

Controlled ovarian stimulation 法および in vitro capacitated sperm を用いた AIH による難治性不妊症の治療に関する研究

浜松医科大学産科婦人科学教室 (主任: 川島吉良教授)

渡辺 憲生 林 賛育 寺尾 俊彦

The Study of the Controlled Ovarian Stimulation and Sperm Capacitated AIH for the Treatment of Refractory Infertility

Norio WATANABE, Tzan-Yu LIN and Toshihiko TERAO

Department of Obstetrics and Gynecology, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu
(Director: Prof. Yoshiro Kawashima)

概要 難治性不妊症患者に対し clomiphene または hMG を用いた controlled ovarian stimulation 法を行いながら, in vitro capacitated sperm を用い AIH を行い, その有用性について検討した. 不妊症患者の内訳は① male subfertility 27例, ②機能性不妊症25例, ③中枢性排卵障害 8例, ④頸管粘液分泌不全症 3例, ⑤子宮内膜症 6例の計69例である. 卵胞発育のモニターとして超音波断層法と RIA による血中 E₂値測定を行った. in vitro capacitation 法は精子遠沈洗浄法または精子洗浄 Percoll 分離法を行った.

1) 妊娠した症例の血中 E₂値変動は hCG 投与日前後まで上昇傾向を示した. 2) 精子遠沈洗浄法後の運動精子の濃縮率は平均1.19倍, 回収率は平均40.0%であった. 一方, 精子洗浄 Percoll 分離法後の運動精子の濃縮率は平均1.81倍, 回収率は平均67.9%であった. 3) 妊娠した者は, ① male subfertility 7例 (妊娠率25.9%), ②機能性不妊症 4例 (妊娠率16.0%), ③中枢性排卵障害 2例 (妊娠率25.0%), ④頸管粘液分泌不全症 1例 (妊娠率33.3%), ⑤子宮内膜症 1例 (妊娠率16.7%) の計15例, 平均妊娠率は21.7%であった. 4) 正期産は10例, そのうち2例が双胎であり, 計12名の新生児が生まれた. 早期産は2例であった. 以上14名の新生児に奇形は認めなかった.

以上より, COS-IVC-AIH 法は難治性不妊症に対する治療として有用であることが確かめられた.

Synopsis The clomiphene or hMG to stimulate ovarian follicle maturation which we call "controlled ovarian stimulation (COS)", in vitro capacitation (IVC) of spermatozoa and artificial insemination of husband's sperm (AIH) were simultaneously given to refractory infertile couples. The following couples were studied in 5 groups, ① male subfertility 27 cases, ② functional infertility 25 cases, ③ ovulatory dysfunction due to central mechanism 8 cases, ④ cervical mucous insufficiency 3 cases, ⑤ endometriosis 6 cases. The pregnancy rate was 21.7% in total (15 of 69 cases): 25.9% in group ①, 16.0% in group ②, 25.0% in group ③, 33.3% in group ④ and 16.7% in group ⑤. The follicle size and serum estradiol were measured every day during the periovulatory phase to evaluate follicle maturation. The Percoll centrifugation method was compared with the washing-centrifugation method with respect to the recovery rate and the concentration rate of motile spermatozoa. The recovery rate was 67.9% with the Percoll centrifugation method, and 40.0% with the washing-centrifugation method. The concentration rate was 1.81 times in the Percoll centrifugation method, and 1.19 times in the washing-centrifugation method. The present studies indicated that the combination of COS and IVC methods for AIH in refractory infertile couples was very effective.

Key words: Infertility • Capacitation • AIH

緒 言

長期間の不妊治療にもかかわらず, 妊娠しない難治性不妊症患者や, 種々の検査で不妊原因が明

らかでない機能性不妊症患者に対する有効な治療法は少なく, 確立された治療法がないのが現状である.

