

## ヒト体外受精における卵成熟度の受精・胚発育に及ぼす影響： Follicle-stimulating hormone 添加未熟卵体外成熟法の試み

杏林大学医学部産婦人科学教室

神野 正雄 羽生 一郎 生方 良延 佐藤 学  
勝又木綿子 吉村 泰典 中村 幸雄

### Effects of the Maturity of Human Oocytes on Fertilization and Embryonic Development: Application of Oocyte Maturation in Medium Containing Follicle-stimulating Hormone

Masao JINNO, Ichirou HANYU, Yoshinobu UBUKATA, Manabu SATOU,

Yuuko KATSUMATA, Yasunori YOSHIMURA and Yukio NAKAMURA

*Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kyorin University, Tokyo*

**概要** 体外受精355周期において、cumulus spreading technique を用いて卵および放射冠を詳細に観察し、卵成熟度と体外受精成績との関係を検討した。放射冠の形態より卵成熟度を、過熟(O)、成熟(M)、中等度成熟(T)、未熟(I)、異常(A)に分類した。計2,145個の卵の成熟度の分布は、O:24.7%, M:45.9%, T:19.1%, I:8.3%そしてA:2.0%であった。受精率・正常胚発育率は、卵成熟度がMのとき最高で、T・Iと成熟度が下がるにつれ順次有意に低下し、過熟Oにおいても有意に低下した。そして、Aにおいて最低であった。受精率・正常胚発育率は、第一極体が観察されたとき、観察されなかったときに比し有意に高かった。放射冠の形態により成熟と判定されたとき、卵丘細胞塊の形態により成熟と判定されたときよりも、受精率・正常胚発育率が有意に高く、放射冠の形態による卵成熟度評価のほうが成熟卵の選別能が高いと示唆された。未熟卵(Iおよび第一極体の放出されていないT)に対して、FSH添加体外成熟培養を施行すると、受精率・正常胚発育率が有意に上昇した。成熟度Tの卵2個のみが採卵された1症例において、2個ともにFSH添加体外成熟培養を施行し、単胎妊娠となり、正常女児が出生した。本研究による卵成熟度評価法は、簡便・迅速でありながら受精・胚分割率をよく反映し、その有用性が示された。

**Synopsis** A total of 2,145 oocytes from 355 IVF cycles were classified as overmature (O), mature (M), transitional (T), immature (I) and abnormal (A) according to the morphology of the corona radiata. The rates of fertilization (%F) and embryonic development (%D) per oocyte were the highest in the M group, and decreased significantly with the decreasing maturity of the oocytes (T and I) and were the lowest in the A group. Decreases in %F and %D were also observed in the O group. %F and %D were significantly higher in oocytes with a polar body (PB) than without a PB. Mature oocytes classified according to the morphology of the corona radiata had significantly higher %F and %D than those classified according to the morphology of the cumulus oophorus. %F and %D were increased when T-oocytes without a PB and I-oocytes were matured in vitro for 18—24 hours in medium supplemented with FSH. A normal female baby was delivered, following IVF-ET of two T-oocytes matured in vitro with FSH.

**Key words:** Oocyte • Maturation of oocyte • In vitro fertilization • FSH • Corona radiata

#### 緒 言

体外受精において、諸種の卵巣刺激法を用いて複数の至適に成熟した卵を得ることは、妊娠に成

功するための要点の一つである。しかしながら、採卵される卵の成熟度にはかなりばらつきがあり<sup>1)~4)</sup>、その約20%が未熟卵と報告されている<sup>1)2)</sup>。

こうした未熟卵をその成熟度に応じて体外で至適に追加成熟させることは<sup>5)~7)</sup>, 体外受精の成績をさらに向上させるうえで非常に重要な課題となっている。そのためには、より精度の高い卵成熟度評価法と至適な体外成熟法が不可欠である。

