

ISSN 1881-9028

日本IVF学会雑誌

Vol.16 No.1

2013

JSAR

Japan Society of Assisted Reproduction

— 総説 —	
子宮移植の背景と現状	3
木須 伊織 ¹ , 阪埜 浩司 ¹ , 三原 誠 ² , 原 尚子 ² , 菅沼 信彦 ³ , 吉村 泰典 ¹ , 青木 大輔 ¹	
¹ 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 / ² 東京大学医学部形成外科・美容外科 / ³ 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻	
— 総説 —	
ガラス化法の基礎と臨床	11
向田 哲規 ¹ , 高橋 克彦 ¹ , 後藤 哲也 ² , 田島 敏秀 ² , 岡 親弘 ²	
¹ 広島 HART クリニック / ² 東京 HART クリニック	
— 総説 —	
不育症 Up to date — 不妊症と不育症の境界領域も含めて —	21
齋藤 滋	
富山大学産科婦人科	
— 原著 —	
受精卵の取り違い防止における電子認証システムの重要性	26
岩山 広, 石山 舞, 下田 美怜, 山下 正紀	
山下レディースクリニック	
— 総説 —	
配偶子・受精卵染色体と異常	32
中岡 義晴, 前沢 忠志, 大西 洋子, 姫野 隆雄, 井上 明子, 伊藤 啓二郎, 森本 義晴	
医療法人三慧会 IVF なんばクリニック	
— レター —	
乳用牛の人工授精現場において受胎率低下を引き起こしている要因の抽出	38
渡辺 伸也	
独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所	
— 原著 —	
胚の質不良例に対するL-カルニチンの有効性に関する検討	42
小倉 里香 ¹ , 松本 寛史 ¹ , 井田 守 ¹ , 福田 愛作 ¹ , 森本 義晴 ²	
¹ 医療法人三慧会 IVF 大阪クリニック / ² 医療法人三慧会 IVF なんばクリニック	
— 総説 —	
凍結胚移植におけるホルモン補充 — 世界の標準 —	46
東口 篤司	
KKR 札幌医療センター斗南病院 生殖内分泌科	
— 原著 —	
調節卵巣刺激周期における採卵あたりの累積妊娠率	54
大野 浩史 ^{1,2} , 福永 憲隆 ^{1,2,3} , 永井 利佳 ^{1,2} , 北坂 浩也 ^{1,2} , 吉村 友邦 ^{1,2} , 田村 総子 ^{1,2} , 長谷川 望 ^{1,2} , 加藤 道高 ^{1,2} , 中山 要 ^{1,2} , 竹内 基子 ^{1,2} , 青柳 奈央 ^{1,2} , 児嶋 瑛子 ^{1,2} , 渡邊 紘之 ^{1,2} , 安江 香友子 ^{1,2} , 糸井 史陽 ³ , 羽柴 良樹 ^{1,2} , 浅田 義正 ^{1,2,3}	
¹ 浅田レディース名古屋駅前クリニック / ² 浅田レディース勝川クリニック / ³ 浅田生殖医療研究所	
— レター —	
ARTにおける合成黄体ホルモン(ルトラール TM :酢酸クロルマジノン)の有用性について	58
浅田 義正 ¹ , 羽柴 良樹 ¹ , 五十嵐 健治 ¹ , 滝口 修司 ¹ , 薬師 義弘 ¹ , 浅田 美佐 ¹ , 近藤 育代 ² , 日比 初紀 ³ , 木下 孝一 ⁴ , 福永 憲隆 ¹ , 園原 めぐみ ¹	
¹ 浅田レディース名古屋駅前クリニック / ² 名城病院 産婦人科 / ³ 協立総合病院 泌尿器科 / ⁴ 藤田保健衛生大学病院 産婦人科	

日本 IVF 学会雑誌発行における投稿論文募集のお知らせ	62
日本 IVF 学会雑誌 投稿規定	63
日本 IVF 学会役員	64
編集委員会	64

子宮移植の背景と現状

木須 伊織¹, 阪埜 浩司¹, 三原 誠², 原 尚子², 菅沼 信彦³, 吉村 泰典¹, 青木 大輔¹

¹ 慶應義塾大学医学部産婦人科学教室 〒160-8582 東京都新宿区信濃町 35 番地

² 東京大学医学部形成外科・美容外科 〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1

³ 京都大学大学院医学研究科人間健康科学系専攻 〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

要旨： 近年、生殖補助医療技術の発達により不妊夫婦に福音がもたらされているが、現在、我が国には生殖補助医療に関する法的規制はなく、生殖医療の進歩は時には生命倫理から逸脱して、社会問題を引き起こす一面も秘めているといえる。特に代理懐胎においては、医学的、倫理的、社会的、法的側面など様々な複雑な問題を内包しており、大きな社会的問題として取り上げられることが多い。そのような背景の中、子宮性不妊女性が挙児を得るには、国内では養子制度の選択肢しか残されていないのが現状であるが、近年の移植技術、微小血管吻合技術、組織保存技術の向上により、これらの女性が挙児を得るための解決策の1つとして子宮移植が考えられるようになってきた。海外では様々な動物を用いた子宮移植基礎研究が行われており、既に人への臨床応用も報告されている。本稿では子宮移植が子宮性不妊患者の治療として考えられるようになった背景と子宮移植の現状について述べる。

キーワード： 子宮移植, 代理懐胎, 子宮性不妊, Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser 症候群

はじめに

1978年にRobert G. Edwards氏とPatrick Steptoe氏らにより、世界初の体外受精による児(Louise J. Brown)が誕生した。その生殖補助技術(Assisted Reproductive Technology: ART)は世界中に急速に普及し、より多くの不妊症患者が挙児を得られるようになった。ESHRE(European Society of Human Reproduction and Embryology)における国際生殖補助技術監視委員(International Committee for Monitoring Assisted Reproduction Technology: ICMART)の発表によると、2011年までに約500万人の児が生殖補助医療技術により誕生したと推定されている。我が国においては、1983年に初めて体外受精による児が誕生し、2010年では全出生児の2.7%(約3万人)が体外受精により出生している¹⁾。多くの不妊症患者が生殖補助医療技術の恩恵を受けているが、子宮性不妊症患者は自らの子宮が存在しないか、もしくは機能しないために挙児を得ることは困難である。これらの女性が挙児を得るには代理懐胎や養子制度などの選択肢が残されるが、代理懐胎に関しては多くの問題点を抱えていることにより我が国では認められていないのが現状であり、諸外国においても同様な状況である国が多い²⁻⁵⁾。そのような背景の中、近年、子宮移植による妊孕性再建が1つの選択肢の可能性として考えられるようになった。現在までに霊長類動物を含め

た様々な実験動物による基礎研究が行われ、これらのデータの蓄積の結果、最近是人への臨床応用も実現されている⁶⁻⁸⁾。本稿では、子宮移植が子宮性不妊患者の治療として考えられるようになった背景と子宮移植の現状について解説する。

子宮移植の背景

子宮移植が子宮性不妊患者に対する治療法の選択肢の1つとして考えられるようになった背景には、子宮性不妊患者が自ら挙児を得ることが不可能である現状と代理懐胎制度がもたらす様々な問題により代理懐胎は諸外国を含めて許容されにくいということが挙げられる。両者について我が国の状況を参考にして述べる。

1) 日本における子宮性不妊患者の現状

世界保健機関は不妊症を1年以上の期間、避妊をしていないのに妊娠に至らない病気として定義づけている⁹⁾。不妊症の原因には様々な因子が挙げられ、生殖技術の発達とともに多くのものが治療可能となってきたが、子宮因子による子宮性不妊症の治療は不可能のままである。子宮性不妊症は先天性と後天性に大別され、先天性子宮性不妊症は、Mayer-Rokitansky-Küster-Hauser(MRKH)症候群、子宮低形成、子宮奇形、Müller管発生異常などがあげられ、MRKH症候群は女児の4,500人に1人の

頻度と報告されている^{10,11)}。そのため、日本においては厚労省の人口統計(2011年)から概算すると年間約120人のMRKH症候群の患者が出生し¹²⁾、総務省統計局人口推計(2012年10月時点)から概算すると、生殖年齢である20歳から40歳までのMRKH症候群の患者数は約3440人存在することとなる¹³⁾。後天性子宮性不妊は、子宮悪性腫瘍、良性疾患(子宮筋腫や子宮腺筋症など)、産後の大量出血などで子宮摘出を余議なくされた場合やAsherman症候群のような子宮内の高度の癒着や部分的子宮奇形などで妊孕能を失った場合があげられる。近年若年性の子宮悪性腫瘍は増加傾向であり、広汎性子宮頸部摘出術や高用量黄体ホルモン療法による妊孕性温存療法が行われているものの、子宮摘出に至るケースも少なくない。日本産科婦人科学会の婦人科腫瘍委員会報告(2010年度患者年報:301機関)から概算すると、子宮頸癌及び子宮体癌の0期からI期(FIGO旧分類)の患者で40歳未満までで子宮摘出される年間患者数は約2000人と推定される¹⁴⁾。以上を合わせると、40歳までのすべての女性が妊娠を希望した場合、子宮性不妊女性は日本全国で約5340人存在することとなる。これらの子宮性不妊女性にとって挙児を得るのは困難なことであり、女性が挙児を得るためには、養子制度や代理懐胎に頼るしか選択肢が残されていないのが現状である。さらには、自分に子供が産めないことにより、精神的、身体的、社会的にQOLの低下を導くこともあり、時には女性としてのアイデンティティの喪失を招くことも報告されている^{15,16)}。

2)代理懐胎の問題点と子宮移植との比較(表1)

我が国では、1950年代に、提供精子を用いた非配偶者間人工授精(artificial insemination with donor semen: AID)が男性不妊に対する治療として行われ、その後、1983年には体外受精、1992年には顕微授精により、それぞれ我が国で初の児が誕生し、これらの技術が不妊治療の重要な手段として広く行われるようになった。しかしながら、技術利用の規制政策の立法化は1990年代後半頃から議論されているものの、生殖補助医療を規制する法や制度は現在まで存在せず、これらは日本産科婦人科学会の会告に基づき、医師の自主規制のもとで実施されている。

その状況の中で、2001年5月に国内初の代理懐胎実施の事例が公表された。この状況を受け、日本産科婦人科学会は代理懐胎の内包している多くの問題とその社会的関心の重要性を鑑み、2003年4月「代理懐胎に関する見解」において、「代理懐胎は認められない」、さらに「代理懐胎の実施及び実施への関与、斡旋も行ってはならない」とした¹⁷⁾。しかしながら、その後医師の自主規制として機能してきた会告に違反するものが出現したり、また夫の同意を得ずに実施されたAIDにより出生した子についての夫の嫡出否認を認める判決が出されたこと、生殖補助医療により生まれる子の福祉を巡る問題が顕著化してきたこと、国外での代理懐胎の斡旋など商業主義的行為が見られるようになってきた¹⁸⁾ことから、国は代理懐胎における法制化を目指してきたが、現在のところ法制化へまでは至っていない。

表1 代理懐胎と子宮移植の比較

	代理懐胎	子宮移植
子宮	第三者	第三者
配偶子	夫婦間*	夫婦間
分娩者	第三者	本人
産みの親と遺伝的な親の関係	異なる	同じ
妊娠・出産における		
- 本人のリスク	なし	あり
- 第三者へのリスク	あり	あり or なし
- 移植手術	なし	あり
- 免疫抑制剤の使用	なし	あり
- 胎児奇形のリスク	なし	不明
母性	形成しにくい	形成しやすい
日本における法規制	なし	なし
家族関係	複雑になりやすい	複雑になりにくい
契約違反の可能性	あり	少ない

*体外受精型代理懐胎の場合

代理懐胎は、医学的、倫理的、社会的、法的側面など様々な複雑な問題を内包している。代理懐胎は妊娠・出産に伴うこれらのリスクと負担を第三者に課するものとも言える。また代理懐胎者が胎児に愛着をもつことで引き渡し拒否が起きたり、児に障害が見つかり引き取り拒否といった問題も起こる。さらに女性の身体の商品化につながる危険性をはらんでいる点にも注意しなければならない。対価を伴う場合、貧富の差を利用した代理懐胎の斡旋及び依頼が行われる危険性もある。出生する「子の福祉」は最大限に尊重されなければならないが、日本では民法772条によって「分娩者＝母親」であることから、代理懐胎は家族関係を複雑にし、社会秩序に混乱をもたらすことが予測される。最近では海外へ代理懐胎を求めにいくカップルも増加し、外国人代理懐胎者から生まれた子の親子関係や国籍に関して問題となることも多く見うけられている。

一方、子宮移植は第三者の子宮を用いる点、夫婦間の配偶子を用いる点は代理懐胎（体外受精型代理懐胎の場合）と共通であるが、子宮移植は本人が分娩するため、妊娠、出産におけるリスクは本人が背負う。ただし、子宮移植では生体間で行われる場合はドナーとなる人に子宮摘出術を行うため、ドナーがその負担を背負うこととなる。脳死ドナーである場合はそのリスクは免れる。さらに子宮移植は移植手術を行い、臓器の拒絶反応を予防するために免疫抑制剤を使用するため、出産までの期間と限定されるもののレシピエントは免疫抑制剤を服用しなければならない。免疫抑制剤による胎児奇形リスクは近代の臓器移植後の妊娠の報告よりリスクを上昇させないと考えられているが^{19,20)}、懸念される問題である。また子宮移植は本人のお腹の中で児を育て、出産することにより、母性を育みやすい。また、分娩者を法律上の実母としている日本では、子宮移植により家族関係が複雑化することは考えられにくく、代理懐胎にみられるような契約違反が生じる可能性も低いと思われる。いずれの生殖医療においても議論すべき問題は存在するが、遺伝的につながりのある親が産みの親となることが子宮移植と代理懐胎で大きく異なる点といえる。

子宮移植の現状

1) 世界初の生体間子宮移植

子宮性不妊患者が自分と遺伝的なつながりをもつ児を得るには体外受精型の代理懐胎しか選択肢が残されていない現状の中、近年の移植技術、微小血管吻合技術、組織保存技術の向上や免疫拒絶のメカニズムの解明、免疫抑制剤の開発に伴い、これらの子宮性不妊患者が挙児

を得るための解決策の1つの選択肢として子宮移植が考えられるようになった。そして、2000年に世界で初めてサウジアラビアで人での生体間子宮移植が報告された⁶⁾。レシピエントは産後出血にて6年前に子宮摘出された26歳の女性で、ドナーは46歳の両側卵巣嚢腫を有した女性であった。移植後、2度の月経が認められたが、移植後99日目に子宮の血管に血栓が詰まり、移植子宮は壊死を起こし、子宮は摘出され失敗に終わっている。この報告は、後にドナーより子宮移植の十分なインフォームドコンセントが得られていないことが判明し、かつドナーの左尿管の損傷も合併したため批判された^{21,22)}。またヒトでの子宮移植の臨床応用の前に十分な動物による基礎実験も行われていなかった。しかしながら、この報告を契機に世界では子宮移植研究が急速に進められ、様々な動物を用いた基礎研究が行われることとなった²³⁾。

2) 子宮移植の基礎研究

世界で子宮移植研究を行っている国として、スウェーデン、トルコ、日本、アメリカ、イギリス、中国、フランス、スペイン、オーストラリアなどが挙げられる。最近では、マウス²⁴⁻²⁶⁾、ラット²⁷⁻²⁹⁾、ウサギ³⁰⁾、豚^{31,32)}、羊^{33,34)}、カニクイザル³⁵⁻³⁷⁾、ヒヒ³⁸⁻⁴⁰⁾などで子宮移植研究が積み重ねられている。また、子宮移植の目的は他の固形臓器移植の臓器機能再建とは異なり、健児を得ることにあるが、免疫抑制剤を使用した同種子宮移植による妊娠や出産も報告されるようになってきた^{29,33)}。FIGOのethical guidelineでは、子宮移植を人で臨床応用するには霊長類を含む大動物で十分な研究を行う必要があると述べており⁴¹⁾、霊長類を用いた子宮移植の研究はまだ数少ないものの³⁵⁻⁴⁰⁾、霊長類で実験を行うことは解剖的、生理学的に人と類似しているため、ヒトへの臨床応用には非常に重要な知見となる。子宮移植研究の難点は子宮が生着して月経が回復することだけでなく、妊娠・出産をもって成功と言えるので、他の臓器移植と異なり、はるかに長い研究期間を費やさなければならないことである。現在、霊長類を用いた基礎研究として、様々な小動物を用いた実験を10年以上前から行っているスウェーデンがヒヒを用い³⁸⁻⁴⁰⁾、我々の日本のグループが数年前よりカニクイザルを用いて行っている³⁵⁻³⁷⁾。ヒヒを用いた子宮自家移植では、月経回復までの成果を挙げたものの、術後の高度癒着や卵管閉塞などにより妊娠には至っていない^{38,39)}。カニクイザルの自家移植では、術後に自然妊娠し、妊娠経過中に胎児発育に異常はなく、帝王切開にて出産の成果を挙げている³⁷⁾。また霊長類における同種移植も報告されるようになってき

ている⁴⁰⁾。今後も手術手技の確立や免疫抑制剤プロトコール決定のために霊長類動物を用いたデータの蓄積が必要とされる。

3) 子宮移植の人への臨床応用

2000年のサウジアラビアにおける世界初の生体間の子宮移植後、種々の動物による自家・同種子宮移植実験、移植後の妊娠・出産、免疫学的・生理学的データの蓄積により、子宮移植が再び人への臨床応用の時期と考えられるようになり⁴²⁾、2011年8月にトルコで2例目の人での子宮移植が施行された⁷⁾。ドナーは22歳の交通事故による脳死の患者でレシピエントは2年前に空腸を用いて造脛術を施行した21歳の先天性のMRKH症候群の患者であった。事前に体外受精により胚凍結を行い、倫理委員会や家族と十分な議論を行った上で子宮移植手術が行われた。術後20日目に月経が再開し、著明な拒絶反応を認めず、周期的な月経がみられ、術後1年以上経過した現在は胚移植による妊娠を試みている。また、2012年9月にはトルコを追跡するようにスウェーデンにて世界で3例目の人での子宮移植が2件行われた⁸⁾。これは世界初の母子間の生体間子宮移植であり、いずれも30歳代の娘がレシピエントでその母親がドナーであった。母親はいずれも閉経後であった。レシピエントはMRKH症候群の患者と子宮頸癌による子宮を摘出した患者である。トルコのグループは動物を用いた基礎研究を十分に行わずに人への臨床応用を踏み切ったが、スウェーデンのグループは15年前より動物による基礎実験を始め、多大なデータの蓄積や子宮移植に対する課題に対して十分な議論を行い続け、臨床応用をついに実現させた。

子宮移植に関わる問題点

子宮は生命維持に欠かせない臓器ではない点から、女性内性器の臓器移植は他の臓器移植と大きく異なり、皮膚、血管、心臓弁、骨・靱帯などと同様に、組織移植とも考えられるが、今ではQOLの向上を目指して手、腕、喉頭、顔面、腹壁の移植の報告までで行われるようになっており⁴³⁻⁴⁶⁾、子宮移植はこの類の移植医療として位置付けられる。健児を得ることを目的とした子宮移植の人への臨床応用には、解決すべき多くの課題が挙げられ、医学的、倫理的、社会的問題を考慮する必要がある(図1)。

1) 医学的問題

子宮移植における医学的問題は、手術手技の確立、移植子宮の血流評価方法、免疫抑制剤プロトコール、拒絶反応の診断、免疫抑制剤による催奇形性、子宮の臓器としての抗原性、虚血再灌流障害などが主に挙げられる。これらの課題は、本稿では割愛するが、解剖生理学的に人に近い霊長類などの大動物を用いた基礎実験での検証が必要である。我々は霊長類であるカニクイザルにおける同所性自家移植後の妊娠、出産の経験により、子宮移植は手術技術的には可能と考えている³⁷⁾。また、臨床応用するためには、様々な職種の介入が必須である。子宮移植の最終的な目的は他の臓器と異なり、子宮の生着ではなく、子供を授かることである。そのため、レシピエント、ドナー、レシピエントの夫、生まれてくる子供の4つの立場を支援できる医療体制作りが求められる⁴⁷⁾。手術を行う婦人科手術専門医、ARTを行う生殖医療専門医、妊娠出産をケアする周産期医療専門医及び新生児科医

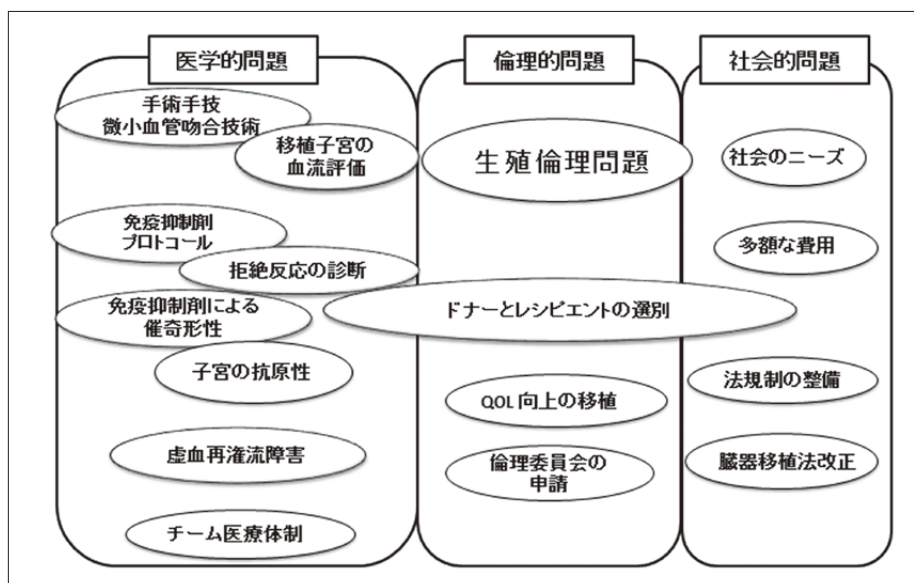


図1 子宮移植を取り囲む医学的、倫理的、社会的問題点

が継続的に連携していく必要がある。また、移植外科医による移植手術や術後の免疫抑制剤の管理や感染症内科医の免疫抑制剤による感染症対策、形成外科医によるMRKHの患者の造腔術や移植手術における微小血管吻合術、病理医による拒絶反応の評価が必要とされる。さらに、レシピエント、ドナー、それらの家族における期待、不安、臓器喪失感などの心理的衝撃や精神的変動は大きいと予想され、精神科医、看護師、臨床心理士、カウンセラーの介入が必須であり、子宮移植に関わるすべての人がそのメリット、デメリットを十分理解した上で進めていかなければならない。

2) 倫理的問題

子宮移植の人へ臨床応用を前提にした場合、生殖倫理問題は特に十分に議論されなければならない。各国での医学的、倫理的、社会的、宗教的背景が異なり、独自の国の背景を鑑みて十分に検討されるべきである。倫理的問題には、生まれた子の福祉が尊重されるか、ドナー・レシピエントをどのような基準で選別するか、生命に関わらない臓器の移植、すなわちQOL向上のための移植が許容されるか、倫理委員会はどの機関が対応すべきかなどが主に挙げられる。特に生殖倫理で一番考慮されるべきことは、出生する「子の福祉」が最大限に尊重されなければならないことである⁴⁸⁾。生まれてくる子の権利には、法的地位の確立、出自を知る権利、養育される権利があげられる。子宮移植は分娩者が母親であることより、生まれた子の法的地位は確立され、母性や愛情をもって養育されることが予想される。配偶子は両親の配偶子を使用しているため、精子や卵子提供で議論される出自を知る権利に関しては抵触しないと考えられる。これらの解釈から子宮移植で生まれた子供の福祉は尊重される立場にあると推測される。ドナーの選別に関しては、生体ドナーか脳死ドナーかで状況が異なる。生体ドナーの場合は、母親、姉妹、第三者が候補者として考えられるが、生体ドナーへの侵襲を強いることとなる。また母親の場合は閉経後の子宮がドナー子宮として適しているのかは議論を呼ぶところである。脳死ドナーの場合は、ドナーへの侵襲を考慮する必要がないが、臓器移植において生体間と比して長期のgraft survivalの成績が悪くなること^{49,50)}や手術が計画的に行えないなどのデメリットも存在する。レシピエントの選別に関しては、子宮性不妊女性がその対象となるが、MRKH症候群の患者の場合、本人の卵子を使用することで先天的疾患が継承されないか危惧されるが、海外の代理懐胎におけるMRKH症候群の患者の児の経過を後方視的に観察したところ、継承には影響なかったと報告されている⁵¹⁾。またレシピ

エントの年齢は高齢であると周産期予後、妊娠率、流産率が不良であるため⁵²⁾、卵巣予備能を十分有した年齢が好ましいと考える。さらに子宮移植後には早期妊娠をめざしARTが必須となるが、子宮が生着しても受精卵が得られないという状況を避けるために、術前にあらかじめ凍結胚を準備しておいた方がよいと考える。また子宮癌による後天性子宮性不妊患者の場合は、免疫抑制剤による癌の再発を助長させる可能性も否定できないため⁵³⁾、少なくとも5年以上再発がないことを確認してから移植をすべきである⁵⁴⁾。子宮移植により、挙児に成功した後は子宮を摘出することでレシピエントは免疫抑制剤の服用が不要となる点は、一生服用しなければならない他の臓器移植と異なる。また、移植後に月経が回復しない、すなわち子宮が機能しない場合や妊娠に至らなかった場合は、どのくらいの期間を待って失敗と判断し、子宮摘出を選択すべきかの基準をあらかじめ決める必要があると考えられるが、その際の患者の精神的サポート体制の整備は必須である。

3) 社会的問題

子宮性不妊患者にとって、子宮移植技術は不妊症治療の向上に貢献され、女性のQOLを含めた健康維持に有益な代替技術として期待される。しかしながら、本技術が真に社会のニーズとして求められているのかという社会的価値を考えなければならない。子宮移植はその他の代替手段である代理懐胎や養子制度などの既存の手段と無駄な重複には当たらないと考えられるが、新技術だけが先走ることを回避するためにも、その他の代替手段よりも社会のニーズとして必要とされているのかを大規模な一般人向けのアンケート調査などで把握をする必要がある。そのためには、まずは産婦人科医を含めた社会への子宮移植の新技术の周知が求められる。

子宮移植の臨床応用への全ての課題がもし仮に解決されたとしても、はじめは探索的な臨床研究の段階であることにより、経済的問題に直面する。移植医療にはドナー、レシピエントの手術だけでなく、術後の免疫抑制剤や検査により多額の費用が強いられる。米国Milliman社の保険計理士が報告している「2011 U.S. organ and tissue transplant cost estimates and discussion」で、米国では術前1か月から術後半年の期間の請求額の概算は、小腸、腎臓、肝臓でそれぞれ約120万ドル、26万ドル、57万ドルと報告している⁵⁵⁾。日米間の医療制度の差を考慮しても、子宮移植には2,000-3,000万円の高額な費用がかかると予想される。探索的研究段階で患者にその負担を求めるのは現実的でないため、少なくとも始めの何例かの症例では、医療者側の全額自己負担が

強いられ、大規模な研究費の獲得がないと本技術の提供は困難である。安全性、有効性が暫定的に保障された後に先進医療制度への申請を検討し、さらなる症例の蓄積により、移植手術も保険診療として承認されれば、費用の負担が軽減され则认为る。

日本では生殖補助医療における法規制が整備されていないため、子宮移植のような新たな生殖医療技術の導入により、生命倫理から逸脱して、時には社会問題を引き起こす一面も秘めており、生殖医療における法規制の整備が今後求められていくと思われる。子宮移植は産婦人科領域だけでなく、移植領域でも議論される必要がある医療技術であり、特に脳死もしくは心停止ドナーからの子宮提供を考えた場合、臓器移植法の改正も視野に入れていくべきである。そのため、日本移植学会や日本組織移植学会との連携も今後必要であるとする。

まとめ

本稿では、子宮移植の背景と現状についてまとめた。近年の先進的医療技術の開発により、新しい医療を提供することが可能となっているが、新技術を人へ臨床応用するには医学的、倫理的、社会的、法的などの様々な側面の問題を十分に議論する必要がある。特に生命倫理観は時代や技術開発と共に変化するものであり、新たな医療技術は不可測の倫理問題や社会的状況を産みだす可能性がある。子宮移植という新たな医療技術は、人での臨床応用が行われ始めたものの、霊長類実験モデルにおける子宮同種移植の妊娠・出産報告はまだ存在せず、さらなる基礎実験のデータの蓄積や解析は今後も必須である。臨床応用にあたっては、安全性や効果が十分に評価された上で考慮されるべきである。そのためには、トルコやスウェーデンにおける人での子宮移植後の経過や成果は重要な知見となるため、今後の経過の報告が注目される。

参考文献

- 1) 日本産科婦人科学会平成 23 年度倫理委員会：登録・調査小委員会報告（2010 年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および 2012 年 7 月における登録施設名）。日産婦誌，64: 2110-2140, 2012.
- 2) Chambers, GM., Sullivan, EA., Ishihara, O., Chapman, MG., Adamson, GD.: The economic impact of assisted reproductive technology: a review of selected developed countries. Fertil. Steril., 91: 2281-2294, 2009.
- 3) International Federation of Fertility Societies International Conference. IFFS Surveillance 04. Fertil Steril., 71: 1S-54S, 2004.
- 4) Semba, Y., Chang, C., Hong, H., Kamisato, A., Kokado, M., Muto, K.: Surrogacy: donor conception regulation in Japan. Bioethics., 24: 348-57, 2010.
- 5) Brinsden, PR: Gestational surrogacy. Hum. Reprod. Update, 9: 483-491, 2003.
- 6) Fageeh, W., Raffa, H., Jabbad, H., Marzouki, A.: Transplantation of the human uterus. Int. J. Gynaecol. Obstet., 76: 245-251, 2004.
- 7) Ozkan, O., Erman, Akar M., Ozkan, O., Erdogan, O., Hadimioglu, N., Yilmaz, M., Gunseren, F., Cincik, M., Pestereli, E., Kocak, H., Mutlu, D., Dinckan, A., Gecici, O., Bektas, G., Suleymanlar, G.: Preliminary results of the first human uterus transplantation from a multiorgan donor. Fertil. Steril., 99: 470-476, 2013.
- 8) Hansen, A.: Swedish surgeons report world's first uterus transplantations from mother to daughter. BMJ., 345: e6357, 2012.
- 9) Zegers-Hochschild, F., Adamson, GD., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S.: International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology; World Health Organization.: International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. Fertil Steril., 92: 1520-1524, 2009.
- 10) Oppelt, P., Renner, SP., Kellermann, A., Brucker, S., Hauser, GA., Ludwig, KS., Strissel, PL., Strick, R., Wallwiener, D., Beckmann, MW.: Clinical aspects of Mayer-Rokitansky-Kuester-Hauser syndrome: recommendations for clinical diagnosis and staging. Hum. Reprod., 21: 792-797, 2006.
- 11) Cheroki, C., Krepisch-Santos, AC., Szuhai, K., Brenner, V., Kim, CA., Otto, PA., Rosenberg, C.: Genomic imbalances associated with mullerian aplasia. J. Med. Genet., 45: 228-232, 2008.
- 12) 2011 年度厚生省人口動態統計。Available at: External link <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suikell1/> Accessed Nov 27, 2012.
- 13) 総務省統計局人口推計。Available at: External link <http://www.stat.go.jp/data/jinsui/> Accessed Nov 27, 2012.
- 14) 日本産科婦人科学会婦人科腫瘍委員会報告（2010 年度患者年報：301 機関）。日産婦誌，64: 1029-1054, 2012.
- 15) Chachamovich, JR., Chachamovich, E., Ezer, H., Fleck, MP., Knauth, D., Passos, EP.: Investigating quality of life and health-related quality of life in infertility: a systematic review. J. Psychosom. Obstet. Gynaecol., 31: 101-110, 2010.
- 16) McCarthy, MP., Chiu, SH.: Differences in Women's Psychological Well-being Based on Infertility Treatment Choice and Outcome. J. Midwifery Womens Health., 56:475-480, 2011.
- 17) Kisu, I., Banno, K., Mihara, M., Iida, T., Yoshimura, Y.: Current status of surrogacy in Japan and uterine transplantation research. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., 158: 135-140, 2011.
- 18) Wilkinson, S.: The exploitation argument against commercial surrogacy. Bioethics, 17:169-187, 2003.
- 19) Bedaiwy, MA., Shahin, AY., Falcone, T.: Reproductive organ transplantation: advances and controversies. Fertil. Steril., 90: 2031-2055, 2008.