従来、高度乏精子症や機能性不妊症に対し、artificial insemination with husband's semen (AIH)が行われており、液化射精精子をそのまま注入する方法、分画射精法などが実施されてきた。しかし、精液には decapacitation factor と呼ばれる受精阻害物質が存在し、この様な AIH に対し阻害的に働き、事実妊娠率も低いものであつた。

最近、不妊治療の一環として体外受精・胚移植法が臨床応用されるに至つた。その技術の応用の一つとして in vitro capacitation 法を行つた精子を用いた AIH が行われるようになってきた⁵⁾。一方、排卵方法もより正確な卵胞発育モニタリングを用い積極的に排卵誘発をする controlled ovarian stimulation 法が行われるようになってきた。

そこで、従来の不妊治療が奏効しなかつた難治性不妊症患者にさらに積極的に妊孕性を高める目的で卵巣を刺激した上で、in vitro にて受精能力を獲得させた精子を用いて AIH を行うことによつて不妊症を治療せんと試みたので、その成績と有用性について報告する。

研究対象及び方法

1. 研究対象

患者は、① male subfertility (精子数 $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下又は運動率 60% 以下) 27 例、② 機能性不妊症 (骨盤内に器質的病変がなく、基礎体温、子宮卵管造影法、精液検査、血中 prolactin 値、Huhner test に異常がないにもかかわらず、2 年以上不妊のもの) 25 例、③ 中枢性排卵障害 (間脳下垂体異常による排卵障害) 8 例、④ 頸管粘液分泌不全症 3 例、⑤ 子宮内膜症 (保存的手術療法又はホルモン療法終了後 1 年以上不妊のもの) 6 例の計 69 例である。

2. Controlled Ovarian Stimulation 法 (COS 法)

① clomiphene-hCG 法

月経周期 5 日目から clomiphene (Clomid[®]) 1 日 50~200mg, 5 日間内服し、月経周期 13 日目より超音波断層法で卵胞発育のモニタリングを行う。卵胞最大径が 20mm 以上となつた時に human chorionic gonadotropin, hCG (HCG モチダ[®]) 10,000IU 筋注し、その 24~48 時間後に IVC-AIH (次項で述べる) を行う。

② hMG-hCG 法

月経周期 3 日目から human menopausal gonadotropin, hMG (ヒュメゴン[®]またはパーゴナル[®]) 150IU 毎日筋注し、月経周期 10 日目より血中 estradiol (E_2) 値と超音波断層法で卵胞発育のモニタリングを行う。血中 E_2 値が 900~1,600pg/ml か又は卵胞最大径が 20mm 以上となつたら hCG に切り換え、最後の hMG より 36 時間後に hCG 10,000IU 筋注し、その 24~48 時間後に IVC-AIH を行う。

血中 E_2 値は第 1 ラジオアイソトープ社製の RIA-kit にて測定した。

3. In Vitro Capacitation 法 (IVC 法)

① 精子遠沈洗浄法

精液を室温にて 30 分間静置・液化させ、その精液 2ml に培養液 5ml を混ぜピペッティングにより攪拌し、2,000 回転 10 分間遠心する。上清を除き、沈渣に培養液 5ml 加えピペッティングにより攪拌し再び遠心する。上清を除き沈渣に培養液 0.8ml を加えピペッティングし、37°C の培養器 (CO_2 : air: $\text{N}_2 = 5\% : 5\% : 90\%$) の中で 30~60 分間培養し、上清 0.2ml を集め AIH を行う。本法を 46 例 175 周期に対し行つた。

② 精子洗浄 Percoll 分離法

精液を室温にて 30 分間静置・液化させ、その精液 2ml を 50% Percoll 液 (Percoll, Pharmacia Fine Chemicals 社製、に培養液を加え 50% にする) 2ml の上に層積し、2,000 回転 15 分間遠心する。上清を除き、沈渣に培養液 5ml を加えピペッティングにより攪拌し、2,000 回転 5 分間遠心する。上清を除き、沈渣に培養液 0.6ml を加え 37°C の培養器 (CO_2 : air: $\text{N}_2 = 5\% : 5\% : 90\%$) の中で 30 分間培養し、AIH を行う。本法を 40 例 57 周期に対し行つた。

培養液は Ham's-F10 (GIBCO 社製) にヒト=アルブミン 7% 添加したものをを用いた。

4. AIH

AIH はビニール製の 6Fr の栄養チューブを用い 0.2~0.3ml の精子液を子宮腔内に入れた。

5. 洗浄精子の評価

精子洗浄の効果を in vitro で評価するために、

精子遠沈洗浄法15例及び精子洗浄 Percoll 分離法15例の精液中の運動精子を位相差顕微鏡下で Makler counting chamber® (Sefi-Medical Instrument 社製)を用いて数え、運動精子の濃縮率及び回収率を算定した。

精子遠沈洗浄後の精子頭部と精子洗浄 Percoll 分離法後の精子頭部を透過型電子顕微鏡にて観察した。試料の作製は常法に従い行った。

研究成績

1. IVC 法後の精子の評価

精子遠沈洗浄法後の運動精子の濃縮率は平均1.19倍、回収率は平均40.0%であった。一方、精子洗浄 Percoll 分離法後の運動精子の濃縮率は平均1.81倍、回収率は平均67.9%であった。IVC後に明らかに精子の運動速度が上昇した症例が認められた。