卵成熟度の評価は、従来、40倍程度の実体顕微鏡下で卵丘細胞塊の性状をおおまかに観察して行われていた<sup>4)8)~11)</sup>。これは、卵を取り囲む放射冠・卵丘細胞塊が、卵のより高倍率での観察の妨げとなるためである。これに対して、卵丘細胞塊を薄く培養皿に付着させることにより、卵をより高倍率で簡便に観察することが考案された<sup>12)</sup>。本研究では、この方法により卵および放射冠を詳細に観察し、その成熟度を評価し、体外受精成績との関係を検討した(卵成熟度評価に関する検討)。また、その結果未熟と判定された卵に対して、Follicle-stimulating hormone (FSH) 添加体外成熟培養を行い、未熟卵の体外受精成績を改善することも試みた (FSH 添加体外成熟培養に関する検討)。

#### 研究対象と方法

##### 1. 卵成熟度評価に関する検討

体外受精359周期 (208人) において、採卵された総計2,145個の卵を対象とし、卵成熟度と体外受精成績との関連を prospective に分析した。重症男性不妊・子宮性不妊は対象から除外した。年齢制限は行わず、対象の平均年齢は34.6歳 (range: 24~46歳) であった。

卵巣刺激法は、gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH-a) 併用 human menopausal gonadotropin (hMG) 法の long protocol を用いた。高温相第4日より GnRH-a の buserelin (Suprecur; Hoechst, 東京) を1日3回連日経鼻投与し、2~3週間後に血清 estradiol ( $E_2$ ) 値が20pg/ml 未満、かつ経腔超音波断層法で卵胞径が12mm 未満であることを確認したうえで、hMG (Humegon; Organon, 東京) の連日筋注投与を開始した。hMG の1日投与量は、40歳未満に対しては3アンプル (FSH 75IU+LH 75IU/1アンプル)、40歳以上に対しては4アンプルで開始し、血清  $E_2$  値が200pg/ml を超え、主席卵胞径が13mm を超えたとき2アンプルに減量した。主席卵胞径

が16~18mm に達し、血清  $E_2$  値が400pg/ml 以上のとき buserelin および hMG 投与を中止し、human chorionic gonadotropin (hCG) 10,000IU (Gonotropin; 帝国臓器, 東京) を筋注投与した。hCG 投与36時間後に、経腔超音波断層法監視下に卵胞を穿刺・吸引して採卵した。

採卵後まず、実体顕微鏡下で卵丘細胞塊の性状を観察し、既報<sup>11)</sup>の卵成熟度分類に従って、卵丘細胞塊が大きく・十分に軟らかく・牽糸性が大きく・細胞密度が疎なとき成熟卵と評価した。引き続き、卵丘細胞塊を少量の培養液とともに培養皿に乗せ、指で培養皿を強く弾いて薄く広げ、倒立顕微鏡で100および200倍にて3~4秒鏡検した<sup>12)</sup>。放射冠の形態から、表1のごとく分類した。図1に各卵成熟度の典型例を示す。さらに第一極体の有無も観察した。卵成熟度の評価はすべて同一人の観察により行われた。鏡検後ただちに培養液を追加して卵丘細胞塊を遊離し、卵成熟度判定の違いに関わらず一律に2~6時間成熟培養した後、媒精した。

追加成熟培養・体外受精・胚培養は、不活化患者血清<sup>13)</sup>を10%添加した human tubal fluid medium (HTF medium; #9962, Irvine, U.S.A.) を用い、既報<sup>13)</sup>のごとく行った。追加成熟培養・体外受精・胚培養を通して、成熟度評価の異なる卵は異なる培養皿で行い、同じ評価の卵は最高6個まで同一の培養皿で行った。卵の個数が著しく多い時には、シリコン・オイルで覆った培養液スポットに一個ずつ卵を入れて培養した。精子処理は、精液を培養液で希釈し、遠沈洗浄を2回繰り返した後、スウィム・アップ45分にて運動精子を回収して媒精に供した。媒精は、前進運動精子150,000/

表1 放射冠の形態に基づく卵成熟度分類

卵成熟度 <sup>a</sup>	放射冠の形態
過熟 (O)	顆粒状で散っている
成熟 (M)	放射状に輝いてみえる
中等度成熟 (T)	帯状に褐色にみえるが卵実質を観察できる
未熟 (I)	さらにコンパクトで卵実質の観察が困難
異常 (A)	卵細胞質の fragmentation や変形