- 20) Framarino, Dei Malatesta M., Rossi, M., Rocca, B., Iappelli, M., Poli, L., Piccioni, MG., Gentile, T., Landucci, L., Berloco, P.: Fertility following solid organ transplantation. *Transplant. Proc.*, 39: 2001-2004, 2007.
- 21) Kandela, P.: Uterine transplantation failure causes Saudi Arabian government clampdown. *Lancet*, 356: 838, 2000.
- 22) Fageeh, W.: Apology to Dr Wafa Mohammed Khalil Fageeh, obstetrician and gynaecologist and assistant professor at King Abdilaziz University, and her medical team. *Lancet*, 358: 1076, 2001.
- 23) Hanafy, A., Diaz-Garcia, C., Olausson, M., Brännström, M.: Uterine transplantation: one human case followed by a decade of experimental research in animal models. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 51: 199-203, 2011.
- 24) Racho El-Akouri, R., Kurlberg, G., Brannstrom, M.: Successful uterine transplantation in the mouse: pregnancy and post-natal development of offspring. *Hum. Reprod.*, 18: 2018-2023, 2003.
- 25) Racho El-Akouri, R., Wranning, CA., Molne, J., Kurlberg, G., Brännström, M.: Pregnancy in transplanted mouse uterus after long-term cold ischaemic preservation. *Hum. Reprod.*, 18: 2024-2030, 2003.
- 26) El-Akouri, RR., Molne, J., Groth, K., Kurlberg, G., Brännström, M.: Rejection patterns in allogeneic uterus transplantation in the mouse. *Hum. Reprod.*, 21: 436-442, 2006.
- 27) Wranning, CA., Akhi, SN., Kurlberg, G., Brännström, M.: Uterus transplantation in the rat: model development, surgical learning and morphological evaluation of healing. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 87: 1239-1247, 2008.
- 28) Wranning, CA., Akhi, SN., Diaz-Garcia, C., Brännström, M.: Pregnancy after syngeneic uterus transplantation and spontaneous mating in the rat. *Human Reprod.*, 26: 553-558, 2011.
- 29) Diaz-Garcia, C., Akhi, SN., Wallin, A., Pellicer, A., Brännström, M.: First report on fertility after allogeneic uterus transplantation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 89: 1491-1494, 2010.
- 30) Sieunarine, K., Doumplis, D., Kuzmin, E., Corless, DJ., Hakim, NS., Del Priore, G., Smith, JR.: Uterine allotransplantation in the rabbit model using a macrovascular patch technique. *Int. Surg.*, 93: 288-294, 2008.
- 31) Avison, DL., DeFaria, W., Tryphonopoulos, P., Tekin, A., Attia, GR., Takahashi, H., Jin, Y., Palaos, E., Pararas, N., Carreno, MR., Santiago, S., Bazer, F., Ruiz, P., Tzakis, A.: Heterotopic uterus transplantation in a swine model. *Transplantation*, 88: 465-469, 2009.
- 32) Wranning, CA., El-Akouri, RR., Lundmark, C., Dahm-Kahler, P., Molne, J., Enskog, A., Brännström, M.: Auto-transplantation of the uterus in the domestic pig (*Sus scrofa*) : Surgical technique and early reperfusion events. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 32: 358-367, 2006.
- 33) Ramirez, ER., Ramirez Nessetti, DK., Nessetti, MB., Khatamee, M., Wolfson, MR., Shaffer, TH., Ramirez, VZ., Ramirez, HA.: Pregnancy and outcome of uterine allotransplantation and assisted reproduction in sheep. *J. Minim. Invasive Gynecol.*, 18: 238-245, 2011.
- 34) Wranning, CA., Marcickiewicz, J., Enskog, A., Dahm-Kähler, P., Hanafy, A., Brännström, M.: Fertility after autologous ovine uterine-tubal-ovarian transplantation by vascular anastomosis to the external iliac vessels. *Hum. Reprod.*, 25: 1973-1979, 2010.
- 35) Kisu, I., Mihara, M., Banno, K., Hara, H., Yamamoto, T., Araki, J., Iida, T., Hayashi, Y., Moriguchi, H., Aoki, D.: A new surgical technique of uterine auto-transplantation in cynomolgus monkey: preliminary report about two cases. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 285: 129-137, 2012.
- 36) Mihara, M., Kisu, I., Hara, H., Iida, T., Yamamoto, T., Araki, J., Hayashi, Y., Moriguchi, H., Narushima, M., Banno, K., Suganuma, N., Aoki, D., Koshima, I.: Uterus autotransplantation in cynomolgus macaques: intraoperative evaluation of uterine blood flow using indocyanine green. *Hum. Reprod.*, 26:3019-3027, 2011.
- 37) Mihara, M., Kisu, I., Hara, H., Iida, T., Araki, J., Shim, T., Narushima, M., Yamamoto, T., Moriguchi, H., Kato, Y., Tonsho, M., Banno, K., Aoki, D., Suganuma, N., Kagawa, N., Takehara, Y., Kato, O., Koshima, I.: Uterine autotransplantation in cynomolgus macaques: the first case of pregnancy and delivery. *Hum. Reprod.*, 27: 2332-2340, 2012.
- 38) Enskog, A., Johannesson, L., Chai, DC., Dahm-Kahler, P., Marcickiewicz, J., Nyachio, A., Mwenda, JM., Brännström, M.: Uterus transplantation in the baboon: methodology and long-term function after auto-transplantation. *Hum. Reprod.*, 25: 1980-1987, 2010.
- 39) Johannesson, L., Enskog, A., Dahm-Kähler, P., Hanafy, A., Chai, DC., Mwenda, JM., Diaz-Garcia, C., Olausson, M., Brännström, M.: Uterus transplantation in a non-human primate: long-term follow-up after autologous transplantation. *Hum. Reprod.*, 27: 1640-1648, 2012.
- 40) Johannesson, L., Enskog, A., Mölne, J., Diaz-Garcia, C., Hanafy, A., Dahm-Kähler, P., Tekin, A., Tryphonopoulos, P., Morales, P., Rivas, K., Ruiz, P., Tzakis, A., Olausson, M., Brännström, M.: Preclinical report on allogeneic uterus transplantation in non-human primates. *Hum. Reprod.*, 28: 189-198, 2013.
- 41) Milliez, J.: Uterine transplantation FIGO Committee for the Ethical Aspects of Human Reproduction and Women's Health. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 106: 270, 2009.
- 42) Lefkowitz, A., Edwards, M., Balayla, J.: The Montreal Criteria for the Ethical Feasibility of Uterine Transplantation. *Transpl. Int.*, 25: 439-447, 2012.
- 43) Jones, JW., Gruber, SA., Barker, JH., Breidenbach, WC.: Successful hand transplantation. One-year follow-up. *Louisville Hand Transplant Team. N. Engl. J. Med.*, 343: 468-473, 2000.
- 44) Strome, M., Stein, J., Esclamado, R., Hicks, D., Lorenz, RR., Braun, W., Yetman, R., Eliachar, I., Mayes, J.: Laryngeal transplantation and 40-month follow-up. *N. Engl. J. Med.*, 344: 1676-1679, 2001.
- 45) Siemionow, M., Papay, F., Alam, D., Bernard, S., Djohan, R., Gordon, C., Hendrickson, M., Lohman, R., Eghtesad, B., Coffman, K., Kodish, E., Paradis, C., Avery, R., Fung, J.: Near-total human face transplantation for a severely disfigured patient in the USA. *Lancet*, 374:203-209, 2009.

- 46) Levi, DM., Tzakis, AG., Kato, T., Madariaga, J., Mittal, NK., Nery, J., Nishida, S., Ruiz, P.: Transplantation of the abdominal wall. *Lancet*, 361: 2173-2176, 2003.
- 47) Brännström, M.: Uterus transplantation. *Fertil. Steril.*, 99: 348-349, 2013.
- 48) Ethics Committee of the American Fertility Society: Surrogate mothers. *Fertil. Steril.*, 62: 71S-4S, 1994.
- 49) Deshpande, NA., James, NT., Kucirka, LM., Boyarsky, BJ., Garonzik-Wang, JM., Montgomery, RA., Segev, DL.: Pregnancy outcomes in kidney transplant recipients: a systematic review and meta-analysis. *Am. J. Transplant.*, 11: 2388-2404, 2011.
- 50) McKay, DB., Josephson, MA.: Pregnancy in recipients of solid organs--effects on mother and child. *N. Engl. J. Med.*, 354:1281-1293, 2006.
- 51) Petrozza, JC., Gray, MR., Davis, AJ., Reindollar, RH.: Congenital absence of the uterus and vagina is not commonly transmitted as a dominant genetic trait: outcomes of surrogate pregnancies. *Fertil. Steril.*, 67:387-389, 1997.
- 52) Soares, SR., Troncoso, C., Bosch, E., Serra, V., Simón, C., Remohí, J., Pellicer, A.: Age and uterine receptiveness: predicting the outcome of oocyte donation cycles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90: 4399-4404, 2005.
- 53) Srisawat, N., Avihingsanon, A., Praditpornsilpa, K., Jiamjarasrangsri, W., Eiam-Ong, S., Avihingsanon, Y.: A prevalence of posttransplantation cancers compared with cancers in people with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome after highly active antiretroviral therapy. *Transplant. Proc.*, 40: 2677-2679, 2008.
- 54) Brännström, M., Diaz-Garcia, C., Hanafy, A., Olausson, M., Tzakis, A.: Uterus transplantation: animal research and human possibilities. *Fertil. Steril.*, 97: 1269-1276, 2012.
- 55) Milliman Inc. 2011 U.S. organ and tissue transplant cost estimates and discussion. Available at: External link <http://insight.milliman.com/article.php?cntid=7625>. Accessed Nov 27, 2012.

ガラス化法の基礎と臨床

向田 哲規¹, 高橋 克彦¹, 後藤 哲也², 田島 敏秀², 岡 親弘²

¹ 広島 HART クリニック 〒730-0051 広島県広島市中区大手町 5-7-10

² 東京 HART クリニック 〒107-0062 東京都港区南青山 5-4-19 南青山コート 1F

要 旨： 現在, 生殖補助医療の分野において卵や胚の凍結保存技術は臨床的にとても重要で, ガラス化法がその中心である. 著者らは2000年当初よりヒト胚盤胞のガラス保存法にクライオループという Tool を用い, 高い臨床成績を報告してきた. その上拡大した胞胚腔はガラス化において透過型耐凍剤の細胞内への浸透および脱水過程の障害となり得るため, ガラス化直前にレーザーを用い拡大胚盤胞の胞胚腔を穿刺し, 人工的に収縮させる胞胚腔穿刺収縮法(Artificial Shrinkage:AS法)により, 融解後生存率を改善した. またガラス化・融解過程は透明帯を硬化させ, それにより Hatching 不全が起こり得るため, 融解直後の囲卵腔が見られる時に透明帯補助孵化法(Assisted Hatching: AHA法)を施行することで着床率を向上させ, 臨床的有用性を更に高めた. この総説では, 低温保存法の基礎的知識と現在臨床において最も用いられている胚のガラス化法の実際の手技と臨床成績・今後の展望について解説する.

キーワード: ガラス化法, ヒト胚盤胞, クライオループ, 透明帯補助孵化法(AHA法), 胞胚腔穿刺収縮法(AS法)

はじめに

ヒト生殖補助医療(ART)において, 余剰胚の低温保存は重要な治療技術の一つであり, 現在では様々な低温保存法が臨床的に用いられている. その理由としては体外受精で得られた胚のうち, 新鮮な状態で移植したあとの余剰胚を低温保存しておくことにより, その後の周期で融解後の生存胚を少数ずつ移植し妊娠に向けることができるためである. 低温保存胚の利用により, 採卵を毎行なう必要がないことから, 患者の負担が軽減され, 採卵周期当たりの妊娠率を向上させることができる. その上一回の移植胚数を減らすことで, 多胎の防止にも役立ち, 子宮内環境不良や卵巣過剰刺激症候群(Ovarian Hyperstimulation Syndrome; OHSS)の発症・増悪が考慮されるなどの新鮮胚を移植することが不適当な症例ではすべての胚を保存し, その後の自然周期または子宮内膜作成周期で移植することも可能となる. それ以外にも卵や精子また受精卵(胚)を低温保存する技術は, 種々の哺乳動物の遺伝子を保存しておく(特に絶滅危惧種において), 家畜繁殖の効率改善に寄与するなどから現在種々の方法が開発・改良され, その有効性および成績の向上は, 生物生理学, 畜産, 医療に大きく関係している.

低温保存についての概略

1) 低温保存の基本

細胞が生存性を損なうことなく長期間保存されるためには, 基本的に液体が結晶化することなく固化した状態のガラス化になる温度(−130度以下)で保存される必要があり, それには一般的に−196℃である液体窒素(Liquid Nitrogen; LN₂)が用いられる. そのために必要なのは, 低温環境下で起こる氷晶形成を防ぐため耐凍剤(凍結保護剤, CPA; Cryo-Protective Agent)を用い, 細胞内の水分分子を結晶化しないサイズにまで濃縮する脱水過程と, 温度を回復させる(融解時)際に, 濃縮された水分分子を細胞内へ戻す加水過程である. 現在, 卵・胚の低温保存手技は様々な方法が用いられ, 20種類以上の哺乳動物の卵や胚を安全に低温保存することができている. 重要な点はいかに細胞内氷晶形成を防ぐかと耐凍剤による毒性を少なくするかである¹⁾. そのため耐凍剤を加え徐々に温度を低下させる緩慢凍結法と, 一気にLN₂に浸すことで急速に冷却し, 氷晶形成がまったくなく固化した状態にするガラス化法がある. 尚, 低温生物学において, 低温保存を表す単語には, 氷晶形成が細胞外に起こる緩慢凍結の場合「凍結; Freezing」とそれを融かす「解凍; Thawing」が適切であり, ガラス化法では, 氷晶形成がないため, 「冷却; Cooling」(または「Vitrifying」)と「融解; Warming」となる. しかし, 一般的にガラス化法の場合も低温保存と冷却保存とせず, 胚の

凍結保存法の一つという説明がなされることもしばしばある。

2) 歴史的経緯

現在臨床的に多く用いられている緩慢凍結法は1972年にWhittinghamら²⁾によって提唱され、比較的低濃度の耐凍剤に細胞を浸すことで脱水と耐凍剤の透過により平衡化し、徐々に温度を低下させる精密な機器を用いて、緩徐な冷却を行い最終的にLN₂内で保存する。この方法では細胞外は植氷(−7℃で強制的に施行)により氷晶形成が起こる。ヒト胚においてはTrounsonらが1983年に妊娠例を報告³⁾して以来、方法論の改善がなされ、現在広く用いられている。一方1985年にRallとFahyによって提唱⁴⁾されたガラス化法(Vitrification)は、高濃度の耐凍剤に細胞を浸し、直接LN₂に入れることで、常温から−196℃へ急激に冷却し、細胞内外ともガラス化するため氷晶形成がまったく起こらない。しかしながら、高濃度の耐凍剤による細胞毒性が問題に成り得る。体外受精などで得られるヒト受精卵は緩慢凍結法で保存されているのが主流であるが、近年ガラス化法(Vitrification)の有効性が認められ臨床的に多く用いられるようになり、その簡便性・有効性の高さから特に日本において多くのクリニックで用いられるようになってきた。

3) 低温保存法の理論

精子のような小型の浮遊細胞は比較的低濃度の耐凍剤を加えてそのまま低温のLN₂の気相に放置することによって凍結保存することが出来る。しかし卵や胚は細胞サイズが大きいため含まれる水分量が多く、この方法を

用いることは出来ない。既に前述したように基本的に細胞をその生存性を損なうことなく低温保存するには、細胞内に氷晶形成を起こさず、細胞質が固化(ガラス化)するレベル以下の温度を保つ必要があり、LN₂内で保存されるのが通常である。また細胞はこの低温保存状態において受ける障害以外に、温度を低下させる過程、回復のため上昇する過程が様々な傷害を起こす可能性がある。

低温保存における傷害¹⁾

細胞を低温保存する際、方法によって図1、2のようにステップおよび温度変化に違いはあるが、次のような傷害が起こり得ることを考慮すべきである。

冷却による傷害：ある種の胚(細胞内に脂質が多く含まれている豚、牛など)では20度以下の温度に曝されることが生存性の低下につながる。それらの共通の特徴は細胞質が黒褐色調で、これは脂肪滴に起因する。

細胞内氷晶形成：哺乳動物の卵や胚は、他の細胞と比較すると格段に大きいいため水分量も多くなり、細胞質内の水分に氷晶形成が起こるとその体積が1.1倍となりその容積増加から細胞膜破砕、細胞内小器官の破壊等の構造的(機械的)傷害を起こし細胞変性にいたる。これは緩慢凍結法において−7度の時点で行う植氷の際にも起こる可能性がある。それを回避するには耐凍剤(たとえば、グリセロール(Glycerol)、エチレングリコール(Ethylene glycol)、DMSO、プロピレングリコールなど)の細胞内への十分な平衡化と緩慢な温度低下が必要となる。しかし、ガラス化法では、高濃度耐凍剤と急速冷却のため氷晶形成は理論的に起こりえないが、耐凍剤が不十分な場合や、冷却速度が緩徐であると氷晶形成が起こりえる。細胞内に氷晶形成されないまで濃縮した状態で

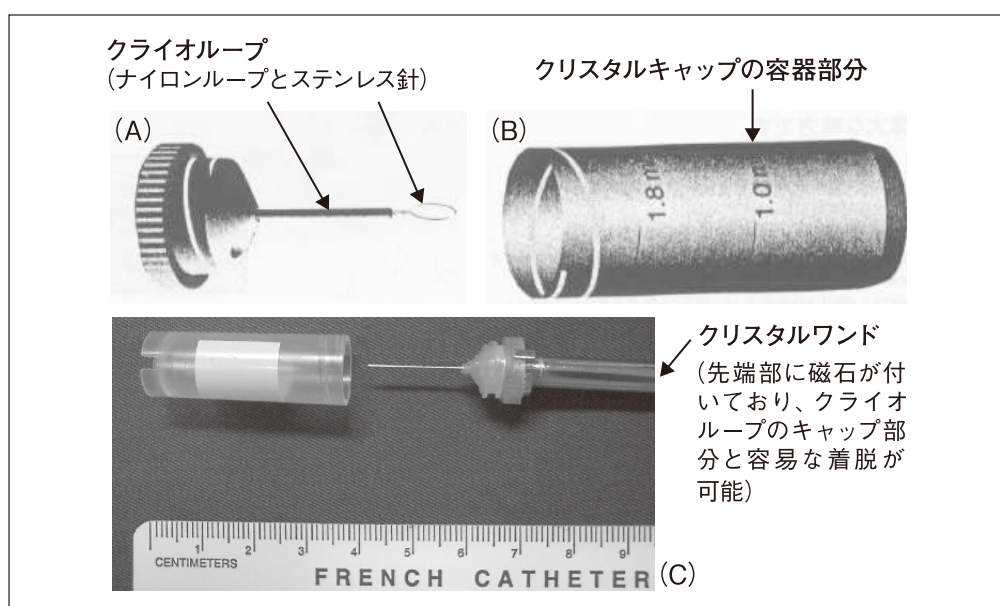


図1 クライオループの構造

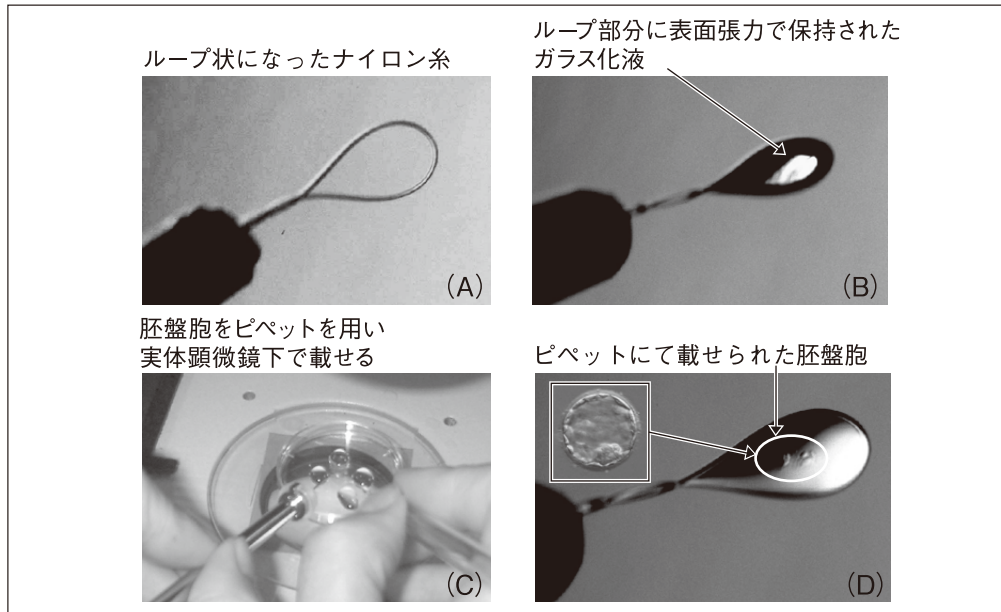


図2 クライオループを用いたガラス化法の手順

のみ長期低温保存が可能であり、これが結晶化することなく固化したガラス化状態である。

フラクチャーダメージ：細胞を低温処理する際、ガラス化状態になる前の液体状態から固体状態の変化が起きる -130°C 付近において、細胞内に不均一な温度変化が生じた場合に亀裂（クラック）が液相と固相の混在によるという形で現れる。実際には卵や胚を融解した後、透明帯や細胞質に亀裂（クラック）として観察される。これは冷却・融解の温度スピードおよびその容器の形状に影響を受ける。

浸透圧膨張：融解直後、卵や胚は細胞内に氷晶形成が起きないようにするために透過型耐凍剤を含んでおり浸透圧は細胞外より高くなる。このため水分の流入の方が耐凍剤の排出より早く起こり、急速な水分流入により体積の増加つまり膨張状態が起こり、それが細胞傷害に繋がりがえるが、膨張状態に対する抵抗性・感受性は卵や胚の時期によって様々である。それを防ぐためには細胞外の浸透圧を上昇させる必要があり、非透過型耐凍剤であるシュークロース液を融解液に入れ、急激な細胞サイズの変化を防ぎ、耐凍剤の流出とともにその濃度を低下させていく対応が必要である。

浸透圧収縮：耐凍剤との平衡化時は、水分の漏出の方が耐凍剤の流入より早いと細胞は収縮し、透過性が低い場合や耐凍剤の濃度が高い場合には過度の収縮が起こり細胞骨格等への傷害となり得る。また融解時に耐凍剤を除去する過程では、細胞外に浸透圧を保つためシュークロース液を入れておくが、耐凍剤が細胞外に流出するにつれ、細胞サイズは小さくなり、そのまま高浸

透圧下が続くと過度な収縮状態になる。これは膨張と同じく細胞に傷害を起こす可能性がある。

耐凍剤の毒性：低温保存する際にもっとも問題になるのは氷晶形成であり、それを防ぐのが細胞内に透過して水分子の結合・結晶を妨げる目的で用いる細胞透過型耐凍剤である。これにはグリセロール、エチレングリコール、DMSO、プロパンダイオール(Propandiol)、アセタミド(Acetamide)があり、すべて細胞毒性が起こり得るがその程度は、対象となる胚の種類、発達段階により大きく異なる。マウス8分割胚を用いた実験では、エチレングリコールが最も毒性が少なかった(Mukaida *et al*, 1998)。緩慢凍結法ではその濃度が1～2M程度と比較的低濃度のため毒性は少ないが、ガラス化法では4～6Mに達するため、平衡化を完全に起こせばその影響は大きく、平衡化およびガラス化過程にかかる時間はとても重要である。しかし融解後は形態学的に変性等が起こるわけではなく一見正常に見えるため、あまり注意が払われず、その後の分割速度の低下や停止などの影響となって表れる。ふさわしい耐凍剤としては、細胞透過性が高い物質が良いとされる。その理由としては(1)耐凍剤が十分に細胞内へ流入することは、細胞内氷晶形成を防ぐためには不可欠である。(2)細胞内への透過性が高い方が耐凍剤と細胞との曝露時間を短くすることが出来、耐凍剤による化学毒性の影響を少なくできる。(3)細胞内から外への漏出が早い方が、融解時に浸透圧膨張の影響を受けにくいと考えられることである。またこれら透過性に関しては温度が高い方がより促進される傾向がある。

4) 低温保存法の種類

現在、卵や胚の低温保存法には、緩慢凍結法とガラス化法があり、そのガラス化法の中でも通常のガラス化法とガラス化液量を少なくし冷却速度を極めて高くした超急速ガラス化法がある。

緩慢凍結法 (Slow freezing method)

緩慢凍結法は、卵や胚をまず 1-2mol/L の耐凍剤に平衡化するまで曝露させ、その後徐々に温度を低下させ、 -7°C 付近で植氷（強制的な氷晶形成；詳細は後述）を行う。その後も徐々に温度を低下させることで氷晶形成が進み ($0.3-0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$)、その過程において細胞内および細胞外で氷晶形成がなされていない所が濃縮され、最終的に LN_2 ではその部分がガラス化される。最初の古典的緩慢凍結法は 1972 年に Whittingham らによって開発²⁾され、 -80°C まで低下させた後 LN_2 へ投入していた。その後、融解過程を急速に行う ($360^{\circ}\text{C}/\text{min}$) と冷却過程を -30°C で中止し液体窒素に投入できることが判明した。この方法は細胞内氷晶形成を防ぐために緩徐な温度低下が必要でそれをコントロールする機器と長時間の操作が必要となる。

古典的のガラス化法 (Conventional vitrification)

一方 1985 年に Rall と Fahy にガラス化法と呼ばれる、全く概念が違うアプローチが提唱⁴⁾される。これは卵や胚を高濃度の耐凍剤に曝露後ストロー内に保持し、常温から数分以内に LN_2 へ投入する方法である。これには氷晶形成が全く起こらない点と温度を調整する器機が不必要な点に加え、生存率が緩慢凍結法より高いという利点がある。しかしながら、高濃度 ($5-8\text{mol/L}$) の耐凍剤を使用することによる細胞化学毒性の影響がある。

現在用いられているガラス化法 (Vitrification)

細胞の種類および発達段階によっては上記の 2 つの方法でも十分な生存率が得られない場合があり、それらには次にあげる 3 つの状況が考えられる。

- (1) 低温障害 (Chilling injury) を受けやすい卵や胚、(ブタやウシの卵や胚など、)
- (2) 耐凍剤の細胞内への透過性が低い細胞、(ヒトの卵や胚盤胞)
- (3) 耐凍剤の化学毒性に対して感受性が高く傷害を受けやすい胚、(ハムスターの卵や胚)

このような傷害を克服する手段として考えられたのが現在汎用されている(超急速)ガラス化法で、冷却速度を極めて高くすることで氷晶形成やその他の傷害を回避するアプローチであり、chilling injury や Fracture damage が起こる温度付近を一気に通過し、 LN_2 の温度まで冷却する方法である。これにより従来のガラス化法で用いる耐凍剤濃度より低いレベルで細胞内氷晶形成

も回避できる。この冷却速度を高める工夫にはガラス化液量を出来るだけ少なくし液体窒素に直接接触する方法があり、このために胚を保持する容器にいろいろなタイプの工夫がなされてきた。最初は 1996 年に Martino らが電子顕微鏡のサンプルを載せるグリッドを用いて行う方法を提唱⁵⁾し、その後、Open pulled straw (OPS)⁶⁾、Cryoloop⁷⁾、Cryotop/Cryotip⁸⁾などが開発された。

近年、ヒト生殖補助医療 (ART) の分野では、培養技術の改善に伴い、多胎の防止、着床率の改善と診断的意義から胚盤胞まで培養し移植する胚盤胞移植 (Blastocyst Transfer : BT) 法が普及してきた⁹⁾。それにつれ余剰胚盤胞の有効保存法が臨床的に重要になってきた。このため我々も従来のグリセロールを耐凍剤とした緩慢凍結法による胚盤胞の凍結保存法¹⁰⁾を試みたが他の多くの施設¹¹⁾と同様に臨床的に満足できる成績を得られなかった。そのため HART クリニックでは従来のストローによるガラス化法を、クライオループという容器を用いてガラス化液量を極度に少なくすることで、冷却速度を急激に高め、耐凍剤の濃度を低下させることで毒性の少ない超急速ガラス化法確立し、臨床応用してきた。そしてこの方法による世界で初めての妊娠出産報告¹²⁾を 2001 年に行なった。その上 2001 年より着床率の向上を目的として透明帯補助孵化法 (Assisted Hatching : AHA)¹³⁾を、2002 年より融解後の生存率の向上を目的として胞胚腔穿刺収縮法 (Artificial Shrinkage : AS)¹⁴⁾を加えている。

低温保存法の実際

この総説では、胚のガラス化法の一つの例として著者らが行なっているクライオループを用いた胚盤胞のガラス化法 (Blastocyst vitrification) の手技・手順を示し、AS 法や AHA 法についても解説する。

1) 胚培養

胚盤胞までの培養は、媒精または ICSI から 15 ~ 18 時間後に受精を確認し、2 前核が明確に認められた受精卵のみ 2 ~ 3 個ずつのグループに分け、Blast Assist Medium 1 (Medicult, Jyllinge, Denmark) にて 48 時間培養した。採卵後 3 日目に胚の発達状態を確認後、Blast Assist Medium 2 (Medicult) にて更に 48 から 72 時間培養する。採卵後 3 日目に胚移植を行なう症例は、移植後の余剰胚のみを追加培養とした。採卵後 5 日目の段階で胚盤胞に到達しているかどうか評価し、桑実胚またはそれ以下の段階の胚は培養液を換え更に 24 時間追加培養する。

胚盤胞に達した胚を倒立顕微鏡下（倍率×400）で形態学的に観察し、胞胚腔の広がりをも1～6の段階に分け、内細胞塊（ICM）と栄養膜外胚葉（Trophectoderm:TE）をA,B,Cに分けるGardnerらの評価法⁹⁾を用いている。Day5において移植後の余剰胚盤胞のICMとTEのスコアがAまたはBの段階にあるものが1つ以上ある胚を、ガラス化保存する。またDay5に胚盤胞形成が見られずDay6に胚盤胞に達した胚の中で、胞胚腔の広がりが4以上でかつAまたはBの段階にある胚のみガラス化保存する。

2) 胚盤胞のクライオループによるガラス化法

ガラス化のための冷却・融解手順は、基本的にLaneら⁷⁾の方法を少し変更して用いており、詳細は既に報告¹²⁻¹⁵⁾している。略記すると、胚をガラス化液と共に載せ液体窒素に浸すToolとして用いるクライオループは、ナイロンループ（太さ20μm、直径0.5～0.7mm）で構成されたループ状の輪がステンレス棒の先端に付いている構造になっており、それがクリスタルキャップ（Hampton Research, Laguna Niguel, CA, USA）と呼ばれる容器のキャップ部分に付いている。そのクライオループが付いたキャップ部分を液体窒素下で、操作出来るように先端部に磁石がついたクリスタルwand（Crystal wand: Hampton Research）というステンレスの棒を使用する（図3）。上記Toolの入手先はwww.hamptonresearch.comのサイトでMounted crystal

loops: Catalog No. HR4-963 (20 microns, 0.5-0.7mm, 25 pieces), Crystal cap: Catalog No. HR4-913 (60 pieces), HR4-911 (Sampler pack), Crystal wand with Tab: Catalog No. HR4-619をメールオーダーすることにより入手できる。ループが付いたステンレス針をキャップ部分に差し込んで使用するが、完全に密着固定できない場合は熱したピンセット等でステンレス針の根元のプラスチック部分を把持する事で固定を確実にする。1つのクライオループに1～3個の胚盤胞を次に示す2段階の耐凍剤濃度による平衡化の後、液体窒素に浸しガラス化保存した。1段階目はHepes-buffered HTFに5 mg/mlのhuman serum albuminを入れたBase mediumにEthylene Glycol (EG)とDMSOがそれぞれ7.5%ずつ入った平衡化液（Solution 1）に2分間、2段階目はBase mediumにEGとDMSOがそれぞれ15%ずつ入り、0.65 M sucroseと10mg/mlのFicoll70（Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden）を加えたガラス化液（Solution 2）に30秒ほど胚盤胞を浸した後（1, 2段階目は37℃）、クライオループに極少量のガラス化液と共に余剰胚盤胞を載せ、直ちに液体窒素に浸す超急速冷却を行った（図4）。実際にはNunc社製の4ウェルディッシュを用い、ウェル1にはBase mediumを入れ、ウェル2に平衡化液（Solution 1）、ウェル3にガラス化液（Solution 2）を入れておき、胚盤胞をウェル1からウェル2に移したと同時にタイマーをスタートし、胚盤胞が平衡化液にある間にガラス化液（Solution 2）のドロップ

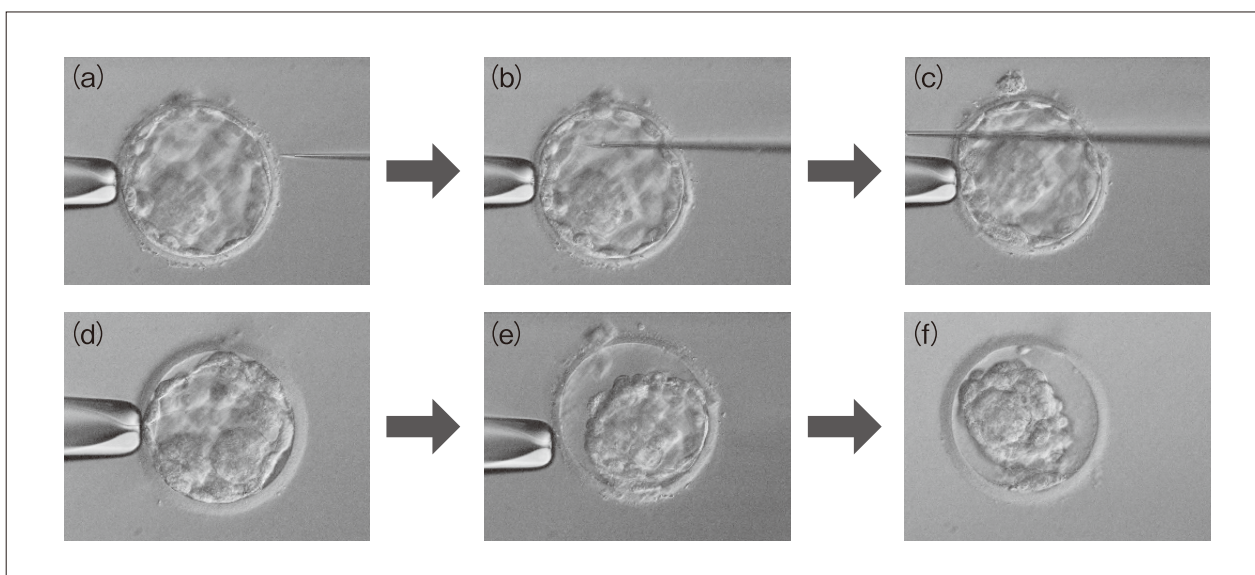


図3 胞胚腔穿刺収縮法：AS法 (Artificial Shrinkage) の手順

Artificial shrinkage of expanded blastocyst with the micro-needle

(a) holding the expanded blastocyst with holding micro-pipette connected to micromanipulation (b) insertion of the micro-needle inside the blastocoele at the point of away from the inner cell mass (c) Puncture through the blastocoele and removing the micro-needle gradually. (d) beginning of shrinkage 10sec. after puncture (e) partial shrinkage 30 sec. after puncture (f) complete shrinkage 1min. after puncture

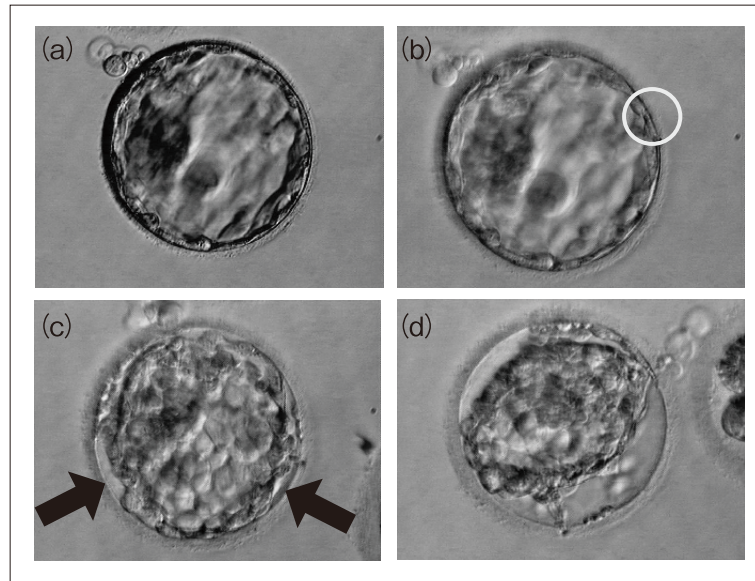


図4 Artificial shrinkage of expanded blastocyst with a single laser pulse

(a) Prior to the artificial shrinkage (b) a single laser pulse at the point of the cellular junction of trophoblast cell at the point of away from the inner cell mass (circle indicated) (c) shrinkage 10sec. after laser shooting (d) almost complete shrinkage 30 sec. after laser shooting

をディッシュの蓋に2つ作る. 約1分45秒から2分の時点で, 胚盤胞をガラス化液(Solution 2)のドロップに移し, もう一つのドロップに移動することでガラス化液との平衡化を図る. 約25秒付近でループ部分に載せ, 直ちに液体窒素に投入する. 胚の操作の上で重要なことは, ガラス化用耐凍剤の濃度が高く, ガラス化液量がとても少ないため, 出来るだけ時間どおりに施行し, 胚をループに載せた後はすばやく液体窒素に浸すことである.