2. IVC 法前後の精子頭部電子顕微鏡像

写真1は単に遠心分離させた精子頭部の透過型電子顕微鏡写真である。写真2は精子遠沈洗浄法

を行った精子の同写真である。原形質膜の膨大を認めるが、先体外膜、先体に変化は認めなかった。

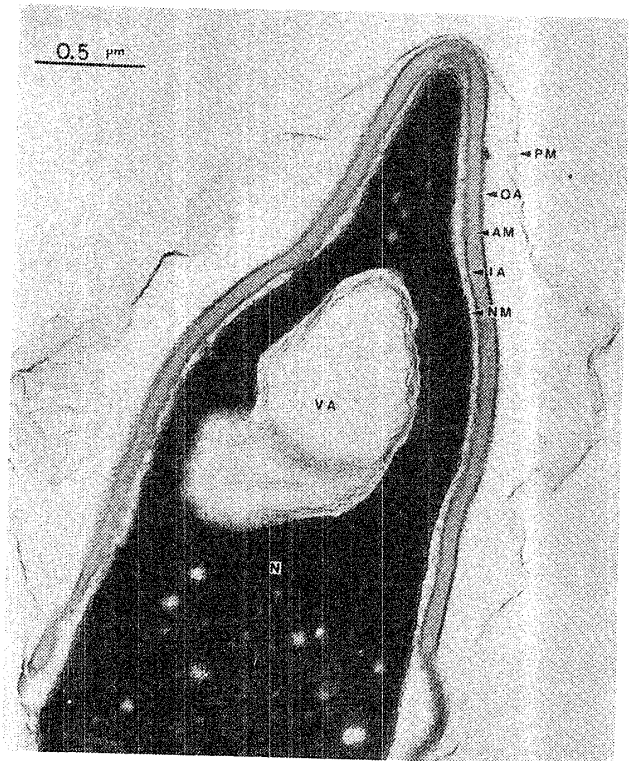


写真2 精子遠沈洗浄法後の精子頭部

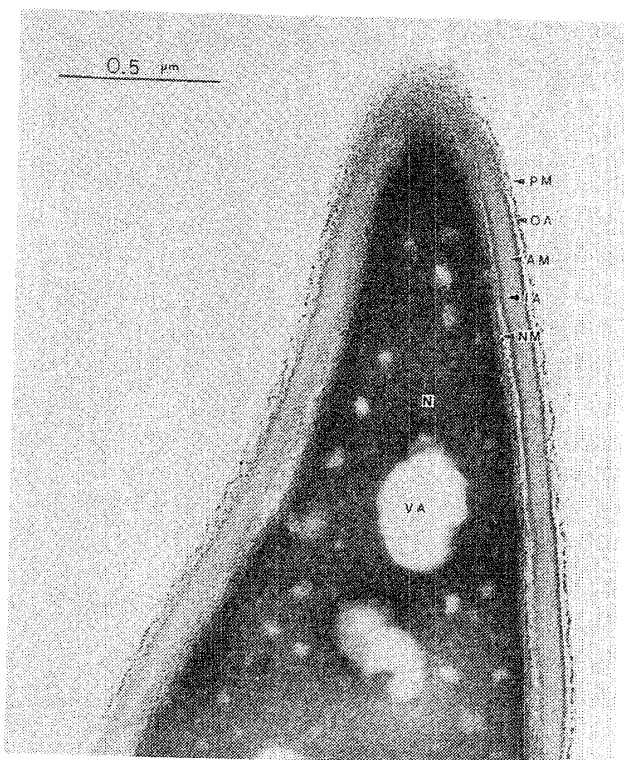


写真1 IVC 法前の精子頭部

PM: plasma membrane, OA: Outer acrosome membrane, AM: Acrosome material, IA: Inner acrosome membrane, NM: Nuclear membrane, N: Nucleus, VA: vacuole