<sup>a</sup>O: overmature, M: mature, T: transitional maturity, I: immature, A: abnormal

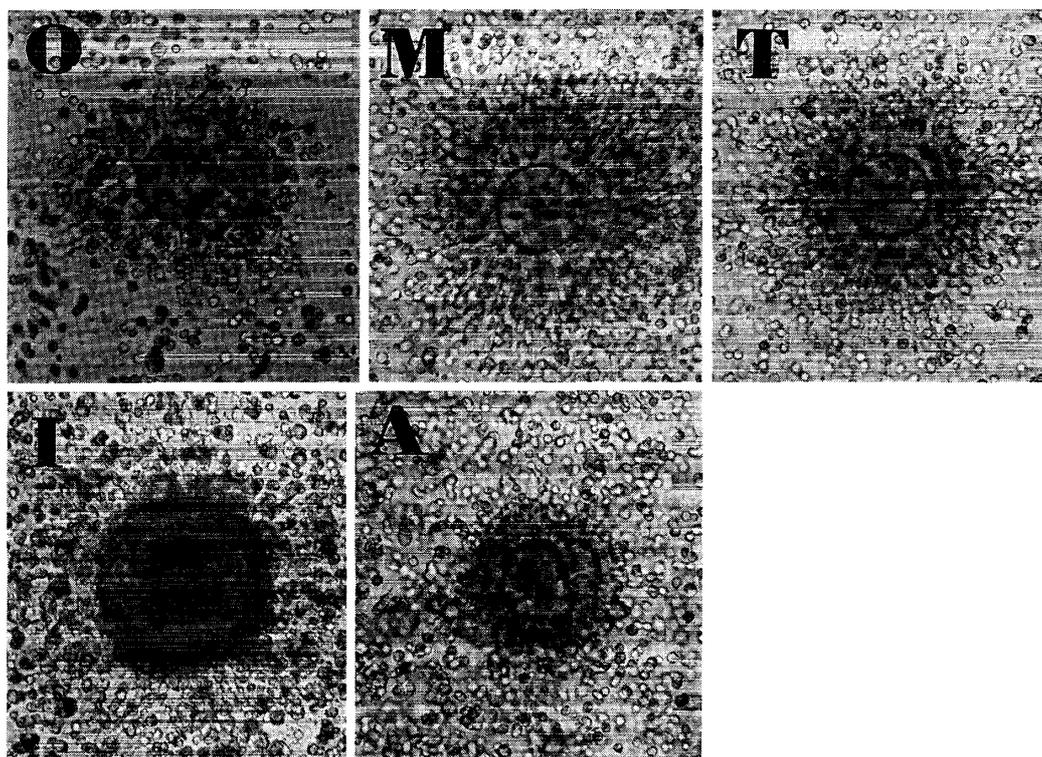


図1 過熟卵(O)：放射冠が散っている。成熟卵(M)：放射冠が放射状に輝いて見え、3時に第一極体が見える。中等度成熟卵(T)：放射冠は褐色帯状でより密であるが卵実質を観察できる。未熟卵(I)：放射冠がさらに密で卵実質を観察できない。異常卵(A)：卵細胞質の変形を認める。

mlにて行い、媒精後16～20時間に前核形成を確認して受精と判定した。媒精後36～48時間で3～8細胞期胚に達し、かつ fragmentation が全くないかごく少量であるとき、正常胚発育をしたと定義した。媒精後36～48時間に、最大4個までの正常発育胚を経頸管的に子宮腔内に胚移植した。移植当日より連日 progesterone 25mg (Oophormin luteum; 帝国臓器, 東京) を筋注投与し、採卵後10日目および14日目に血清 hCG 値を測定し、その上昇をもって妊娠と判定した。出産および妊娠14週を超えて正常に経過した妊娠を合わせて継続妊娠と定義した。

血清  $E_2$  値は、radioimmunoassay ( $E_2$  キット; DPC, 東京) により測定した。感度は、10pg/ml, 同時測定内および測定間変動係数は、それぞれ 5.5% および 10% であった。血清 hCG 値は、radial partition fluorometric enzyme immunoassay (Stratus system; Baxter, 東京) により測定し、感度・同時測定内および測定間変動係数は、それ