融解も次に示す2段階にて行った. クリスタルワンドを用いて液体窒素中でキャップをはずし, 直ちにループ部分を0.33 M sucroseの入ったBase mediumに浸す事で急速融解した. 2分間0.33Mのsucrose液に浸した後, 0.25Mのsucrose液に移し3分間, その後Base medium中で十分洗浄, その後5分保持し, G2.3またはBlast Assist Medium 2等の胚盤胞用培養液で移植まで培養した.

冷却および融解のステップは, あらかじめIncubator内で平衡化液, 融解液を温めておき加温板(Stage Warmer)を用いる事で出来るだけ37℃に近い状態で行った. ガラス化液のドロップからループに載せる際は, ループ部分の表面張力で自動的に細いピペットから胚が移動し, 融解時には, ループ部分に載せられた胚盤胞は, 0.33Mのsucrose液に浸すことで自動的にディッシュの底部へ落ちていくため, 回収のためにいかなる操作も必要ない. 基本的に操作は簡便で5分以内に終了する.

3) ガラス化・融解の評価法

融解胚盤胞は, 融解直後には脱水により収縮しほぼ桑実胚と同様な形態をしており, やや褐色に見えることもあるため, その時点で評価は行わず, 融解後2～3時間目に胞胚腔の再拡大の有無および程度, ICMおよびTEの状態を前述した胚盤胞の評価法にしたがって調べる. 胞胚腔の再拡大が見られ, 胚盤胞を構成する細胞に変性が見られない場合のみ生存と判定し, 原則として融解当日に生存胚盤胞を原則1個移植する. 初期胚盤胞をガラス化した場合, 反復不成功の場合などは, 前日の午後融解し, Overnightさせ翌日の午前中に移植することもある.

4) 胞胚腔穿刺収縮法(Artificial Shrinkage:AS法)とその意義

2003年末の段階で過去4年間(551周期, 1430個)のガラス化融解胚盤胞移植の成績を胚盤胞の発達段階別に解析したところ, 初期胚盤胞の融解後生存率は97.2%であるが拡大胚盤胞では82.2%と有意な低下が見られた¹⁵⁾. これは胞胚腔の大きさが関係していると考えられ, 特に拡大した胞胚腔がガラス化過程において胞胚腔からの脱水, 耐凍剤の浸透の障害となる可能性が推察された. そこで, ガラス化直前にマイクロマニピュレーターを用いて胞胚腔をマイクロニードルで穿刺収縮させるAS法により, 胞胚腔を収縮させ初期胚盤胞と同じ状態にしガラス化保存することで生存率を改善で

きるかどうかの次のような前方視的研究を試みた。拡大胚盤胞をガラス化保存後融解できた合計198治療周期において360個の拡大胚盤胞をガラス化保存後融解し、322個の胚盤胞が形態学的に生存と判定された(生存率89.4%)。全周期で1個以上の胚移植が可能で合計291個の胚盤胞を移植し、平均移植胚数は1.47個であった。そのうち94周期に臨床的妊娠が認められ、移植あたりの妊娠率は47.4%で、106の胎嚢(GS)が確認された(着床率:36.4%)。このうちAS法(+)は、130周期で、229個の拡大胚盤胞を融解し、222個が生存(96.9%)し、193個(平均移植胚数1.49個)を移植した。そのうち67周期に妊娠が確認され(51.5%)、78個の胎嚢を確認できた(着床率:40.4%)。一方、AS法(-)は、68周期で、131個の拡大胚盤胞を融解し、100個が生存(76.3%)し、98個(平均移植胚数1.41個)を移植した。そのうち27周期で妊娠が確認され(39.7%)、28個の胎嚢が確認された(着床率:28.6%)。また融解後3時間以内にFullの胚盤胞までの完全再拡大が見られた割合は、AS法(+)では、229個中183個(79.9%)であったが、AS法(-)では131個中59個(45%)で有意な差が見られた。両群の平均年齢、移植胚数に差は認められなかったが、結果として生存率、完全再拡大率、着床率に統計学的有意差($p<0.05$)が認められた。これにより拡大した胞胚腔はガラス化過程の障害となるが、人工的に収縮させることで有意に生存率・着床率を向上できることが示された。手技自体は、マイクロマニピュレーターを用い拡大胚盤胞の胞胚腔をマイクロニードルで穿刺し人工的に収縮させ、その後直ちにガラス化を行なうという手順である(図3)。また、Laserを用いることでマイクロマニピュレーターを用いることなく、図4のようにSingle Laser Pulseを外細胞層の部分に照射することで、胞胚腔の収縮を起こすことが出来る。

5) 透明帯補助孵化法(AHA法)とその臨床的意義

凍結・融解の過程で胚の透明帯に硬化が生じるため、融解移植胚にAHA法を施行して移植することで着床率が向上することは既に知られている¹⁶⁾。我々もガラス化胚盤胞と新鮮胚盤胞の透明帯が酵素によって融解されるのに必要な時間を比較した場合、ガラス化胚盤胞において有意な延長を認め、透明帯がガラス化過程においても硬化されることを既に示した¹³⁾。また新鮮胚盤胞は胚腔が拡がり栄養膜外胚葉が透明帯に接するため、栄養膜外胚葉にダメージを与えずAHA法を施行することは困難である。しかしながらガラス化融解直後の胚盤胞は、胞胚腔が収縮し囲卵腔が形成

されているのでAHA法の施行は新鮮胚盤胞と比べ格段に容易である。HARTクリニックにおける臨床成績でも患者背景の同じ群においてAHA法施行群の253周期と対照群の119周期を比較した場合、融解後の生存率に差は見られなかったが、対照群では46周期38.7%に妊娠が認められ着床率21.2%であったのに対し、AHA施行群では126周期49.8%に妊娠が認められ、着床率も32.6%であり、AHA法を行なうことで統計学的に有意な改善が見られた。透明帯補助孵化法(AHA法)は融解ステップの最後の段階、すなわちBase Mediumで5分間待つ間に施行する。その時点では融解直後のため胞胚腔が未だ拡がっておらず収縮したままの状態であり、囲卵腔の形成が認められる。手技は倒立顕微鏡下でHepesの入ったBase Medium50 μ lのドロップ内において、融解直後胚盤胞を9時の位置からHoldingピペットにて保持し、3時の位置から直径10 μ mのピペットより酸性タイロイド液(pH2.3)を透明帯に向けて吹きかけ、その一部を化学的に溶解する通常のAHA法と同じである。強酸であるタイロイド液を吹きかけている時間は、3秒以内にすべきである。しかしながら酸性タイロイドは強酸でありそれによる胚へのダメージを回避するため、現在はLaserによるAHA法が主流となり、著者らもLaserシステム(Zilos-tk: Hamilton Thorn社, USA)を平成16年9月より導入し、その有効性、安全性を確認の後、臨床使用している¹³⁾。方法は上記の酸性タイロイドを用いて行なうよりはるかに簡便で安全であり、マイクロマニピュレーターを用いる必要がなく、図5のように透明帯部分にLaser照射を行なうのみである。我々は透明帯の厚さおよび囲卵腔の幅に合わせて照射時間500~1500(microsec)を選択し、照射平面上において透明帯全体の1/3-1/2の部分、照射部周辺への熱による影響を注意しながら行なっている。LAH手技は透明帯に接線方向からLaser Pulseが照射されるため照射平面上50%のLAHにても開口部はスリットであり、透明帯自体が半分無くなるのではないため、直ちにHatched Outする状態ではない。

6) 臨床成績とその比較検討

HARTクリニックでは1999年末より胚盤胞を、上記に示したクライオループを用いた超急速ガラス化法で行なっており、広島・東京の2施設において2011年末までの11年間で6467周期、10274個の胚盤胞を融解し、9744個が胞胚腔の再拡大が見られたため生存と判断し(94.8%)、その内8785個を6372周期に移植した。GSの確認出来た臨床的妊娠は3032周期(47.6%)であり、3378個のGSが確認された(着床率38.5%)。その内

780周期は流産に終わった（25.7%）。422周期は妊娠経過中で、40周期は妊娠転帰不明の状態である。1830症例の出産において2059児が得られ、帝王切開による出産は847症例（46.3%）、双胎が200症例（10.9%）、品胎は13症例（0.7%）であった。出生児の内訳は男児1060、女児999で性差はみられなかった（表1）。32症例、34胎児・新生児において妊娠13週以降の周産期異常・先天異常が認められ、染色体異常児（ダウン症）出産回避のため妊娠22週の時点での人工中絶、妊娠32週と37週の原因不明胎児死亡の計3症例が含まれ、その内訳を表2に示す。本検討での先天異常の発生率は、1830症例中34症例（1.9%）であった。また、新鮮胚盤胞移植を行い妊娠出産に至った338児とガラス化融解胚盤胞移植により出産に至った1625児の在胎日数と児体重等の周産期データを比較すると表3のように、在胎日数においては単胎児と双胎児、経膈分娩児と帝王切開出産児の間に新鮮胚移植、ガラス化胚盤胞移植による差は見られないが、児体重においては、単胎の場合新鮮胚移植児：2998±371.5g、ガラス化胚盤胞による出生児：3097±406.2gと有意な差が見られた。（ $P<0.01$ ）

凍結胚を用いた治療成績の日本における統計資料としては、日本産科婦人科学会の平成23年度倫理委員会登録・調査小委員会報告による平成22年度（2010年）の集計結果があり、これによると治療周期総数83626周期の内、81209周期に移植を行ない、27364周期に臨床的妊娠が認められ、移植あたりの妊娠率33.7%となっている。その内流産が6993周期（25.6%）に認められ、何らかの理由で人工中絶も87例報告されている。死産分娩数107例を除いた生産分娩数は18202例で、移植あたりの生産率は22.4%であった。単胎生産17229、双胎生産871、品胎生産10で、合計19001例の出生児を得ている。313症例の胎児・新生児が周産期先天異常として報告されており、先天異常のため中絶になった症例が46ある。妊娠後の経過不明が1790症例あり、その群の流産率は転記が判明している症例と同じであると仮定し、胎児異常の発生率を判明している出産数から算出すると、17883症例中313胎児・出産児の1.75%である。

また日本産科婦人科学会の平成23年度倫理委員会登録・調査小委員会報告の2010年の新鮮胚を用いた治療成績の集計結果では、移植総周期数65077の内、妊娠数

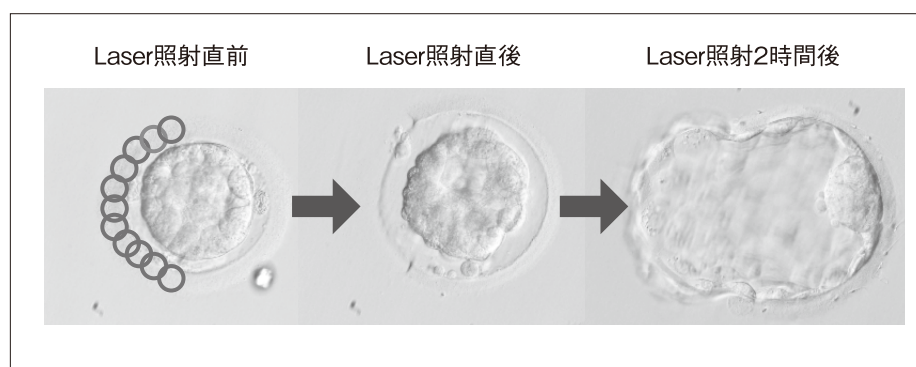


図5 Laser 照射による AHA 法の実際

表1 2000 年から 2011 年までのガラス化胚盤胞移植による臨床成績
（東京・広島 HART クリニック）

Clinical outcome of vitrified BL (2000-2011)	
Total No. of attempted cycles	6467
Total No. of warmed vitrified BL.	10274
Total No. of survived BL.	9744
Survival rate	94.8%
No. of transferred cycles	6372
Mean No. of BL transferred	1.38 (2010-11: 1.12)
No. of clinical pregnancies (%/BT)	3032 (47.6%)
No. of Implantations (%)	3378 (38.5%)
No. of birth (babies;boys:girls)	1830 (2059;1060:999)
No. of Miscarriages (%)	780 (25.7%)

表 2 2000 年から 2011 年までのガラス化胚盤胞移植による周産期先天異常の発生状況
(東京・広島 HART クリニック)

Summary of chromosomal abnormalities or neonatal complications	
< 34 babies in 34 deliveries (34/1830:1.9%) >	
• Six chromosomal abnormalities (two 18 trisomy, four 21 trisomy), • Six multiple anomalies • One stillbirth due to hydropus • Five stillbirths of unknown cause (25, 29, 30, 32, 37 weeks) • One anencephaly, One spina bifida • Ten congenital heart malformations • One biliary duct and one esophageal duct obstruction • One Cornelia de Lange syndrome(CdLS) • One Treacher Collins syndrome	

表 3 新鮮胚盤胞移植による出生児 (338 児) とガラス化胚盤胞移植による出生児 (1625 児) の周産期情報の比較
Comparison of mode of delivery and characteristics of infants conceived after fresh and vitrified BLs transfer

Type of BT	Fresh BL (%)		Vitrified BL (%)	
Live born	338		1625	
Male	166	(49.1)	841	(51.8)
Female	172	(50.9)	784	(48.2)
Mean gestational days				
(Singleton)	272.5 days		273.8 days	
(Twin)	261.1 days		254.1 days	
Preterm birth (<37wk)	30	(8.8)	125	(7.8)
Mean birth weight (g)				
Preterm Birth	2178 ± 686.2		2260 ± 561.2	
Full Term	2998 ± 371.5		3097 ± 406.2 (P<0.01)	
Vaginal delivery	240	(71.6)	761	(50.5)
(Mg days, Mb weight)	275.4 days	2977.3	276.9 days	3087.1
Cesarean section	95	(28.4)	746	(49.5)
(Mg days, Mb weight)	265.0 days	2802.5	269.5 days	2965.0

は 14255 で、移植あたりの妊娠率は 21.9% で、そのうち 3575 症例が流産となり (25.1%), 何らかの理由での人工中絶が 40 周期報告されている。死産分娩数 84 を除いた生産分娩数は 9471 で、移植あたりの生産率は 14.6% であった。単胎生産 8099, 双胎生産 1082, 品胎生産 25 で、合計 10338 例の出生児を得ている。164 症例の胎児・新生児が先天異常として報告されているが、胎児異常のため中絶になった症例が 34 あり、妊娠後の経過不明が 860 症例あるため、上記と同様に先天異常の発生率を判明している出産数から算出すると、9934 症例中 168 胎児・出産児の 1.69% である。

上記の成績より、ART 出生児の約 2/3 である 65.7% が凍結融解技術を用いて出生に至っており、移植あたりの妊娠率 (新鮮胚: 21.9%, 融解胚: 33.7%), 移植あたりの生産率 (新鮮胚: 14.6%, 融解胚: 22.4%) となり、有意な差が見られる。

至適な胚の凍結法とは？

どのような胚の低温保存法が臨床に適しているかを EBM に基づいて考えた場合、近年胚盤胞発達へむけた培養液に進歩もあり、余剰胚を胚盤胞まで追加培養し、胚盤胞に達した胚のみをガラス化保存する方法が得られる臨床的効果は高いと考えられる。なぜなら次のような理由からである。

- ① 余剰胚の胚盤胞発達の有無から、胚の成長の点からみた胚の質的診断になり、とりわけ 8 分割胚以降の胚発達は精子の質も含めた胚自身の遺伝子発現も関係していると報告されている。
- ② 従来の形態学的評価より有用と判断される胚盤胞発達という点からの凍結胚選択基準となる。
- ③ このことは不必要な胚の凍結を減らし、結果的に有意に分割胚の融解胚移植より高い妊娠率を得ることが出来る。

- ④ 短時間で簡単に出来、かつ再現性に富み、高価な機器が必要ではないので、小規模クリニックで可能である。

考 察

卵や胚の低温保存の臨床的な面からの有用性は近年より増加しており、多胎を防ぎ、採卵1回あたりでの累積妊娠を増加させる目的で積極的に提唱されている単一胚移植を行なうには、より生産率の高い低温保存法が必要不可欠である。このため今回示した胚盤胞の段階での超急速ガラス化法は最も有用な技術の一つである。しかしこれらの技術の安全性についての検証は、上記に示したような臨床成績の解析および比較検討を行っていく以外方法がないのが現状である。結果として比較した先天異常の発生率においては、胚盤胞のガラス化保存法では1.7%、2010年の日本における凍結胚を用いた治療成績では1.75%、また同時期の新鮮胚を用いた治療成績では1.69%と統計的に有意な差は見られておらず、また染色体の異常を胚の含めた初期胚の異常が関係する流産率においても、ガラス化胚盤胞では25.7%、日本における凍結胚全体では25.6%、同様に新鮮胚全体では25.1%と有意な差は見られていない。これより胚盤胞をガラス化保存することで先天異常が発生する割合が高くなることはないと考えられ、このような調査を2005年にも既に報告¹⁸⁾している。自然妊娠と比較した解析に関しては、自然妊娠における先天異常の統計結果が発表されていない点、上記に示した不妊治療を受ける患者背景と自然妊娠例の背景とが必ずしも一致しない点から、日本においては示すことができないが、欧米での成績を系統的に集計し考察した報告¹⁹⁾でも有意な差は認められていないことより、低温保存胚移植を含めた生殖補助医療において先天異常児の発生率が高くなる点は特殊な背景を除いて示されていない。しかしながらこのような調査を継続的に行っていくことはとても重要であり、今後は出生児の精神・身体発達を含めた調査から得られる長期的予後のフォローもより重要である。

参 考 文 献

- 1) Kasai, M.: Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: development of ultrarapid vitrification. *Reprod. Med. Biol.*, 1: 1-9, 2002.
- 2) Whittingham, D.G., Leibo, S.P., Mazur, P.: Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C. *Science*, 178: 411-414, 1972.
- 3) Trounson, A., Mohr, H.: Human pregnancy following cryopreservation; thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature*, 305:707-9, 1983.
- 4) Rall, W.F., Fahy, G.M.: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313:573-5, 1985.
- 5) Martino, A., Songsasen, N., Leibo, S.P.: Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol. Reprod.*, 54: 1059-1069, 1996.
- 6) Vajta, G., Holm, P., Kuwayama, M., Booth, P.J., Jacobsen, H., Greve, T., Callesen, H.: Open Pulled Straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 51: 53-58, 1998.
- 7) Lane, M., Schoolcraft, W.B., Gardner, D.K.: Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil. Steril.*, 72: 1073-1078, 1999.
- 8) Kuwayama, M., Vajta, G., Kato, O.: Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. *Reprod. Biomed. Online*, 11:300-8, 2005.
- 9) Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B.: *In-vitro* culture of human blastocyst. In Jansen, R. Mortimer, D., ed, *Towards Reproductive Certainty, Infertility and Genetics Beyond*, pp. 378-388, Parthenon Press, Carnforth, 1999.
- 10) Menezo, Y., Nicollet, B., Andre, D.: Freezing cocultured human Blastocysts. *Fertil. Steril.*, 58: 977-980, 1992.
- 11) Vanderzwalmen, P., Zech, H., Van Roosendaal, E.: Pregnancy and implantation rates after transfers of fresh and vitrified embryos on day 4 or 5. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 16: 147-155, 1999.
- 12) Mukaida, T., Kasai, M., Takahashi, K., Wada, S.: Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil. Steril.*, 76: 618-620, 2001.
- 13) 向田哲規・中村早苗・松原朋子・後藤哲也・岡親弘・吉野弘美・和田滋子・高橋克彦: 超急速ガラス化 (Vitrification) 法により保存された胚盤胞の融解時に透明帯補助孵化法 (AHA 法) を加え着床率の改善を試みた臨床成績. *日受精着床会誌*, 21(1): 82-87, 2004.
- 14) 向田哲規・中村早苗・松原朋子・後藤哲也・岡親弘・吉野弘美・和田滋子・高橋克彦: 超急速ガラス化法において拡大胚盤胞の胞胚腔を人工的に収縮させること (Artificial Shrinkage 法) で融解後生存率の向上を試みた臨床成績. *日受精着床会誌*, 22(1): 85-90, 2005.
- 15) Mukaida, T., Takahashi, K., Goto, T., Oka, C.: Artificial Shrinkage of blastocoele using either micro-needle or laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum. Reprod.*, 21:3246-3252, 2006.
- 16) Smith, G.D., Silva, E., Silva, C.A.: Developmental consequences of cryopreservation of mammalian oocytes and embryos. *Reprod. Biomed. Online*, 9 (2):171-8, 2004.
- 17) 日本産科婦人科学会平成 23 年度倫理委員会: 登録・調査小委員会報告 2010 年分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および 2012 年 7 月における登録施設名. *産婦人科学会誌*, 64:2110-2140, 2012.
- 18) Takahashi, K., Mukaida, T., Goto, T., Oka, C.: Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: A 4 year follow-up study. *Fertil. Steril.*, 84: 88-92, 2005.
- 19) Wennerholm, U.B., Söderström-Anttila, V., Bergh, C., Aittomäki, K., Hazekamp, J., Nygren, K.G., Selbing, A., Loft, A.: Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum. Reprod.*, 24:2158-72, 2009.

不育症 Up to date —不妊症と不育症の境界領域も含めて—

齋藤 滋

富山大学産科婦人科 〒930-0194 富山市杉谷 2630

はじめに

2008－2010年度に厚生労働科学研究(成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業)「不育症治療に関する再評価と新たな治療法の開発に関する研究」が行なわれ^{1,2)}、これまで混沌としていた不育症の定義、不育症のスクリーニング法、不育症の治療成績が明らかになるとともに、抗リン脂質抗体症候群に対するヘパリンカルシウム製剤の保険収載、プロテインS活性の保険収載、血栓性素因(先天性アンチトロンビン欠乏症、プロテインC欠乏症、プロテインS欠乏症、抗リン脂質抗体症候群など)を有する患者へのヘパリン在宅自己注射が保険収載され、不育症の治療の大半が保険診療で行なえるようになった。加えて、全国の都道府県に不育症相談窓口(49ヶ所)が開設され、24ヶ所の市町村(一部県単位)で、不育症に対しての助成金給付が行なわれている。

このような状況の変化に加え、不育症と不妊症を併せ持つ症例、不育症と不妊症の境界領域にある症例、対象者高齢化など、不妊症をプロフェッショナルとする方々にも、不育症のことを知っていただき、適切な対処を行なうか、もしくは不妊クリニックと不育症外来とのコラボレーションが必要な時期に来ている。本稿では、不育症の現状と今後の展望につき解説する。

不育症の定義

アメリカ産科婦人科学会(2001)³⁾、アメリカ生殖医療学会(2008)⁴⁾ともに、3回以上の流産、死産の既往がある場合をrecurrent pregnancy loss (recurrent miscarriage)と呼ぶと提唱している。しかし、いずれの報告でも、多くのエクスパートは、2回以上の流産・死産の既往でもrecurrent pregnancy lossに含めて良いと考えているという但し書きがある。そのため、厚生労働研究班では、2回以上の流産・死産あるいは、早期新生児死亡の既往があることを提唱した。早期新生児死亡

には、抗リン脂質抗体症候群による重度のIUGR/FGR症例や、早発型の妊娠高血圧症候群など、不育症関連の疾患が含まれる一方で、遺伝的代謝疾患や免疫異常など、明らかに流産とは関連性がない疾患も含まれることを留意すべきである。また、班員で意見が分かれたが、現在のところ生化学的妊娠は流産に含めないこととした。これは、生化学的妊娠(化学妊娠、化学流産)の頻度が高いため⁵⁾、臨床的流産のみを不育症の流産に含めることとした。しかし、図1に示すように生化学的妊娠、着床不全と不育症は基盤を同じくしており、また不妊症と不育症を併せ持つ症例が20～30%存在している。現在、筆者の不育症外来の約30%が不妊クリニックからの紹介患者であり、今後、益々不妊クリニックと、不育症外来を開設する病院、もしくはクリニックとの連携が必要となってきている。

1. 不育症の頻度

海外の不育症の頻度は約1%とされているが⁶⁾、日本ではこれまでその頻度は不明であった。Sugiura-Ogasawaraらは愛知県岡崎地区における住民健診で、

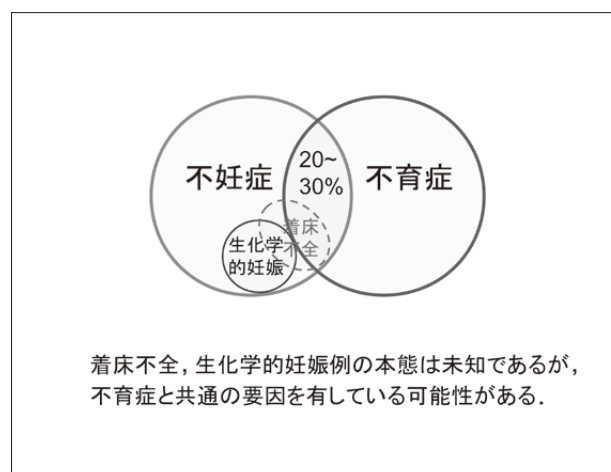


図1 不妊症、着床不全、生化学的妊娠、不育症の関係

妊娠歴、流産歴を聴取し、2回以上の流産歴が4.2%、3回以上の流産歴が0.88%であることを明らかにした⁸⁾。また、2回以上の流産歴のある89.5%が生児を得ていた。不育症患者で通院している患者の生児獲得率も85.5%と高かった⁸⁾。

流産を繰り返すと、次の妊娠自体が恐くなり、避妊をしたり、性交渉を拒むケースもしばしば経験するが、不育症であっても生児を得られる率は高いことや、スクリーニングを勧め、各リスクに応じた対応すれば、85%以上が生児を獲得できていることを、知ってもらうことは重要である。また、不育症例では、離婚のリスクが3.1倍(95%CI:1.474-6.53)と高いことも明らかとなり⁷⁾、流産後の夫を交えたカウンセリング等の心のケアも重要となる。体外受精胚移植(IVF-ET)で、不成功になった場合の心の落ち込みは、流産と同等とも推察されるので、不妊クリニックにおいても、IVF治療が不成功になった後の心のケアが、益々重要となっている。

II. 不育症のスクリーニング

図2に不育症のリスク因子の検査項目を一次スクリーニングと選択的検査に分けて示した。一部の検査が薬事未承認のため自費となるが、検査にかかる負担は以前に比して軽減した。図3にこれらリスク因子の頻度を示した。なお、抗リン脂質抗体陽性であれば、12週間後に再検査を行ない、再度陽性であれば抗リン脂質抗体症候群と確定診断できる。陰性化した際は、偶発的抗リン脂質抗体(まだ用語は確定していない)となる。

III. 各リスク別の治療

不育症の治療は多岐に渡るため、専門医師の診断を仰いだ方がよい場合もあるが、ここでは代表的な治療方法を提示する。

1) 子宮形態異常

子宮奇形という用語は子供にも遺伝するという誤解を招くため、用いない方がよい。子宮形態異常で手術の対象となるのは、中隔子宮と双角子宮になる。その他の弓状子宮などは、手術療法の有効性に対する十分なエビデンスがない。中隔子宮でも、すべての症例が流産のリスクになるのではなく、中隔の突出度(D)と、内子宮口から中隔頂部への長さ(C)の比(D/C)が0.61以上だと流産のリスクが高くなるという報告があるので⁸⁾、D/C比が0.61未満であれば、経過観察も選択肢の一つになる。最近、3D超音波により子宮内膜が明瞭に描出されるようになったので、スクリー

ニングとしては子宮卵管造影法(HSG)より簡便で、患者に与える苦痛も少ない。

2) 甲状腺機能異常

内科の専門医を紹介し、正常機能となってから妊娠を許可する。妊娠後も引き続き治療が必要である。なお、潜在性甲状腺機能低下症に対して、積極的に治療すべきか否かは、結論が出ていないが、筆者は少量の甲状腺剤の投与を内科医に依頼している。

3) 染色体異常

まず検査をする前に十分なカウンセリングを行ない、結果によっては一方の配偶者が不利益を得ないような配慮が必要である。すなわち、夫婦のいずれかに異常があるということを知らせる選択肢があることを、あらかじめ伝えておく。

異常が認められた際、十分な遺伝カウンセリングを行なうとともに、正しい知識を伝えることが大切である。すなわち、流産率は高いが、妊娠を繰り返すことで、80%以上の高い累積生児獲得率が得られること、不均衡型染色体異常を持って生まれる確率は、1%と低い(不均衡型だと、多くは流産するため、流産しないで生まれてくる子供の異常は低い)ことを説明する。均衡型転座の場合は、上記を説明した上で、羊水染色体検査のメリット、デメリットを述べた上で、検査を受けるかどうかを夫婦で選択してもらう。しかし、Robertson型転座では、トリソミーの可能性があるので、羊水検査を勧めた方がよい。

4) 抗リン脂質抗体症候群

低用量アスピリン(50~100mg/日)を、できれば妊娠を計画した時点から黄体期に内服してもらい(月経期には中止する)、妊娠した時点から陣痛発来時点まで、ヘパリンカルシウム5,000単位を朝、夕2回(一日10,000単位)皮下注射する。治療開始後に、ヘパリンに対する抗体が産生されると、ヘパリン起因性血小板減少症(HIT)が生じ、血栓症をきたすことがある。HITは投与後2週間以内に生じることが多いので、ヘパリン投与2週間以内に複数回、血小板数を測定し、低下していればヘパリン投与を中止する。自己注射に関するDVDやマニュアルが作製されているので、参考にしていきたい。またAPTT値は、初期値の1.5倍を越えないように容量を調節する。なお、偶発的抗リン脂質抗体例も、無治療だと流産率が高いことが、経験上知られているため、低用量アスピリン療法を行なうことも一法である。

5) プロテインS 欠乏症

白人には、プロテインS 欠乏症が0.03~0.13%しかないが、日本人では、1.5%程度がプロテイン

S 欠乏症で、しかも不育症では 7.2% と高率である。妊娠 10 週以降の流産・死産の既往歴が 1 回でもあるプロテイン S 欠乏症では、ヘパリンと低用量アスピリン群の生児獲得率が 78.6% (11/14) であるのに対して、低用量アスピリン群では、7.1% (1/14) の生児獲得率に留まる⁹⁾。したがって、妊娠 10 週以降の胎児染色体異常のない流産・死産の既往があるプロテイン S 欠乏症では、ヘパリンと低用量アスピリン療法が勧められる。

これまで、妊娠 10 週までの流産歴のあるプロテイン S 欠乏症に対しての治療方針は、欧米での症例数の少なさもあり、確定していなかった。厚生労働研究班の不育症データベースで明らかになったこととして、プロテイン S 欠乏症に対して、無治療、低用量アスピリン、ヘパリン＋低用量アスピリンでの生児獲得率は、それぞれ 10.5% (2/19), 71.4% (25/35), 76.9% (40/52) であった。以上より、妊娠 10 週までに流産を繰り返すプロテイン S 欠乏症には、低用量アスピリン療法を行なうことも一法である²⁾。

6) 抗 PE 抗体陽性例

抗 PE-IgG, 抗 PE-IgM 高値は、不育症全体で 34.3%, リスク因子不明/偶発的流産例の 22.6% を占める(図 3)。抗 PE 抗体陽性例に対する治療方針は、厚生労働研究班の間でも意見の一致を見ていない。研究班のデータベースでは、低用量アスピリン療法の有効性が認められたので、低用量アスピリン療法を行なうのも一法である。

7) 偶発的流産/リスク因子不明

検査を行なっても、リスク因子が判明しない際、これまでの流産が胎児染色体異常により生じた可能性が高いことを十分に説明し、原則的に無治療で臨んでも良好な治療成績が得られていることを説明すべきである²⁾。既往流産回数が 2 回、もしくは 3 回の場合、カウンセリングを受け、その他は無治療群での生児獲得率は、それぞれ 81.4% (35/43), 81.0% (17/21) と高い。これらの率は、胎児染色体異常例の流産を除くと、92.1% (35/38), 85.0% (17/20) とさらに高率となる。これらの症例に対するカウンセリングは、極めて有用である。

