ②父親の年齢は41-50歳受精率に影響を与えるが着床には影響しない
- ③精子DNAフラグメントは着床率に影響しない
- ④母体のBMIが高いと結果に悪い影響を与える(高流産率、低出産率)
- ⑤ビタミンDは特に影響しない
- ⑥TSHが2.5未満でも成績に影響しない

Timing of embryo biopsy	There is good evidence that cleavage-stage biopsy negatively impacts the euploid embryo clinical pregnancy rate, whereas blastocyst-stage biopsy does not appear to have the same negative impact.
Size of biopsy	There is fair evidence that a larger biopsy size can negatively impact the euploid embryo pregnancy rates.
Type of culture media	There is good evidence that culturing euploid blastocysts in sequential media over monophasic media does not improve the implantation rates, although blastocyst progression is improved.
Culture temperature	There is good evidence that lowering the embryo culture temperature to 36°C from 37°C does not improve the embryo implantation rates.
Dynamic vs. static embryo culture	There is good evidence that dynamic embryo culture does not yield better blastocyst or implantation rates when compared with static embryo culture.
Number of vitrification cycles	There is fair evidence that double vitrification and double biopsy of a blastocyst can negatively impact the implantation potential of euploid blastocysts.

正常胚の移植に影響を与える胚発生のプロトコール

- ①初期胚よりも胚盤胞でのバイオプシーが好ましい
- ②バイオプシーをする量が多いと悪い影響を与える
- ③2回バイオプシーして2回凍結融解すると成績が低下する

Does maternal age affect assisted reproduction technology success rates after euploid embryo transfer? A systematic review and meta-analysis

Amerigo Vitagliano, M.D., Ph.D.,^a Alessio Paffoni, Ph.D.,^b and Paola Viganò, Ph.D.^c

^a Department of Women and Children's Health, Unit of Gynecology and Obstetrics, University of Padua, Padua, Italy;

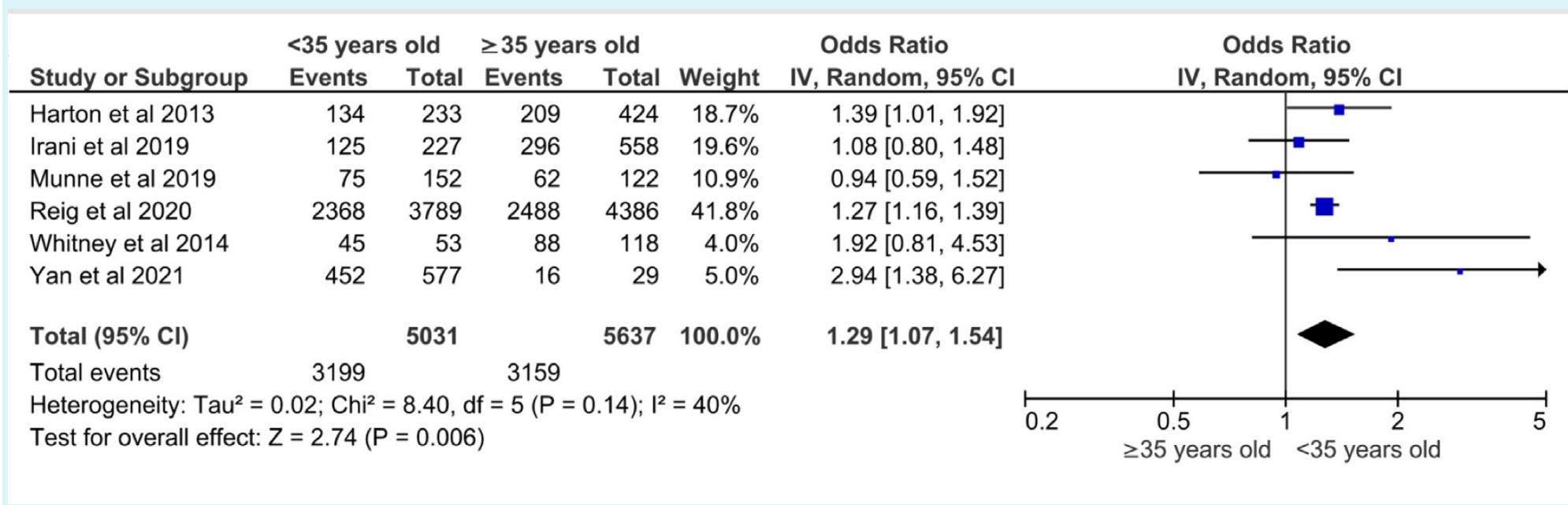
^b Infertility Unit, ASST Lariana, Cantù (Como), Italy; and ^c Infertility Unit, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico, Milano, Italy

