

生殖医療技術の進歩：顕微授精の現状と問題点

福井医科大学産科婦人科学教室（主任：小辻文和教授）

小辻 文和，折坂 誠

THE CURRENT STATUS OF ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY

Fumikazu KOTSUJI and Makoto ORISAKA

From the Department of Obstetrics and Gynecology, Fukui Medical University

It has been over two decades since the birth of the first child conceived by in vitro fertilization (IVF). During the intervening years, technology has evolved; however, IVF has not solved the problems concerning sperm. The first successful pregnancies after the intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte (ICSI) were rapidly followed by the widespread use of this novel technique for the treatment of male factor infertility. Injection of motile (living) spermatozoa into the oocyte is the most important factor in obtaining good results and other sperm parameters, anti-sperm antibodies and sperm origin, i.e., ejaculated, epididymal and testicular, do not have a strong influence on the outcome of ICSI. ICSI has revolutionized the treatment of male infertility and the application of ICSI is rapidly expanding around the world. However, this technique avoids the natural process of sperm selection and fertilization. Therefore, it is of upmost importance to monitor carefully the development, throughout childhood and into adulthood, of individuals born as a result of ICSI in order to assess its safety. ICSI should only be used for specific indications until its safety has been established. In this paper, the current status of two new approaches, ICSI with spermatid and donor oocyte cytoplasm transfusion, is also reviewed.

(Acta Urol. Jpn. 46: 571-576, 2000)

Key words: ART, IVF, ICSI

はじめに

世界初の体外受精 胚移植による妊娠出産の報告から20年の歳月を経、生殖医療技術 (assisted reproductive technology: ART) により誕生した児は世界で30万人に達する。Table 1 にこの間のおもな出来事をまとめる。卵管不妊の解決策として登場した体外受精胚移植法 (in vitro fertilization and embryo transfer: IVF-ET) は、当初男性不妊にも応用できると期待されたが、様々な工夫にもかかわらず決定的な治療法とならず、大きな福音となったのが顕微授精法の登場である。本総説では顕微授精の現状と問題点を、男

性不妊との関わりに絞って概説する。

I. 顕微授精法の誕生の背景

顕微授精法には、卵細胞質内に直接に精子を注入する intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 法、透明帯に切開を加え精子と共に体外培養する partial zona dissection (PZD) 法、卵細胞内に精子を注入する subzonal sperm injection (SUZI) 法が存在する。このうち最初に登場したのは ICSI 法である (Fig. 1)。ICSI 法は当初、受精現象を in vitro で研究する技術として誕生したが、1980年代の ART の広がりと共に臨床への応用が考えられるようになった¹⁾ しかし、ICSI 法には卵細胞質障害をもたらす可能性があることから、1988年には Cohen らにより PZD 法

Table 1. 補助生殖技術の進歩の歴史

1978年	世界初の体外受精 (IVF-ET) 児の妊娠出産
1982年	日本初の体外受精児の妊娠出産
1983年	凍結融解胚の移植による妊娠出産
1984年	配偶子卵管内移植 (GIFT) による妊娠出産
1985年	精巣上体内精子を用いた IVF-ET による妊娠出産
1988年	顕微授精 (透明帯部分切開法) による妊娠出産
1990年	胚生検による着床前診断の報告
1992年	卵細胞質内精子注入法 (ICSI) による妊娠出産
1993年	精巣内精子を用いた ICSI による妊娠出産



Fig. 1. 顕微授精法

Table 2. ICSI の普及に繋がった技術開発

1. 排卵誘発法の工夫 過排卵による余剰卵の有効利用 GnRH アナログを用いた排卵誘発スケジュール
2. 経膈超音波を用いた採卵法の登場
3. 正確な Micromanipulator の普及
4. 精子不動化法の開発
5. 卵の meiotic spindle 損傷を避ける穿刺法
6. 精子採取法の進歩 精巣上体や精巣からの精子採取