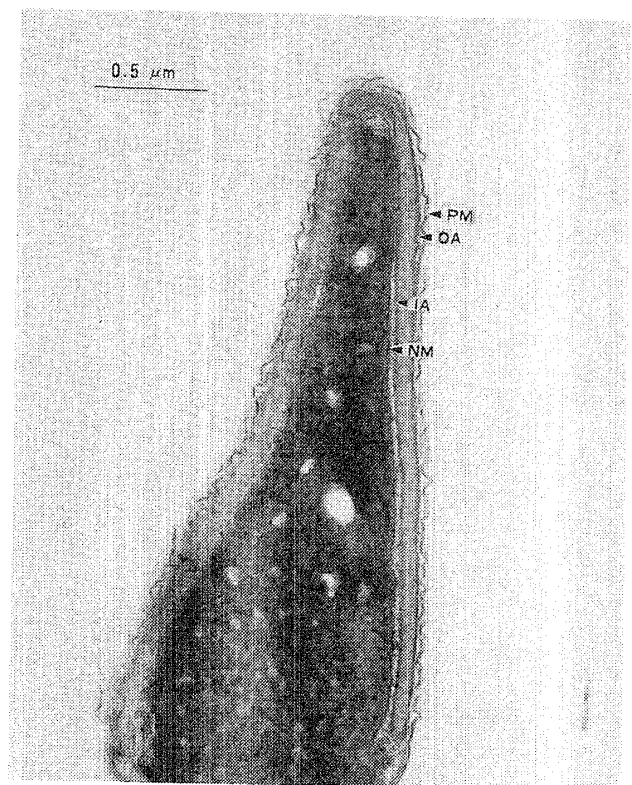


写真3 精子洗浄 Percoll 分離法後の精子頭部

写真3は精子洗浄 Percoll 分離法を行つた精子の同写真である。原形質膜を含め精子形態に変化は認めなかつた。

3. 血中 E₂ 値の変動

Clomiphene-hCG 法を行つた症例の血中 E₂ 値変動は大きく 3 群に分けられる(図1)。すなわち, high level group (1,000pg/ml ≤ peak E₂), middle level group (400pg/ml ≤ peak E₂ < 1,000pg/ml), low level group (peak E₂ < 400pg/ml) である。各群の妊娠率は high level group で14.8% (4/27 症例), middle level group で21.4% (6/28 症例), low level group で0% (0/11 症例) であつた。また妊娠した周期の血中 E₂ 値変動を見ると, day -1 (day 0 を hCG 投与日とする) にピークとなる山型のパターンとなり, その平均値は764pg/ml (440~1,300pg/ml) であつた(図1)。妊娠症例のうち妊娠した周期と妊娠しなかつた周期の血中 E₂ 値は統計学的に有意差を認めなかつた。

hMG-hCG 法を行つた症例の血中 E₂ 値変動も同様に 3 群に大別できる(図2)。各群の妊娠率は

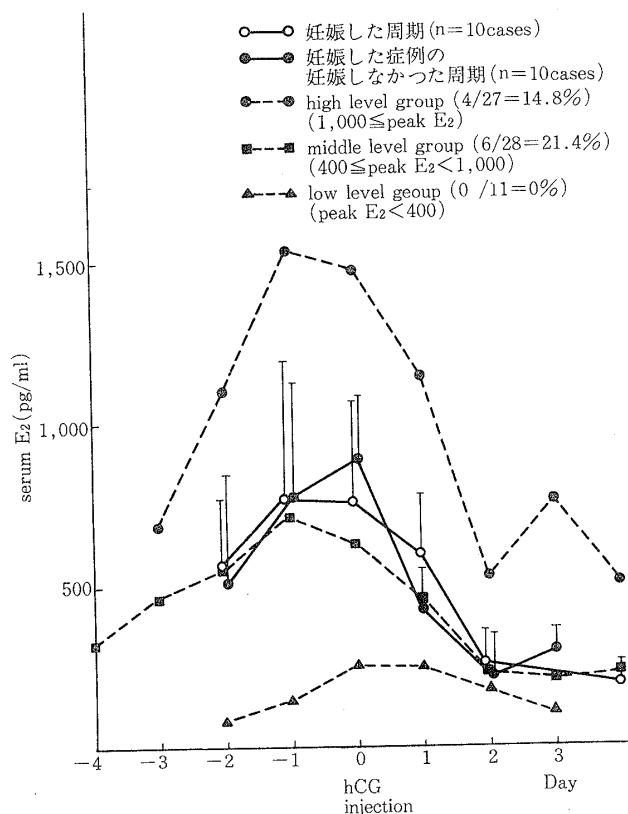


図1 血中 E₂ 値の変動 (clomiphene)

high level group で15.4% (2/13 症例), middle level group で21.4% (3/14 症例), low level group で0% (0/16 症例) であつた。妊娠した周期の血中 E₂ 値変動について見ると, day 0 にピークとなる山型のパターンとなり, その平均値は2,070pg/ml (1,300~3,800pg/ml) であつた(図2)。妊娠した症例のうち妊娠した周期の血中 E₂ 値と妊娠しなかつた周期の血中 E₂ 値は統計学的に有意差は認めなかつたが, 妊娠した周期の方が高い傾向にあつた。