ぞれ、1.9IU/l・5.8% および 7.5% であった。

結果は  $\chi^2$  検定又は Fisher 直接検定により分析し、 $p < 0.05$  をもって有意と判定した。

## 2. FSH 添加体外成熟培養に関する検討

39歳以下の卵管性不妊(子宮内膜症を含まない)で、男性因子正常な体外受精症例で採卵された未熟卵(I および第一極体の放出されていない T) を対象とした。27周期よりの計51個の未熟卵に対しては、FSH (Fertinorm P; Serono Japan, 東京) を750mIU/ml 添加した培養液で18～24時間追加成熟培養を施行し、その後、媒精した。44周期よりの計93個の未熟卵に対しては、培養液のみで18～24時間追加成熟培養を施行した後、媒精し、対照群とした。媒精後12～20時間に前核形成を観察して受精を判定し、媒精後26～32時間で胚移植した。媒精後26～32時間において2細胞期胚に達したとき、正常胚発育とした。FSH 添加群および対照群の受精率・正常胚発育率を比較し、FSH 添加の有効性を検討した。なお FSH 添加群および

対照群における平均年齢・原発不妊の割合は、それぞれ $33.6 \pm 0.7$  (SE) 歳・57%および $33.3 \pm 0.5$  歳・52%であり、両群で有意の差を認めなかった。

卵巣刺激・採卵・媒精・卵培養・統計処理に関しては、「1. 卵成熟度評価に関する検討」で述べたと同様に行った。

### 研究成績

#### 1. 卵成熟度評価に関する検討

体外受精359周期のうち、355周期(99%)で採卵に成功し、307周期(86%)で受精、275周期(77%)が胚移植に達した。144周期が妊娠し(採卵術あたり妊娠率40%)、89周期が出産ないし順調に妊娠継続している(採卵術あたり継続妊娠率25%)。

放射冠の形態による卵成熟度評価と媒精卵あたりの受精率・正常胚発育率との関係を表2に示す。計2,145個の卵の成熟度の分布は、O:24.7%, M:45.9%, T:19.1%, I:8.3%そしてA:2.0%であった。Mの受精率・正常胚発育率は、それぞれ70.1%・51.4%であり、他のどの成熟度における受精率・正常胚発育率よりも有意に高かった。OとTの受精率・正常胚発育率は、有意の差がなく、どちらもIおよびAの受精率・正常胚発育率より有意に高かった。IとAの受精率・正常胚発育率も有意の差がなかった。

第一極体の有無と媒精卵あたりの受精率・正常胚発育率との関係を表3にまとめる。囲卵腔を観察できないIと異常卵のAは、分析より除外した。O・M・Tを集計すると、受精率も正常胚発育率も、ともに、第一極体が観察されたとき、観察されなかったときに比し有意に高かった。O・M・

表2 放射冠の形態に基づく卵成熟度と卵あたり受精率・正常胚発育率の関係

卵成熟度	卵数	卵あたり受精率	卵あたり正常胚発育率
O	530	51.1% <sup>a</sup>	33.0% <sup>a</sup>
M	985	70.1% <sup>b</sup>	51.4% <sup>b</sup>
T	409	48.2% <sup>a</sup>	27.1% <sup>c</sup>
I	178	20.8%	11.2%
A	43	18.6%	9.3%
計	2,145	56.1%	38.0%

<sup>a</sup>p<0.001 vs. I/A    <sup>b</sup>p<0.001 vs. O/T/I/A

<sup>c</sup>p<0.05 vs. I/A

表3 第一極体の有無と卵あたり受精率・正常胚発育率との関係

放射冠による卵成熟度	第一極体の有無	卵数	卵あたり受精率	卵あたり正常胚発育率
O	+	453	52.1%	34.4%
	-	77	45.5%	24.7%
M	+	908	70.7%	52.5% <sup>a</sup>
	-	77	62.3%	37.7%
T	+	264	49.2%	27.3%
	-	145	46.2%	26.9%
計	+	1,625	62.0% <sup>b</sup>	43.4% <sup>b</sup>
	-	299	50.2%	29.1%