が²⁾、また Ng らにより SUZI 法が発表された³⁾。しかし、これら2つの方法は技術的な困難性が伴い、成功したのは一部の施設であり、妊娠率も10~20%と満足できるものではなかった。その後、1992~1995年にかけて特にベルギーのグループから、男性不妊に対する、ICSI の優れた成績が発表され⁴⁻⁹⁾、今日では顕微授精はすべて ICSI で行われる。続いて、閉塞性や非閉塞性無精子症患者の精巣上体や精巣から取り出した精子を用いた ICSI による妊娠¹⁰⁻¹³⁾、さらには凍結融解精子を用いた ICSI による妊娠も可能となった¹⁴⁾。また、Table 2 に示す様々な技術革新もまた ICSI の普及に貢献した。特に、精密な精子注入装置の開発、排卵誘発法と採卵法の工夫は大きな要因である。

II. 男性不妊と ICSI : ICSI 成功に影響する要素

ICSI の適応症例を知るためには、精液検査所見と ICSI の成否との関係を明らかにする必要がある。以下にブリュッセル大学から発表された1,011周期の ICSI の成績をまとめた報告¹⁵⁾を紹介する。

1. 精子濃度と成功率との相関

Table 3 には精子濃度と成績の関係をまとめた。精

Table 3. 精子濃度と ICSI 成績

	精子濃度		
	0	0-5×10 ⁶	>5×10 ⁶
周期数	57	97	684
ICSI 卵数	586	1,038	6,981
2PN 卵 (%)	58±25% ^a	65±24%	70±24% ^b
妊娠率 (%/ET)	45%	37%	42%

Nagy et al.¹⁴⁾ より改変

Table 4. 精子形態と ICSI 成績

	正常形態精子頻度		
	0%	1-3%	>14%
周期数	48	125	203
ICSI 卵数	488	1,214	2,146
2PN 卵 (%)	68±30%	70±20%	75±21%
妊娠率 (%/ET)	45%	42%	41%

Nagy et al.¹⁴⁾ より改変

子濃度0は、初回採精時には精子を認めず何回目かにわずかの精子を採取できた群である。精子濃度0の群では受精率はやや低いものの、妊娠率に関してはまったく差がなく、精液内に精子が存在するかぎり高率に妊娠が期待できることが解かる。

2. 精子形態と成績の相関

Table 4 には精子の形態と成績の関係をまとめた。従来の IVF では、正常形態精子が14%以下。特に4%以下となると極端に成績が低下する。しかし ICSI では、精子形態と受精率、妊娠率には相関がなく、胚の quality や初期流産頻度もまた正常形態精子の場合と差を認めなかった。すなわち、IVF で妊娠が望めないものが ICSI では妊娠可能と考えられる。

この考察として、1つには ICSI ではより正常に近い1匹が選択される可能性があること、さらには形態異常は卵細胞質への通過能だけを反映し、genetic abnormality を反映するものではないことが考えられる。例外として、100% globozoospermia では Karyotype は正常であっても受精率はきわめて低いと報告される。ただし、このような精子であっても患者によっては高い受精率を確保できる場合もあり¹⁶⁾、acrosome を伴わない精子の中にも受精能に差異があることが示唆される。

3. 抗精子抗体と ICSI 成績の相関

抗精子抗体の存在、immunoglobulin タイプ、精子上の localization は ICSI の際の受精、胚発育、妊娠率には影響を及ぼさない。抗精子抗体の不妊への関与はなお定かでないが、抗精子抗体が不妊の原因と考えられるケースでは ICSI は有用な解決法となり得る。

4. 精子運動率

Table 5 には採取された精子の運動率と成績との関係をまとめた。運動率0%の群の運動精子とは、初回の採取では運動精子を認めず、何回目かの採取で少数の運動精子が得られ、これを用いて ICSI を施行した群である。全体の運動率にかかわらず、運動精子を用いた場合には高い受精率、妊娠率が得られる。また、非運動精子を用いた場合の受精率11%はこの群の精子の生存率に一致し、非運動精子であっても生きているものを使えば受精が可能と考えられる。

Table 5. 精子運動率と ICSI 成績

運動率	0%			1~5%	>50%
	非運動精子	運動精子			
周期数	12	54	19	337	
ICSI 卵数	175	503	252	3,498	
2PN 卵 (%)	11±12 ^a	60±27 ^b	68±22 ^b	74±21 ^b	
ET 施行頻度	42%	87%	100%	95%	
妊娠率 (%/ET)	0%	23%	42%	36%	

Nagy et al.¹⁴⁾ より改変

Table 6. 精巣内精子による ICSI 成績: 精子運動性との関連

	運動精子	非運動精子	総計
周期数	97	8	123
ICSI 卵数	810	89	1,042
2PN 卵 (%)	65±27 ^a %	21±18 ^b %	59±30 ^a %
ET 施行頻度 (%/ET)	70±28%	84±28%	71±28%