PGTをして正常胚を移植すると6割から7割の妊娠率となります。ただ正常胚を移植しても母体の年齢と共にこの成功率は低下するのではというデータが過去にいくつか出ています。

この来月に掲載される最新のメタ解析の論文ではまさにその不安を調べている大変貴重な論文なので紹介します。

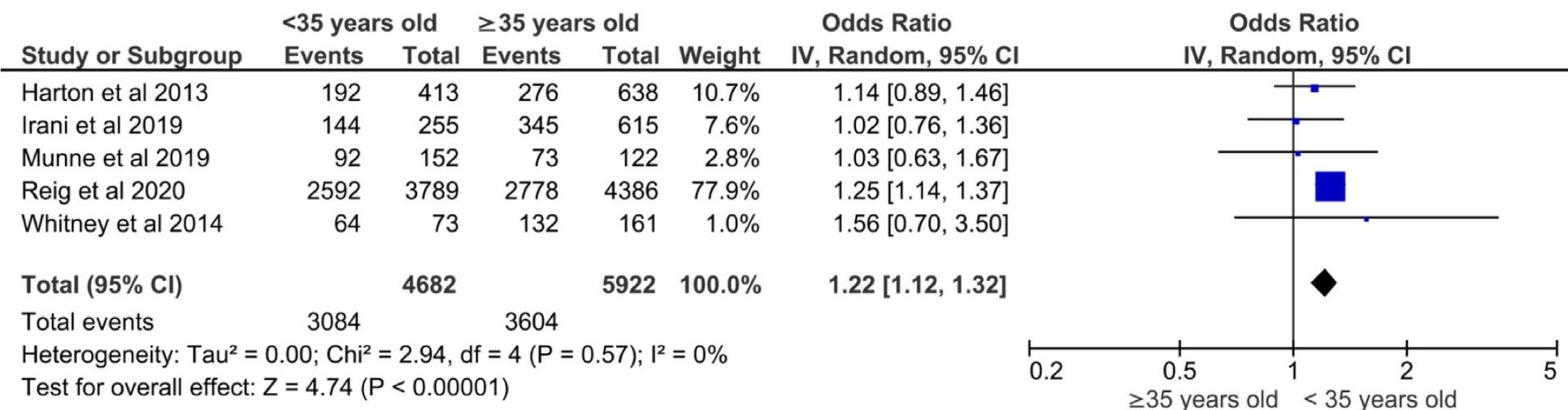
7個の良質な論文を解析しています。実に11335個の正常胚を移植して年齢に分けて成功率を検討しています

来月掲載予定Received November 4, 2022; revised and accepted February 27, 2023.