<sup>a</sup>p<0.05 vs. 第一極体(-)群

<sup>b</sup>p<0.001 vs. 第一極体(-)群

表4 卵丘細胞塊と放射冠の形態に基づく卵成熟度評価の比較

卵成熟度評価法	成熟度	卵数	卵あたり受精率	卵あたり正常胚発育率
卵丘細胞塊	成熟	1,343	64.1% <sup>a</sup>	46.4% <sup>b</sup>
	その他	802	42.6%	24.1%
放射冠	M	985	70.1%	51.4%
	その他	1,160	44.2%	26.7%

<sup>a</sup>p<0.01 vs. M群の卵あたり受精率

<sup>b</sup>p<0.05 vs. M群の卵あたり正常胚発育率

Tの各群ごとにおいても同様の傾向が認められ、Mの正常胚発育率に関しては統計的にも有意であった。

実体顕微鏡下の卵丘細胞塊の観察による卵成熟度評価と、倒立顕微鏡下の放射冠の観察による卵成熟度評価との比較を、表4に示す。放射冠の観察により成熟と判定されたときのほうが、卵丘細胞塊の観察により成熟と判定されたときよりも、受精率・正常胚発育率とも有意に高かった。その他の成熟度に関しては、二つの卵成熟度評価法で、受精率・正常胚発育率に有意の差を生じなかった。したがって、倒立顕微鏡下の放射冠の観察による卵成熟度評価のほうが、成熟卵の選別能が高いと考えられた。

#### 2. FSH 添加体外成熟培養に関する検討

未熟卵(Iおよび第一極体の放出されていないT)に対して、FSH添加体外成熟培養により、受精率・正常胚発育率が改善されるかを検討した(表

表5 FSH添加体外成熟培養の受精率・正常胚発育率に及ぼす効果

卵成熟度	FSH添加の有無	症例数	卵数	卵あたり受精率	卵あたり正常胚発育率
T	+	23	40	75% <sup>a</sup>	55% <sup>b</sup>
	-	41	68	53%	26%
I	+	8	11	27%	18%
	-	18	25	20%	8%
計	+	27	51	65% <sup>a</sup>	47% <sup>b</sup>
	-	44	93	44%	22%

<sup>a</sup>p<0.05 vs. FSH (-) 群<sup>b</sup>p<0.01 vs. FSH (-) 群

5). Tおよび総計において, FSH添加体外成熟培養により, 受精率および正常胚発育率が有意に上昇した. 妊娠率に関する影響は, 妊娠1例を除き, 他の全症例で成熟卵由来の胚が同時に移植されたため, 検討できなかった. この1例の妊娠症例では, 成熟度Tの卵2個のみが採卵されたので, 2個ともFSH添加体外成熟培養(18時間)を施行した後, 媒精した(図2). 2個とも受精・分割し, 媒精後29時間(採卵後2日目)に2および3細胞期胚を移植して単胎妊娠となり, 正常女児を出産した.

### 考 察

卵成熟度の評価法としては, 生化学的指標の検討もなされてはいるが, いまだ確立されておらず<sup>14)15)</sup>, 有効性・簡便性・無侵襲性から形態学的評

価が体外受精の臨床上主流となっている. 採卵時の卵は卵丘細胞塊・放射冠により密に覆われており, 卵の直接観察のためにはこれらを hyaluronidase 処理にて除去しなければならない. 十分に成熟した時点では, 卵丘細胞および放射冠除去はその後の受精・胚発育に影響しないが<sup>16)</sup>, 未熟卵においては追加成熟が障害され, 受精率も低下する<sup>17)18)</sup>. そのため, 卵丘細胞・放射冠除去による卵の直接観察は, 体外受精の臨床においては実用的でない.