		検査内容	医療保険の適応	保険点数
一次スクリーニング	子宮形態検査	経膈超音波	○	530 点
		子宮卵管造影		(800 点)
		子宮鏡		
	内分泌検査	甲状腺機能	○	T4: 120 点
		糖尿病検査		TSH: 115 点
	夫婦染色体検査		○	2600 点 分染法加算 400 点
	抗リン脂質抗体	抗カルジオリピン β_2 グルコプロ テイン I 複合体抗体	○	230 点
		ループスアンチコアグラント	○	290 点
抗 CLIgG 抗体		○	250 点	
抗 CLIgM 抗体		× (薬事未承認)	自費	
選択的検査	抗リン脂質抗体	抗 PEIgG 抗体 (抗フォスファチ ジルエタノールアミン抗体)	× (薬事未承認)	自費
		抗 PEIgM 抗体	× (薬事未承認)	自費
	凝固因子検査	第 XII 因子活性	○	240 点
		プロテイン S 活性もしくは抗原	○	170 点
		プロテイン C 活性もしくは抗原	○	260 点
		APTT	○	29 点

計 5234 点
3 割負担だと 15,700 円

図 2 不育症のリスク因子の検査の医療保険適応

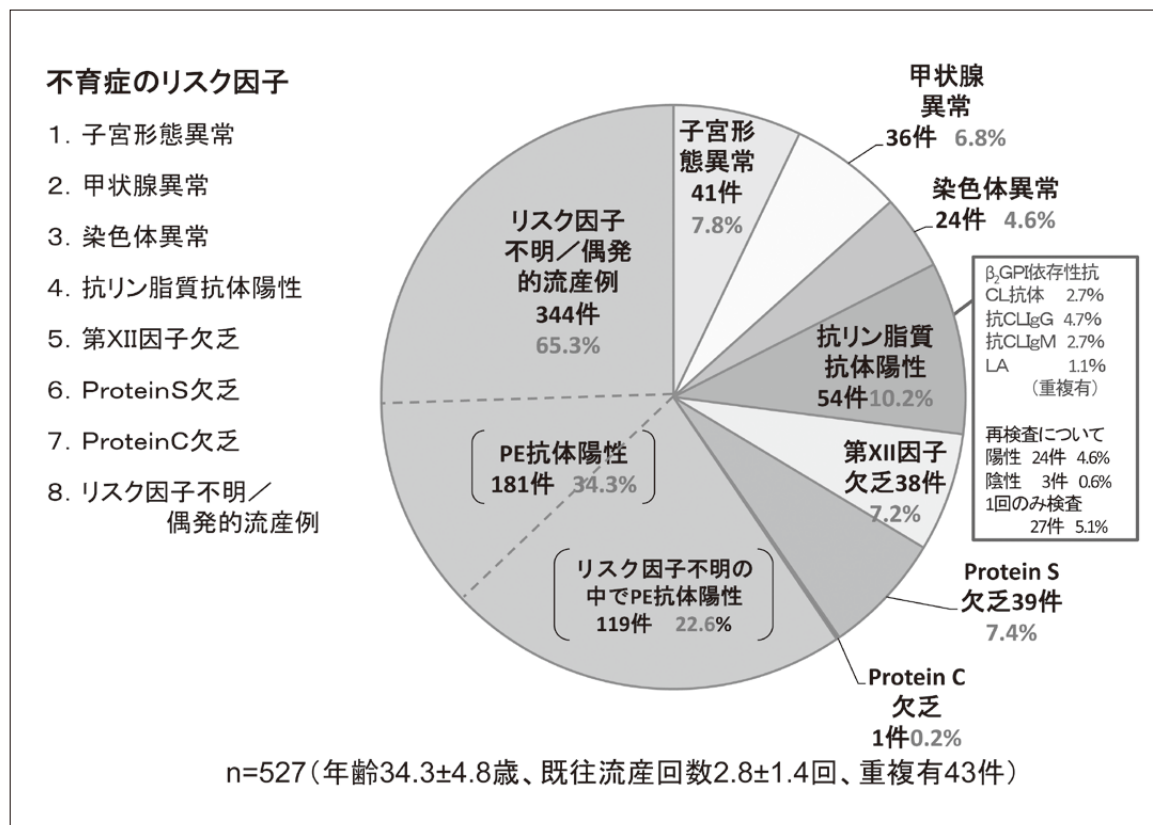


図3 不育症のリスク別頻度

表1 カウンセリングや Tender loving care

表：原因不明不育症例に対する Tender loving care の有用性

対象	成功率		報告者
	Tender loving care	No Treatment	
Unknown etiology この項はまだ APS の概念 ない。子宮形態異常、染色体異 常、内分泌異常は除かれている。	86% (32/37)	33% (8/24)	Stray-Pedersen <i>et al.</i> AJOG 148:140-146, 1984.
Unexplained recurrent pregnancy loss	73.8% (118/160) (妊娠初期から来院)	48.8% (20/41) (妊娠初期に受診せず)	Clifford <i>et al.</i> Hum. Reprod. 12:387389, 1997.
厚労研究データ	75.9% (41/54)	39.6% (19/48)	

Tender loving care は有効

TLC: カウンセリングの他、リスクを十分にスクリーニングして説明すること、治療方針を明確にすること、家族や友人が話を聞いてあげること、職場や近所で気を使わなくてよい配慮、妊娠後に超音波で胎児の状態を観察することも含まれます。

IV. カウンセリングや Tender loving care の有用性

表1に示すように、カウンセリングや優しく労りのある態度で接する Tender loving care は、生児獲得率を高める^{10,11,12)}。妊娠する前に十分な時間を取って、カウンセリングをしたり、夫婦でじっくり話を聞いてあげることも重要で、患者同士のピアサポートも有益である。なかなか、外来では時間を取れないため、各地方自治体に開設された不育症相談窓口を紹介しても良い。また、妊娠してからの Tender loving care は、極めて重要となる。なお、これらのマニュアルは、インターネットで入手できる¹²⁾。また、総説を参考にしていきたい¹³⁾。また、カウンセリングは不妊治療における成功率を向上させるので、今後は保険診療で可能なように働きかけていく必要がある。

V. 不妊症に対する低用量アスピリン、ヘパリン療法の有効性

現在のところ、着床不全や生化学的妊娠を繰り返す症例に対して、低用量アスピリン療法やヘパリン療法を行っても、その有益性は証明されていない。しかし、これらの症例は確実に存在し、臨床家として、何とかしてあげたいと正直思うところはある。今後、不妊症と不育症の境界領域にあるこれらの症例に対して、どのように対応すべきかを、真剣に議論し、解決策を見出していく必要がある。

VI. 不妊治療を行っても臨床的流産を繰り返す症例

不妊治療を行ない、良好胚を移植しても、臨床的流産を繰り返す症例は「不育症」と「不妊症」を併せ持つ症例として認識すべきである。不育症のスクリーニングを行なった上で、不妊クリニックと不育クリニックとのコラボレーションが必要となる。

おわりに

不妊症治療を専門に行なっている医療関係者が集まる IVF 学会で、不育症のことをお話しする機会を得たことは、筆者にとり大きな喜びである。不育症のことが、ようやく注目されるようになってきたので、今後はエビデンスに基づいた検査や治療が行なわれ、従来、軽視されていたカウンセリング療法を行なって、不育症で悩んでおられる方々が無事出産されることを心から願っている。

参考文献

- 1) 厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）「不育症治療に関する再評価と新たな治療法の開発に関する研究」。平成 20～22 年度総合研究報告書，2011。研究代表者 齋藤 滋。
- 2) 厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）「不育症治療に関する再評価と新たな治療法の開発に関する研究班を基にした不育症管理に関する提言」，2011。研究代表者 齋藤 滋。
- 3) ACOG practice bulletin: management of recurrent early pregnancy loss. No. 24. Washinton, DC : American College of Obstetricians and Gynecologists, February 2001.
- 4) Birmingham, AL.: Patient's fact sheet: recurrent pregnancy loss. American Society for Reproductive Medicine, 2008.
- 5) Zinaman, MJ., Clegg, ED., Brown, CC., O'Connor, J., Selevan, SG.: Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil. Steril.*, 65 : 503-509, 1996.
- 6) Branch, DW., Gibson, M., Silver, RM.: Recurrent miscarriage. *N Engl. J. Med.*, 363 : 1740-1747, 2010.
- 7) Sugiura-Ogasawara, M., Suzuki, S., Ozaki, Y., Katano, K., Suzumori, N., Kitaori, T.: Frequency of recurrent spontaneous abortion and its influence on further marital relationship and illness: the Okazaki Cohort Study in Japan. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 39 : 126-131, 2013.
- 8) Sugiura-Ogasawara, M., Ozaki, Y., Kitaori, T., Kumagai, K., Suzuki, S.: Midline uterine defect size is correlated with miscarriage of euploid embryos in recurrent cases. *Fertil. Steril.*, 93 : 1983-1988, 2010.
- 9) Gris, JC., Mercier, E., Quéré, I., Lavigne-Lissalde, G., Cochery-Nouvellon, E., Hoffet, M., Ripart-Neveu, S., Tailland, ML., Dauzat, M., Marès, P.: Low-molecular-weight heparin versus low-dose aspirin in women with one fetal loss and a constitutional thrombophilic disorder. *Blood*, 103 : 3695-3699, 2004.
- 10) Stray-Pedersen, B., Stray-Pedersen, S.: Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 148 : 140-146, 1984.
- 11) Clifford, K., Rai, R., Regan, L.: Future pregnancy outcome in unexplained recurrent first trimester miscarriage. *Hum. Reprod.*, 12 : 387-389, 1997.
- 12) 厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）「地域における周産期医療システムの充実と医療資源の適正配置に関する研究」：反復・習慣流産（いわゆる「不育症」）の相談対応マニュアル。2011。http://fuiku.jp
- 13) 齋藤 滋：「反復・習慣流産（いわゆる『不育症』）の相談対応マニュアル」について。助産雑誌，66 : 845-848, 2012。

受精卵の取り違い防止における 電子認証システムの重要性

岩山 広, 石山 舞, 下田 美怜, 山下 正紀

山下レディースクリニック 〒651-0086 神戸市中央区磯上通 7-1-8 三宮インテス 4F

要 旨： 不妊治療において、受精卵の取り違い防止は極めて重要であり、検体の移動時点での正確性をどのように担保していくのが重要な課題となっている。我々は電子認証システムを導入し、従来からの人間系認証システム（ダブルチェック）と共に運用している。本研究では、電子認証記録から1回の認証行為において施行者が目的と異なる検体の移動元・移動先を準備する誤認率を算出した。さらに、それらを基に人間系認証において検体の取り違いが起こる見かけ上の誤認率を予測し、人間系認証の問題点と電子認証の必要性を考察した。電子認証記録4698件のうち、患者認証における誤認事例が8件（0.170%）みられた。電子認証から得られた施行者別の誤認率は0-0.620%であり、そこから算出された人間系認証の誤認率は0-0.102%であり、その精度は不安定である可能性が示された。故に、常に一定の精度での認証を行える電子認証は、安定した検体認証システムを構築するための非常に有力なツールの1つになるものと思われた。

キーワード： 誤認率、ダブルチェック、電子認証システム、取り違い、人間系認証システム

はじめに

医療行為において、患者とそれに属する検体あるいは投薬処置に対する誤認はしばしば起こりうるものである¹⁾、結果的に患者に多大な不利益をもたらすことになる。不妊治療においては、重大な医療過誤の1つに受精卵の取り違いが挙げられる。万が一、受精卵が取り違いられたならば、その社会的な問題の大きさもさることながら、着床あるいは出産にまで至りその事象が認識された場合には、人工妊娠中絶の可能性あるいは親子関係をめぐる係争事件にまで発展する可能性など、患者自身への精神的および身体的負担は計り知れないものとなることが予想される。そのため、受精卵を取り扱う処置時点での正確性や安全性をどのように担保していくのが重要な課題となっている。近年、バーコードなどを利用した電子的な認証システムが医療行為の安全性を保証するための手段の1つとして認識されつつある^{2,3)}。一般的にこのような電子認証システムは、従来からの人間系の認証システムよりも効率的かつ正確に認証行為が実施できると考えられる。

これらを背景に、我々は、受精卵の取り違いを防止するための処置行為の枠組みとして5つの的確さ（5 Rights）—「正しい時間（Right time）」に「正しい患者（Right patient）」に対して「正しい処置（Right treatment）」が「正しい手

順（Right procedure）」で実施され「正しい記録（Right document）」がなされている。—を定義し、QRコードによる電子認証システムを独自に構築し、人間系の認証システムであるダブルチェックと共に運用している。

本研究では、電子認証システムにおいて、特に取り違いと直接的に関係する患者認証の誤認事例に着目し、1回の認証行為において施行者が対象とする患者と異なる検体の移動元あるいは移動先を準備する誤認率を算出することで検討した。さらに、電子認証記録より得られた人間の単独誤認率を基に人間系のダブルチェックの場合の潜在リスクを予測し、人間系の認証システムの問題点と電子認証システムの重要性を考察した。

対象と方法

電子認証システムと培養室業務

QRコードの生成およびラベル印刷ソフト（ラベル屋さんHOME Ver.8.26; A-one）により作成されたラベルシール（#73125; A-one）には、患者氏名、IDおよび処置内容が格納されたQRコードが付与されており、それらは、ラボシート（患者毎に作成される胚培養の記録用紙）および検体の移動元・移動先（培養ディッシュ等）に貼り付けられる。検体の電子認証作業は、赤色LEDを読み取り光源とする2次元バーコードリーダー

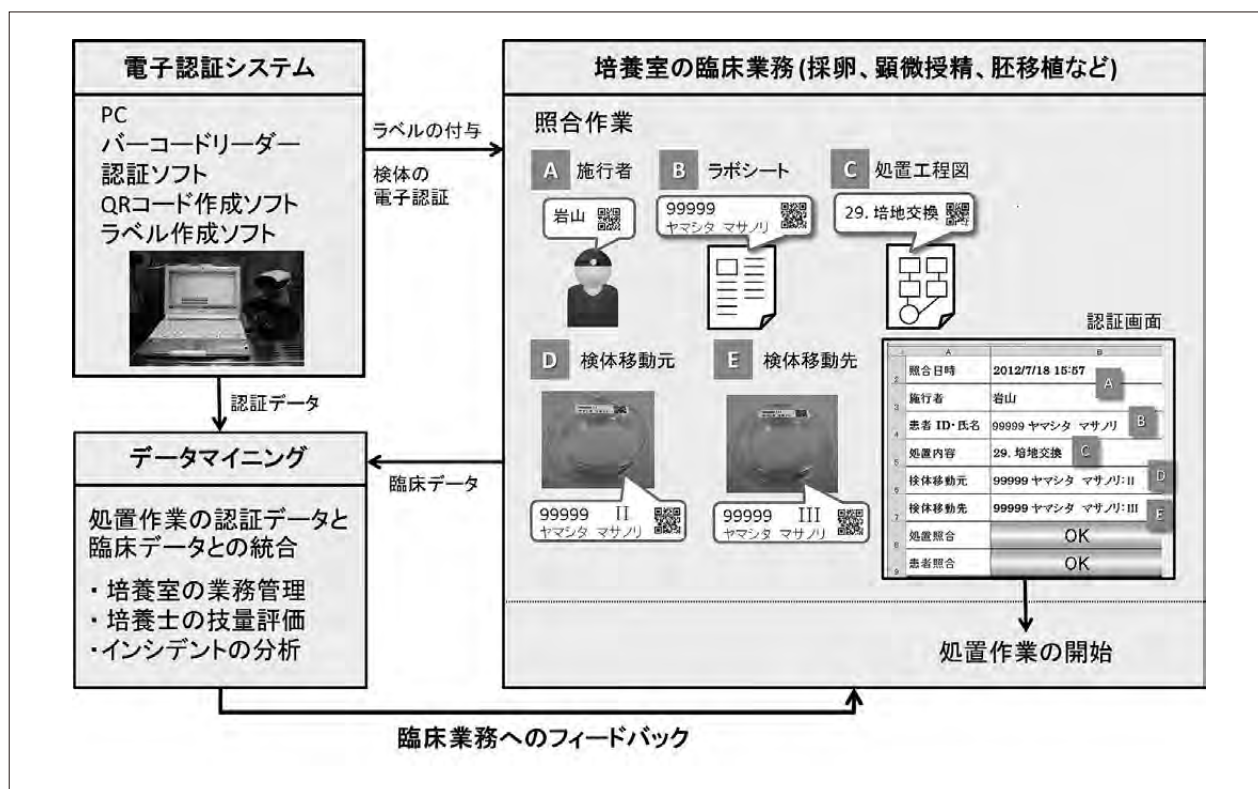


図1 電子認証システムと培養室業務

(Xenon 1902gHD; Honeywell) で連続的に対象となるQRコードを読み込むことで進められる。まず、処置作業の施行者に付されたQRコードを読み込むことで施行者登録を行い(図1A), それに伴って日時が自動入力される(図1A)。次に、ラボシートに付されたQRコードから患者登録を行い(図1B), 処置工程図から該当する処置のQRコードを読み込む(図1C)。そして、検体移動元および移動先となるディッシュを準備し、検体の移動順位に従って検体移動元(図1D) から移動先(図1E) へとディッシュ本体側面のQRコードを読み進める。最終的に、読み込まれた各々のQRコードの情報に基づき認証ソフト(YLC検体照合システムVer.3.0; Excelで自作)により処置内容(検体の移動順位を含む)および患者情報が照合され合致することでPC画面上にOK表示がされ、処置作業の開始となる。一方で、異なる順位で検体移動元と移動先を読み込んだ場合、あるいは、処置内容の登録に対して異なる検体の移動元と移動先を準備し読み込んだ場合には、PC画面上に処置認証に関してNGであることが表示され警告を促す仕様になっている。また、登録された患者情報に対して異なる検体移動元あるいは移動先を準備し読み込んだ場合にも、患者認証に関して同様な警告を発するようになっている。これらによって処置作業実施時に、それぞれRight procedure / Right treatment / Right patientが担保される。なお、一

連の電子認証の過程、つまり、胚の読み取り光源への瞬間的な曝露や培養器外での僅かな処置作業時間の増加により、胚発生能が低下するような傾向は認められていない(データ未発表)。そして、自動記録される処置実施時間を含む認証データは、インターネットオフライン、多重バックアップ環境下で保護・管理される。これらより実施された処置作業に対してのRight time / Right documentが担保される。後に認証データは、臨床へのフィードバックを目的としたデータマイニング、つまり、培養室の業務管理、培養士の技量評価およびインシデントの分析などに用いられる。

電子認証記録の解析

対象は2012年4月から12月に体外受精、顕微授精あるいは凍結融解胚移植の適応となった治療周期における4698件の電子認証記録とした。これらの記録には、処置認証あるいは患者認証がNGとなる事例が確認されているが、本研究では取り違えと直接的に関係する患者認証の誤認事例に着目し解析を行った。処置作業の施行者(勤務体系、勤続年数)は、A(常勤、7年)、B(常勤、3年)、C(常勤、2年)、D(非常勤、7年)およびE(非常勤、3年)の5名であった。処置作業の内容に関しては、常勤スタッフは培養室における処置作業全般を行い、非常勤スタッフは精液調整・検査を中心に行なっている。

患者認証がNGとなる事例については、登録されたラボシートからの患者情報に対する検体移動元あるいは移動先の患者情報が異なる場合であり、例えば、移植胚の準備をする際に、事前に登録した患者とは異なる培養用ディッシュあるいは胚移植用ディッシュ、またはその両方を準備した施行者単独の誤認事例となる。このような患者認証のNGケースの発生状況を検討するために、一部誤認事例の発生状況の詳細を示すとともに、処置作業の内容（受精確認、凍結、採卵準備～採卵、ET準備～新鮮胚移植、凍結・午前、精子調整、卵丘除去、ET準備～凍結胚移植、ICSI、培地交換、媒精、凍結・午後）および単日の処置の平均実施時間帯（平均開始時刻から平均終了時刻）、そして処置の施行者（A, B, C, D, E）に着目して誤認率を算出した。さらに、施行者の単独誤認率と同様の誤認率を確認者が有すると仮定し、施行者と確認者の2人が検体を誤認する見かけ上の確率（該当する2人の単独誤認率の積）、すなわち人間系のダブルチェックにおいて検体の取り違えが起こる潜在的な誤認率を算出した。

本研究では、解析対象とする誤認事例数が母数となる照合件数に対して極めて少数であり統計学的解析を適用するには至らなかった。

結 果

典型的な誤認事例の一例

処置内容： 精子調整

対象症例： IVF症例4件分の精子調整
(うち2症例は発音の似かよった患者氏名)

発生時刻： 9:54

処置施行者： E

業務の状況： 他スタッフの欠勤により1人で4件の精子調整を行う。1人の施行者が複数件の精子調整を同時進行することを認めていないので、精子調整の工程を重複なく4件分実施し媒精時間に間に合わせる必要があった。

誤認の内容： 最初に調整に使用するすべての器具にラベルシールを張り付け、それらを症例ごとの個別の容器に移動させるときに、氏名の似かよった患者の遠沈管が入れ替わって配置されていた（現在は工程毎に器具を準備してラベルシールを付与している）。結果として、遠心洗浄の工程で電子認証システムの患者認証がNGを示すことで認知された。

表1 処置内容および実施時間帯が患者認証の誤認率に及ぼす影響

処置内容	処置実施の平均時間帯 *	誤認事例発生時刻	認証件数	誤認件数	誤認率(%)
受精確認	8:26 - 8:30	7:54**	293	1	0.341
融解	8:38 - 9:23	9:14	294	1	0.340
採卵準備～採卵	8:53 - 9:25	8:38**	683	1	0.146
ET 準備～新鮮胚移植	9:04 - 9:30	8:38**, 9:33**	570	2	0.351
凍結 (午前)	10:04 - 10:41	-	301	0	0
精子調整	10:09 - 11:37	9:50**, 9:54**, 11:21	853	3	0.352
卵丘除去	11:07 - 11:16	-	309	0	0
ET 準備～凍結胚移植	12:03 - 12:45	-	324	0	0
ICSI	12:05 - 13:06	-	640	0	0
培地交換	12:16 - 12:31	-	168	0	0
媒精	12:50 - 12:57	-	186	0	0
凍結 (午後)	15:24 - 15:57	-	77	0	0

* 単日における処置の平均開始時刻から平均終了時刻を示す。

** 平均実施時間帯から逸脱した誤認発生時刻を示す。

電子認証の照合記録からみた患者認証の誤認事例の発生状況

電子認証の照合記録の4698件のうち患者認証が誤認であった事例は8件（0.170%）であった。それら8件の誤認事例について、処置の内容および実施時間帯が患者認証の誤認率に及ぼす影響を表1に示した。誤認事例は、受精確認、融解、採卵準備～採卵、ET準備～新鮮胚移植および精子調整の処置において認められ、各々の誤認率は、0.341%（1/293）、0.340%（1/294）、0.146%（1/683）、0.351%（2/570）および0.352%（3/853）であった。また、それぞれの処置の単日の平均実施時間帯と誤認事例の発生時刻は、8:26-8:30（7:54）、8:38-9:23（9:14）、8:53-9:25（8:38）、9:04-9:30（8:38、9:33）および10:09-11:37（9:50、9:54、11:21）であっ

た。次に、施行者が患者認証の誤認率に及ぼす影響を表2に示した。施行者A、B、C、DおよびEの各々の誤認率は、0.118%（2/1700）、0.164%（1/609）、0.140%（2/1425）、0%（0/480）および0.620%（3/484）であった。

人間系の認証システム（ダブルチェック）の潜在リスクの評価

見かけ上の処置実施者および確認者の組み合わせが人間系のダブルチェックの潜在的な誤認率に及ぼす影響を図2に示した。施行者と確認者の組み合わせA/B、A/C、A/E、B/C、B/EおよびC/Eの潜在的な誤認率は、0.019%、0.017%、0.073%、0.023%、0.102%および0.087%であった。施行者Dの関する組み合わせについてはすべて0%であった。

表2 処置の施行者が患者認証の誤認率に及ぼす影響

施行者	勤務形態	勤続年数（年）	認証件数	誤認件数	誤認率（%）
A	常勤	7	1700	2	0.118
B	常勤	3	609	1	0.164
C	常勤	2	1425	2	0.140
D	非常勤	7	480	0	0
E	非常勤	3	484	3	0.620

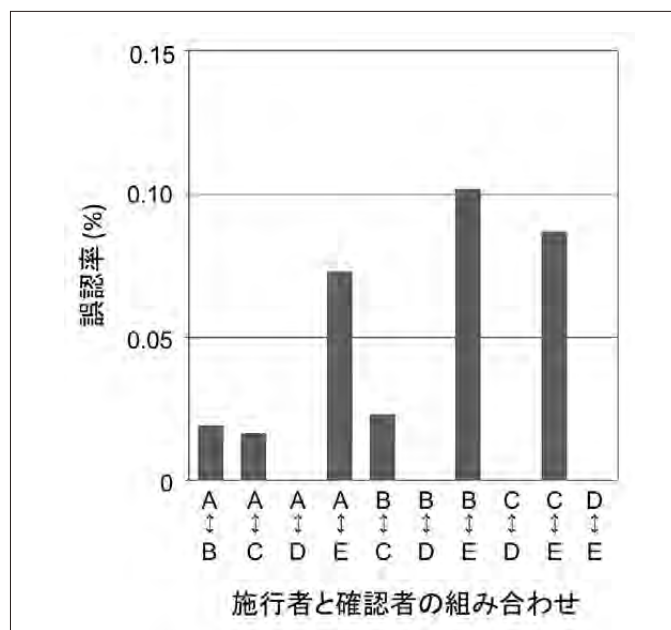


図2 処置実施者および確認者の組み合わせが人間系のダブルチェックの潜在的な誤認率に及ぼす影響

考 察

MEDLINE/PubMedにおいて、“受精卵（配偶子）の取り換え”は“IVF, mix up”という単語で検索することができる。1999年にはアメリカにおいて、白人カップルから黒人と白人の双子が生まれたことが報告された⁴⁾。これは本来凍結保存される予定の黒人カップルの受精卵が白人カップルの受精卵と共に移植された事例であった。また、2003年にはイギリスにおいて、黒人カップルの精子が取り換えられて白人カップルの顕微授精に用いられ、白人カップルから黒人の双子が生まれた事例が報告された^{5, 6)}。取り換えの個々の事象については、これらのように患者が被る負担や社会的影響については幾つかの報告が散見されるものの、我々が知る限りにおいて、実際の臨床の現場において具体的な検体誤認のリスクを示した報告はない。本研究では、実際に臨床で蓄積された検体の照合記録から検体誤認のリスクを示すとともに、人間系の認証システムの問題点と電子認証システムの重要性を考察した。

本研究において、電子認証の照合記録4698件のうち8件（0.170%）の患者認証の誤認が認められ、その発生状況を処置内容および処置実施時間帯により分類した。注目すべきは、受精確認から精子調整までの約3時間の時間帯にすべての誤認事例が集中していることである。この時間帯に実施される受精確認は前日の採卵症例を対象とし、新鮮ETについては分割期胚あるいは胚盤胞期胚の移植など複数の採卵日の症例を対象としている。一方で、卵丘除去以降の処置と時間帯において誤認事例は認められなかった。これらは、短時間に複数症例に対して様々な処置を実施しなければならない状況が誤認を誘発する要因の1つになっている可能性を示しているものと思われる。また、実際の誤認事例の発生時刻に着目すると、6件の事例において平均的な処置時間帯を逸脱していることが認められた。これは、通常とは異なる時間配分で業務が進行されることが誤認を発生させる可能性を示しており、症例が過密になる状態、あるいは、培養室内の処置工程に大幅な変更があったときなど、特に十分な注意を払う必要があるのかもしれない。

患者認証における誤認事例を処置施行者別に分類したところ、各施行者の誤認率は、0%（0/480）から0.620%（3/484）であり一様ではなかった。また、これらの誤認率と勤務形態や勤続年数など経験に関わる項目との間に関連性を見出すことはできなかった。このような誤認事例には、個人の性格やその時の精神状態および体調など客観的に評価することが困難な要因が影響を及ぼしているのかもしれない。次に、施行者別の単独

の過誤率を基に、人間系の患者認証（ダブルチェック）の見かけ上の取り換えの確率を算出したところ、0%（組み合わせ：B/D, C/D, D/E）から0.102%（組み合わせ：B/E）となり、施行者と確認者の組み合わせにより一様ではないことが示された。加えて実際の施行者と確認者との関係には、「どちらか一方が確認をしているだろう」という相互依存、「目上の人に誤認の可能性を指摘できない」という権威勾配、あるいは、「確認者に誤認を判断するだけの知識や経験が不足している」場合などが想定され、人間系のダブルチェックの精度はさらに不安定になることが予測された。

取り換えの防止には、患者認証において誤認の発生そのものを低減するために採卵症例や処置の分散をすること、処置の手技工程をより簡便にすること、あるいは、安定した認証精度で誤認を摘みとるシステムを構築することが重要であると考えられる。しかし、臨床における採卵日の決定や処置の業務工程は、患者の都合や外来業務との連携の上に成り立っているものであり容易に変更できるものではない。また、手技工程に関しても、各々の培養室で既にある程度洗練されたものである場合が多く劇的な改善を望むことは難しいのかもしれない。また、このような状況において、安定した人間系のダブルチェックを実施するために、各人の精神状態や人間関係にまで踏み込んで人員配置をすることも困難であるように思える。それ故に、どのような状況においても一定の精度での認証を行える電子認証システムを導入することは有効な対策の1つであると考えられた。

電子認証システムを臨床に導入することで、Poonらは、薬剤管理における誤認率が11.5%から6.8%へ、患者への投薬時の誤認率が3.1%から1.6%へ減少したと、その有効性を報告している³⁾。また、Haydenらは、小児がんの検体管理における誤認率が0.03%から0.005%に減少したと報告している⁷⁾。一方で、電子認証システムにおいて、使用時の人間による操作ミス、バーコードの読み取り機器の不具合、ソフトウェアの不具合あるいは対象に付与されたバーコードの不具合で、電子認証システムが機能しなかったケースも報告されており⁸⁾、決して100%の誤認の回避を保証するものではないこともうかがえた。

本研究より、電子認証の照合記録からは検体認証における各人の認証精度は一様ではないことが示された。さらに、人間系のダブルチェックを想定した場合、処置施行者と確認者の組み合わせが異なるだけで取り換えの潜在的なリスクは変化し、その認証精度は極めて不安定であることが示された。これらのことから、人間系の認証に何らかの異なる認証システムを付加する（あるいは代

替する) 必要があることは明白であり, 故に, 検体に対して “5 Rights” を担保でき一定の判断精度での認証を行える電子認証システムは, 安全な検体認証システムを構築するうえで非常に有力なツールの1つになるものと思われた。

参考文献

- 1) Brennan, TA., Leape, LL., Laird, NM., Hebert, L., Localio, AR., Lawthers, AG., Newhouse, JP., Weiler, PC., Hiatt, HH.: Incidence of adverse events and negligence in hospitalized patients. Results of the Harvard Medical Practice Study I. N. Engl. J. Med., 324: 370-376, 1991.
- 2) Sandler, SG., Langeberg, A., Dohnalek, L.: Bar code technology improves positive patient identification and transfusion safety. Dev. Biol (Basel)., 120: 19-24, 2005.
- 3) Poon, EG., Keohane, CA., Yoon, CS., Ditmore, M., Bane, A., Levitzion-Korach, O., Moniz, T., Rothschild, JM., Kachalia, AB., Hayes, J., Churchill, WW., Lipsitz, S., Whittemore, AD., Bates, DW., Gandhi, TK.: Effect of bar-code technology on the safety of medication administration. N. Engl. J. Med., 362: 1698-1707, 2010.
- 4) Gottlieb, S.: US couple files malpractice lawsuit against doctor for embryo mixup. BMJ., 318: 1025, 1999.
- 5) Dyer, C.: Biological father declared the legal father in IVF mix up. BMJ., 326: 518, 2003.
- 6) Spriggs, M.: IVF mixup: white couple have black babies. J. Med. Ethics., 29: 65, 2003.
- 7) Hayden, RT., Patterson, DJ., Jay, DW., Cross, C., Dotson, P., Possel, RE., Srivastava, DK., Mirro, J., Shenep, JL.: Computer-assisted bar-coding system significantly reduces clinical laboratory specimen identification errors in a pediatric oncology hospital. J. Pediatr., 152: 219-224, 2008.
- 8) Ohsaka, A., Kobayashi, M., Abe, K.: Causes of failure of a barcode-based pretransfusion check at the bedside: experience in a university hospital. Transfus. Med., 18: 216-222, 2008.