Nagy et al.¹⁵⁾ より改変

5. 精巣内精子と ICSI 成績

今日では射出精子だけでなく精巣上体や精巣内の精子も ICSI に用いられる。Table 6 に精巣内精子を用いた場合の成績を示す。この場合にも運動精子を用いると受精率はきわめて高い。一方、非運動精子を用いた場合にも受精率は20%と、射出された非運動精子の場合の2倍に上昇する。すなわち、精巣内では非運動精子であっても生存頻度が高いことが示唆され、精液中に運動精子を認めない場合にも精巣内精子の採取を試みる事が支持される。

以上のように、生存精子を見出すことが ICSI 成功の鍵と考えられ、非運動精子中の生存精子を安全に選別できる方法の確立が今後の課題である。これまでに Hypo-Osmotic Swelling Test が報告されるが¹⁷⁾、必ずしも判定が容易でなく、安全性の確認もなされておらず、今後の検討が待たれる。また、閉塞性あるいは非閉塞性無精子症の多くで精巣生検により何匹かの sluggish あるいは twitching type の運動を示す精子を見出す可能性が高い。さらには、精液中に運動精子を認めない場合にも精巣生検では運動精子を得ることがある。仮に運動精子を認めない場合にも、精巣内の非運動精子は死滅精子の頻度が低い¹⁸⁾ したがって、無精子症や精液中に運動精子を認めない場合には積極的に精巣内精子採取を試みるべきと考えられる。

III. ART の安全性と問題点

ART で最も懸念されるのは、様々な人為操作が生児に及ぼす影響である。

1. IVF の児への安全性

IVF 児では自然妊娠児に比べ低体重の頻度が高いが、これは体外受精の影響ではなく、排卵誘発の影響であることが明らかにされている。また生後1年をフォローすると両者間の差は消失する。奇形の発生頻度については両者に差を認めない。IVF には既に20年の歴史があり出生児の発育や奇形に関する数多くの報告がある。安全性に関しては問題はないと考えて良いようである。

2. ICSI の安全性

ICSI について考えられる問題点を以下に述べる。

- 1) 卵細胞質傷害の可能性がある。
- 2) 異常な精子や卵でも妊娠が成立する可能性がある

る。すなわち、自然の妊娠ではごく少数の精子のみが受精の場に到達し、しかも複雑な受精機構が待ち受けていることから、何らかの精子の選別機構が働いている可能性がある。ICSI ではこのステップがスキップされており、自然とは異なるメカニズムでの受精も否定できない。ただし、自然の妊娠においても、精子の選別機構は存在しないと考える研究者もいる¹⁹⁾

3) 配偶子の接合に際し遺伝子変異が起こる可能性があるが、自然の受精ではこれを防止する機構が働くことがマウスで報告される。ICSI ではこの防止機構が働かない可能性があり、特に、未成熟な配偶子や体外で成熟させた配偶子を用いた場合にはその可能性が高いとされる²⁰⁾

4) Genomic Imprinting ミス

受精卵が正しくヒトに発生するためには、幾つかの遺伝子について、両親から受け継いだ一組の対立遺伝子のいずれか一方がサイレントになる必要がある。このためには精子や卵子の形成過程で、それらの遺伝子に、精子由来である、あるいは卵由来であることが正しくマークされる必要があり、この現象が遺伝子刷り込み (genomic imprinting) と称される²¹⁾ マウスでは二次精母細胞の段階でこれが完了しているらしいと報告される²²⁾ しかしヒトでは、いつ始まりいつ完成するのかは明らかでなく、精巣上体内まで続くとする報告もある^{23,24)} 今日では精巣内精子、時には精子細胞が ICSI に用いられるが、万が一、刷り込みが未完成の精子が用いられると、成長後に Beckwith-Wiedemann 症候群、Prader-Willi 症候群、Angelman 症候群などの遺伝子病や腫瘍発生の形でその影響がでる。

5) 染色体異常

一般に不妊カップルでは男女ともに染色体異常の頻度が高く、これが児に受け継がれる可能性がある。また、これとは別に乏精子症や無精子症例の精子を用いた ICSI では、de novo の染色体異常の発症頻度が高いことが指摘される。精子異常のために卵の減数分裂異常が生ずることがそのメカニズムの1つにあげられる²⁵⁻³⁰⁾