4. COS-IVC-AIH を受ける前の不妊治療歴

不妊原因別に妊娠した症例と妊娠しなかつた症例について, ① COS-IVC-AIH を受けるまでの不妊期間, ② 不妊治療開始から COS-IVC-AIH を受けるまでの期間, ③ COS-IVC-AIH を受ける前の不妊治療法 (clomiphene 療法, hMG 療法, AIH) を調べ, 有意差があるかどうかを検討した(表1)。有意差があつたものは機能性不妊症における

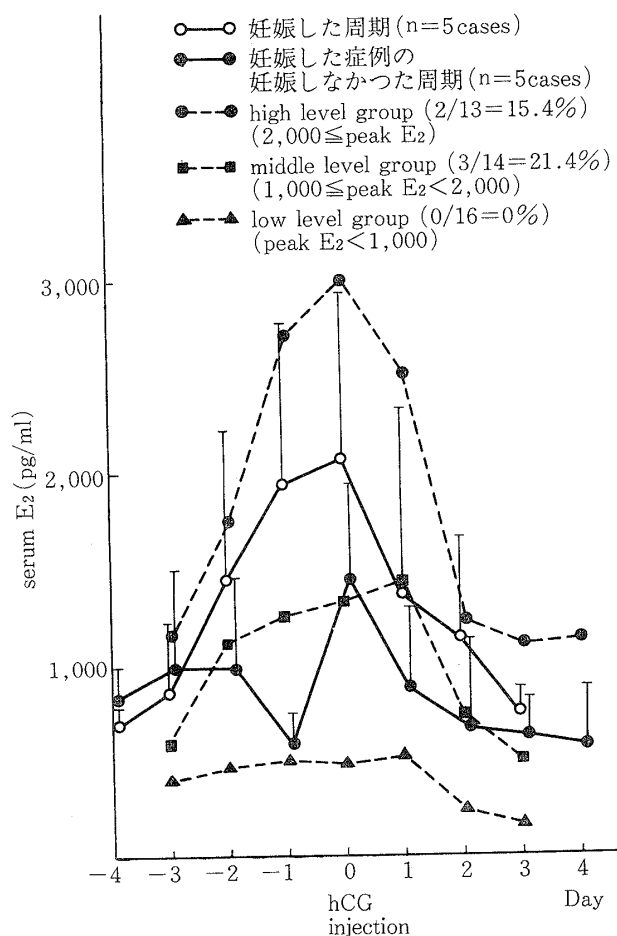


図2 血中 E₂ 値の変動 (hMG)

表1 COS-IVC-AIH を受けるまでの不妊治療歴

		COS-IVC-AIH を受けるまでの 不妊期間	不妊治療開始か らCOS-IVC-AIH を受けるまでの 期間	COS-IVC-AIH を受ける前の不妊治療法		
				clomiphene 法	hMG-hCG 法	AIH
male subfertility (n=27)	妊娠 症例 (n=7)	61.3ヵ月 N.S.	45.6ヵ月 N.S.	7/7 〔(平均6.4周期)〕	1/7	1/7
	妊娠い し症 な例 (n=20)	52.9ヵ月	33.4ヵ月	N.S. 20/20 〔(平均8.5周期)〕	0/20	3/20
機 能 性 不 妊 症 (n=25)	妊娠 症例 (n=4)	58.5ヵ月 N.S.	28.5ヵ月 N.S.	4/4 ※※ 〔(平均12.8周期)〕	1/4	1/4
	妊娠い し症 な例 (n=21)	68.7ヵ月	41.9ヵ月	20/21 〔(平均5.3周期)〕	2/21	1/21
中 枢 性 排 卵 障 害 (n=8)	妊娠 症例 (n=2)	120.5ヵ月 ※※	78.0ヵ月 ※	1/2 〔(平均2.5周期)〕	1/2 〔(平均16周期)〕	2/2 〔(平均8.0周期)〕
	妊娠い し症 な例 (n=6)	59.6ヵ月	52.4ヵ月	N.S. 6/6 〔(平均7.0周期)〕	N.S. 5/6 〔(平均1.8周期)〕	1/6
頸 管 粘 液 分 泌 不 全 症 (n=3)	妊娠 症例 (n=1)	169ヵ月	133ヵ月	0/1	0/1	0/1
	妊娠い し症 な例 (n=2)	93ヵ月	76ヵ月	2/2 〔(平均1.5周期)〕	0/2	1/2 〔(平均3.5周期)〕
子 宮 内 膜 症 (n=6)	妊娠 症例 (n=1)	60ヵ月	33ヵ月	1/1 (14周期)	0/1	0/1
	妊娠い し症 な例 (n=5)	48.5ヵ月	30ヵ月	5/5 〔(平均5.0周期)〕	0/5	0/5