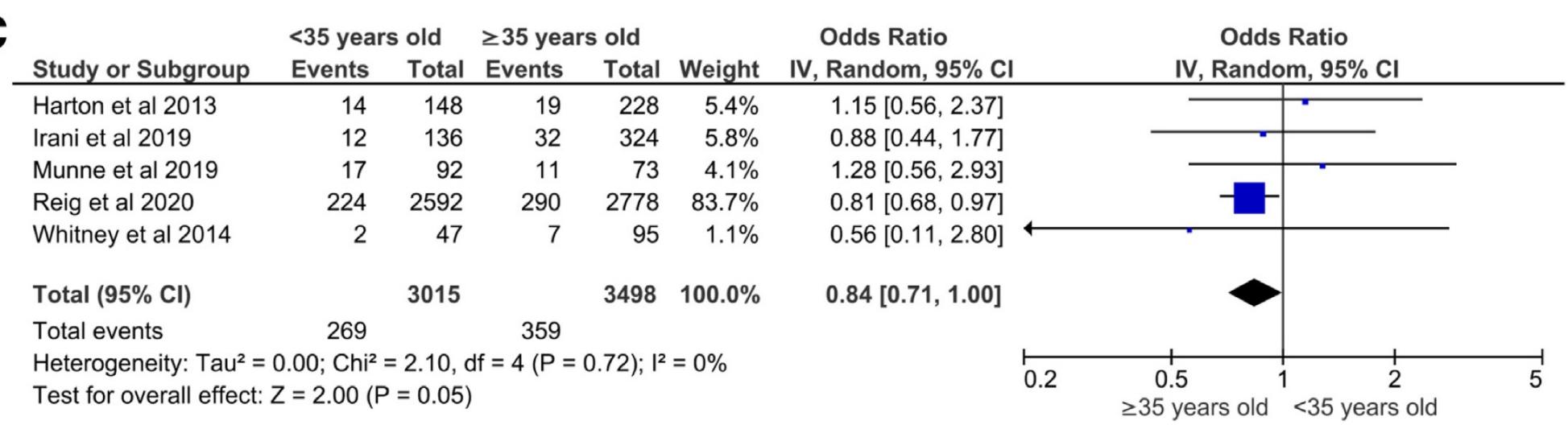


35歳未満と35歳以上を比較すると出産率はオッズ比 1.29; 95% CI, 1.07–1.54 有意差あり

3

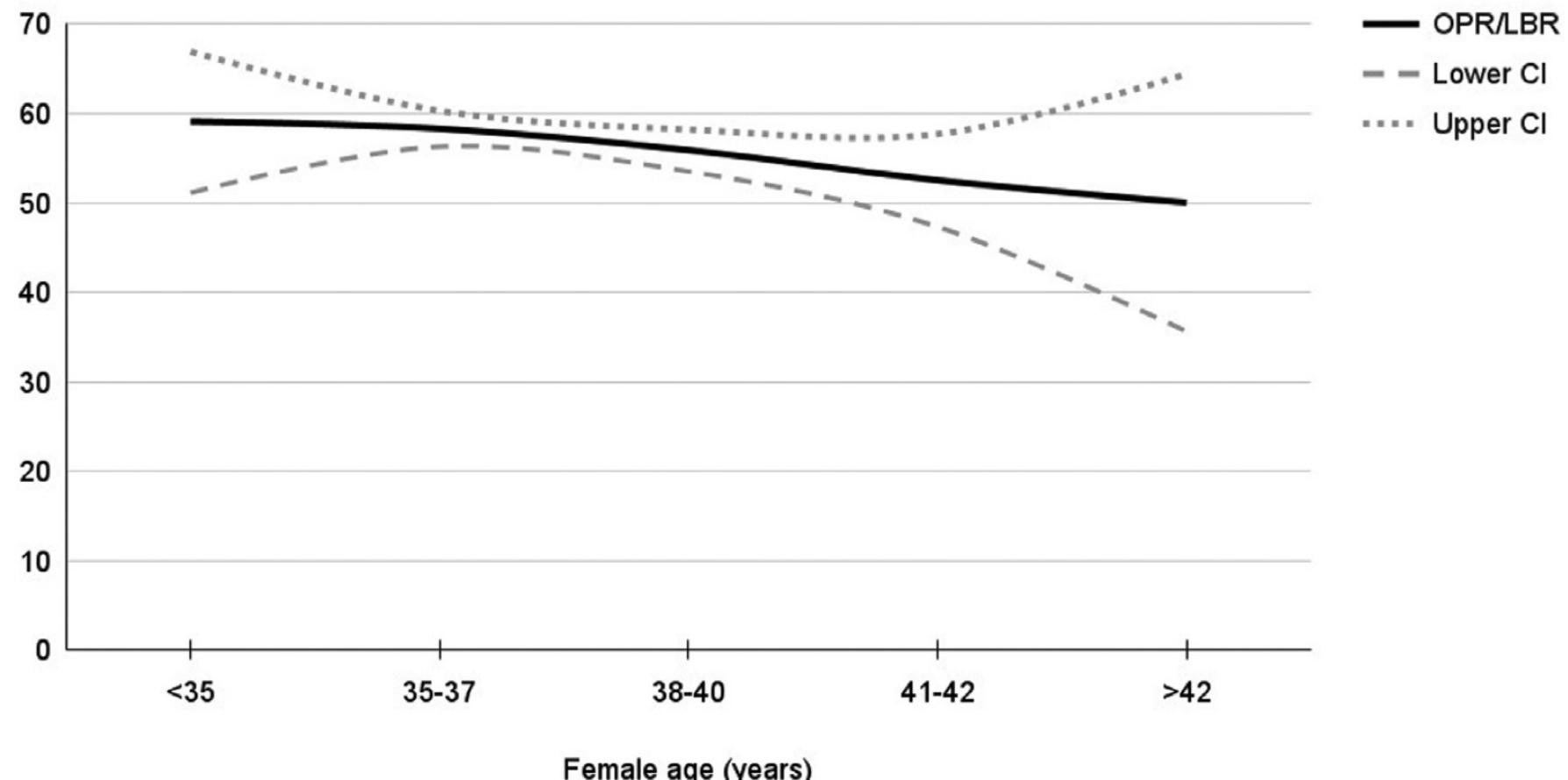


35歳未満と35歳以上を比較すると着床率はオッズ比 1.22; 95% CI, 1.12–1.32 有意差あり



35歳未満と35歳以上を比較すると流産率はオッズ比 0.84; 95% CI, 0.71–1.00 有意差なし

この下のグラフは母体年齢が<35 を 35-37, 38-40, 41-42と比較した場合の出産率を見ています。
年齢が上がると共に出産率が低下しているのがわかります。