3. 出生児の追跡調査成績

ICSI の安全性の確認には、この方法で生れた子供たちの長期のフォローが必要であるが、現在のところ国家レベルのプログラムを持つ国はみあたらない。

Table 7. ICSI による出生児にみられる奇形の頻度

	射出精子	精巣上体精子	精巣内精子
Major Anomaly	47/2,486 (1.9%)	0/119 (0%)	3/63 (4.8%)
Minor Anomaly	185/2,486 (7.4%)	3/119 (2.5%)	2/63 (3.2%)

Tarlatzis and Bili³¹⁾ より改変

Table 7 に、奇形発生についての European Society for Human Reproduction and Embryology に属する 101施設での 23,932件の ICSI で誕生した 2,668児をプロスペクティブに調べた結果を示す³¹⁾ この結果は IVF や自然妊娠児との間に有意の差を認めない。また、射出精子、精巣上体精子、精巣内精子に分けて検討した場合にも同様と報告される。

ICSI では性染色体異常の頻度がやや高いことがこのレポート以外にも報告されている^{32,33)} 両親からの染色体異常を受け継ぐ可能性の他に、男性不妊の ICSI に伴う de novo の性染色体異常の頻度が高くなることは前述の通りである。ICSI に際してはカップルの Karyotype を調べ、予想される異常についてはカウンセリングしておく必要がある。ICSI は臨床応用からの日が浅く、安全性の確認には出生児のさらに長期のフォローアップが必要である。

IV. 男性不妊症例への ART の適応

現在、男性不妊に行われる ART は、配偶者間人工授精、IVF、ICSI であるが、より自然に近い人工授精を第一選択とする。これが有効でない場合には IVF を考慮し、ICSI については、安全性が確立されていないことから、適応を厳格とすべきであろう。また、精子所見の改善をはかり、ICSI を IVF に、IVF を人工授精や自然妊娠に持っていくことに、泌尿器科医と婦人科医との協力の意義があると考えられる。しかし一方では、女性の加齢と共に妊娠が加速度的に困難となる、また近年の晩婚傾向のために多くのケースで患者と医師の双方に焦りがあり、つつい早めに ICSI に移りがちであることも事実である。

V ART の成績向上の試み

ART の成績向上に向けた最近の試みを 2つ紹介する。

1 精子細胞を用いた ICSI

辜丸生検を行ってもなお精子が見つからない場合に精子細胞を用いた ICSI が試みられる。1990年代前半に動物での受精や妊娠の報告に続き、1995～1996年にかけてヒトでの妊娠出産が報告された。1999年11月現在で、35件の妊娠成功例が報告される。35例中27例では後期精子細胞が用いられており、残る 8例では初期精子細胞（円形精子細胞）が用いられている。円形精子細胞で妊娠した 8症例ではいずれもフォローアップ中に、一度は後期精子細胞が認められており、これをまったく認めない症例での妊娠の報告は存在しない。すなわち、ヒトの場合、初期と後期の精子細胞の間に、生殖現象に関する大きなギャップがあることが示唆される。その原因として、円形精子細胞では核蛋白のヒストンからプロタミンへの移行が不完全であり

Oocytes-activation ができないこと、遺伝物質そのものや genomic imprinting が未成熟である可能性が考えられる。

円形精子細胞を体外で培養し成熟させる試みも報告される^{34,35)} しかしこれまでに 1例の妊娠が報告されるのみで、精子細胞から精子への 16日間の行程を、短期間の体外培養で代用することは困難なようである。このような現状から、日本産科婦人科学会、日本不妊学会では基礎研究を奨励し、臨床応用には慎重であることを求めている。

2. 卵細胞質移植

女性の加齢と共に妊娠率が加速度的に低下する原因の 1つに、加齢による卵細胞質の劣化が考えられる。これを補う為に、精子と共に若いドナーの卵細胞質を高年齢婦人の卵に移植することが試みられる。