N.S.=not significant * p<0.01 ** p<0.05

clomiphene の治療回数と、中枢性排卵障害の COS-IVC-AIH を受けるまでの不妊期間及び、不妊治療開始から COS-IVC-AIH を受けるまでの期間であり、いずれも妊娠した症例の回数、期間とも多くなっていた。

以上より妊娠した症例は妊娠しなかつた症例と

ほぼ同様の不妊治療歴を有しているか、妊娠した症例の方がむしろより多くの治療を受けていることがわかった。

5. 妊娠率

不妊外来患者11例に対し IVC-AIH 単独を行い1例が妊娠した(妊娠率9.1%)。また、不妊外来

患者72例に対しCOS法単独を行い8例が妊娠した(妊娠率11.1%)。IVC-AIH単独又はCOS法単独で妊娠しなかつた症例のうち69例に対しCOS-IVC-AIHを行った(1. 研究対象)。COS-IVC-AIHを行つて妊娠した者は、①male subfertility 7例(妊娠率25.9%)、②機能性不妊症4例(妊娠率16.0%)、③中枢性排卵障害2例(妊娠率25.0%)、④頸管粘液分泌不全症1例(妊娠率33.3%)、⑤子宮内膜症1例(妊娠率16.7%)の計15例、平均妊娠率は21.7%であつた。

精子遠沈洗浄法により11例が妊娠し、実施周期数に対する妊娠率は6.3%であつた。精子洗浄Percoll分離法により4例が妊娠し、実施周期数に対する妊娠率は7.0%であつた。

6. 妊娠経過

正期産は10例で、そのうち2例が双胎であり計12名の新生児が生まれた。単胎のみの平均体重は3,007gであつた。早期産は2例で、そのうち1例は妊娠28週に胎盤早期剝離のため帝王切開を行つた。もう1例は妊娠35週に経腔分娩となつた。以上14名の新生児に奇形は認めなかつた。男女比は男6名女8名であつた。流産は3例あり、流産率は20.0%であつた。また、双胎は15例中2例であるため、双胎率は13.3%であつた。

考 察

ヒト精子は、精漿成分を除去し、比較的単純な組成の電解質溶液中で精子を培養する事により、容易にin vitroでcapacitationをさせ得る事がわかつてきた。

射精された精子頭部の表面には精子被覆抗原と呼ばれる精漿蛋白が付着しているが、この蛋白が除かれることによつて精子頭部原形質膜の糖蛋白が変化する事がcapacitationの本質だと考えられている。この精子被覆抗原は受精能破壊因子(decapacitation factor)と呼ばれており、これは精巢上体より分泌される分子量170,000の糖蛋白と考えられている。

IVC法の利点として、①運動良好精子だけを集める事が可能で死滅精子や他の細胞や混入異物から分離する事ができる。②精漿に含まれている受精能破壊因子を大部分除去しうる。③この間に精

子に受精能を獲得せしめうる。④混入細菌など病原体を除去し得るか、又は減少せしめうる、などが挙げられる。

ヒト精子の受精能獲得に要する時間(in vitro)については1.5~7時間と様々な報告が見られ一定した見解はない。著者の行つたIVC法は培養時間が30~60分と短めであり、全ての精子がcapacitationを完了しているとは考えにくい。しかし、AIHの場合は体外受精のように卵子周囲に媒精された精子がすぐにin vitroで受精能を得て、透明帯層に付着する必要がなく、著者の方法ではin vivoでcapacitationを完了するものと思われる。

一方、受精能を獲得した精子はさらに先体反応(acrosome reaction)を必要とすると言われている。acrosome reactionとは原形質膜と先体外膜の間で隔合が起こり(vesiculation)、先体の内容が放出されるとともに、先体が除去される変化のことであり、形態的な変化を伴う。