論文の考察を読んでいくとどうしてこの様なことが起きるのか3つの仮説を提案しています。

一つ目は高齢になるとともに子宮内膜の状態が低下するとしています。内膜も老化すると指摘しています。遺伝子発現が変化すると過去の論文でも報告されています。

二つ目は異数性以外の胚の質を決めている部分が低下している。例えば母親が高齢に伴い父親も高齢になり精子由来の因子が胚の染色体以外の質を低下させているのではと。

三つ目は子宮筋腫や子宮腺筋症など子宮側の問題が年齢共に増えるのではと指摘しています。

その他流産を増やす要因として子宮の手術歴、甲状腺、糖尿病も年齢とともに増えることが関係していることも指摘されています。

正常胚を移植しても年齢と共に成績は低下するという今回の結果は高齢の方からみると厳しい結果を突きつけられています。ただこの結果を「これは辛い結果だな、」ではなく、「どうしたら良いのか」といかに前向きに捉えるか、ここが大切になります。

論文でも考察している通り受けて側に問題が増えるのであればそこを治してから移植をすれば良いと言うことになります。

その最適な方法として腹腔鏡手術があります。オペでは直視下に一つ一つ病巣を治します。筋腫があれば摘出することも可能です。治せることを治してから移植する。体外受精の弱点である着床障害は腹腔鏡手術で補うことができます。

当院では正常胚を移植する前には腹腔鏡検査を提案することにしています。

高齢の方には体外受精と腹腔鏡手術を組み合わせることで最大の効力を発揮できるのだと思います。

今回が29回目

- 2021年1月25日に第1回目のオンラインセミナーを行い、毎月1回行い今回が28回目。
- コロナ禍でオンラインに切り替えたことでより多くの方に参加して頂く事が出来ました。
- 毎回100名前後、かなり遠方の方や海外の方も参加して頂いています。
- YouTubeでアーカイブも残しており多くのアクセスがあります。
- 毎回異なるテーマで自分にとっても作るのは大変ですが、知識が整理されとても勉強になります。

第1回:PGT-Aについて

第2回:腹腔鏡手術(ラパロ)について

第3回:良好胚をつくるための刺激方法

第4回:着床障害に対する検査と治療法

第5回:不妊治療の費用と流れ

第6回:不妊治療の基本から

第7回:男性不妊

第8回:良い卵子を作るためには

第9回:着床率向上の工夫

第10回:着床前診断:最新の情報

第11回:FTと腹腔鏡下手術について

第12回:胚培養

第13回:高齢の方の治療戦略

第14回:高齢の方の治療戦略 続編

第15回:40歳代前半に焦点を当てた高齢不妊治療の成功例

- 第16回：高齢、低AMHで結果を出す治療戦略：成功例をもとに
- 第17回：高齢で結果を出す方法：ここが他院とのちがい
- 第18回：高齢で結果を出す秘訣
- 第19回：PFC-FD：最新技術で妊娠させる！
- 第20回：保険診療で結果が出なかった場合の治療戦略
- 第21回：高齢で結果を出している方の共通点
- 第22回：高齢の方への治療戦略：排卵誘発編
- 第23回：不妊治療 大質問会
- 第24回：高齢の方への治療戦略：着床不全に対する対策
- 第25回：結果が出た方の不妊治療中の運動習慣および生活習慣
- 第26回：培養の疑問 その技術はエビデンスがあるか？
ガイドラインをもとに説明します
- 第27回：保険診療での課題：どうしたら妊娠できるか、具体的な戦略は
- 第28回：培養の疑問 その技術はエビデンスがあるか？
ガイドラインをもとに説明します—続編
- 第29回：採卵：当院の工夫を紹介します

次回の説明会のテーマ

- **移植に関して**
- 当院の工夫

成功した症例も提示します

- ・ 今回同様成功した症例を2例提示します。
 - ・ 今回同様ライブでのみ紹介します。
 - ・ 次回紹介する症例は以下の2例です。
-
- ・ 子宮筋腫の手術をし6年かけて授かった症例
 - ・ 反復流産で3年かけてPGT-Aで授かった症例
-
- ・ 非常に参考になる経過のため是非ご参加ください。

次回のご案内

- ・ 次回のオンライン説明会は7月22日(土)15時からです。
- ・ 大勢の方のご参加をお待ちしております。
- ・ 申し込みの案内はこの後メール致します。

ご清聴ありがとうございました