LH サージ発来又は hCG 投与から排卵に近づくにつれ, 卵丘は細胞の解離と間質の増加により増大し, 透明・粘液状となり, 細胞密度が低下する<sup>19)20)</sup>. そこで, 一般に卵成熟度は, 実体顕微鏡でこうした卵丘細胞塊の性状を観察して判定されている<sup>4)8)~11)</sup>. しかしながら, 卵巣刺激により過排卵誘発をしたときには, 卵丘細胞塊の性状と卵核成熟の stage との間に不一致が生ずることが示された<sup>3)</sup>. 過排卵誘発下の卵丘細胞・放射冠細胞の解離と卵核成熟の経時的变化を詳細に検討した報告<sup>20)</sup>によると, 卵核成熟は hCG 投与後15・20・35時間でそれぞれ卵核崩壊・第一減数分裂中期・第二減数分裂中期に達するが, 卵丘細胞の解離は経時的に進むものの一律でなく, hCG 投与後15時間から20時間の間に急速に進行し, hCG 投与後20時間でほぼ排卵時(36時間後)と同程度に達してしまう. したがって卵丘細胞の解離の程度から第一減

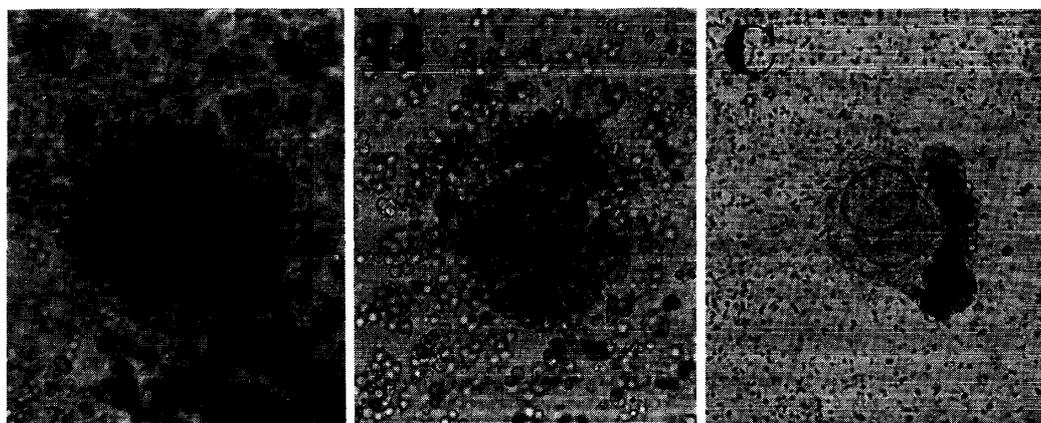


図2 FSH添加体外成熟培養における放射冠の変化. (A) 採卵直後, 成熟度 T. (B) FSH 750mIU/ml 添加成熟培養18時間後, 放射冠の拡散が認められる. (C) 媒精後29時間, 2細胞期胚. この症例は妊娠し, 正常女児を出産した.

数分裂中期以降の stage を推定することは困難と考えられる。これに対し、放射冠細胞の解離は排卵まではほぼ一律に進行し、放射冠細胞密度の低下は直線的であった<sup>20)</sup>。そのため、卵核成熟の推定には、卵により近接する放射冠細胞の解離の程度のほうが、より鋭敏な指標となると考えられる。

近年、卵丘細胞塊を薄く培養皿に付着させることにより、卵をより高倍率で簡便に観察することが考案された (cumulus spreading technique)<sup>12)</sup>。本研究では、この方法により卵および放射冠を詳細に観察し、主として放射冠細胞の解離の程度に基づき、卵成熟度を評価した。その結果、受精・胚発育率は成熟度評価とよく相関し、成熟度が M のとき最高で、T・I と未熟度が増すにつれ順次有意に低下し、また過熟 O においても低下した。また、従来用いてきた主として卵丘細胞の解離の程度に基づく卵成熟度評価<sup>11)</sup>と比較したところ、放射冠の観察により成熟と判定されたときの、卵丘細胞塊の観察により成熟と判定されたときよりも、受精率・正常胚発育率とも有意に高く、放射冠観察による卵成熟度評価のほうが成熟卵の選別能が高いと示唆された。第一極体の有無も受精率・胚発育率と有意な関連を示したが、極体が観察できないときにも約50%の受精率が得られ、false negative が多いことが示唆された。これは、卵丘および放射冠を薄く延ばしてそれ越しに観察するため、本質的にみにくかつ極体の見易い位置に卵を転がすこともできず、そのため実際には極体があっても卵の上下に位置すると見落して極体なしと判定しやすいためと考えられる。