この試みには次のような理論的背景がある。卵は卵巣内で成熟する間に細胞質内にエネルギーを貯え、受精後の細胞分裂に伴うエネルギー消費に備える。したがって、未熟な卵は受精能は有するものの、受精後の個体への発生能を持たない。事実、未熟な卵に、成熟した卵の細胞質を移植すると、その後の ICSI により妊娠が成立することが、サルとマウスで報告される^{36,37)} Cohen らは、この事実を 39歳の不妊婦人に応用した。27歳のドナーと患者に同時に排卵誘発を行い、両者から採卵した。患者の卵の半数には通常の ICSI を行い、残る半数の卵にドナー卵の細胞質と共に夫の精子を注入したところ、細胞質移植を受けた卵のみが良好な胚に育ち、生児を得た³⁸⁾ 近年わが国でも問題になっている卵子供与に変わりうる方法であるが、ミトコンドリア遺伝子の異常をドナー卵細胞質から持ち込む可能性があり、なお倫理的問題を伴う。

おわりに

ART の進歩が男性不妊医療にもたらした影響

ART の進歩は男性不妊患者に大きな福音となると同時に、男性不妊因子としての genetic factor に人々の目を向けた。しかし一方では、配偶子を用いた治療にエネルギーが注がれ、患者自身を診断治療することから人々の関心を失わせたことも事実である。ICSI の安全性や適応が定まっていないことは世界のコンセンサスである。従来男性不妊に対する診断治療法の意義が取り沙汰される昨今であるが、自然妊娠という究極のゴールを目指し、1人でも多くの泌尿器科医に生殖医療に関心を持っていただき、臨床・基礎研究を進めていただきたい。

文 献

- 1) Lanzendorf SE, Maloney MK, Veeck LL, et al.: A preclinical evaluation of human spermatozoa into

- human oocytes. *Fertil Steril* **49**: 835-842, 1988
- 2) Cohen J, Malter M, Fehilly C, et al.: Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* **8603**: 162, 1988
 - 3) Ng SC, Bongo TA, Ratnam SS, et al.: Pregnancy after transfer of multiple sperm under the zona. *Lancet* **8614**: 790, 1988
 - 4) Palermo G, Joris H, Devroey P, et al.: Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* **340**: 17-18, 1992
 - 5) Palermo G, Joris H, Derde MP, et al.: Sperm characteristics and outcome of human assisted fertilization by subzonal insemination and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **59**: 826-835, 1993
 - 6) Van Steirteghem A, Nagy Z, Joris H, et al.: High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* **8**: 1061-1066, 1993
 - 7) Van Steirteghem A, Liu J, Nagy Z, et al.: Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Hum Reprod* **8**: 1055-1060, 1993
 - 8) Van Steirteghem A, Liu J, Nagy Z, et al.: Use of assisted fertilization. *Hum Reprod* **8**: 1784-1785, 1993
 - 9) Nagy ZP, Liu J, Joris H, et al.: The result of intracytoplasmic sperm injection is not related to any of the three basic sperm parameters. *Hum Reprod* **10**: 1123-1129, 1995
 - 10) Devroey P, Liu J, Nagy Z, et al.: Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **62**: 639-641, 1994
 - 11) Tournaye H, Devroey P, Liu J, et al.: Microsurgical epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection: a new effective approach to infertility as a result of congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* **61**: 1045-1051, 1994
 - 12) Devroey P, Liu J, Nagy Z, et al.: Pregnancies after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* **10**: 1457-1460, 1995
 - 13) Silver SJ, Nagy Z, Liu J, et al.: The use of epididymal and testicular spermatozoa for intracytoplasmic sperm injection: the genetic implications for male infertility. *Hum Reprod* **10**: 2031-2043, 1995
 - 14) Nagy Z, Silber S, Liu J, et al.: Using ejaculated, fresh, and frozen-thawed epididymal and testicular spermatozoa gives rise to comparable results after intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* **63**: 808-815, 1995
 - 15) Nagy Z, Verheyen G, Tournaye H, et al.: Special applications of intracytoplasmic sperm injection: the influence of sperm count, motility, morphology, source and sperm antibody on the outcome of ICSI. In Devroey P, Tarlatzis B and Van Steirteghem A (eds), *Current Theory and Practice of ICSI*. *Hum Reprod* **13**(suppl 1): 143-154, 1998
 - 16) Lundin K, Sjogren A, Nilsson L, et al.: Fertilization and pregnancy after intracytoplasmic microinjection of acrosomeless spermatozoa. *Fertil Steril* **62**: 1266-1267, 1994
 - 17) Casper RF, Meriano JS, Jarvi KA, et al.: The hypoosmotic swelling test for selection of viable sperm for intracytoplasmic sperm injection in men with complete asthenozoospermia. *Fertil Steril* **65**: 972-976, 1996
 - 18) Tournaye H, Liu J, Nagy Z, et al.: The use of testicular sperm for intracytoplasmic sperm injection in patients with necrozoospermia. *Fertil Steril* **66**: 331-334, 1996
 - 19) Yanagimachi R: Is an animal model needed for intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and other assisted reproduction technologies? *Hum Reprod* **10**: 2525-2526, 1995
 - 20) Latham K, Rambhatla KE and Varmuza S: Identification of genes showing altered expression in preimplantation and early postimplantation parthenogenetic embryos. *Dev Genet* **17**: 223-232, 1995
 - 21) Monk M: Genomic imprinting *Dev Genes* **2**: 921-925, 1988
 - 22) Shamanski FL, Kimura Y, Lavoie M, et al.: Status of genomic imprinting in mouse spermatids. *Hum Reprod* **14**: 1050-1056, 1999
 - 23) Ariel M, Cedar H and McCarrey J: Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet* **7**: 59-63, 1994
 - 24) Jue K, Bostor TH and Trasler JM: Regulated synthesis and localization of DNA methyltransferase during spermatogenesis. *Biol Reprod* **53**: 561-569, 1995
 - 25) Martin R: The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod* **11**: 924-925, 1996
 - 26) Lahdetie J, Saari N, Ajosempo M, et al.: Incidence of aneuploid spermatozoa among infertile men studies by multicolour fluorescence in situ hybridization. *Am J Med Genet* **71**: 115-121, 1997
 - 27) Bernardini L, Martini E, Geraedts J, et al.: Comparison of gonosomal aneuploidy in spermatozoa to normal fertile men and those with severe male factor detected by in-situ hybridization. *Mol Hum Reprod* **3**: 431-438, 1997
 - 28) Plachot M: The human oocytes. genetic aspects. *Ann Genet* **40**: 115-120, 1997
 - 29) McInnes B, Rademaker A, Greene CA, et al.: Abnormalities for chromosomes 13 and 21 detected