本法の電子顕微鏡による成績では精子遠沈洗浄法及び精子洗浄Percoll分離法を行つてもacrosome reactionは全く見られなかつた。

capacitationは主として代謝や運動性の変化であり、通常の電子顕微鏡的手法によつては観察できないと言われている。著者の成績においてもcapacitationにより精子に大きな変化を認めなかつた。ただ、精子遠沈洗浄法の精子頭部に原形質膜の膨大を認めたが、これはIVC法の操作による影響であり、遠心などによる機械的刺激が原因の一つと考えている。Mahadevan et al.⁶⁾は、冷凍精子の電顕学的研究により原形質膜が膨大していたり損傷している精子にも十分受精能力があると述べており、原形質膜が膨大していることは受精能力に影響を与えないものと思われる。

優良精子を分離するために行う精子遠沈洗浄法と精子洗浄Percoll分離法の成績を比較検討したが、運動精子の濃縮率、回収率ともに精子洗浄Percoll分離法の方が良好な結果であつた。また、精子洗浄Percoll分離法は奇形精子の割合も少なく、異物や他の細胞成分もほとんど含まれず、運動良好な精子を集めるのに有効な手段であると思

われる。実施周期数に対する妊娠率も精子洗浄 Percoll 分離法の方が若干良く、今後は全て精子洗浄 Percoll 分離法で行う予定である。

Berger et al.²⁾は運動良好精子選別法として Percoll 法と control washing 法, albumin gradients 法, swim up 法を比較したが, Percoll 法は他の方法に比べ回収率, 運動率の向上とも高く, また正常形態精子の割合も高かったと述べている。

Forster et al.³⁾は washing technique では細菌は除けないが Percoll 法では大部分の細菌を除くことができ, しかもハムスターテストを用いた受精能検査で他の medium layering system, bovine serum albumin column 法では受精能力は向上しないが, Percoll 法は多くの症例で受精能力を高めることができるので, AIH 用の精子調整法に最適な方法であると述べている。

次にどのようなホルモン動態を示すときに妊娠し易いかを検討した。

血中 E₂ 値のパターンと妊娠率について Jones et al.⁴⁾は hMG-hCG 法を用い血中 E₂ 値の変動を六つのパターンに分け, hCG 注射後翌日まで血中 E₂ 値が上昇するパターンが最も妊娠率が高く, hCG 注射日にピークを持つパターンの妊娠率が次いで高かったと述べている。従つて, 血中 E₂ 値変動パターンは hCG 注射後翌日まで上昇することが妊娠率を高める条件と言えよう。

hMG-hCG-IVC-AIH で妊娠した症例の妊娠した周期の血中 E₂ 値変動は day 0 にピークとなるパターンであり, Jones et al. の 2 番目に妊娠率の高いパターンに相当した。血中 E₂ 値と妊娠率について見ると, high level group で 15.4% (2/13 症例), moderate level group で 21.4% (3/14 症例), poor level group では妊娠した症例はなかった。血中 E₂ 値変動について妊娠するために必要な条件は, ① hCG 投与日又はその前後まで血中 E₂ 値が上昇し続けること, ② peak E₂ 値が 2,000pg/ml 前後になること, であると考えられる。

clomiphene-hCG-IVC-AIH で妊娠した症例の妊娠した周期の血中 E₂ 値変動は day -1 にピークとなるパターンであり, hMG-hCG 法同様に hCG

投与日前後まで血中 E₂ 値は上昇を続けていた。また, peak E₂ 値はほぼ 400~1,000pg/ml の間にあつた。peak E₂ 値が hMG-hCG 法より低いのは発育した卵胞の数の違いによるものと思われる。

飯塚ら⁵⁾は in vitro capacitation を行わない従来 of AIH の妊娠率は 16.4% であると報告している。それらのうち, 男性因子が適応となつた症例 (精子数 40×10⁶/ml 以下または運動率 50% 以下) の妊娠率は 10.7% であつたと述べている。一方, Kerin et al.⁶⁾は自然排卵で IVC-AIH を行つた場合の妊娠率は 20.5% と報告している。この対象は, ほぼ飯塚らの男性因子の適応と一致しており, Kerin et al. の IVC-AIH の妊娠率が高いのは IVC 法が男性不妊に対し有効であつたことを示しているものと考えられる。著者の COS-IVC-AIH のうち male subfertility の妊娠率は 25.9% であり, Kerin et al. の報告より若干よい結果となつている。