配偶子・受精卵染色体と異常

中岡 義晴, 前沢 忠志, 大西 洋子, 姫野 隆雄, 井上 朋子, 伊藤 啓二郎, 森本 義晴

医療法人三慧会 IVF なんばクリニック 〒550-0015 大阪市西区南堀江1丁目17-28

要 旨： 生殖補助医療における様々な技術的な革新が行われた現在においても、その治療成績、特に生児獲得の成績は未だ満足できるものではない。その成績を決定する大きな要因である胚の質は、胚の染色体構成を評価することが重要となるが、必ずしも胚発育や形態学的な評価では染色体異常の有無を判別することができない。通常、分割胚では約70%、胚盤胞においても約50%と高率に染色体異常が認められることがわかってきている。さらに、その異常率は女性の加齢と共に増加し、高い染色体異常胚がもたらす高年齢女性における妊娠率の低下と流産率の上昇は生殖医療の大きな課題となっている。そこで今回、精子や卵子の配偶子、および受精卵の染色体に関する最新のデータを集め、考察した。

キーワード： 卵子, 精子, 受精卵, 染色体異常, モザイク

はじめに

高度な生殖医療としての体外受精胚移植が臨床の場で実施されるようになってから、すでに35年が経とうとしている。その間に、顕微授精などの革新的な技術の進歩も認められたものの、生児獲得の治療成績は必ずしも満足できるものではない。

女性の年齢が高くなるに従い、形態良好胚を移植するもののその妊娠率は低下し、さらに妊娠後の流産率は上昇する（図1）。それは胚質が胚の形態のみでは診断できないことを示しており、良好胚か否かを決定する大きな

要因が胚の染色体にあると考えられる。近年、分子生物学的検査法の発達により、今まで不明であった染色体の情報が詳細に正確に得られるようになってきた。

分割胚の染色体異常率は約70%と高率でかつモザイクの割合が高いことが報告¹⁾され、さらに胚盤胞においても約50%に染色体異常が存在すると報告²⁾³⁾されている。体外受精の治療成績は胚の染色体異常が左右すると言っても過言ではない。

今回、生殖医療における最大の問題となっている配偶子、胚の染色体異常に関して文献的考察を中心に述べてみたい。

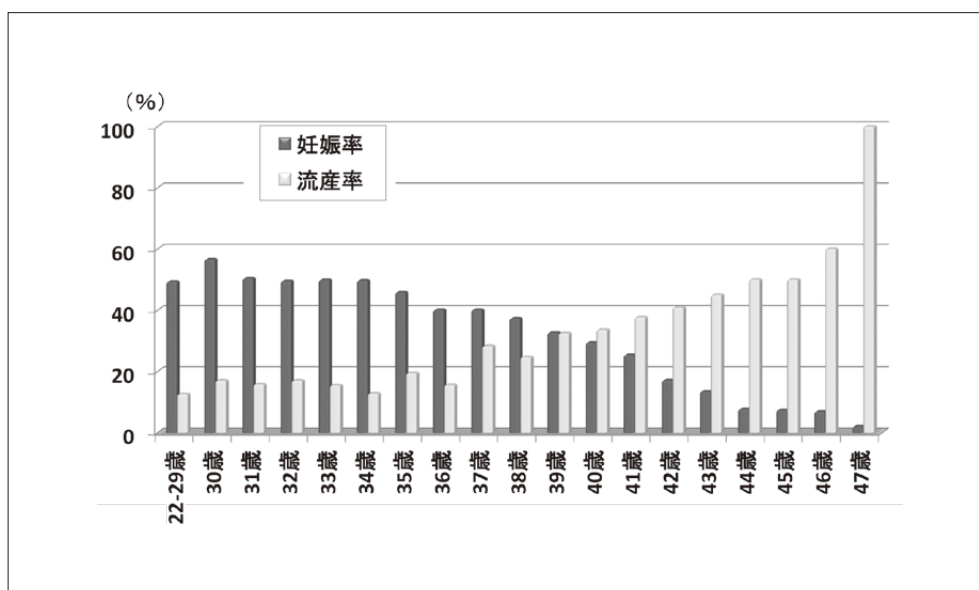


図1 当院の体外受精における年齢別の妊娠率、流産率

受付 2013年1月30日 / 受理 2013年2月27日

著者連絡先：中岡 義晴 e-mail [nakaoka@ivfnamba.com]

染色体異常の種類

染色体異常の種類およびその形成に関して述べたい。

染色体異常は大まかに分類して、異数性異常、倍数性異常、構造異常、モザイクがある。数の異常のうち、異数性異常は染色体単位での数の増減であり、倍数性異常は染色体23本単位で増減する異常である。その発生メカニズムは、異数性異常が主として配偶子形成時の減数分裂の染色体の分離異常により生じるものに対し、倍数性異常は配偶子形成時の分裂異常(極体放出不全など)、多精子受精さらに受精後の分裂異常などにより生じる。構造異常は転座、欠失、重複、逆位など染色体の形の異常である。親からの遺伝により生じるものや、主として精子に由来する偶然に生じるものがある。モザイクは、胚のそれぞれの細胞の染色体が単一でなく複数混在している状態である。受精後の細胞分裂時に、一部の細胞が染色体不分離や分裂異常が生じることにより形成される。

配偶子(卵子, 精子)の形成

卵子や精子の配偶子形成には、染色体が半数になる減数分裂が必要となる。卵子と精子では減数分裂がかなり異なり、その違いが染色体異常の頻度や種類の違いを引き起こしている。

卵子の減数分裂は胎生3-7ヶ月から開始し、胎生期の後半に第一減数分裂前期の複糸期(網糸期)で分裂を停止する。思春期になり月経が開始すると減数分裂が再開し、発育した卵胞から排卵した卵子は第二減数分裂中期にまで進む。その後、受精により卵子は第二極体を放出

し第二減数分裂を完了させる(図2)。

卵子は女性の年齢が高くなるほど減数分裂途中の不安定な時期が長いことになる。さらに、加齢によるホルモンバランスの異常、卵子数の減少、卵胞周囲の血行障害による酸素供給の減少、染色体の凝集・脱凝集の異常、染色分体をつなぐ結合の異常、染色体の分離に必要な紡錘糸の形成能力の低下などにより、染色体の分離障害を生じやすくなるとされている。また、加齢により第一減数分裂前期における相同染色体の交叉を通しての組み換え(キアズマ)が減少することにより、早期の染色体分離(predivision)が生じやすくなる⁴⁾と考えられている(図3)。

一方、精子の減数分裂は卵子形成とは異なり、精原細胞は一生涯分裂増殖を繰り返す。その精原細胞は思春期になると減数分裂を開始し、約24日と短時間で減数分裂は完了する。その後約50日かけて精子が形成される。精子は最小限の細胞質しかなく、DNA損傷を修復する機能も持ち合わせていない。DNAの損傷は構造異常を生じる原因となる(図2)。

配偶子の染色体異常

1) 卵子の染色体異常

胚の染色体異常を生じる直接および間接的な要因の多くが卵子にあると考えられる。

未受精卵を直接固定して染色体分析を行う古典的な染色体分析法では、第一減数分裂での異常率は約20%で、その異常の47%が異数性異常であり、35%が倍数性異常、18%が構造異常であると報告⁵⁻⁷⁾されている。

一方、全染色体を網羅的に分析できるComparative

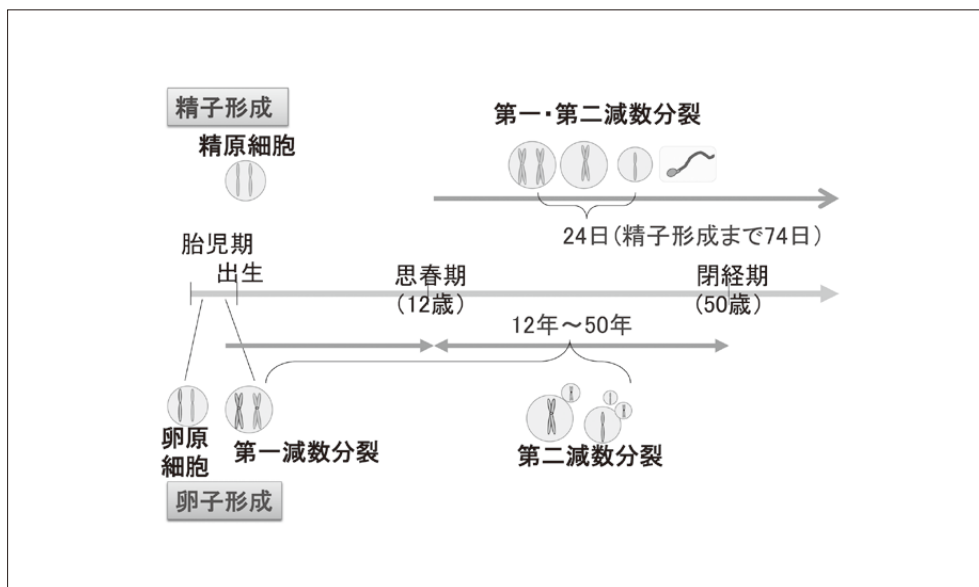


図2 配偶子の減数分裂の特徴

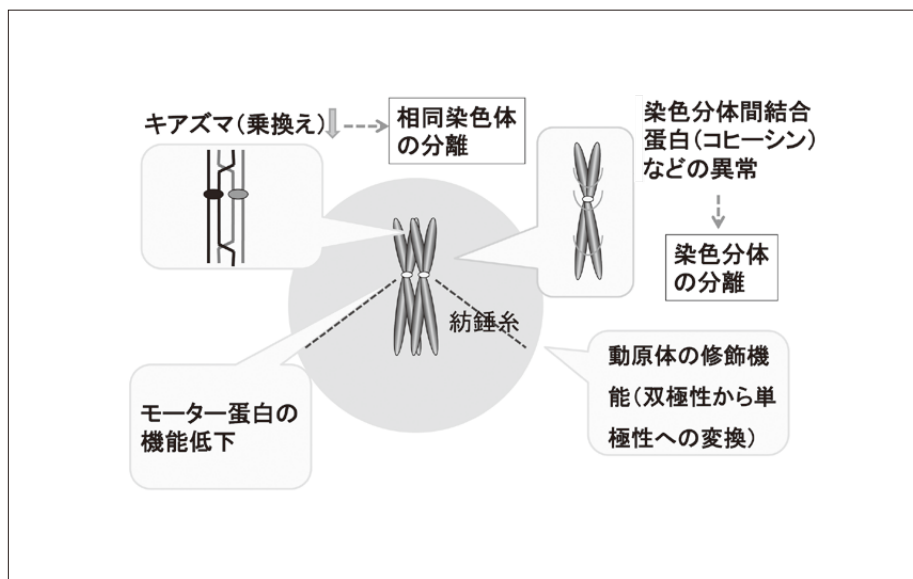


図3 第一減数分裂の染色体不分離の原因

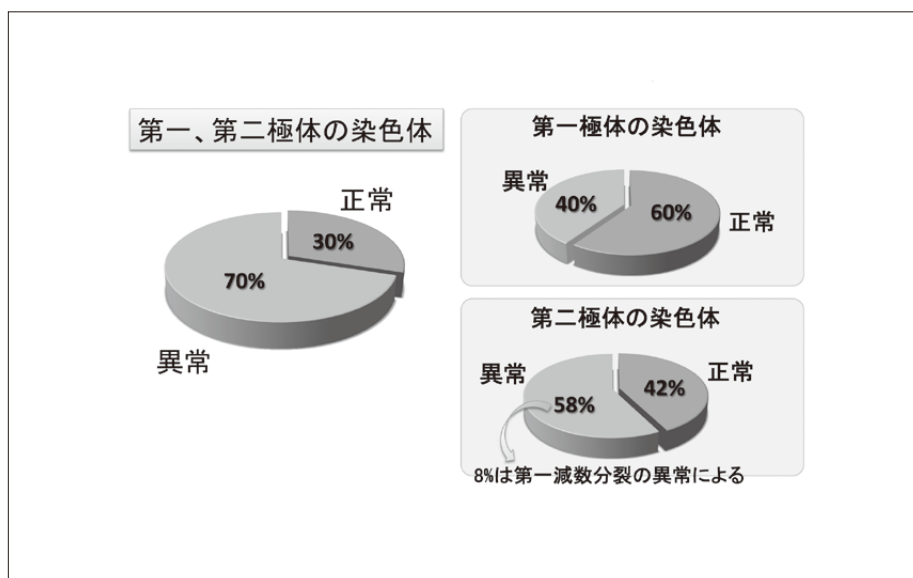


図4 極体の染色体異常

Fragouli E ら⁸⁾

genomic hybridization (CGH) 法を用いて, Fragouli ら⁸⁾ が極体の染色体分析を行っている (図4). 平均年齢が40.8歳の女性から得られた卵子308個を分析し, 第一極体の異常率(第一減数分裂の異常率)が40%, 第二極体の異常率(第二減数分裂の異常率)が57%で, 第一極体と第二極体を合わせた異常率は70%であったとしている. このデータからは, 今まで第一減数分裂で生じる異常が多いと考えられていた卵子の異常は, 実は第二減数分裂の方が多いことが示された. 第二減数分裂は受精後に生じるために, 体外培養環境や受精方法に影響を受ける可能性があることに十分注意が必要である. また, 第一極体の異常は, 染色体型の異常が38%であるのに

対して, 染色分体型の異常が62%と多く, 染色体(二分染色体)が極体と卵細胞とに均等に分離しない染色体型異常より, 第一減数分裂中期までに対合している2本の染色体が早期に分離する⁹⁾ ことにより生じる染色分体型の異常が多数を占めることもわかった. さらに, 異常な染色体の発生頻度には差があり, 流産児に多く認められる15番, 16番, 21番, 22番などの染色体に, 卵子でも高頻度に異常が認められている.

Pellestor ら⁷⁾ は古典的染色体分析法を用い, 792症例から得られた1,397個の未受精卵を染色体分析し, 図5に示すごとく女性年齢が高くなるにつれて卵子異数性異常率が明らかに増えることを報告している.

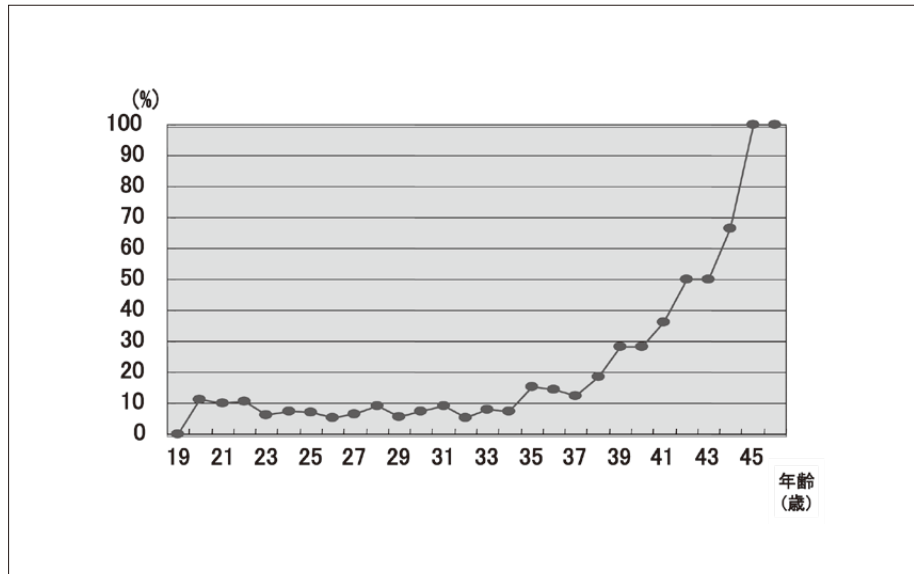


図5 女性年齢と卵子の異数性異常率

Pellestor F. ら⁷⁾

2) 精子の染色体異常

精子の染色体異常の特徴は、異数性異常より構造異常が多く認められることである。Kamiguchi ら¹⁰⁾ はハムスター卵子に正常男性の精子を異種間受精し得られた精子染色体の15.5%に染色体異常を認め、その内訳は異数性異常が1.4%、構造異常が14.1%であったと報告している。精子はDNA損傷に対する修復能を持たないことに加え、ヒト精子は他の動物以上に化学物質等の感受性が高いとされているために、高頻度に構造異常が生じている。

男性も加齢により精液所見は悪化し、妊孕性の低下も認められるが、女性と異なり壮年期を過ぎても比較的妊孕性は維持される。異数性異常と年齢と間にはほとんどの報告が関連を認めない^{10,11)} としているが、Martin ら¹¹⁾ は構造異常率が20-24歳では2.8%であるのに対して45歳以上では13.6%と加齢により高くなるとしている。加齢により精子のクロマチン分子構造が変化しやすくなり、DNAが損傷されやすいため¹²⁾ と考えられている。

体外での培養環境が精子染色体に影響する可能性がある。Munne ら¹³⁾ はヒト精子をBWW培養液中に24時間保存すると、構造異常が3倍増加したとしている。また、立野ら¹⁴⁾ もマウス精子を用いて培養液中で保存したところ、培養時間が長くなれば構造異常率が高くなること、さらに、Watanabe ら¹⁵⁾ は培養液の種類により構造異常率に違いがあることを報告している。精子処理には、適切な培養液の選択と、培養時間を短くするなどの十分な注意が必要であると考えられる。

受精卵の染色体異常

受精卵の染色体異常は、染色体異常の卵子や精子の受精、受精時の異常(多精子受精による倍数性異常)や卵割時の異常(モザイクなど)によって生じる。

正常形態を示す受精卵にも高頻度で染色体異常が存在し、形態不良胚や発育不良胚ではさらに異常率が高くなることがわかっている。

Munne ら¹⁶⁾ は体外受精の発育、形態とも良好な余剰分割胚をFISH法により染色体分析し、染色体異常率が65%であり、異数性異常が23%、モザイクが40%に認められているとしている。分割胚のモザイクの頻度は多くの報告^{17,18)} でも15-50%と高率であるとされている。形態不良胚の染色体異常は、異数性異常は増えないが、モザイクや倍数性異常が多くなるとされている。

また、Mertzanidou ら¹⁾ は、35歳以下の女性から得られた14個の形態良好分割胚からすべての割球をCGH法により染色体分析し、正常胚が28.6%、異常胚が71.4%であり、その異常胚のすべてはモザイクであったとしている。また、染色体異常を持つ割球のうち29%に構造異常が認めている。

さらに、胚盤胞に関しても、その染色体異常率は約50%であると考えられている。Yang ら²⁾ は平均女性年齢31.2歳の胚盤胞425個の44.9%が、Alfarawati ら³⁾ は平均女性年齢38.5歳の胚盤胞500個の56.7%が染色体異常と報告している。Alfarawati らは胚盤胞の発育形態により発育良好胚盤胞(grade 5-6)の染色体異常率が50.8%、初期胚盤胞(grade 1-2)が62.5%と、発育良好胚に染色体異常が少ないとし、内部細胞塊および栄

養膜細胞のgradeはそれぞれ良好なほど染色体異常率が低いとしている。また、異常染色体は数の異常のみならず構造異常が6.5%に認められている。

Yangら(図6)は44.9%に認められる染色体異常の胚盤胞のうち、モノソミーが35%, トリソミーが21%, 2本の重複染色体異常が29%, 3本以上の複雑染色体異常が15%に認められている。モノソミーや複雑な染色体異常胚は胚盤胞にまでは達するが流産児にはほとんど認められないことから、着床するまでの能力は持っていないことを示している。

女性年齢との関連においては、Gutierrez-Mateoら¹⁹⁾は、759個の分割胚から1個の割球採取にてCGH法実施した結果(図7)において、34歳以下で51%, 35-39歳で60%, 40歳以上で78%と年齢との相関を認めている。この検査は胚の中の1細胞のみを染色体分析しているために、胚の染色体異常はそれより高率であることが予想される。

おわりに

ヒトの胚には高率に染色体異常が発生しているが、異常の有無は形態学的な評価では診断することができない。生殖補助医療における成功の鍵は、いかにして染色体異常ない良好胚を得ることができるかにかかっている。女性の加齢とともに胚の染色体異常率が上昇することから、女性年齢が若い時期に積極的な治療を行うことであり、特に35歳を過ぎた女性には生殖補助治療などの積極的な治療を勧めるようにする。また、高年齢女性の治療に対しては、染色体異常の発生を減らす明らかなエビデンスはないがアンチエイジング作用を有する薬剤の使用などもその一つの方法であろう。また、染色体異常の有無を形態学的に評価することができないことから、その診断には直接胚の染色体を調べる着床前染色体スクリーニング以外にはない。海外の報告では、以前実施されていたFISH法に代わり全染色体を正確に診

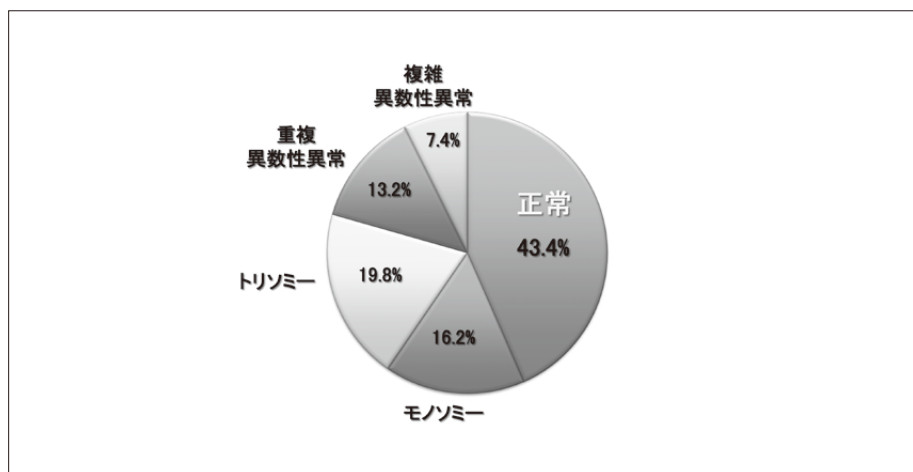


図6 胚盤胞の染色体異常

Alfarawati S ら³⁾

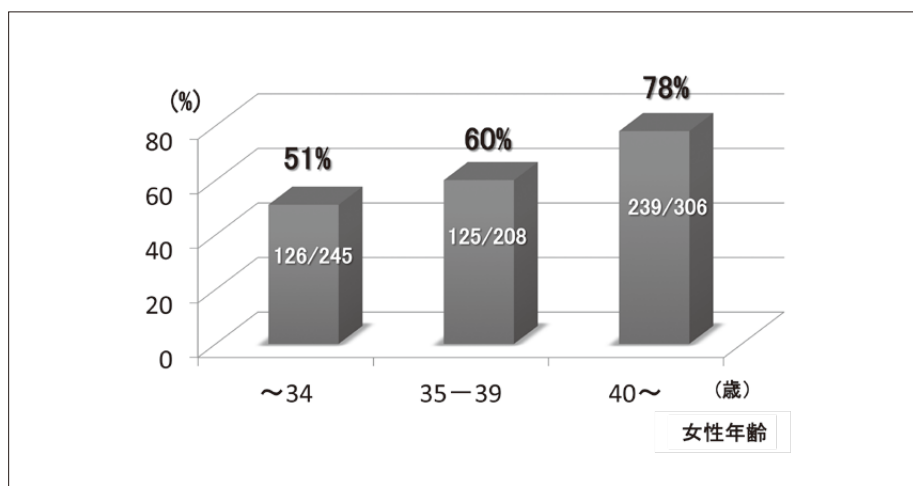


図7 分割胚の異数性異常率

Gutierrez-Mateo ら¹⁹⁾

断できるCGH法を用いた着床前染色体スクリーニングにより妊娠率が有意に上昇するとする報告²⁾がなされるようになってきている。ただ、現在我が国では倫理的な問題からその実施が認められていないが、安全に行うことができ倫理的な問題に一定のコンセンサスができれば、流産率を低下させる意味も含め今後の一つの選択肢となり得ると考えられる。

参考文献

- 1) Mertzaniidou, A., Wilton, L., Cheng, J., Spits, C., Vanneste, E., Moreau, Y., Vermeesch, J.R., Sermon, K.: Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum. Reprod.*, 28: 256-264, 2013.
- 2) Yang, Z., Liu, J., Collins, G.S., Salem, S.A., Liu, X., Lyle, S.S., Peck, A.C., Sills, E.S., Salem, R.D.: Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol. Cytogenet.*, 5:24, 2012.
- 3) Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P., Stevens, J., Gutiérrez-Mateo, C., Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., Wells, D.: The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil. Steril.*, 95:520-524, 2011.
- 4) Hawley, R.S., Frazier, J.A., Rasooly, R.: Separation anxiety: the etiology of nondisjunction in flies and people. *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1521-1528, 1994.
- 5) Nakaoka, Y., Okamoto, E., Mihar, N., Ohama, K.: Chromosome analysis in human oocytes remaining unfertilized after in-vitro insemination: effect of maternal age and fertilization rate. *Hum. Reprod.*, 13:419-424, 1998.
- 6) Kamiguchi, Y., Rosenbusch, B., Stertik, K., Mikamo, K.: Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. *Hum. Genet.*, 90: 533-541, 1993.
- 7) Pellestor, F., Andreo, B., Arnal, F., Humeau, C., Demaille, J.: Maternal aging and chromosomal abnormalities: new data drawn from in vitro unfertilized human oocytes. *Hum. Genet.*, 112: 195-203, 2003.
- 8) Fragouli, E., Alfarawati, S., Goodall, N.N., Sánchez-García, J.F., Colls, P., Wells, D.: The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Mol. Hum. Reprod.*, 17: 286-295, 2011.
- 9) Angell, R.R.: Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum. Genet.*, 86:383-387, 1991.
- 10) Kamiguchi, Y., Tateno, H., Mikamo, K.: Chromosomally abnormal gametes as a cause of developmental and congenital anomalies in humans. *Cong. Anom.*, 34:1-12, 1994.
- 11) Martin, R.H., Rademaker, A.W.: The effect of age on the frequency of sperm chromosomal abnormalities in normal men. *Am. J. Hum. Genet.*, 41:484-492, 1987.
- 12) Buwe, A., Guttenbach, M., Schmid, M.: Effect of paternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human spermatozoa. *Cytogenet. Genome. Res.*, 111: 213-228, 2005.
- 13) Munne, S., Estop, A.M.: Chromosome analysis of human spermatozoa stored in vitro. *Hum. Reprod.*, 8: 581-586, 1993.
- 14) 立野裕幸: 配偶子の体外操作が惹起する染色体異常. 産婦人科の実際, 55: 197-205, 2006.
- 15) Watanabe, S.: Frequent structural chromosome aberrations in immotile human sperm exposed to culture media. *Hum. Reprod.*, 19: 940-947, 2004.
- 16) Munne, S., Alikani, M., Tomkin, G., Grifo, J., Cohen, J.: Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.*, 64: 382-391, 1995.
- 17) Bielanska, M., Tan, S.L., Ao, A.: Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in vitro: incidence, type and relevance to embryo outcome. *Hum. Reprod.*, 17: 413-419, 2002.
- 18) Marquez, C., Sandalinas, M., Bahce, M., Alikani, M., Munné, S.: Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod. Biomed. Online.*, 1: 17-27, 2000.
- 19) Gutiérrez-Mateo, C., Colls, P., Sánchez-García, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Wells, D., Munné, S.: Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil. Steril.*, 95: 953-958, 2011.

乳用牛の人工授精現場において 受胎率低下を引き起こしている要因の抽出

渡辺 伸也

独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 〒305-0901 茨城研つくば市池の台2

要旨： 牛の人工授精現場では、1989年頃より続く受胎率低下が進行している。この問題を解決するための研究開発の一環として、乳用牛の受胎率低下に関与する要因の抽出を試みた。その結果、乳用牛の人工授精における受胎率低下に関与している要因は、人的要因、雌側要因、雄側要因に分類できた。人的要因は、当事者（農家、獣医師、家畜人工授精師）の連携やコミュニケーション、サービスを提供する側（獣医師、家畜人工授精師）の組織体制、サービスを受ける側（農家）の方針に、雌側要因は、乳用牛の高泌乳化に付随するとみられる発情微弱化、黄体形成異常、卵巣静止および子宮環境悪化等の現象、雄側要因は、受胎率の低い種雄牛の存在に、それぞれ、整理できた。これらには、生殖医療現場で受胎率を左右している要因との類似性が考えられる。したがって、医学と畜産学との間の学際的な交流による相互利益が期待される。

キーワード： 乳用牛, 受胎率低下, 人的要因, 雌側要因, 雄側要因

はじめに

わが国における牛の分娩頭数は、2012年現在、年間およそ145万頭である^{1,2)}。遺伝的能力の高い雄牛を多くの雌牛に交配するための手段として、凍結精液による人工授精が普及しているため、国内で生産される牛のほとんどが人工授精で生産されている。人工授精以外の繁殖手段で生産される牛は、およそ2万頭の受精卵移植由来産子程度で、自然交配により生産される牛は極めて珍しい。人工授精の普及を支えてきた技術的な側面として

は、1射精の牛精液（約5mℓ）から100～200本程度の人工授精用の精液ストローが作製できることや精子の耐凍能が高いことがあげられる³⁾。さらに、法的な側面としては、1950年の家畜改良増殖法が、また、凍結精液の生産・配布体制の側面としては、1965年の社団法人家畜改良事業団（広域人工授精センター）の設置が、それぞれ、わが国の牛人工授精を支えてきた。

わが国の牛人工授精現場では、1989年頃より、初回受胎率が低下している^{4,5)}（図1）。たとえば、乳用牛の人工授精における2010年の初回受胎率は、44.7%で、前

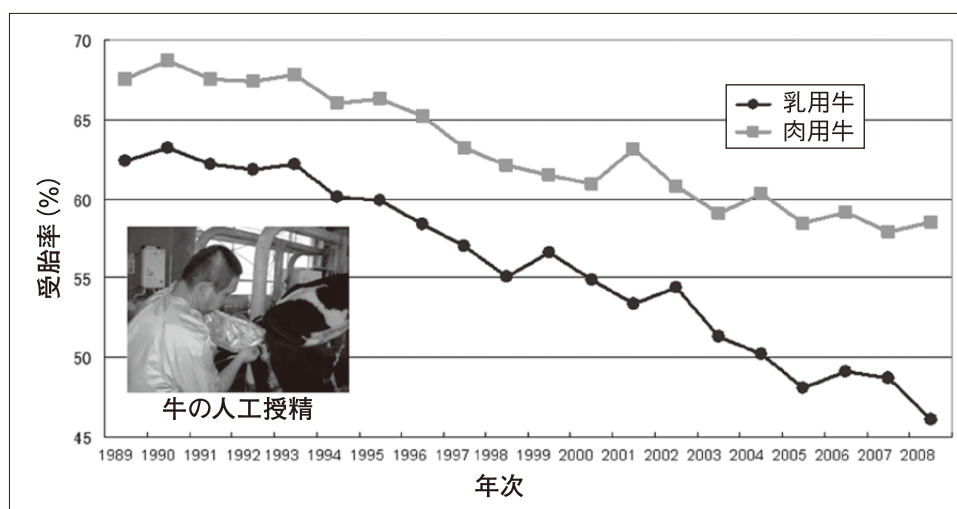


図1 牛人工授精における受胎率の推移

（吉ざわら⁴⁾を改変）

家畜改良事業団:2008年度受胎成績の初回受胎率を示した。牛の人工授精における受胎率は、低下傾向で推移している。この傾向は、乳用牛で特に著しい。

受付 2013年1月30日 / 受理 2013年3月5日

著者連絡先：渡辺 伸也 e-mail [shw@affrc.go.jp]

年より1.7%低下している。また、その初回受胎率を1989年の値(62.4%)と比較すると、17.7%低下している⁵⁾。本稿では、現時点までに抽出された乳用牛の人工授精現場において受胎率低下を引き起こしていると考えられる要因を概説する。

対象と方法

乳用牛の受胎率低下を解決するための研究開発の一環として、畜産草地研究所・問題別研究会⁶⁾や新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業(課題番号:23032)の現地検討会の場を活用して、牛の人工授精現場で活躍している獣医師や家畜人工授精師(現在までのところ5名)より、牛の受胎率を低下させていると思われる所見を聞き取り、その内容を整理した。

結果と考察

人的要因

乳用牛の人工授精現場における主な当事者は、農家(畜主)、獣医師ならびに家畜人工授精師である(獣医師ならびに家畜人工授精を総称して繁殖技術者とも呼ばれる)。牛の受胎率を向上させるためには、これら3者の連携と的確な役割分担が重要である。具体的な役割分担は、農家による牛の発情発見を含む日常的な牛群の繁殖・飼養管理と発情牛を発見した場合の獣医師や家畜人工授精師への連絡、獣医師による牛への薬剤投与などの治療、獣医師または家畜人工授精師による人工授精となる。現在、多用される凍結精液を用いた牛の人工授精では、発情終了から10時間くらいの間が授精最適期とされている³⁾。なお、農家によっては、自家授精を選択する場合もある。

1) 当事者間の連携やコミュニケーション

地域によって、獣医師と家畜人工授精師の連携の程度はまちまちである。ある地域では、獣医師と家畜人工授精師が同じ情報を共有して活動しているが、別の地域では、獣医師は診療・治療業務のみに携わり、授精業務は家畜人工授精師に全て任せるという場合もある。後者において、家畜人工授精師は、授精する牛に発情誘起処理がしてあることを農家に聞いてはじめて知る一方、牛に発情誘起処理を行った獣医師は、その牛が授精されたことを知らないこともある。繁殖の問題は、グレーゾーンが多く、どこからが病気で、どこまでが病気でないかわからないので、受胎率向上のためには、獣医師と家畜人工授精師との連携やコミュニケーションを緊密にし

ていくことが重要である。

牛の発情兆候を農家自身で判断した結果に基づき、農家に授精を要請されても、検査の結果、牛の状態が悪いため人工授精を見合わせたほうが良いと判断される場合もある。その際、繁殖技術者は、授精を見合わせる理由を農家に説明する必要がある。しかし、農家とのコミュニケーションをうまく取っておかないと、農家の強い意向に押し切られ、受胎が困難であることが予想できても繁殖技術者は、授精せざるを得ない場合がある。

2) サービスを提供する側(繁殖技術者)の組織体制

人工授精の現場において、もっと人材を増やせる環境にあるならば、繁殖技術者が人工授精前後のきめ細やかなケアをすることで、現状より遙かに良い受胎率になる可能性がある。しかし、そのような環境には全くないので、どうしても、限られた時間での業務になるため、繁殖技術者のできることは限られてくる。

さらに、往診距離の長さが適期の人工授精を困難にしている可能性がある。たとえば、北海道の場合、広域合併の指針で、ひとつの診療所がカバーする範囲は、50kmとされている。この50kmは、北海道であっても、かなり遠い。このような状況下、ひとりの繁殖技術者が昼間に120~160kmを自動車で行き、それに夜間往診を加えると1日に250~280km走ることもある。

3) サービスを受ける側(農家)の方針

近年の多頭化傾向や高泌乳牛の飼養管理の問題により、発情が発見しにくくなっている^{7,8)}。そこで、発情発見の労力を少なくするために、獣医師と相談しながら、繁殖定期健診を取り入れる農家が増えている。定期健診は繁殖障害牛の摘発の側面もあるため、PGF_{2α}による発情誘起処理が増えてくる。繁殖障害の治療を積極的に行えば、授精頭数は増加するが、受胎率は低くなる。発情発見をせずに、発情誘起処理に頼ることが、受胎率低下の要因のひとつとなっている可能性がある。

一方、発情を観察している場合でも、自らある牛が発情していると判断すると、繁殖技術者が牛の状態が悪いことを根拠に授精の見送りを提案しても、「授精しないと、受胎しないので、とにかく人工授精を実施する」という方針のもと、繁殖技術者に授精を強要する農家もある。このような農家の方針によっても受胎率が低下していると考えられる。