未熟卵の受精・胚発育能は、本研究ならびに他の報告<sup>4)~7)9)~12)</sup>で示されたごとく、成熟卵に比し劣っており、出産にまで至るのはさらにまれである<sup>8)12)</sup>。そこで追加体外成熟が必要とされるが、卵卵丘細胞塊培養法による体内成熟に相当する程度の体外成熟は、マウス以外の哺乳類では成功していない<sup>21)</sup>。これは、核成熟は体外で比較的容易に達成できるが、細胞質成熟および膜成熟は体外ではかなり不十分となるためである<sup>14)</sup>。培養液に gonadotropin や steroid を添加することにより、細胞質成熟および膜成熟が改善し、より生理的な

卵成熟となるのが、ラット・マウス・ヒトなどで報告されている<sup>21)</sup>。Prins et al. は、ヒト未熟卵を hMG 75mIU/ml 添加培養液で24~48時間成熟培養し、第一極体放出率および受精率の上昇を得た<sup>22)</sup>。本研究においても、未熟卵(Iおよび第一極体の放出されていない T) の FSH 添加体外成熟培養により、受精率および正常胚発育率が有意に上昇した。本研究で hMG でなく FSH を添加したのは、マウス卵体外成熟で FSH と LH を同時に添加すると FSH 単独添加に比し体外成熟が劣ったためである<sup>11)</sup>。FSH の添加濃度に関しては、マウスの研究では FSH 濃度が生理的レベルを超えても有効性の低下は認められず<sup>23)</sup>、またヒトでは Prins et al. が hMG を75mIU/ml 添加して有効と報告しているため<sup>22)</sup>、本研究では暫定的にその10倍量の750mIU/ml を添加することにした。FSH の至適添加濃度に関しては、今後検討を要する課題と考える。epidermal growth factor および insulin-like growth factor I の添加培養はヒト卵の核成熟を促進し<sup>24)</sup>、paracrine control で重要なこうした growth factor の添加も、生理的体外成熟に役立つ可能性があると考えられる。

ヒト卵が体外培養で卵核胞期から第二減数分裂中期に達するには、おおよそ34時間要すると一般に考えられているが<sup>14)</sup>、24時間で約40%の卵が第二減数分裂中期に達したとの報告も最近なされた<sup>25)</sup>。採卵は通常昼間に施行されるので、体外成熟後の媒精が夜間とならないように、また妊娠に貢献する可能性が I より T の未熟卵のほうが高いとの考えから、未熟卵の FSH 添加体外成熟実験では追加成熟培養時間を18~24時間に設定した。Hill et al.<sup>4)</sup>は、未熟卵・中等度成熟卵に対し、それぞれ24~30時間・6~24時間の培養を行い、0%・59%の受精率を得た。また、2~3時間ごとに第一極体の有無を観察し、第一極体放出の確認後1~3時間に媒精するという卵個別のスケジュールも報告されている<sup>7)12)</sup>。これによると、卵核胞期卵の49%が、そして卵核胞も第一極体も認められない時期の卵の82%が受精に至った<sup>12)</sup>。卵成熟度に応じた至適な成熟培養時間は、今後さらに検討を要すると考える。