- in spermatozoa from infertile men. *Hum Reprod* **13**: 2787-2790, 1998
- 30) Van Der Ven K, Peschka B, Montag M, et al.: Increased frequency of congenital chromosomal aberrations in female partners of couples undergoing ICSI. *Hum Reprod* **13**: 48-54, 1999
- 31) Tarlatzis BC and Bili H: Surbey on intracytoplasmic sperm injection: report from the ESHRE ICSI task force. In Devroey P, Tarlatzis B and Van Steirteghem A (eds), *Current Theory and Practice of ICSI*. *Hum Reprod* **13**(suppl 1): 165-177, 1998
- 32) Bonduelle M, Legein J, Derde MP, et al.: Comparative follow-up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and 130 children born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* **10**: 3327-3331, 1995
- 33) Wisanto A, Bonduelle M, Camus M, et al.: Obstetrics outcome of 904 pregnancies after intracytoplasmic sperm injection. In Van Steirteghem A, Devroey P and Liebaers I (eds), *Genetics and Assisted Human Conception*. *Hum Reprod* **11**(suppl 4): 121-130, 1996
- 34) Bernabeu R, Cremades N, Takahashi K and Sousa M: Successful pregnancy after spermatid injection. *Hum Reprod* **13**: 1898-1900, 1998
- 35) Aslam I and Fishel S: Evaluation of the fertilization potential of freshly isolated, in-vitro cultured and cryopreserved human spermatids by injection into hamster oocytes. *Hum Reprod* **14**: 1528-1533, 1999
- 36) Flood JT, Iritani A, Chillik CF, et al.: Ooplasmic transfusion: prophase germinal vesicle oocytes made developmentally competent by microinjection of metaphase II egg cytoplasm. *Fertil Steril* **53**: 1049-1054, 1990
- 37) Levron J, Willadsen S, Bertoli M and Cohen J: The development of mouse zygotes after fusion with synchronous and asynchronous cytoplasm. *Hum Reprod* **11**: 1287-1292, 1996
- 38) Cohen J, Scott R, Schimmel T, et al.: Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet* **350**: 186-187, 1997

(Received on March 8, 2000)
(Accepted on April 18, 2000)