COS 法と IVC-AIH を組み合わせた COS-IVC-AIH の成績について見てみると, Sher et al.⁷⁾は妊娠率 35.7% であると報告している。著者の妊娠率は 21.7% と Sher et al. より低いが, 著者の妊娠症例は過去の様々な不妊治療にも抵抗した難治性不妊症であり, この点に意義があると思われる。また, 著者の成績では, IVC-AIH 単独の妊娠率は 9.1%, COS 法単独の妊娠率は 11.1% であつた。これに対し COS-IVC-AIH の妊娠率は 21.7% であり, IVC-AIH 単独や COS 法単独よりこの二つを組み合わせた COS-IVC-AIH の方が難治性不妊症に対し有効であると考えられる。

不妊原因別について妊娠率を見ると male subfertility と中枢性排卵障害が他の疾患より妊娠率が高かつた。male subfertility について考えると, ①精子が濃縮され運動精子の濃度が上昇した, ②精子運動率が向上した, ③ decapacitation factor を取り除き capacitation を完了しやすくしている, などにより高い妊娠率が得られたものと考えられる。

中枢性排卵障害については IVC 法よりは COS 法が有効に作用したのと考えられる。

機能性不妊症のうち COS-IVC-AIH が有効で

あるものとして次のものが考えられる。①精子 capacitation の障害による不妊症, ②精漿中の抗精子抗体による免疫性不妊症。

頸管粘液分泌不全症で妊娠した症例は, 子宮腔部びらんのため焼灼療法を受けた後であり外子宮口は極めて小さくかつ頸管粘液が全く分泌されない症例であった。この様な症例は AIH の良き適応となるものと考えられる。

子宮内膜症は AIH の絶対適応とは言えない。しかし, 著者は保存的手術療法又はホルモン療法を行っても妊娠しない内膜症に対し, より妊孕性を高めるため COS-IVC-AIH を行い 1 例の妊娠例を得た。この様に, 治療を行っても妊娠し得ない内膜症に対し COS-IVC-AIH を行うことは有効な治療法の一つであると考えられる。

妊娠経過についてみると, 流産率は 20% と自然流産の 10~15% よりやや高率となつたが clomiphene や hMG のみで妊娠した時の流産率は 22~23% であり, これらよりは低い値であつた。また, 正期産の単胎のみの出生時体重についてみると, 自然妊娠の単胎の場合とそれほど変わらず, また, 奇形もないことより IVC-AIH は胎児発育に関して影響を与えないものと考えられる。

以上, 難治性不妊症や機能性不妊症に対し, COS 法と IVC-AIH を組み合わせた COS-IVC-AIH は有効な治療法であると考えられる。

稿を終えるに臨み, 終始御懇篤な御指導並びに御校閲を賜りました恩師, 川島吉良教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. 飯塚理八, 佐藤博久: 人工授精外来. 臨婦産, 34: 224, 1980.
2. Berger, T., Marrs, R.P. and Moyer, D.L.: Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. Fertil. Steril., 43: 268, 1985.
3. Forster, M.S., Smith, W.D., Lee, W.I., Berger, R.E., Krap, L.E. and Stenchever, M.A.: Selection of human spermatozoa according to their relative motility and their interaction with zona-free hamster eggs. Fertil. Steril., 40: 655, 1983.
4. Jones, H.W., McDowell, J., Acosta, A., Sandow, B., Andrews, M.C., Veeck, L., Garcia, J.E., Whibley, T., Jones, G.S., Wilkes, C., Mantzavinos, T. and Wright, G.: The importance of the follicular phase to success and failure in in vitro fertilization. Fertil. Steril., 40: 317, 1983.
5. Kerin, J.F.P., Kirby, C., Peek, J., Jeffrey, R., Warnes, G.M., Matthews, C.D. and Cox, L.W.: Improved conception rate after intrauterine insemination of washed spermatozoa from men with poor quality semen. Lancet, 1: 533, 1984.
6. Mahadevan, M.M. and Trounson, A.O.: Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human semen. Fertil. Steril., 41: 287, 1984.
7. Sher, G., Knutzen, V.K., Stratton, C.J., Montakhab, M.M. and Allenson, S.G.: In vitro sperm capacitation and transcervical intrauterine insemination for the treatment of refractory infertility: Phase I. Fertil. Steril., 41: 260, 1984.
(No. 6188 昭62・5・12受付)