雌性側の要因

乳用牛において、分娩後に開始される泌乳は、日ごとに量が増加し、1~2カ月後に「泌乳量のピーク」を迎え、

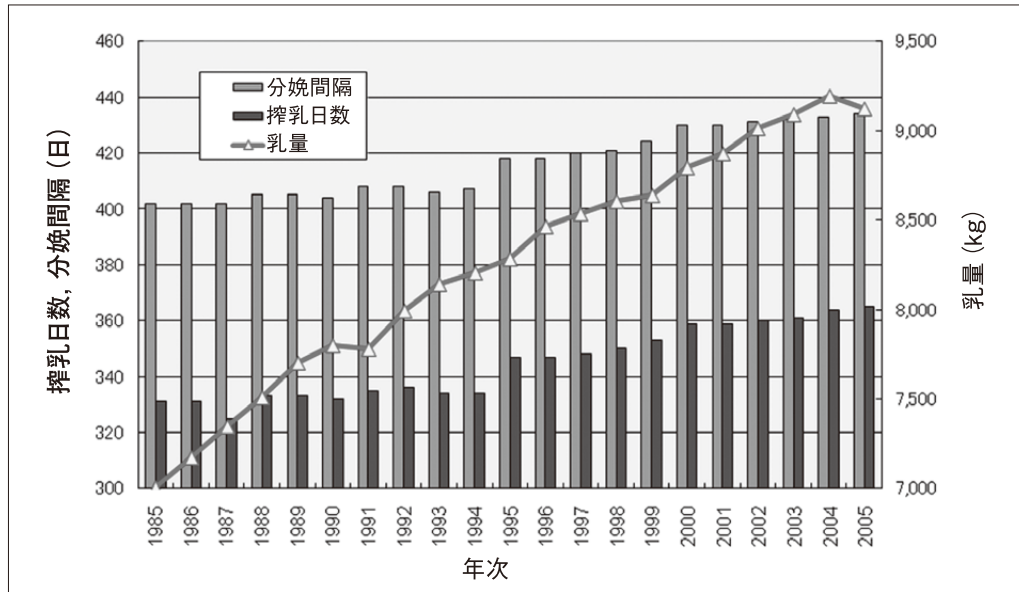


図2 乳用牛における乳量、分娩間隔および空胎期間

(吉ざわら⁴⁾を改変)

その後、徐々に減少する。改良により乳用牛の泌乳量は飛躍的に増加しているが（図2）、それに伴い、「泌乳量のピーク」を迎える時期の前後には、牛が餌として摂取できるエネルギー以上に乳を生産する状態になっている。この時期の乳用牛では、文字通り、身を削って泌乳しているため、エネルギー不足の状態に陥っている。それに伴い、発情微弱化、卵巢静止、黄体機能低下などが発生することで、人工授精時の受胎率が低下していると考えられている⁹⁾。実際、泌乳量の増加と同時並行的に人工授精時の受胎率低下が進行している。その受胎率低下に引っ張られる形で、乳用牛の分娩間隔も延長している（図2）。さらに、泌乳量の増加によって引き起こされる代謝性疾患が乳用牛の子宮内環境を悪化させていると考えられている。これらの問題に対しては、乳用牛の栄養管理¹⁰⁾が有効であるとされているが、解決の目処は立っていない。

1) 発情兆候の変化

20～30年前の牛では、発情がはっきりしていた。しかし、近年では、発情兆候が不明瞭、発情粘液が少ない、子宮収縮が弱いなど、牛の発情兆候が弱くなっている。そのため、発情の見逃しや発情兆候に対する農家と繁殖技術者の間の意見不一致を招いている。一方、乳用牛の発情持続時間が短くなったともいわれているが、牛をよく観察していると、発情がすごく長い牛もいるし、逆に、短い牛もいる。したがって、発情が短くなったとは、一概にいけない。

2) 黄体形成異常

泌乳牛においては、「分娩後のどの時期で、エネルギー

出納がどのような状態か」が牛の繁殖性にとって非常に重要である。現在の乳用牛では、高泌乳化に伴い、特に泌乳初期の乳量が極めて多い時期にエネルギー出納が負になってしまっている。エネルギーの充足状況に応じ、「発情がきました、黄体ができました」、「発情がきました、黄体ができませんでした」、「発情がきました、膿腫様黄体になりました」などの状態が招来されるという所見がある。牛群の中に2～3割存在する受胎が困難な牛と黄体形成異常との関連性が疑われる。

3) 卵巢静止

農家に行くと、卵巢が萎縮し、卵胞も黄体もないという卵巢静止のため、発情兆候の見られない牛が結構いる。このような牛に対し、積極的に治療しても、いい発情は来ないことが多い。これは、エネルギーの充足率が満たされていないために引き起こされていると判断される。

4) 子宮環境の悪化

高泌乳化に伴う代謝性疾患などの要因が重なり、分娩後100日を過ぎると、子宮環境が悪くなるために、人工授精をした後の受胎率が低下してしまう。高泌乳牛の場合、分娩後の人工授精を遅らせてもよいという意見もあるが、その場合、農家が望む時期に人工授精によって確実に受胎するかどうかの問題である。乳用牛の繁殖においては、昔から1年1産、すなわち、12カ月の分娩間隔が理想とされてきたが、現在では、およそ15カ月程度の分娩間隔で乳用牛の繁殖サイクルが回されていることが多いようである。

雄性側の要因

わが国では、人工授精用の精液を採取する遺伝的能力の高い雄牛（種雄牛）の候補が国や都道府県の予算（後代検定事業等）で選抜されている。その際に行われる調整交配の結果に基づき、明らかに受胎率が低い候補牛は、種雄牛から排除されているはずだが、現実には、それをくぐり抜けた種雄牛が存在している。そのため、受胎調査の結果、種雄牛別の受胎率は、30～60%の幅を示している。受精能の低い精子が生産される背景としては、先天的な要因をはじめ、加齢などの後天的な要因も存在すると考えられるが、その実態は不明である。そこで、種雄牛による受胎率の差を事前に判定できるような精液検査法の開発が課題である。さらに、およそ30年間、技術的な改良が停滞している牛凍結精液を作製する技術の改良や人工授精技術のブラッシュアップも急務である。

結 論

本研究において乳用牛の人工授精現場において受胎率低下を引き起こしている要因として抽出された「当事者間のコミュニケーション」、「サービスを提供する側の組織体制」、「サービスを受ける側の方針」などの「人的要因」、「雌雄両性の要因」は、生殖医療現場の受胎率を左右している要因との類似性があると考えられた。人的要因については、研究開発で解決できる要素は少ないが、受胎を妨げている雌雄両性の要因のうち、生物学的な、あるいは、生殖技術的な要素については、医学と畜産学との間の学際的な交流による相互利益が期待される。

謝 辞

本調査の一部は、新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業（農林水産省）の採択課題「雌を妊娠させやすい雄牛の評価と新規精液凍結法による繁殖性向上技術の開発とその実証（課題番号：23032）」の助成を受けて実施した。

参 考 文 献

- 1) 農林水産省大臣官房統計部：乳用牛の分べん頭数及び出生頭数。畜産統計（平成24年2月1日現在）。pp.22, 農林水産省。2012.
- 2) 農林水産省大臣官房統計部：肉用種の出生頭数（平成24年2月1日現在）。畜産統計。pp.55, 農林水産省。2012.
- 3) 日本家畜人工授精師協会：家畜人工授精講習会テキスト 家畜人工授精編。日本家畜人工授精師協会。1998.
- 4) 吉ざわ努・平子誠・下司雅也・高橋昌志・永井卓：生産現場における受胎に係る要因について—アンケート調査結果から—。日

本胚移植学雑誌, 31:105-118, 2009.

- 5) 家畜改良事業団：平成22年受胎調査成績。家畜改良事業団。2011.
- 6) 渡辺伸也：牛の人工授精における受胎率低下に関する主な論点。日本胚移植学雑誌, 34: 81-84, 2012.
- 7) Senger, PL.: The Estrus Detection Problem: New Concepts, Technologies and Possibilities. J. Dairy Sci., 77:2745-2753, 1994.
- 8) Roelofs, J., López-Gatiusc, F., Hunterd, RHF., van Eerdenburge, FJCM., Hanzenf, Ch.: When is a cow in estrus? Clinical and practical aspects. Theriogenology, 74:327-344, 2010.
- 9) 中尾敏彦：乳牛の繁殖をめぐる最近の問題。中尾敏彦編。pp.16-22. デーリーマン社。2003.
- 10) Chagas, LM., Bass, JJ., Blache, D., Burke, CR., Kay, JK., Lindsay, DR., Lucy, MC., Martin, GB., Meier, S., Rhodes, FM., Roche, JR., Thatcher, WW., Webb, R.: Invited Review: New Perspectives on the Roles of Nutrition and Metabolic Priorities in the Subfertility of High-Producing Dairy Cows. J. Dairy Sci., 90:4022-4032, 2007.

胚の質不良例に対する L-カルニチンの有効性に関する検討

小倉 里香¹, 松本 寛史¹, 井田 守¹, 福田 愛作¹, 森本 義晴²

¹医療法人三慧会 IVF 大阪クリニック 〒577-0012 東大阪市長田東1丁目1-14

²医療法人三慧会 IVF なんばクリニック 〒550-0015 大阪市西区南堀江1-17-28 なんばSSビル3F

要 旨： L-カルニチンは、脂肪酸がミトコンドリア内膜を透過する際に必要で、 β 酸化による効率的燃焼を促進、種々の細胞の増殖・機能の促進効果を持つことが知られている。今回、胚の質が不良なために胚移植、または妊娠に至らなかった症例に対しL-カルニチンを投与することで、体外受精の成績に有益な結果が出るか検討を行った。2009年10月から2012年10月までに、体外受精において胚の質が不良であると認められた151周期32症例の患者を対象にL-カルニチン1000mgを連日投与し、投与前と投与後の体外受精周期における採卵数、卵成熟率、受精率、分割期良好胚率、胚盤胞到達率、良好胚盤胞率、胚移植あたりの妊娠率を比較検討した。投与後の周期で良好胚盤胞率は有意に上昇し、胚移植あたりの妊娠率も有意に上昇する結果となった。L-カルニチンの投与は胚の質が不良であるために胚移植、または妊娠に至らなかった症例に対し有効であることが示唆された。

キーワード： L-カルニチン、ミトコンドリア、アポトーシス、胚の質不良

はじめに

遊離脂肪酸はミトコンドリアで β 酸化されてエネルギー生成に重要な役割を果たし、この機構にL-カルニチンが必須であることが知られている。L-カルニチンは脂肪酸から諸反応によって生じたアシルCoAがミトコンドリア内膜を透過する際のキャリア分子として働き、ミトコンドリア機能の改善、 β 酸化による効率的燃焼の促進、エネルギー供給の活発化、種々の細胞の増殖・機能の促進効果を持つ。一般的に体外受精では得られた胚の中で形態的に最も質の高いものを選別し、患者子宮へ移植されている。胚盤胞発生能を含む移植胚の質の向上は妊娠成績に多大な影響を及ぼす。一方胚の質の低下にはDNAの断片化やカスパーゼ活性化等のアポトーシスによる変化が関与しているという可能性が報告されている。今回、胚の質が不良であるために胚移植キャンセルとなった症例、または胚の質が不良であるために妊娠に至らなかったと考えられる症例に対しL-カルニチンを投与することで、体外受精の成績向上に有益な結果が出るか検討を行った。

対象と方法

2009年10月から2012年10月までの期間に、体外受精において胚の質不良により胚移植キャンセルと

なった、または妊娠にいたらなかった32症例を対象に、L-カルニチン1000mgを連日投与し、L-カルニチン投与前と投与後の体外受精周期における採卵数、卵成熟率、受精率、分割期良好胚率、胚盤胞到達率、良好胚盤胞率、分割期胚の新鮮胚移植および凍結融解胚移植の胚移植あたり妊娠率を比較検討した。投与前の採卵周期数は71周期、投与後は80周期であり、採卵時患者平均年齢は投与前後でそれぞれ 38.9 ± 4.3 , 39.8 ± 4.1 歳であった。分割期良好胚は当院分類(図1)にてGrade 3b以上かつ適正な分割速度のものとし、良好胚盤胞はGardner分類にてBL3以上でICM/TEの両方にCを含まないものとした。カルニチン投与後の凍結融解胚移植の妊娠率は、投与後の採卵で得られた卵子に由来する胚を移植した周期を対象とした。超音波検査にて子宮内に胎嚢を確認したものを(臨床)妊娠と定義した。有意差検定には χ^2 乗検定、およびt検定を用い、 $p < 0.05$ をもって有意とした。

結 果

自然周期における採卵数はL-カルニチン投与前後の周期でそれぞれ 3.0 ± 2.6 個、 3.2 ± 2.7 個、刺激周期における採卵数はそれぞれ 8.5 ± 4.0 個、 9.0 ± 4.2 個であり両群間に有意な差は認められなかった(表1)。成熟率は投与前後でそれぞれ87.2% (218/250)、83.3%

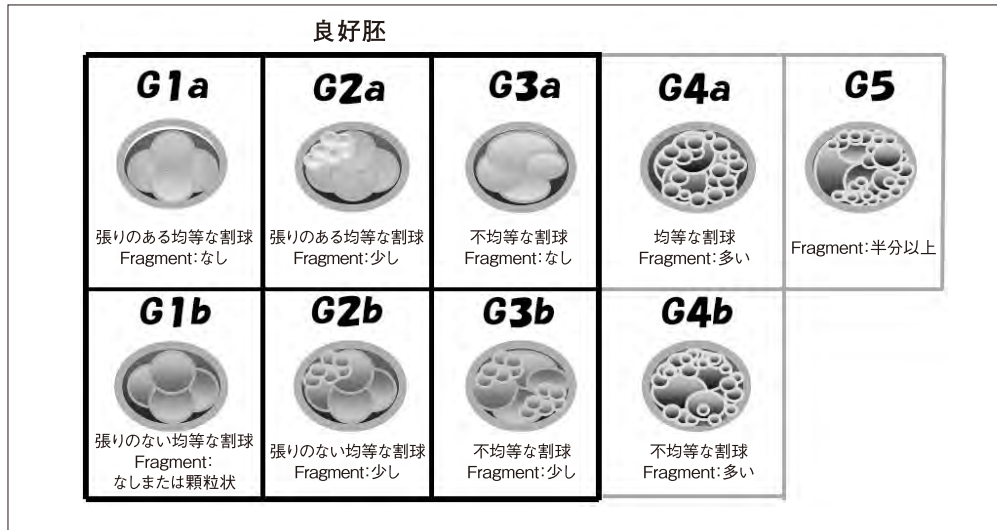


図1 分割期良好胚 当院分類

表1 L-カルニチン投与前後の採卵数・培養成績

	L-カルニチン投与前 71 周期	投与後 80 周期	p
自然周期採卵数	3.0 ± 2.6 個	3.2 ± 2.7 個	n.s
刺激周期採卵数	8.5 ± 4.0 個	9.0 ± 4.2 個	n.s
成熟率	87.2% (218/250)	83.3% (236/283)	n.s
ICSI 受精率	78.9% (112/142)	80.4% (119/148)	n.s
Conventional IVF 受精率	76.3% (58/76)	81.8% (72/88)	n.s
分割期良好胚率	53.3% (56/105)	56.9% (58/102)	n.s
胚盤胞到達率	46.0% (29/63)	50.6 (39/77)	n.s
良好胚盤胞率	6.9% (2/29)	35.9% (14/39)	< 0.01

表2 L-カルニチン投与前後の胚移植時子宮内膜厚，平均胚移植個数

	L-カルニチン投与前	投与後	p
新鮮胚移植子宮内膜厚	11.1 ± 2.3mm	12.2 ± 2.7mm	n.s
新鮮胚移植平均胚移植個数	1.5 ± 0.7 個	1.7 ± 0.5 個	n.s
凍結融解胚移植子宮内膜厚	12.1 ± 3.1mm	10.6 ± 1.3mm	n.s
凍結融解胚移植平均胚移植個数	1.4 ± 0.5 個	1.7 ± 0.6 個	n.s

(236/283), ICSIの受精率はそれぞれ78.9% (112/142), 80.4% (119/148), conventional IVFの受精率はそれぞれ76.3% (58/76), 81.8% (72/88), 分割期良好胚率はそれぞれ53.3% (56/105), 56.9% (58/102), 胚盤胞到達率はそれぞれ46.0% (29/63), 50.6% (39/77)であり両群間に有意な差は認められなかった。良好胚盤胞率に関してはL-カルニチン投与前が6.9% (2/29) で

あるのに対し、投与後が35.9% (14/39)であり、投与による良好胚盤胞率の有意な増加が認められた。分割期胚新鮮胚移植に関しては胚移植時の子宮内膜厚が投与前後でそれぞれ11.1 ± 2.3mm, 12.2 ± 2.7mm (表2), 平均胚移植個数が投与前後で1.5 ± 0.7個, 1.7 ± 0.5個であり両群間に有意な差は認められなかったが、胚移植あたりの妊娠率は投与前の0% (0/13) に比し投与後は

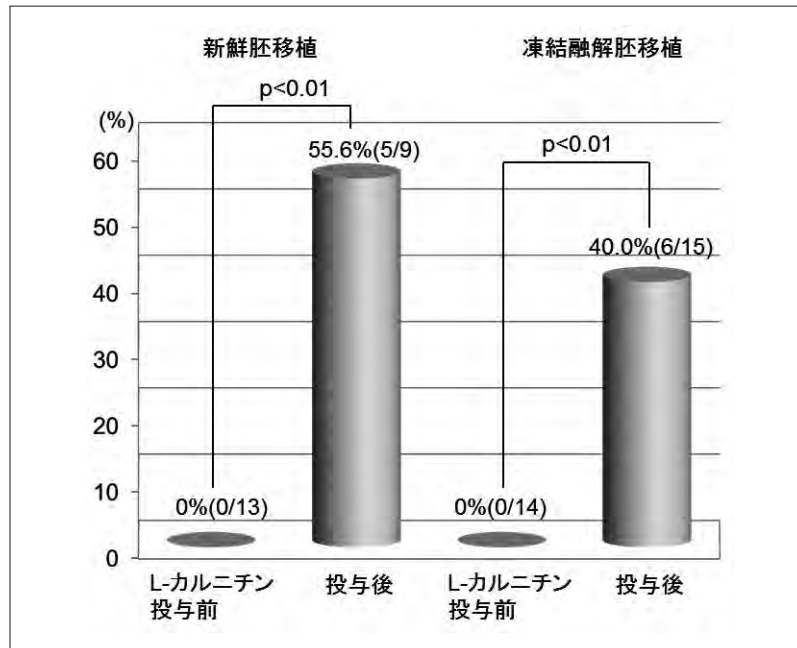


図2 L-カルニチン投与前後の新鮮胚移植，凍結融解胚移植の妊娠率

55.6% (5/9)と投与後で有意な増加が認められた(図2). 分割期胚凍結融解胚移植に関しては胚移植時の子宮内膜厚が投与前後でそれぞれ $12.1 \pm 3.1\text{mm}$, $10.6 \pm 1.3\text{mm}$, 平均胚移植個数が投与前後でそれぞれ 1.4 ± 0.5 個, 1.7 ± 0.6 個であり両群間に有意な差は認められなかったが, 胚移植あたりの妊娠率は投与前の0% (0/14)に比し投与後は40.0% (6/15)と投与後で有意な増加が認められた.

考 察

本研究の結果, L-カルニチンの投与により採卵数・受精率・成熟率・胚盤胞到達率に変化は認められなかったが, 良好胚盤胞率および妊娠率に改善が見られ, L-カルニチンに胚の質を改善する効果が期待できることが示唆された. 近年, カルニチンのアポトーシス抑制作用が注目されている¹⁾⁻³⁾. アポトーシスは生体の形態形成をはじめ免疫細胞の選択的除去やその異常による自己免疫疾患など, 生体のホメオスタシスに重要な機能を果たしている. アポトーシスは種々の細胞ストレスで誘導されるが, 生体内で見られる多くのアポトーシスにはミトコンドリア膜透過性遷移が関与している⁴⁾. このアポトーシスでは細胞内カルシウムの増加に共役したミトコンドリアの膨順やシトクロームc漏出⁵⁾によるApaf (apoptotic protease activating factor) 複合体形成に続いてカスパーゼの活性化やDNAの断片化が起こる⁶⁾.

一般的に卵子は母体の加齢とともにその質が低下することが知られている. アポトーシスと卵子の質についてはGloriaらがカスパーゼ活性・DNA断片化と細胞質フラグメントを含む形態悪化卵子について関連があることを記述している⁷⁾. またFujinoらは老齢マウスから採取した卵子ではDNAフラグメンテーション率が高く, これがアポトーシスによる変化であることを示唆している⁸⁾. Juanらも細胞質フラグメントを含む老齢マウス由来卵子の特徴とアポトーシスの関連について言及している⁹⁾. これらの報告から卵子や胚で起こりうるミトコンドリア依存性のアポトーシスを抑制できれば, 胚の質の改善に繋がる可能性が示唆される. カルニチン投与によるアポトーシス抑制に関しては, ミトコンドリア電子伝達阻害剤3-ニトロプロピオン酸 (3-NP) による神経細胞死が原因と考えられるハンチントン舞踏病モデルマウスの発症がカルニチン前投与により抑制されることが報告されている¹⁾. またカルニチンがカルシウム依存性膜透過性遷移²⁾や3-NPによる膜透過性遷移³⁾を抑制することが報告されている.

本研究ではL-カルニチンの経口投与が卵子・胚のアポトーシスおよびミトコンドリア膜透過性遷移へ直接的な関与をしていることを検証することはできなかったが, 投与によって良好胚盤胞率および妊娠率の改善が認められた. これより卵子および胚においてL-カルニチンによる β 酸化が促進され, 膜透過性遷移が抑制された結果, ミトコンドリア依存性のアポトーシスが抑制され,

胚の質を改善・妊娠につながった可能性が示唆された。以上のことから胚の質不良によって胚移植・妊娠に至らない症例に対して、L-カルニチンの投与は有効な治療法の一つであることが推察された。

参考文献

- 1) Binienda, ZK., Przybyla, BD., Robinson, BL., Salem, N., Virmani, A., Amato, A., Ali, SF.: Effects of L-carnitine pretreatment in methamphetamine and 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1074: 74-83, 2006.
- 2) Kashiwagi, A., Kanno, T., Arita, K., Ishisaka, R., Utsumi, T., Utsumi, K.: Suppression of T (3) -and fatty acid-induced membrane permeability transition by L-carnitine. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, 130: 411-418, 2001.
- 3) Nishimura, M., Okimura, Y., Fujita, H., Yano, H., Lee, J., Suzaki, E., Inoue, M., Utsumi, K., Sasaki, J.: Mechanism of 3-nitropropionic acid-induced membrane permeability transition of isolated mitochondria and its suppression by L-carnitine. *Cell. Biochem. Funct.*, 26: 881-891, 2008.
- 4) Tempestini, A., Schiavone, N., Papucci, L., Witort, E., Lapucci, A., Cutri, M., Donnini, M., Capaccioli, S.: The mechanisms of apoptosis in biology and medicine : a new focus for ophthalmology. *Eur. J. Ophthalmol.*, 13: S11-18, 2003.
- 5) Kanno, T., Sato, EE., Muranaka, S., Fujita, H., Fujiwara, T., Utsumi, T., Inoue, M., Utsumi, K.: Oxidative stress underlies the mechanism for Ca (2+) -induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic. Res.*, 38: 27-35, 2004.
- 6) Cai, J., Yang, J., Jones, DP.: Mitochondrial control of apoptosis : the role of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1366: 139-149, 1998.
- 7) Gloria, IP., Xiao, JT., Jonathan, LT.: Fragmentation and death (a.k.a. apoptosis) of ovulated oocytes. *Mol. Hum. Reprod.*, 5: 414-420, 1999.
- 8) Fujino, Y., Ozaki, K., Yamamasu, S., Ito, F., Matsuoka, I., Hayashi, E., Nakamura, H., Ogita, S., Sato, E., Inoue, M.: DNA fragmentation of oocytes in aged mice. *Hum. Reprod.*, 11:1480-1483, 1996.
- 9) Juan, JT., Sonia, PA., Antonio, C.: Cellular and morphological traits of oocytes retrieved from aging mice after exogenous ovarian stimulation. *Biol. Reprod.*, 65: 141-150, 2001.

凍結胚移植におけるホルモン補充 — 世界の標準 —

東口 篤司

KKR 札幌医療センター斗南病院 生殖内分泌科 〒060-0001 札幌市中央区北1条西6丁目

要 旨： 凍結胚移植のためのホルモン補充に、どのような卵胞ホルモン、黄体ホルモンを選択すべきか、国内外の事情を比較し参考にするため学会発表、文献を調査した。卵胞ホルモンに関しては国外では経口Estradiol製剤が過半数を占めたが国内では経口Estradiol製剤が少なく、Mestranol, Ethinylestradiolなど国外では全く報告のない薬剤が少数だが使用されていた。黄体ホルモンに関しては国外ではすべて天然型のProgesteroneだったが国内では合成黄体ホルモン製剤が多く、国外では全く報告のないNorgestrel, Dienogestが少数だが使用されていた。国外の薬剤選択の根底に流れている考えは、「自然妊娠で発生してくる卵胞ホルモンと黄体ホルモンを自然に似るように」ということではないかと思われる。国内外の状況をみただけで使用するべき薬剤選択の結論を出すことはできないが、我が国では現在凍結胚移植において補充すべきステロイドホルモンについて詳細に検討すべき状況なのではないかと思われた。

キーワード： 凍結胚移植, 卵胞ホルモンの選択, 黄体ホルモンの選択, 国内外の比較

はじめに

凍結胚移植におけるホルモン補充は子宮内膜を調整するために月経中から卵胞ホルモンが用いられ、その後胚移植に合わせて黄体ホルモンが追加される。これらのステロイドホルモンは通常妊娠7～8週まで継続される。補充するステロイドホルモンは天然型から合成型まで様々な薬剤を選ぶことができる。妊娠中にも使うことになるステロイドホルモンをどのような基準で選択するか、日本と北米、欧州ではかなり事情が異なる。日本でホルモン補充による凍結胚移植が始まった1990代には経口Estradiol製剤も、MicronizeされたProgesteroneの腔剤も国内では入手できなかった（現在国内で販売されている経口Estradiol製剤はART用としては1錠あたりの含量が少なく、Micronized progesterone腔剤は現在でも国内で販売されていない）。また北米、欧州では1940～1971年に数百万人の妊婦に処方されたDiethylstilbestrol (DES)¹⁾による出生女児の陰ガン発生という苦い経験があり、そのため妊娠中の卵胞ホルモン製剤の投与には極めて敏感である。日本ではDESの一般的な使用経験はない。凍結胚移植においてホルモンを補充する時、どのような卵胞ホルモン、黄体ホルモンを選択すべきかを探るため、国内外の学会発表、文献を比較検討した。

対象と方法

国内は「凍結胚移植」のキーワードによる平成24年12月時点でのJ-Dream II文献（238件中18件²⁻¹⁹⁾）と平成20年から24年の日本受精着床学会と日本生殖医学会のホルモン補充の内容に関して記載されている抄録（30件²⁰⁻⁴⁹⁾）を参照にした。同じ施設から報告されている重複する薬剤は除外した。国外は「hormone replacement, frozen embryo transfer」と「hormone replacement, egg donation」のキーワードによる平成24年12月時点でのPubMedでの英文文献（それぞれ33件⁵⁰⁻⁸²⁾および22件⁸³⁻¹⁰⁴⁾）を参照した。同じ施設からの重複する薬剤の報告は避け、レビュー文献と日本からのPubMed文献¹⁰⁵⁻¹⁰⁸⁾（Estradiol patch: 3 Mestranol: 1 Progesterone筋注: 1, 自家製progesterone腔剤: 1, Chlormadinone acetate: 1, Medroxyprogesterone acetate: 1）は除外した。これらの文献、学会報告の中で凍結胚移植（国外ではEgg donationを含む）におけるホルモン補充として、どのような卵胞ホルモン、黄体ホルモンが使用されているか調査した。

結 果

日本以外の国別PubMed文献数は米国17、英国11、中国4、ベルギー3、スペイン3、オーストラリア2、デンマーク2、フランス2、ドイツ2、アルゼンチン2、台湾2、

カナダ2, イスラエル1, イタリア1, スウェーデン1, シンガポール1, ギリシャ1, サウジアラビア1, 韓国1, アイスランド1, イラン1 だった。調査の結果を表1に示した。卵胞ホルモンについては国外ではConjugated estrogen が2件報告(2件とも台湾からの文献)されているだけで、他はすべて体内ではEstradiolとして作用するタイプの卵胞ホルモンだった。一方、国内では経口のEstradiol製剤が少なく、

国外でまったく報告がないMestranol, Ethinylestradiol が少数だが報告されていることが特徴だった。黄体ホルモンについては国外では、すべてProgesteroneの筋注か腔剤だった。一方、国内では切迫流産に適応を有する合成の黄体ホルモンが多く用いられていること、国外でまったく報告がないNorgestrel, Dienogestが少数だが用いられていることが特徴だった。

表1 凍結胚移植に補充される卵胞ホルモン・黄体ホルモンの国内外における比較

卵胞ホルモン	国内	国外	投与経路	妊娠中の取り扱い (日本薬局方)	妊娠中の取り扱い (FDA)	体内で作用する時の構造
経口用エステル型 Estradiol (プロギノバなど)	3	30	経口	日本薬局方に存在しない	カテゴリー X	Estradiol
Micronized estradiol ^{a)} (ジュリナ エストレースなど)	3	14 ^{f)}	経口	禁忌	カテゴリー X	Estradiol
Estradiol patch (エストラーナなど)	23	13	経皮	禁忌	カテゴリー X	Estradiol
Estradiol gel (ディビゲルなど)	4	2	経皮	禁忌	カテゴリー X	Estradiol
筋注用エステル型 Estradiol (オバホルモンドポーなど)	1	0	筋注	禁忌または妊娠中の 取扱いの記載なし	カテゴリー X	Estradiol
Conjugated estrogen ^{b)} (プレマリンなど)	9	2	経口	禁忌	カテゴリー X	Estrone Equilin など 10 種類以上 ¹¹⁰⁾
Mestranol (デボシンなど)	1	0	経口	妊娠中の取扱い の記載なし	カテゴリー X	Ethinylestradiol
Ethinylestradiol (プラノバールなどの一部)	2	0	経口	妊娠中の取扱い の記載なし	カテゴリー X	Ethinylestradiol
黄体ホルモン	国内	国外	投与経路	妊娠中の取り扱い (日本薬局方)	妊娠中の取り扱い (FDA)	体内で作用する時の構造
筋注用 Progesterone (プロゲホルモンなど)	11	30	筋注	禁忌 (切迫流産に適応あり)	カテゴリー B	Progesterone
経腔用 Micronized Progesterone (ウトロゲスタンなど)	6 ^{a)}	30	経腔	日本薬局方に存在しない	カテゴリー B	Progesterone
自家製経腔用 Progesterone ^{c)}	15	1	経腔	日本薬局方に存在しない	カテゴリー B	Progesterone
Chlormadinone (ルトラールなど)	9	0	経口	妊娠中の取扱い の記載なし	妊娠中の取扱い の記載なし	Chlormadinone
Dydrogesterone (デュファストンなど)	5	0	経口	切迫流産に適応あり	妊娠中の取扱い の記載なし	Dydrogesterone
Hydroxyprogesterone ^{d)} (プロゲデポーなど)	5	0	筋注	禁忌 (切迫流産に適応あり)	カテゴリー D	Hydroxyprogesterone
Medroxyprogesterone ^{e)} (プロベラなど)	3	0	経口	切迫流産に適応あり	カテゴリー D	Medroxyprogesterone
Norgestrel (プラノバールなどの一部)	2	0	経口	禁忌	カテゴリー X	Norgestrel
Dienogest (ディナゲストなど)	1	0	経口	禁忌	妊娠中の取扱い の記載なし	Dienogest

a) Micronize とは特殊な技術で固形粒子を微小化し溶解速度、吸収速度、生理的利用率を改善する方法。

b) 主成分の Estrone 以外に馬特有の卵胞ホルモン Equilin などを含む。

c) Micronize されていないと思われる。

d) Progesterone との交差率 3.4%¹⁰⁹⁾。

e) Progesterone との交差率 0.3%¹⁰⁹⁾。

f) 14 例のうち 1 例は Estrace の経腔投与。

g) 6 例のうち 1 例はウトロゲスタンの経直腸投与。

それぞれの卵胞ホルモン、黄体ホルモンの特徴を表1に示した。日本薬局方とFDA（アメリカ食品医薬品局）で薬剤の取扱いが異なること、国内にない薬剤や国内では妊娠中に使用することを予期していない薬剤が存在することがわかる。

考 察

表1は凍結胚移植に用いられるステロイドホルモンに関して国内外で発表されている報告のほんの一部にすぎないが、全体の大まかな傾向を窺うことはできる。表1でみられるような国内外の違いはどこから来るのだろうか？

卵胞ホルモン

国内外の卵胞ホルモンの違いに関しては、まず第1に国内で凍結胚移植が始まった1990年代は国内で調達できる経口のEstradiol製剤がなく、そのため多くの施設でConjugated estrogen（プレマリン）やEthinylestradiol（プラノバール）が使われ始めたことが影響しているのかもしれない。第2に国外では北米・欧州におけるDESの経験が影響している可能性が考えられる。国内でDESが一般に使用された歴史はない。