## 文 献

1. *Garcia JE, Padilla SL, Bayati J, Baramki TA.* Follicular phase gonadotropin-releasing hormone agonist and human gonadotropins: A better alternative for ovulation induction in in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1990; 53: 302—305
2. *Ron-El R, Herman A, Golan A, Nachum H, Soffer Y, Caspi E.* Gonadotropins and combined gonadotropin-releasing hormone agonist-gonadotropins protocols in a randomized prospective study. *Fertil Steril* 1991; 55: 574—578
3. *Laufer N, Tarlatzis BC, DeCherney AH, Masters JT, Haseltine FP, MacLusky N, Naftolin F.* Asynchrony between human cumulus-corona cell complex and oocyte maturation after human menopausal gonadotropin treatment for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1984; 42: 366—372
4. *Hill GA, Freeman M, Bastias MC, Rogers BJ, Herbert CM, Osteen KG, Wentz AC.* The influence of oocyte maturity and embryo quality on pregnancy rate in a program for in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1989; 52: 801—806
5. *Trounson AO, Mohr LR, Wood C, Leeton JF.* Effect of delayed insemination on in-vitro fertilization, culture and transfer of human embryos. *J Reprod Fert* 1982; 64: 285—294
6. *Testart J, Lassalle B, Frydman R, Belaisch JC.* A study of factors affecting the success of human fertilization in vitro. II. Influence of semen quality and oocyte maturity on fertilization and cleavage. *Biol Reprod* 1983; 28: 425—431
7. *Veeck LL.* Extracorporeal maturation: Norfolk, 1984. *Ann NY Acad Sci* 1985; 442: 357—367
8. *Veeck LL, Wortham JWE Jr, Witmyer J, Sandow BA, Acosta AA, Garcia JE, Jones GS, Jones HW Jr.* Maturation and fertilization of morphologically immature human oocytes in a program of in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1983; 39: 594—602
9. 星 和彦, 星合 昊, 齊藤 晃, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 鈴木雅洲. ヒト卵子の成熟度に関する Grade 分類の試み. *日産婦誌* 1983; 35: 2300—2304
10. *Plachot M, Mandelbaum J, Cohen JJ, Debache C, Pigeau F, Junca A.* Sequential use of clomiphene citrate, human menopausal gonadotropin, and human chorionic gonadotropin in human in vitro fertilization. I. Follicular growth and oocyte suitability. *Fertil Steril* 1985; 43: 255—262
11. 神野正雄. ヒト体外受精のための未熟卵体外成熟法: 臨床的意義の分析とマウスによる基礎研究. *慶應医学* 1989; 66: 127—138
12. *Veeck LL.* Oocyte assessment and biological performance. *Ann NY Acad Sci* 1988; 541: 259—274
13. *Jinno M.* Comparison of media used for human in vitro fertilization and embryo transfer programs—A new method of serum preparation—. *Acta Obst Gynaec Jpn* 1986; 38: 102—110
14. *Plachot M, Mandelbaum J.* Oocyte maturation, fertilization and embryonic growth in vitro. *Brit Medical Bull* 1990; 46: 675—694
15. 堤 治. 卵の成熟と発育. *日産婦誌* 1993; 45: 829—835
16. *Mahadevan MM, Trounson AO.* Removal of the cumulus oophorus from the human oocyte for in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1985; 43: 263—267
17. *Chan PJ, Hutz RJ, Dukelow WR.* Nonhuman primate in vitro fertilization: Seasonality, cumulus cells, cyclic nucleotides, ribonucleic acid, and viability assays. *Fertil Steril* 1982; 38: 609—615
18. *Schroeder AC, Eppiq JJ.* The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. *Develop Biol* 1984; 102: 493—497
19. *Wassarman PM.* The mammalian ovum. In: Knobil E, Neill JD, eds. *The Physiology of Reproduction*. Vol 1. New York: Raven Press, 1988; 69—102
20. *Bomsel-Helmreich O, Huyen LVN, Durand-Gasselin I, Salat-Baroux J, Antoine JM.* Timing of nuclear maturation and cumulus dissociation in human oocytes stimulated with clomiphene citrate, human menopausal gonadotropin, and human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1987; 48: 586—595
21. *Jinno M, Iizuka R, Sandow BA, Hodgen GD.* In vitro maturation of oocytes. *Assisted Reproductive Technology/Andrology* 1990; 1: 54—68
22. *Prins GS, Wagner C, Weidel L, Gianfortoni J, Marut EL, Scommegna A.* Gonadotropins augment maturation and fertilization of human immature oocytes cultured in vitro. *Fertil Steril* 1987; 47: 1035—1037
23. *Dekel N, Beers WH.* Rat oocyte maturation in

- vitro: Relief of cyclic AMP inhibition by gonadotropins. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 4369—4373
24. Gomez E, Tarin JJ, Pellicer A. Oocyte maturation in humans: The role of gonadotropins and growth factors. Fertil Steril 1993; 60: 40—46
25. Lopata A, Leung PC. The fertilizability of human oocytes at different stages of meiotic maturation. Ann NY Acad Sci 1988; 541: 324—336

(No. 7625 平7・3・17受付)