DESは1938年に合成された卵胞ホルモン様作用物質で、流産を防止し健康な新生児を生むためと称して1940年代から1971年まで数百万人の妊婦に処方された¹¹¹⁾。その結果DESを服用した母体から出生した女兒が成人後に約1000人に1人の確率で腔癌を発症した¹¹²⁾。このDESの作用はDESが合成ホルモンだからではなく卵胞ホルモン活性が強いためであることが動物実験で証明されている。たとえば1975年Kimuraは妊娠マウスを開腹し子宮壁から胎児にEstradiol 50 μ gを皮下注すると児は出生後に不可逆的な腔上皮の角化、重層化を示したと報告している¹¹³⁾。また1977年Nomura and Kanzakiは妊娠後期のマウスにEstradiol 20 μ g/gを皮下注で1回投与すると娘マウスに子宮頸部のhypertrophyを発症することを報告している¹¹⁴⁾。Estradiol 20 μ g/gは50kgのヒトでは1,000mgに相当するが、強力な卵胞ホルモンで一度引き金を引くと胎児、新生児腔上皮では不可逆的な角質化と増殖が惹起されることが腔癌発症のメカニズムといわれている¹¹⁵⁾。それほど多くのEstradiolが妊娠中に服用されることは現実にはなく、現在まで国内外で妊娠中に投与されてきたEstradiolが臨床的に問題になることはない。一方、国内ではかつて卵胞ホルモン成分として合成のEthinylestradiolを含むピルが黄体補充薬として紹介されたことがあった¹¹⁶⁾。Luteal support

とoral contraceptive pillのキーワードでPubMedを検索すると平成24年12月の時点で460件、Hormone replacementとoral contraceptive pillのキーワードでは2454件ヒットするが、その中でヒトの妊娠中にピルがホルモン補充として処方されている文献は1件もない。したがって妊娠中のホルモン補充としてのピルの処方は日本だけのことと思われる。ピルに含まれるEthinylestradiolに関しても0.01mg/kg 7日間を妊娠マウスに経口投与したところ娘マウスの腔上皮増殖異常が発症したとの報告がある¹¹⁷⁾。これは50kgのヒトではEthinylestradiol 0.5mg（プラノバール10錠）7日間に相当する。それほど多くのEthinylestradiolが服用されることも現実にはなく、臨床的に問題になることはないと思われ。しかし、これらはいずれも動物実験を介したデータであり、最少でどのくらいの量のEstradiol、Ethinylestradiolが危険かを正確に予見するものではない。いずれにせよ約30年世界的に使用されてきたEstradiolと異なりEthinylestradiolの臨床的なデータは世界的な視野でみれば極めて微少であり、妊娠中のピルの投与には十分な注意が必要である。

国内外の事情を比較して凍結胚移植におけるホルモン補充としては、どのような卵胞ホルモンの選択が適切なのかを考える時、問題を複雑にしているのは、ほとんどの国で卵胞ホルモンが妊娠中禁忌とされているのにもかかわらず実際には使われることである。この点は他の分野では見られない凍結胚移植の極めて特殊な事情である。したがって凍結胚移植に限っては、禁忌であることが使用できない理由にはならない。しかし「禁忌でも使う」ということが「何を使っても良い」ということを意味するわけではない。月経中から卵胞ホルモンを補充し胚移植に合わせて黄体ホルモンを追加する方法は1984年LutjenらによるEgg donationの報告¹¹⁸⁾が最初で、その後の世界の報告はほとんどが彼らの方法に準じている。彼らはその論文の中で、卵胞ホルモンとしてProgynovaを選択し、できるだけ自然月経周期における卵胞ホルモン動態に似るように処方計画を立てたと述べている。つまり表1にみられる国外の傾向は卵胞ホルモン補充を自然月経周期に似せるといふ考え方の結果ではないと思われる。

黄体ホルモン

国内外の黄体ホルモンの違いに関しては、国内で凍結胚移植が始まった1990年代から今日までmicronizeされたprogesterone腔剤が国内では調達できないことが、強く影響していると予想される。自家製Progesterone腔剤も日本薬局方ではなく、それらの結果、合成の経口黄体ホルモンが多く使用されるようになったと思われる。

本研究の国外における調査結果では、すべて天然型の Progesterone が用いられていた。2008 年 ASRM は IVF において経口の Progesterone は妊娠率が低く流産率が高いこと、筋注と経腔の Progesterone では妊娠率に差がないことを報告しているが、ASRM のこの報告は Progesterone の投与経路を議論しており、天然型の Progesterone は前提であって合成の黄体ホルモンのことは最初から議論の対象としていないようにみえる¹¹⁹⁾。IVF-worldwide.com による世界 408 施設における新鮮胚移植 284,600 周期の調査では補充された黄体ホルモンの 77.0% が経腔製剤で、経腔製剤はすべて天然型の Progesterone が使用されていたと発表されており、凍結胚移植のための黄体補充にも、ほとんど天然型の Progesterone が使われていると予想される

国内外の事情を比較して凍結胚移植におけるホルモン補充としては、どのような黄体ホルモンの選択が適切なのかを考える時、国内で問題を複雑にしているのは、日本薬局方で「妊娠中禁忌だが切迫流産には適応がある」という独特の適応を有する黄体ホルモンがあることである。Progesterone はこのグループに属する。この考え方では、むしろ「妊娠中禁忌ではなく切迫流産に適応がある」とされる他の合成黄体ホルモンの方が適正のように見えなくもない。しかし、前記 1984 年 Lutjen らは、補充すべき黄体ホルモンとしては Progesterone 腔剤を選択し卵胞ホルモンと同様に自然月経周期に似せるように計画したと述べている。つまり表 1 にみられる国外の傾向は卵胞ホルモンと同様に黄体ホルモンも自然月経周期に似せるという考え方の結果ではないかと思われる。

これらの事情に踏まえて、使用するステロイドホルモン剤に関して、なぜ禁忌とされているか、なぜ禁忌でも使うか、どんなリスクが予想されるか、について書面による説明と同意が必要である。また選択すべきステロイドホルモン剤はその説明の内容に矛盾することのない、誰もが納得できる薬剤であることが要求される。ホルモン補充に関する 1984 年以降の国外の傾向はその点で説得力を持つ。

All or none の法則

薬剤を選択する上でもう一つ言及しておく必要があるのは、国内では黄体期に投与していた薬剤を、妊娠が判明した時点で他の薬剤に変えるという方針が時々報告されることである。黄体期には使って良いが妊娠後は使えないとの判断によるものと予想されるが、このことは All or none の法則が根拠になっていると思われる。All or none の法則は放射線やサリドマイドの経験からのセオリーで、月経 32 日目までに投与された薬剤は胚

に致死的に作用するか、奇形をつくらず正常に発育させるかであるとするものである。しかし All or none の法則には例外の薬剤が知られている¹²⁰⁾。また採卵前周期の高温相より GnRHa の long protocol を施行していて、すでに妊娠していたという場合、児に多動児が多いとする報告がある¹²¹⁾。この報告には反対意見もあるが¹²²⁾、いずれにしても機能的な児の異常に All or none の法則が適用されるかどうかは不明である。さらに卵胞ホルモンの妊娠中投与で心配されるのは将来の膣がん発生の可能性であり、催奇性と異なり、この点での臨界期も明らかになっているわけではない。したがって、妊娠中に使えないと判断される薬剤は黄体期にも使用すべきではないと思われる。

結 論

凍結胚移植におけるステロイドホルモン使用の国外の状況のみをみただけで使用するべき薬剤選択の結論を出すことはできないし、決して国外の方針に盲目的に従う必要はない。しかし、表 1 でみられた世界の標準は「自然妊娠で発生してくるホルモンを自然妊娠に似るように補充する」という考え方を結果として示しており、その考えは 30 年にわたる歴史に裏打ちされている。国内的には妊娠中に自然には発生してこない合成の物質でも切迫流産に適応がある薬剤は可と考えるべきかもしれない。いずれにしても我が国では凍結胚移植において補充すべきステロイドホルモンについて詳細に検討すべき時期に来ているのではないかと思われる。

参 考 文 献

- 1) Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C.: Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. N. Engl. J. Med., 284:878-881, 1971.
- 2) 田中 温: 子宮体部内膜の周期的変化の超音波断層像—自然周期とホルモン投与周期との比較. 超音波医学, 37:699, 2010.
- 3) 福井淳史・藤井俊策・福原理恵・中村理果・山田健市・横田恵・福山麻美・阿部和弘・木村秀崇・水沼英樹: 経皮吸収エストラジオールゲル剤を用いた凍結胚移植. 産婦人科の実際, 59:1419-1971, 2010.
- 4) 脇本栄子・藤野祐司・松本真弓・植田潤子・林清音・飯田尚美・堀真由子・小池浩嗣・法喜めぐみ・駒由佳・横山綾子・内田律子・中村喜宏・今中基晴: 各種エストロゲン製剤によるホルモン補充周期胚移植の比較. 日受精着床会誌, 27:196-199, 2010.
- 5) 濱田由香里・中川ゆう子・澤 理美・山本千加子・竹林浩一: 当クリニックにおける凍結融解胚移植. 日産婦学会滋賀地方部会誌, 6:5-6, 2008.
- 6) 向田哲規: 余剰胚凍結法と凍結胚移植周期の管理. 今月の

- 臨床, 62:297-301, 2008.
- 7) 東口篤司・逸見博文:子宮内膜操作と着床率の向上. 産婦人科治療, 93:292-296, 2006.
 - 8) 伊東宗毅・林直樹・松永茂剛・高井泰・末永昭彦・斉藤正博・竹田省:当科における凍結胚移植の現況. 日産婦学会埼玉地方部会誌, 37:88-91, 2001.
 - 9) 中里和正・高宮城直子・上原尚・花城孝子・金城利恵子・糸数健:ホルモン補充周期の凍結はい移植にて妊娠成立した1例. 日産婦学会沖縄地方部会雑誌, 24:15-17, 2002.
 - 10) 菅沼信彦・榎原重久・鈴木範子・若原靖典:凍結はい移植周期の管理は? 臨床婦人科産科, 57:1410-1413, 2003.
 - 11) 福田愛作・當中正丈・山崎雅友・岩本英熙・中岡義晴・河田淳・森本義晴・神崎秀陽:未熟卵体外受精はい移植法の臨床成績改善の試み. 日受精着床会誌, 19:32-35, 2002.
 - 12) Takeuchi, S., Minoura, H., Kawata, H., Futamura, N., Toyoda, N.: Establishment of a successful pregnancy following frozen-thawed embryo transfer after exogenous hormone replacement therapy with GnRH α for a woman with a thin endometrium. Jpn. J. Fertil. Steril., 46:87-90, 2001.
 - 13) 山下正紀・森布紀子・福島護之: エチレングリコールを用いたヒト凍結はい移植. 臨床婦人科産科, 54:1414-1417, 2000.
 - 14) 神谷博文・森若治・田中恵・八木亜希子・下大澤とし恵: 選択的凍結胚移植(全胚凍結胚移植) 臨婦産, 54:1405-1409, 2000.
 - 15) 種市明代・柴原浩章・大野貴史・山内有子・小原ひろみ・藤原寛行・小川修一・出居貞義・小池俊光・佐山雅昭・荒木重雄・佐藤郁夫: HRT 周期における凍結はい移植の臨床成績. 栃木県産婦人科医報, 27:10-13, 2000.
 - 16) 向田哲規・高橋克彦・岡親弘・富山達大: 反復 ART 不成功例に対するはい盤胞移植の臨床成績. 日産婦誌, 51:1125-1133, 1999.
 - 17) 森若治・神谷博文・東口篤司・高階俊光・芦原康氏・田中恵: GnRH α 併用ホルモン補充周期法による凍結はい移植の成績. 日受精着床会誌, 14:208-211, 1997.
 - 18) 竹内巧・関守利・伊吹令人: 不妊症治療をめぐる最近の話題凍結はい移植. 産婦人科治療, 72: 921-926. 1996.
 - 19) 堤 治・堤 亮: 体外受精プロトコール. 産婦人科の実際, 61:1706-1713. 2012.
 - 20) 宇都博文・坂本絵里・早坂一美・太田奈里子・戸屋真由美・菅藤哲・安田師仁・土信田雄一・中條友紀子・西中千佳子・太田百恵・菅原可奈子・田村純・斉藤有理・京野廣一: ホルモン補充周期における凍結胚移植時の卵胞ホルモン投与法の検討. 日生殖医学会誌, 53:366, 2008.
 - 21) 奥裕嗣・佃笑美・赤松芳恵・橋本周・石島富士男・伊藤啓二朗・春木篤・森本義晴・福田愛作: ホルモン補充凍結融解胚盤胞移植周期において単一胚盤胞移植 (SBT) は2個胚盤胞移植 (DBT) に比べ高い着床率が得られる. 第26回日本受精着床学会講演抄録集, pp229, 2008.
 - 22) 佐野智美・古井憲司・北川武司・野村昌男・野尻由香・荒木歩: 当院における凍結融解胚移植の臨床的検討. 第27回日本受精着床学会講演抄録集, pp186, 2009.
 - 23) 塚越静香・渋谷幸裕・花岡嘉奈子・松江陽一・塩川素子・祖母井英・田宮親: 卵巣刺激を伴わない自然周期採卵胚移植後における黄体ホルモン・卵胞ホルモンの推移. 第27回日本受精着床学会講演抄録集, pp124, 2009.
 - 24) 北村誠司・田巻智慧・三浦菜々子・松村康子・太田智子・恵中千晶・佐々木幸子・清水健伸・宇都博文・水澤友利・呉屋憲一・吉田宏之・高橋純・杉本到・杉山武: ホルモン補充周期融解胚移植での E2,P4 による妊娠予測. 日生殖医学会誌, 54:354, 2009.
 - 25) 林美佳・林篤史・山本輝・吉田陽子・菊田正子・山下能毅・奥田喜代司・大道正英: HRT 下の凍結融解胚移植におけるエストロゲン剤の使用経験. 日生殖医学会誌, 54:347, 2009.
 - 26) 泉陽子・後藤栄・松浦まき・橋本洋美・松本由紀子・水澤友利・緒方誠司・山田聡・若口昭次・塩谷雅英: ホルモン調節 (HRT) 周期での凍結融解胚盤胞移植におけるプロゲステロン補充方法の妊娠率への影響. 第28回日本受精着床学会講演抄録集, pp229, 2010.
 - 27) 野原理・新川唯彦・東政弘・佐久本哲郎: ホルモン補充療法による凍結融解胚移植時の子宮鏡所見について. 日生殖医学会誌, 55:379, 2010.
 - 28) 矢野有貴・諸井博明・寺西佳枝・高柳武志・鈴木範子・若原靖典・安藤寿夫: 凍結融解胚移植時のホルモン補充周期における天然型エストロゲン貼付剤と軟膏剤との prospective randomized study における子宮内膜の検討. 日生殖医学会誌, 55:364, 2010.
 - 29) 金谷美希・八木亜希子・田中恵美・藤本尚・森若治・神谷博文: 凍結融解胚移植における経口剤・経陰剤の黄体ホルモン投与法が妊娠率に及ぼす影響. 日生殖医学会誌, 55:363, 2010.
 - 30) 伊藤啓二朗・橋本周・佃笑美・森梨沙・大西洋子・井上朋子・中岡義晴・森本義晴: 体外受精新鮮胚移植周期における黄体補充の開始時期が妊娠率に及ぼす影響. 日生殖医学会誌, 55:348, 2010.
 - 31) 菅谷健・竹内茂人・森本誠・鈴木孝明・山口絵理香・村田紋香・長谷充子・前沢忠志: 当院における凍結融解胚盤胞移植の臨床成績—ホルモン補充周期と排卵周期の比較検討—. 日生殖医学会誌, 55:322, 2010.
 - 32) 宮谷静江・太田百恵・中條友紀子・佐藤祐香里・服部裕充・土信田雅一・戸屋真由美・京野廣一: 凍結胚移植における内服と筋肉注射の黄体補充の比較. 日生殖医学会誌, 55:274, 2010.
 - 33) 小野修一・峰克也・阿部崇・富山僚子・神戸沙織・渋谷庸子・市川智子・桑原慶充・明楽重夫・竹下俊行: ホルモン補充周期における移植当日プロゲステロン迅速評価の有用性. 日生殖医学会誌, 55:274, 2010.
 - 34) 木村秀崇・福原理恵・福井淳史・中村理果・山田健市: IVF-ET での黄体補充に経口 dydrogesterone は有効か? 第29回日本受精着床学会講演抄録集, pp270, 2011.
 - 35) 東口篤司・逸見博文・金澤朋扇・板橋詠子・斉藤学: 凍結胚に用いるホルモン補充の望ましい条件. 第29回日本受精着床学会講演抄録集, pp238, 2011.
 - 36) 松浦俊樹・池上美希・山本祐司・山本絵美・久我彰・長瀬祐樹・吉岡麻衣子・西原富次郎・白井滋: レトロゾールを使用したホルモン補充周期における凍結融解単一胚盤胞移植の妊娠率に与える影響. 第29回日本受精着床学会講演抄録集, pp208, 2011.
 - 37) 穂満ゆかり・樽松朋子・遊木靖人・福元由美子・黒木裕子・佐多良章・竹内美穂・栗田松一郎・竹内一浩: 凍結胚移植における黄体補充の年齢別比較. 第29回日本受精着床学会講演抄録集, pp185, 2011.
 - 38) 井庭裕美子・サージャント晴香クレア・甲斐義輝・溝口千鶴・土江佑佳・上田美奈子・河井綾美・今城昭史・湯本啓太郎・岩田京子・見尾保幸: 凍結融解胚移植のための HRT 周期における GnRHagonist 併用の有無と内分泌動態ならびにその臨床成績. 第29回日本受精着床学会講演抄録集, pp184,

- 2011.
- 39) 大谷飛鳥・杉原研吾・藤岡聡子・森梨沙・井田守・春木篤・福田愛作・森本義晴：各種ホルモン製剤による凍結融解胚移植成績の比較検討．第29回日本受精着床学会講演抄録集，pp183, 2011.
- 40) 阪本美香・園原めぐみ・胡桃沢智子・加納博美・立木都・福永憲隆・佐々木雅弘・木間寛之・小栗久典・羽柴良樹・浅田義正：ホルモン補充周期融解胚移植でのE2値，子宮内膜厚による妊孕性検討．日生殖医学会誌，56:420, 2011.
- 41) 宮本有希・赤松芳恵・佐藤学・橋本周・西澤知佳・姫野隆雄・大西洋子・井上朋子・伊藤啓二郎・中岡義晴・森本義晴：ホルモン補充周期凍結融解胚移植を決定する時のE2は妊娠率に影響を及ぼすか？日生殖医学会誌，56:386, 2011.
- 42) 永吉基・田中温・山本正孝・岡田潤幸・田中威づみ・鈴木敏史・竹田省：排卵誘発周期における胚移植時プロゲステロン値の測定は黄体管理に有用かどうかの検討：日生殖医学会誌，56:313, 2011.
- 43) 中川浩次・小代裕子・壽園裕康・高橋千絵・金城洋・西弥生・大島裕子・鈴木有香・米田佳孝・山城恵美・白井安砂子・杉山里英・栗林靖・杉山力一・井上正人：クロミフェンにより子宮内膜が薄くなった症例に対する新しい子宮内膜調整法．日生殖医学会誌，56:312, 2011.
- 44) 永吉基・田中威づみ・伊熊慎一郎・田中温：黄体期補充のウトロゲスタンとプロゲステロン陰座薬（PVS）の凍結胚移植の症例の比較検討．第30回日本受精着床学会講演抄録集，pp166, 2012.
- 45) 大橋浩栄・大桃幸夫・荒川修：凍結胚移植における Assisted hatching の必要性についての検討．日生殖医学会誌，57:371, 2012.
- 46) 尾崎智哉・飯泉文香・土屋翔太郎・兼子由美・松井有紀・佐藤和文・西村満：ホルモン補充周期での凍結融解胚盤胞移植におけるエストラジオール製剤の違いによる臨床成績の比較．日生殖医学会誌，57:374, 2012.
- 47) 宇佐美友希・村瀬真理子・大島綾・浜之上はるか・湯村 寧・山本みずき・千木野みわ・古野敦子・北川雅一・片山佳代・吉田浩・榊原秀也・野口和美・平原史樹：凍結融解胚移植の内膜調整法についての検討．日生殖医学会誌，57:375, 2012.
- 48) 岡本恵理・藤井美喜・十倉陽子・緒方誠司・山田聡・水澤友利・松本由紀子・若口昭次・塩谷雅英：ホルモン補充周期におけるプロゲステロン坐剤の投与経路を直腸内とすることの有用性について．日生殖医学会誌，57:375, 2012.
- 49) 久保敏子・橋田菜保子・菅愛佳・白石美穂・村上亜紀・大橋いく子・景浦瑠美・矢野浩史：ホルモン補充周期による凍結融解胚盤胞移植の臨床成績に及ぼす因子の検討．日生殖医学会誌，57:376, 2012.
- 50) Levrán, D., Dor, J., Rudak, E., Nebel, L., Ben-Shlomo, I., Ben-Rafael, Z., Mashlach, S.: Pregnancy potential of human oocytes-the effect of cryopreservation. *N. Engl. J. Med.*, 323:1153-1156, 1990.
- 51) Yee, B., Lin, Y.P., Chacon, R.R., Soubra, S., Rosen, G.F., Cassidenti, D.L.: A simplified method of timing frozen embryo transfers. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 172:1844-1848; discussion 1848-1850, 1995.
- 52) Zhang, L.Z., Chen, G.A., Liu, P.: Successful clinical pregnancy after transfer of frozen-thawed embryos. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.*, 29:706-707, 1994.
- 53) Bernardini, L., Asch, R.H.: Spontaneous resolution of ectopic pregnancy in a surrogate after oocyte donation and frozen embryo transfer. *Hum. Reprod.*, Dec;11:2785-2788, 1996.
- 54) Foudila, T., Söderström-Anttila, V., Hovatta, O.: Turner's syndrome and pregnancies after oocyte donation. *Hum. Reprod.*, 14:532-535, 1999.
- 55) Xiao, Z., Zhou, X., Xu, W., Yang, J., Xie, Q.: Natural cycle is superior to hormone replacement therapy cycle for vitrified-preserved frozen-thawed embryo transfer. *Syst. Biol. Reprod. Med.*, 58:107-112, 2012.
- 56) Byrd, W.: Cryopreservation, thawing, and transfer of human embryos. *Semin. Reprod. Med.*, 20:37-43, 2002.
- 57) Loh, S.K., Leong, N.K.: Factors affecting success in an embryo cryopreservation programme. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 28: 260-5, 1999.
- 58) Patrizio, P., Silber, S., Ord, T., Marello, E., Balmaceda, J.P., Asch, R.H.: Replacement of frozen embryos generated from epididymal spermatozoa: the first two pregnancies. *Hum. Reprod.*, 7:652-653, 1992.
- 59) Lütjen, P.J., Leeton, J.F., Findlay, J.K.: Oocyte and embryo donation in IVF programmes. *Clin. Obstet. Gynaecol.*, 12:799-813, 1985.
- 60) Sathanandan, M., Macnamee, M.C., Rainsbury, P., Wick, K., Brinsden, P., Edwards, R.G.: Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: a prospective semi-randomized study. *Hum. Reprod.*, 6:685-687, 1991.
- 61) Devroey, P., Pellicer, A., Nyboe Andersen, A., Arce, J.C.: A randomized assessor-blind trial comparing highly purified hMG and recombinant FSH in a GnRH antagonist cycle with compulsory single-blastocyst transfer. Menopur in GnRH Antagonist Cycles with Single Embryo Transfer Trial Group. *Fertil. Steril.*, 97:561-571, 2012.
- 62) Salat-Baroux, J., Alvarez, S., Antoine, J.M., Cornet, D., Tibi, C., Plachot, M., Mandelbaum, J.: Treatment of hyperstimulation during in-vitro fertilization. *Hum. Reprod.*, 5:36-39, 1990.
- 63) Treetampinich, C., O'Connor, A.E., MacLachlan, V., Groome, N.P., de Kretser, D.M.: Maternal serum inhibin A concentrations in early pregnancy after IVF and embryo transfer reflect the corpus luteum contribution and pregnancy outcome. *Hum. Reprod.*, 15:2028-2032, 2000.
- 64) Coroleu, B., Barri, P.N., Carreras, O., Martínez, F., Veiga, A., Balasch, J.: The usefulness of ultrasound guidance in frozen-thawed embryo transfer: a prospective randomized clinical trial. *Hum. Reprod.*, 17:2885-2890, 2002.
- 65) El-Toukhy, T., Taylor, A., Khalaf, Y., Al-Darazi, K., Rowell, P., Seed, P., Braude, P.: Pituitary suppression in ultrasound-monitored frozen embryo replacement cycles. A randomised study. *Hum. Reprod.*, Apr;19:874-879, 2004.
- 66) Tong, S., Rombauts, L., Mulder, A., Marjono, B., Onwude, J.L., Wallace, E.M.: Increased day 15-17 serum pro-alphaC inhibin levels specific to successful pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 89:4464-4468, 2004.
- 67) Morozov, V., Ruman, J., Kenigsberg, D., Moodie, G., Brenner, S.: Natural cycle cryo-thaw transfer may improve pregnancy outcome. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 24:119-123, 2007.

- 68) Niu, Z., Feng, Y., Sun, Y., Zhang, A., Zhang, H.: Estrogen level monitoring in artificial frozen-thawed embryo transfer cycles using step-up regime without pituitary suppression: is it necessary? *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.*, 4:5:4, 2008.
- 69) Kassab, A., Sabatini, L., Tozer, A., Zosmer, A., Mostafa, M., Al-Shawaf, T.: The correlation between basal serum follicle-stimulating hormone levels before embryo cryopreservation and the clinical outcome of frozen embryo transfers. *Fertil. Steril.*, 92:1269-1275, 2009.
- 70) Tong, X.M., Zhu, H.Y., Zhou, F., Huang, Q.X., Jiang, L.Y., Li, C., Lin, X.N., Zhang, S.Y.: Maintenance of early pregnancy without early hormone support after frozen-thawed embryo transfer in hormone replacement treatment cycles. *Fertil. Steril.*, 95:2125.e15-7, 2011.
- 71) Griesinger, G., Kolibianakis, E.M., Papanikolaou, E.G., Diedrich, K., Van Steirteghem, A., Devroey, P., Ejdrup Bredkjaer, H., Humaidan, P.: Triggering of final oocyte maturation with gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin. Live birth after frozen-thawed embryo replacement cycles. *Fertil. Steril.*, 88:616-621, 2007.
- 72) Queenan, J.T. Jr., Veeck, L.L., Seltman, H.J., Muasher, S.J.: Transfer of cryopreserved-thawed pre-embryos in a natural cycle or a programmed cycle with exogenous hormonal replacement yields similar pregnancy results. *Fertil. Steril.*, 62:545-550, 1994.
- 73) Awonuga, A.O., Dean, N., Zaidi, J., Pittrof, R.U., Bekir, J.S., Tan, S.L.: Outcome of frozen embryo replacement cycles following elective cryopreservation of all embryos in women at risk of developing ovarian hyperstimulation syndrome. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 13:293-297, 1996.
- 74) Frederick, J.L., Ord, T., Kettel, L.M., Stone, S.C., Balmaceda, J.P., Asch, R.H.: Successful pregnancy outcome after cryopreservation of all fresh embryos with subsequent transfer into an unstimulated cycle. *Fertil. Steril.*, 64:987-990, 1995.
- 75) Lockwood, G.M., Ledger, W.L., Barlow, D.H., Groome, N.P., Muttukrishna, S.: Identification of the source of inhibins at the time of conception provides a diagnostic role for them in very early pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 40:303-308, 1998.
- 76) Zikopoulos, K., Kolibianakis, E.M., Camus, M., Tournaye, H., Van den Abbeel, E., Joris, H., Van Steirteghem, A., Devroey, P.: Duration of gonadotropin-releasing hormone antagonist administration does not affect the outcome of subsequent frozen-thawed cycles. *Fertil. Steril.*, 81:473-475, 2004.
- 77) Moomjy, M., Mangieri, R., Beltramone, F., Cholst, I., Veeck, L., Rosenwaks, Z.: Shared oocyte donation: society's benefits. *Fertil. Steril.*, 73:1165-1169, 2000.
- 78) Potter, D.A., Witz, C.A., Burns, W.N., Brzyski, R.G., Schenken, R.S.: Endometrial biopsy during hormone replacement cycle in donor oocyte recipients before in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 70:219-221, 1998.
- 79) Gelbaya, T.A., Nardo, L.G., Hunter, H.R., Fitzgerald, C.T., Horne, G., Pease, E.E., Brison, D.R., Lieberman, B.A.: Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study. *Fertil. Steril.*, 85:603-609, 2006.
- 80) Damario, M.A., Hammitt, D.G., Galanits, T.M., Session, D.R., Dumesic, D.A.: Pronuclear stage cryopreservation after intracytoplasmic sperm injection and conventional IVF: implications for timing of the freeze. *Fertil. Steril.*, 72:1049-1054, 1999. Erratum in: *Fertil. Steril.*, 73:874, 2000.
- 81) al-Shawaf, T., Yang, D., al-Magid, Y., Seaton, A., Iketubosin, F., Craft, I.: Ultrasonic monitoring during replacement of frozen/thawed embryos in natural and hormone replacement cycles. *Hum. Reprod.*, 8:2068-2074, 1993.
- 82) Jaroudi, K.A., Hamilton, C.J., Willemsen, W.N., Sieck, U.V., Roca, G.: Artificial endometrial stimulation for frozen embryo replacement. *Fertil. Steril.*, 55:835-837, 1991.
- 83) Davies, M.C., Anderson, M.C., Mason, B.A., Jacobs, H.S.: Oocyte donation: the role of endometrial receptivity. *Hum. Reprod.*, 5:862-869, 1990.
- 84) Chang, S.Y., Chang, M.Y., Wang, M.L., Chan, P.J., Soong, Y.K.: Ovum donation program at Chang Gung Memorial Hospital, Taipei. *Changgeng Yi Xue Za Zhi.*, 15:9-14, 1992.
- 85) Yang, Y.S., Hwang, J.L., Ho, H.N., Kuo, Y.S., Lien, Y.R., Lee, T.Y.: Pregnancy following oocyte donation and tubal embryo transfer in patients with premature ovarian failure: report of two cases. *J. Formos. Med. Assoc.*, 90:688-692, 1991.
- 86) Chang, Y.S., Kim, S.H., Choi, Y.M., Moon, S.Y., Lee, J.Y.: Oocyte donation program using a simplified hormonal regimen. *Asia. Oceania. J. Obstet. Gynaecol.*, 16:181-190, 1990.
- 87) Tourgeman, D.E., Gentzchein, E., Stanczyk, F.Z., Paulson, R.J.: Serum and tissue hormone levels of vaginally and orally administered estradiol. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 180:1480-1483, 1999.
- 88) Kan, A.K., Abdalla, H.I., Oskarsson, T.: Two successful pregnancies in a 46,XY patient. *Hum. Reprod.*, 12:1434-1435, 1997.
- 89) Fonttis, A.A., Napolitano, R., Borda, C.: Successful pregnancy and delivery after delaying the initiation of progesterone supplementation in a postmenopausal donor oocyte recipient. *Reprod. Biomed. Online*, 9:611-613, 2004.
- 90) Madani, T., Ghaffari, F., Kiani, K., Hosseini, F.: Hysteroscopic polypectomy without cycle cancellation in IVF cycles. *Reprod. Biomed. Online*, 18:412-415, 2009.
- 91) de Ziegler, D., Frydman, R.: Different implantation rates after transfers of cryopreserved embryos originating from donated oocytes or from regular in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 54:682-688, 1990.
- 92) Hofmann, G.E., Bentzien, F., Bergh, P.A., Garrisi, G.J., Williams, M.C., Guzman, I., Navot, D.: Premature luteinization in controlled ovarian hyperstimulation has no adverse effect on oocyte and embryo quality. *Fertil. Steril.*, 60:675-679, 1993.
- 93) Sauer, M.V., Kaufman, F.R., Paulson, R.J., Lobo, R.A.: Pregnancy after oocyte donation to a woman with ovarian failure and classical galactosemia. *Fertil. Steril.*, 55:1197-

- 1199, 1991.
- 94) Serhal, P.F., Craft, I.L.: Ovum donation--a simplified approach. *Fertil. Steril.*, 48:265-269, 1987.
- 95) Jobanputra, K., Toner, J.P., Denoncourt, R., Gibbons, W.E.: Crinone 8% (90 mg) given once daily for progesterone replacement therapy in donor egg cycles. *Fertil. Steril.*, 72:980-984, 1999.
- 96) Navot, D., Fox, J.H., Williams, M., Brodman, M., Friedman, F. Jr., Cohen, C.J.: The concept of uterine preservation with ovarian malignancies. *Obstet. Gynecol.*, 78:566-568, 1991.
- 97) Brooks, A.A., Johnson, M.R., Hills, F., Chard, T., Irvine, R., Abdalla, H.I.: Insulin-related growth factor binding protein-1 levels in ovum donation pregnancies. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 59:91-94, 1995.
- 98) Guanes, P.P., Remohí, J., Gallardo, E., Valbuena, D., Simón, C., Pellicer, A.: Age does not affect uterine resistance to vascular flow in patients undergoing oocyte donation. *Fertil. Steril.*, 66:265-270, 1996.
- 99) Hofmann, G.E., Thie, J., Scott, R.T. Jr., Navot, D.: Endometrial thickness is predictive of histologic endometrial maturation in women undergoing hormone replacement for ovum donation. *Fertil. Steril.*, 66:380-383, 1996.
- 100) Damario, M.A., Hammitt, D.G., Galanits, T.M., Stevens, S.A., Session, D.R., Dumesic, D.A.: Anonymous oocyte donation performed exclusively with embryos cryopreserved at the pronuclear stage. *Fertil. Steril.*, 71:830-835, 1999.
- 101) Stadtmauer, L., Harrison, D.D., Boyd, J., Bocca, S., Oehninger, S.: Pilot study evaluating a progesterone vaginal ring for luteal-phase replacement in donor oocyte recipients. *Fertil. Steril.*, 92:1600-1605, 2009.
- 102) Meldrum, D.R., Wisot, A., Hamilton F., Gutlay-Yeo, A.L., Marr, B., Huynh, D.: Artificial agonadism and hormone replacement for oocyte donation. *Fertil. Steril.*, 52:509-11, 1989.
- 103) Remohí, J., Gutiérrez, A., Cano, F., Ruiz, A., Simón, C., Pellicer, A.: Long oestradiol replacement in an oocyte donation programme. *Hum. Reprod.*, 10:1387-1391, 1995.
- 104) Press, F., Shapiro, H.M., Cowell, C.A., Oliver, G.D.: Outcome of ovum donation in Turner's syndrome patients. *Fertil. Steril.*, 64:995-998, 1995.
- 105) Naher, N., Sudo, S., Kudo, M., Nishi S., Moriwaki, M., Minakami H., Sakuragi, N.: Bioactivity of human chorionic gonadotropin produced in frozen-thawed embryo transfer cycles with exogenous hormone replacement. *Hokkaido Igaku Zasshi*, 81:187-95, 2006.
- 106) Kamiya, H., Moriwaka, O.: Human embryo cryopreservation. *Hum. Cell*, 10:39-44, 1997.
- 107) Murata, Y., Oku, H., Morimoto, Y., Tokuda, M., Murata, T., Sugihara, K., Nagata, F., Nakaoka, Y., Fukuda, A.: Freeze-thaw programmes rescue the implantation of day 6 blastocysts. *Reprod. Biomed. Online*, 11:428-433, 2005.
- 108) Utsunomiya, T., Ito, H., Hira, K., Otsu, E., Watanabe, H., Mori, T.: Developmentally retarded frozen blastocysts can be rescued by synchronizing culture prior to transfer. *Reprod. Biomed. Online*, 12:622-629, 2006.
- 109) プロゲステロンキット, DPC・プロゲステロン, 三菱化学メディエンス株式会社, 添付文書より.
- 110) Bhavnani, B.R.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of conjugated equine estrogens: chemistry and metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217:6-16, 1998.
- 111) Stillman, R.J.: In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 142:905-21, 1982.
- 112) Melnick, S., Cole P., Anderson, D., Herbst, A.: Rates and risks of diethylstilbestrol-related clear-cell adenocarcinoma of the vagina and cervix. An update. *N. Engl. J. Med.*, 316:514-516, 1987.
- 113) Kimura T. Persistent vaginal cornification in mice treated with estrogen prenatally. *Endocrinol. Jpn.*, 22:497-502, 1975.
- 114) Nomura, T., Kanzaki, T.: Induction of urogenital anomalies and some tumors in the progeny of mice receiving diethylstilbestrol during pregnancy. *Cancer Res.*, 37:1099-1104, 1977.
- 115) 高杉暹:ステロイドホルモンによって誘起されるマウス膈上皮の不可逆変化と腫瘍形成. 最新医学, 23:522-531, 1968.
- 116) 日本産婦人科医会 研修ノート, No.67 pp. 120-122. 2001.
- 117) 安田佳子・木原隆英・西村秀雄:妊娠中に ethinylestradiol の投与を受けた母マウス由来の成熟雌マウスの膈上皮の変化. 医学の歩み, 98: 537-538, 1976.
- 118) Lutjen, P., Trounson, A., Leeton, J., Findlay, J., Wood, C., Renou, P.: The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature*, 307:174-175, 1984.
- 119) Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine.: Progesterone supplementation during the luteal phase and in early pregnancy in the treatment of infertility: an educational bulletin. *Fertil. Steril.*, 89:789-92, 2008.
- 120) 西村秀雄:先天奇形に臨界期. 医学の歩み, 103:955-959, 1977.
- 121) Lahat, E., Raziel, A., Friedler, S., Schieber-Kazir, M., Ron-El, R.: Long-term follow-up of children born after inadvertent administration of a gonadotrophin-releasing hormone agonist in early pregnancy. *Hum. Reprod.*, 14:2656-60, 1999.
- 122) Platteau, P., Vandervorst, M., Devroey, P.: Long term follow-up of children born after inadvertent administration of a GnRH-analogue in early pregnancy. *Hum. Reprod.*, 15:1421. 2000.

調節卵巣刺激周期における採卵あたりの累積妊娠率

大野 浩史^{1,2}, 福永 憲隆^{1,2,3}, 永井 利佳^{1,2}, 北坂 浩也^{1,2}, 吉村 友邦^{1,2},
田村 総子^{1,2}, 長谷川 望^{1,2}, 加藤 道高^{1,2}, 中山 要^{1,2},
竹内 基子^{1,2}, 青柳 奈央^{1,2}, 児嶋 瑛子^{1,2}, 渡邊 紘之^{1,2},
安江 香友子^{1,2}, 糸井 史陽³, 羽柴 良樹^{1,2}, 浅田 義正^{1,2,3}

¹ 浅田レディース名古屋駅前クリニック 〒450-0002 愛知県名古屋市中村区名駅4-6-17 名古屋ビルディング 3F

² 浅田レディース勝川クリニック 〒486-0931 愛知県春日井市松新町1-4 ルネック 5F

³ 浅田生殖医療研究所 〒486-0931 愛知県春日井市松新町1-4 ルネック 4F

要 旨： 生殖補助医療は患者にとって身体的・精神的・経済的負担となる。特に採卵の負担は大きく、採卵あたりの妊娠率向上は患者への負担軽減となる。本検討では調節卵巣刺激による採卵1回あたりの累積妊娠率を算出することで、1回の採卵で移植何回分の胚を確保すべきかを検討した。また移植1回目に新鮮胚移植または凍結融解胚移植のどちらの移植方法の選択が早期の妊娠に繋がるのかを比較検討した。対象症例は35歳以下、36～38、39歳以上の3群に分け、累積妊娠率を算出した。その結果、移植2回目に有意に妊娠率が上昇し、その後移植4回目まで妊娠率が上昇した。以上のことから1回の採卵で移植2回分以上の胚の確保が重要であることが明らかとなった。移植1回目に凍結融解胚移植を施行した群は新鮮胚移植を施行した群と比較して高い累積妊娠率が得られたことから、移植は凍結融解胚移植を第一選択とすべきであると考えられる。

キーワード： 累積妊娠率, 妊娠率, 調節卵巣刺激, 新鮮胚移植, 凍結融解胚移植

はじめに

近年、生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology: ART) を希望する患者の高齢化が進み、妊娠・出産に至るまでに採卵と移植を繰り返すことが多い¹⁾。妊孕性は年齢と共に低下する²⁾ため、可能な限り早期に妊娠に繋がる治療法の選択が望ましいが、その選択に苦慮する場合が多い。ARTによる治療の長期化は、患者への身体的・精神的・経済的負担の増大に繋がる。Domar³⁾やBoivin⁴⁾らは、ARTに伴う身体的および心理的なストレスは治療成績に悪影響を及ぼすという報告を行っている。これらの報告からも、ART患者のストレス軽減は重要な課題であると考えられる。特に、体外受精に必要となる採卵は膣壁から卵巣を穿刺するため、患者の身体的・精神的負担が大きい。これらの背景から、当院における調節卵巣刺激は、1回の採卵において2回以上の移植が可能な受精卵数を確保することを考慮し卵巣刺激を行うことで、採卵あたりの妊娠率向上を目的としている。そこで今回我々は、調節卵巣刺激による採卵1回あたりの累積妊娠率を算出し、1回の採卵で移植何回分の胚

を確保することが妥当であるかを検討した。また、採卵1回あたりの累積妊娠率を高めるためには移植1回目に凍結融解胚移植と新鮮胚移植のどちらを選択することが有効であるかを検討したので報告する。

対象と方法

対 象

2009年1月から2011年12月の期間においてlong法、short法、antagonist法による調節卵巣刺激で採卵した1617症例1966周期を対象とした。さらに、採卵周期に新鮮胚移植を施行した712症例908周期をFresh-ET群、採卵後に前核期胚凍結し次周期以降に凍結融解胚移植を施行した905症例1058周期をThaw-ET群とした。

方 法

対象症例を35歳以下、36～38、39歳以上の年齢3群に分け、採卵1回あたりの累積妊娠率を算出し、1回の採卵で移植何回分の胚を確保することが妥当であるかを検討した。Fresh-ET群、Thaw-ET群においても年

受付 2013年2月1日/受理 2013年3月15日

著者連絡先: 大野 浩史 e-mail [lab_asada@ivf-asada.jp]

齢3群に分け累積妊娠率を比較した。両群共に移植に用いなかった余剰胚が良好胚盤胞に成長した場合、凍結して次周期以降の移植に供した。Fresh-ET群において、採卵周期に前核期胚が移植2回分（前核期胚7個）以上確保できた場合、移植に使用しない前核期胚を凍結し、次周期に凍結融解胚移植に供した。当院における調節卵巣刺激法は、患者年齢とAnti-Mullerian Hormone (AMH)の値をもとに卵巣予備能を評価しshort法またはantagonist法を選択している。通常、rFSHあるいはhMG150IU、225IUあるいは300IUで投与を開始する。卵胞発育・エストラジオール値をモニターし、投与量・投与期間を経過をみながら調節する。凍結にはVitrification Kit vitrification media(北里コーポレーション)を使用し、胚を平衡化液にて平衡化させ、ガラス化液に移し、少量のガラス化液とともにcryotop（北里コーポレーション）上に載せ液体窒素につけて凍結した。融解には、Vitrification Kit thawing media（北里コーポレーション）を使用した。前核期胚の凍結は最大4個を移植1回分、胚盤胞の凍結は1個を移植1回分とした。移

植はホルモン補充による内膜調整後、ETカテーテル・ETスタイレット(北里コーポレーション)を使用し超音波下にて施行した。妊娠判定は子宮内に胎嚢が認められた症例を臨床的妊娠とした。Fresh-ET群とThaw-ET群の平均年齢、平均採卵個数、平均移植回数、累積妊娠率を比較した。有意差検定にはt検定、カイ二乗検定を用い、 $P<0.05$ を有意とした。

結 果

採卵あたりの累積妊娠率

調節卵巣刺激により採卵した1617症例1966採卵周期の平均年齢は 35.5 ± 4.0 歳、平均採卵個数は 15.4 ± 9.6 個、平均移植回数は 1.9 ± 1.2 回であった(表1)。

移植1回目から5回目までの累積妊娠率はそれぞれ35歳以下の群で43.3-69.8%、36～38歳の群で29.3-53.2%、39歳以上の群では18.2-30.2%であった(図1)。各年齢群ともに、移植2回目に妊娠率が有意に増加した。一方、移植3回目以降は各年齢群ともに妊娠

表1 対象症例の背景

	症例数および周期数	平均年齢 (Mean $\pm$ SD)	平均採卵個数	平均移植回数
1回の採卵あたり	1617 症例 1966 周期	35.5 ± 4.0	15.4 ± 9.6	1.9 ± 1.2
Fresh-ET 群あたり	712 症例 908 周期	36.2 ± 3.9^a	10.7 ± 5.3^c	1.8 ± 1.1^e
Thaw-ET 群あたり	905 症例 1058 周期	34.8 ± 3.9^b	19.5 ± 10.5^d	2.0 ± 1.2^f

※ a, b, c, d, e, f: 同一項目異符号間に有意差あり ($p<0.05$)

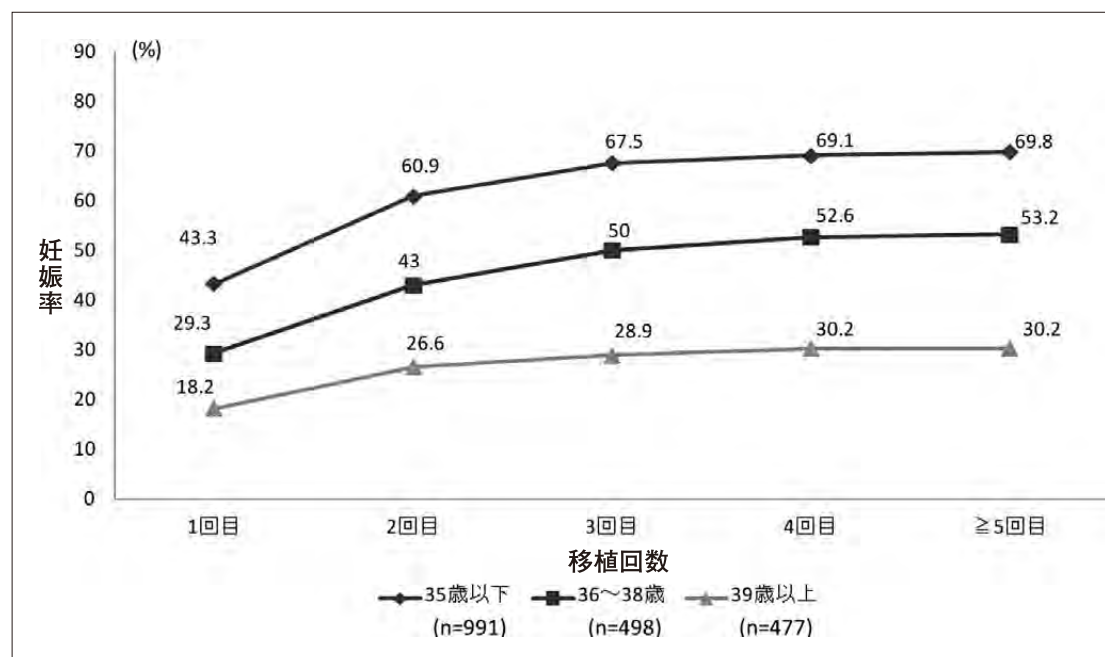


図1 採卵1回あたりの累積妊娠率

率の上昇は7%以下となり、移植4回目以降はプラトーに達した。

1回目の移植に新鮮胚移植または凍結融解胚移植を施行した場合の累積妊娠率

Fresh-ET群とThaw-ET群の平均年齢、平均採卵個数、平均移植回数を比較した。その結果、平均年齢はFresh-ET群で 36.2 ± 3.9 歳、Thaw-ET群で 34.8 ± 3.9 歳であり、Thaw-ET群の年齢は有意に低かった ($P < 0.05$)。平均採卵個数は、Fresh-ET群で 10.7 ± 5.3 個、Thaw-ET群で 19.5 ± 10.5 個であり、Thaw-ET群で有意に多かった ($P < 0.05$)。平均移植回数は、Fresh-ET群で1.8

± 1.1 回、Thaw-ET群で 2.0 ± 1.2 回でありThaw-ET群は有意に高かった ($P < 0.05$) (表1)。

Fresh-ET群の移植1回目から5回目までの累積妊娠率はそれぞれ35歳以下の群で31.9-55.2%、36～38歳の群で18.9-42.9%、39歳以上の群では15.2-27.9%であった (図2)。Thaw-ET群の移植1回目から5回目までの累積妊娠率はそれぞれ35歳以下の群で50.2-78.6%、36～38歳の群で40.6-65.3%、39歳以上の群では22.4-33.3%であった (図3)。各年齢群ともに、Thaw-ET群の累積妊娠率はFresh-ET群に比較して高い値となった。移植2回目以降の累積妊娠率の上昇は両群ともに大きな差は認められなかった。

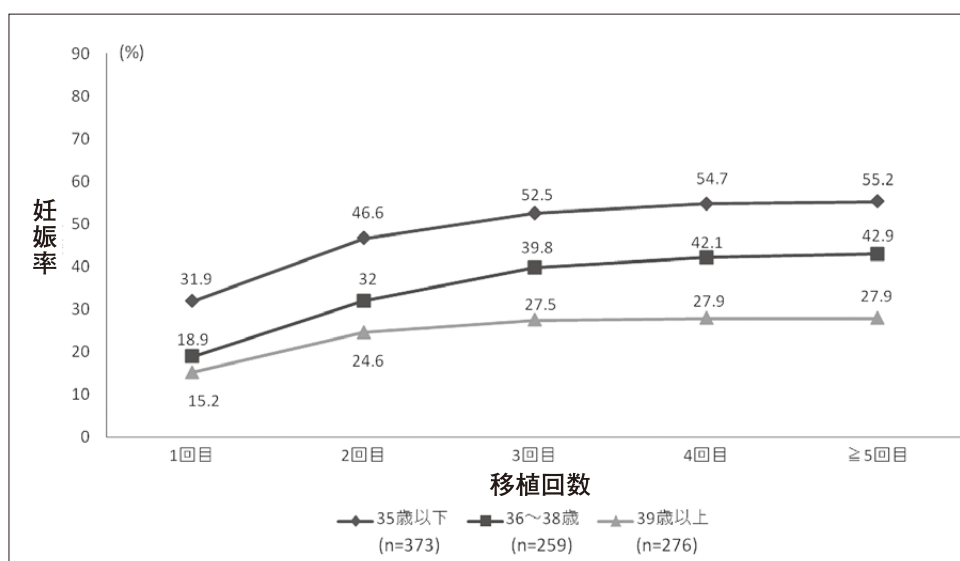


図2 Fresh-ET 群における採卵1回あたりの累積妊娠率

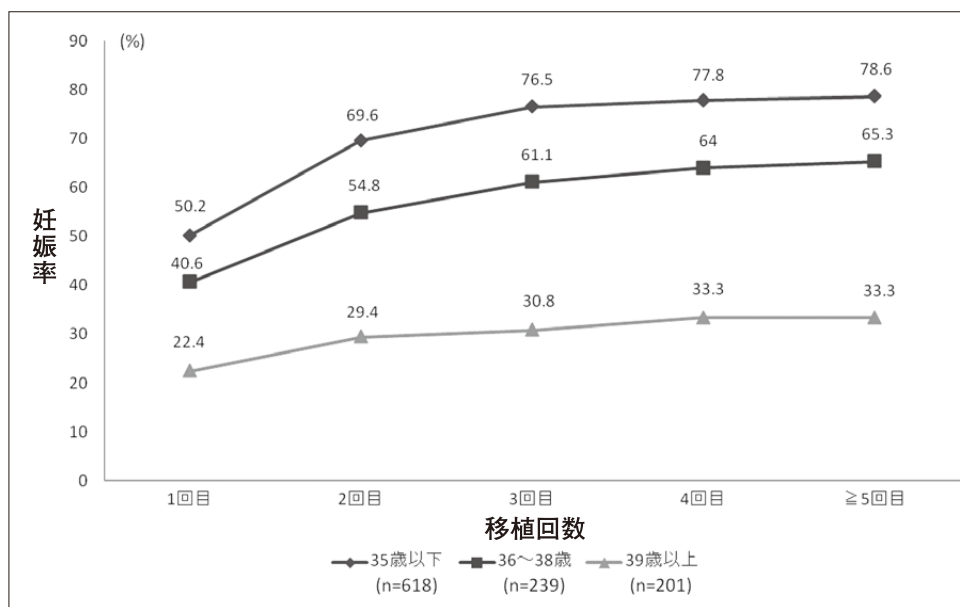


図3 Thaw-ET 群における採卵1回あたりの累積妊娠率

考 察

本検討により、調節卵巣刺激による採卵1回あたりの累積妊娠率は移植2回目に有意に上昇し、その後移植4回目まで妊娠率が上昇したことから、1回の採卵で移植2回分以上の受精卵を確保することが重要であることが明らかとなった。採卵1回あたりの累積妊娠率において移植2回目の妊娠率が大きく上昇した理由は、移植2回目は融解胚移植周期であり子宮内膜の状態を整えた状態で移植を行ったためであると考えられる。

Thaw-ET群の妊娠率がFresh-ET群に比較して高かったのは、Thaw-ET群には年齢が低く、採卵個数の多い症例が多く含まれ、OHSSを発症するリスクが高いため採卵により得られた胚を全て凍結し、子宮内膜を調整後に移植を行ったためであると考えられる。一方、Fresh-ET群は卵巣刺激のために卵胞ホルモンの投与量が多くなり、子宮環境が着床に適した状態では無かったと考えられる。移植2回目以降は両群ともに累積妊娠率の上昇に有意差はなかったことから、移植1回目の妊娠率の差が移植5回目の累積妊娠率の差となって表れたと考えられる。Shapiroら⁵⁾は凍結融解胚移植群は新鮮胚移植群に比較し、移植あたりの臨床妊娠率は有意に上昇したという結果から、妊娠率上昇の理由には子宮内膜の受容能が関与しているのではないかという報告をしており、今回の本検討の検討結果と一致している。

一般的に凍結融解胚移植の主なリスクとして、凍結や融解による胚へのダメージや、出生児に対する影響が考えられる。しかし近年、凍結融解技術は飛躍的に向上し、当院で融解を行った過去3年間の凍結胚の融解時生存率は前核期胚98.8% (9238/9349)、胚盤胞99.9% (2397/2400)であった。Wennerholm⁶⁾らは、凍結融解胚移植と新鮮胚移植により出産された児の健康状態を比較したとき、両者に差はないという報告をしている。またNakashima⁷⁾らは凍結融解胚移植により出産された児の低体重児のリスクは新鮮胚移植により出産された児に比較して低いことを報告している。このような背景からも、採卵周期で得られた受精卵は全胚凍結し次周期以降に移植することは、採卵1回あたりの累積妊娠率を向上させる上で重要であると考えられる。そのため当院では2013年より新鮮胚移植を中止し、全症例において凍結融解周期における移植を行っている。社会情勢の変化により40歳以上の高齢患者が加速的に増加しているために、卵巣予備能の低下により調節卵巣刺激が有効でない場合も多いが、卵巣予備能を正しく評価し調節卵巣刺激が可能な患者は、1回の採卵において移植2回分以上の胚を凍結保存し、次周期以降に凍結融解胚移植を

行うことで、妊娠までの採卵回数を減らし早期の妊娠に繋げることができると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Homburg, R., Meltzer, S., Robinson, J., Scharf, S., Anteby, EY., Orvieto, R.: Is there a limit for the number of in vitro fertilization cycles for an individual patient?. *Fertil. Steril.*, 91:1329-1331, 2009.
- 2) Maheshwari, A., Hamilton, M., Bhattacharya, S.: Effect of female age on the diagnostic categories of infertility. *Hum. reprod.*, 23:538-542, 2008.
- 3) Domar, A., Gordon, K., Garcia-Velasco, J., La Marca, A., Barriere, P., Beligotti, F.: Understanding the perceptions of and emotional barriers to infertility treatment: a survey in four European countries. *Hum. reprod.*, 27:1073-1079, 2012.
- 4) Boivin, J., Schmidt, L.: Infertility-related stress in men and women predicts treatment outcome 1 year later. *Fertil. Steril.*, 83: 1745-1752, 2005.
- 5) Shapiro, BS., Daneshmand, ST., Garner, FC., Aguirre, M., Hudson, C., Thomas, S.: Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil. Steril.*, 96: 344-348, 2011.
- 6) Wennerholm, UB., Soderstrom-Anttila, V., Bergh, C., Aittomaki, K., Hazekamp, J., Nygren, KG., Selbing, A., Loft A.: Children born after cryopreservation of embryos or oocytes: a systematic review of outcome data. *Hum. reprod.*, 24: 2158-2172, 2009.
- 7) Nakashima, A., Araki, R., Tani, H., Ishihara, O., Kuwahara, A., Irahara, M., Yoshimura, Y., Kuramoto, T., Saito, H., Nakaza, A., Sakumoto, T.: Implications of assisted reproductive technologies on term singleton birth weight: an analysis of 25,777 children in the national assisted reproduction registry of Japan. *Fertil. Steril.*, 99:450-455, 2013.

ARTにおける合成黄体ホルモン (ルトラールTM: 酢酸クロルマジノン)の有用性について

浅田 義正¹, 羽柴 良樹¹, 五十嵐 健治¹, 滝口 修司¹,
薬師 義弘¹, 浅田 美佐¹, 近藤 育代², 日比 初紀³,
木下 孝一⁴, 福永 憲隆¹, 園原 めぐみ¹

¹ 浅田レディース名古屋駅前クリニック 〒450-0002 愛知県名古屋市中村区名駅4-6-17 名古屋ビルディング3F

² 名城病院 産婦人科 〒460-0001 愛知県名古屋市中区三の丸1-3-1

³ 協立総合病院 泌尿器科 〒456-8611 愛知県名古屋市中熱田五番町4-33

⁴ 藤田保健衛生大学病院 産婦人科 〒470-1192 愛知県豊明市杣掛町田楽ヶ窪1-98

要旨: ARTは目覚ましい発展を遂げてきた。黄体管理は重要なプロセスであるが、黄体ホルモン補充はあまり注目されてこなかった。当院では黄体ホルモンの筋注からはじまり、腔坐薬の使用を経て、2007年4月から内服でルトラールTM(酢酸クロルマジノン)を使用してきた。今回アンケートを実施した結果、我が国で体外受精(顕微授精を含め)ではルトラール使用で1万人以上の、一般不妊治療でも6千人以上の出生が判明し、特に異常は認めなかった。ルトラール内服は簡便で安価で副作用も少ない。ルトラールは過去にアメリカ、イギリスで販売中止になった経緯があるが、現在はその根拠が否定され、我が国を含め各国で使われ続けている。FDA「D」と誤解されてきたが、アメリカで販売されていないため、評価されていなかったというのが真実であった。今回の我々の膨大なデータから安全性の高い有用なホルモン補充として評価でき、合成ホルモンという偏見を打破したい。

キーワード: ルトラールTM(酢酸クロルマジノン), 黄体ホルモン補充, 黄体管理, ART, 融解胚移植

はじめに

体外受精胚移植, 顕微授精, ガラス化法凍結融解等の技術革新により, ART(Assisted Reproductive Technology)は目覚ましい発展を遂げてきた。卵巣刺激, 採卵, 体外培養, 胚移植, 黄体管理は臨床成績の向上を目指すうえでそれぞれ重要なプロセスである。卵巣刺激については常に話題にのぼり議論が絶えず, 新薬も続々登場しいろいろ変革されてきた。体外培養も培養液, 培養器ともに大きく変化してきた。採卵, 胚移植も機器, 採卵針, 移植カテーテル等の改良, 新製品の登場で変わってきた。一方, 黄体ホルモン補充はあまり重要視されず, 各施設が独自のやり方で施行し, ほかの技術進歩に比べ大きな変革がなされて来なかった印象がある。当院では黄体ホルモンの筋注からはじまり, 腔坐薬の使用を経て, 2007年4月から合成黄体ホルモンであるルトラールTM(酢酸クロルマジノン)を使用し, 新鮮胚移植, 凍結融解胚移植の黄体管理をしてきた。2010年の当院における全妊娠反応陽性者は1041例であり, そのうち, 913例が体外受精あるいは顕微授精での妊娠例であり, その93.9%, 857例が凍結受精卵融解胚移植による妊娠で

あった。当院では融解胚移植の全例をホルモン補充周期で施行している。融解胚移植に不可欠な黄体ホルモン補充は目立たないがもっともその施行頻度が多い重要な治療となった。

ルトラールの使用は1992年に遡る。名古屋大学分院産婦人科では1990年6月中部地方で初めての凍結融解妊娠に成功した。1992年には日本初の内膜調整法による凍結融解妊娠に成功し報告した。患者は視床下部性無月経患者でデボシンTM+ルトラールの内膜調整法を使用した。名古屋大学では当時黄体ホルモンの連日50mg筋注を基本としていた。筆者は1998年からナカジマクリニック不妊センターでプロゲステロン腔坐薬(200mg×2/day)を作り始め, 筋注から徐々に腔坐薬に移行した。2007年毎回1kgずつプロゲステロン原末を購入していた製薬会社から製剤許可の提示を突然求められ坐薬づくりを断念した。2007年4月より, 全症例の黄体ホルモン補充にルトラールを使用してきた。

今回, いまだ世界的には筋注, 腔坐薬, 腔用ゲル等が主流である黄体管理であるが, ルトラールによる黄体管理の安全性と簡便性について検討したので報告する。

受付 2013年2月4日/受理 2013年3月2日

著者連絡先: 浅田 義正 e-mail [y_asada@ivf-asada.jp]

対象と方法

ルトラルの投与法は、以前からルトラルを使用していたIVF大阪クリニックのプロトコルにならい、融解胚移植一日3錠、新鮮胚移植ではEP比を考慮し一日6錠投与とした。現在も変わっていないが、2012年秋より全症例の新鮮胚移植はとりやめ、全例融解胚移植にしたため、現在はルトラル、一日3錠処方のみとなった。2010年受精着床学会での筆者のランチョンセミナーをきっかけにルトラルの使用を試されたドクターから好評をいただいたことから、今回、ルトラル使用がわかっていた13施設にアンケートを送り、ルトラルについて多施設での使用結果、使用経験について回答を得た。

結果

当院以外13施設からアンケートの回答をいただいた。いつごろからは使い始めたかの質問には1986年、2003年、2005年頃からの施設もあったが、多くの施設は2010年頃からであり、筆者の講演がきっかけになっていた。古くから使用の先生は以前勤務の大学や病院での経験がきっかけになっていた。ホルモン効果が高いから、内服だから、薬剤部での坐薬製作の拒否という理由もあった。今回のアンケートで体外受精（顕微授精を含め）ではルトラル使用で1万人以上の出生が確認され、一般不妊治療でも6千人以上が出生していた。ルトラル服用で気になることはあるかの質問には、服用中にうつになる人がごく稀にいるような気がするという回答があったが、それ以外の回答ではすべて異常はないというものであった。奇形率の異常、特に印象に残っている奇形等はあるかの質問には、全例ないという返答であった。多くの施設は妊娠後も使用を続けたが、3施設では妊娠後薬剤を変更していた。2施設はウトロゲスタンTM（マイクロナイズドプロゲステロン）、1施設ではデュファストンTM（ジドロゲステロン）に変更していた。ルトラルが切迫流産に保険適応されていないためという理由であった。

考察

ARTにおける黄体ホルモン補充はいろいろ議論のあるところである。新鮮胚移植においては、IVF/ICSI後の経腔的プロゲステロン投与を妊娠5週で中止したとしても妊娠8週で中断したものと比較し同様な臨床結果が得られ、長期の黄体ホルモン投与の必要性はないとする報告もある¹⁾。凍結融解胚移植においては、黄体管

理は必須であるが、estrogen + progesterone補充周期で胚移植を行ったところ、自然排卵周期より高い妊娠反応陽性率が得られたと報告されている²⁾。黄体ホルモンの補充方法は自己注射の普及も関係し、世界的には筋注が主流であったが、少しずつ変化しつつある。筋注とプロゲステロン腔錠を比較検討したもの³⁾、筋注と腔用ゲル⁴⁾、腔用ゲルとプロゲステロン腔錠の比較検討⁵⁾等が報告されている。いずれの報告においても副作用等の差異はあるものの臨床的成績には差はないとされている。内服における報告はほとんどないが、デュファストンが黄体ホルモン補充に有効であるという報告がある⁶⁾。ルトラルについては報告がない。そのため、合成という言葉の印象からも合成黄体ホルモンは使うべきでないとする主張も根強く存在する。

腔坐薬からルトラル内服への変更により、患者からは今まで不快であった腔坐薬から解放され、かつ安価で喜んで受け入れられた。ルトラルは薬価27.3円であり、一日100円以下の負担で済み、明らかに経済的負担は低下した。坐薬の吸収不安定の心配も内服ではなく、坐薬による不正出血や帯下の増加の心配もなくなった。当院で最もつらいとされた腔坐薬作りから新人胚培養士は解放され、スタッフからも好評であった。初期には坐薬製作時空中に舞ったプロゲステロン粉末により、院内ホルモン測定値に異常を生じたこともあり、製作場所もフロアーを変えるなど苦労が多かった。妊娠悪阻で内服できない患者のために残しておいた何千個もの腔坐薬はほとんど使われずに廃棄になった。理由ははっきりしないが、結果的に悪阻が少ない印象があり、内服できず困ったことはほとんどない。また、佐久本らは子宮鏡でデュファストンに比べルトラルでは着床により子宮内膜が観察され、ルトラル内服で十分効果が得られることを報告している⁷⁾。当院における融解胚移植は通常、エコーによる子宮内膜厚の確認、融解胚移植、妊娠判定の一周期の通院は3回のみで完結する。したがって患者の通院負担も最小限となる。我が国の薬剤説明書にはルトラル、デュファストンともに、妊婦、産婦、授乳婦等への投与に関して記載がない。もともとART全体でわが国では保険適応のある薬剤はなく、ルトラルにおいても患者には適応がなく使用することに関しての承諾は必要と思われる。米国FDA胎児危険度分類では「カテゴリDに分けられ、潜在的なリスクがあるにもかかわらず妊婦への使用が正当化されることがありうる。」とされていたが事実はそうでなかった。インターネット上で黄体ホルモンはすべてFDA「D」という情報が出まわっており、筆者もそう認識していたが間違いであった。ルトラルはアメリカで販売されていないため、評価さ

れていないというのが真実であった。

ルトラールは混合剤の1成分としてEstalor-21 およびC-Quensの名でアメリカ、イギリスで市販されていたが、犬を使用した試験で乳がんの発生が認められたためメーカーは1970年販売を中止した。そして、1972年FDAはEstalor-21 およびC-Quensの承認を取り消した。我が国では安全情報に十分注意を払うということで発売を継続した。その後、ヒトでの乳がん発症の報告はなく、1992年WHOによる疫学調査の結果、乳がんとの関連を小とする報告がなされ、また、IARC (International Agency for Research on Cancer) においても疫学調査により安全とみなされている^{8) 9)}。アメリカとイギリスでは販売中止となったが、我が国、フランス、ドイツ、スイス、オーストリアでは現在も販売されている。すなわち、ルトラールはFDA「D」でなく、誤解が招いた心配だったと言わざるを得ない。

何より今回の我々の膨大なデータが一番の検証であり、一番の安全性の証明であると考えている。

おわりに

以前は黄体ホルモンを十分、十二分に投与していたが、実際必要とされる黄体ホルモンは少なくてよいと考えている。個人的感想、個人的経験で検証されず過剰に黄体ホルモンは投与され続けられてきた感がある。ルトラール3錠で十分という見解には不安もあると思うが、結果が証明していると考えている。私以外に日本全国で多くのドクターが採用し好評を得ている。今後さらに研究が進み、患者に福音となる方法が議論されることを願っている。

謝 辞

今回のアンケートのご協力いただきました以下の施設の多くのドクターに心より感謝申し上げます。(順不同)IVFなんばクリニック、IVF大阪クリニック、梅ヶ丘産婦人科、越田クリニック、松田ウイメンズクリニック、竹内レディースクリニック、豊見城中央病院、荒川・大桃エンゼルマザークリニック、芝公園かみやまクリニック、池袋えざきレディースクリニック、みむろウイメンズクリニック、レディースクリニックあいいく、幸町IVFクリニック

参 考 文 献

- 1) Kohls, G., Ruiz, F., Martinez, M., Hauzman, E., Fuente, G., Pellicer, Garcia-Velasco, A.: Early progesterone cessation after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection: a

randomized, controlled trial. *Fertil. Steril.*, 98 (4) :858-862, 2012.

- 2) Candido, T., Alsberg, T., Martikainen, H., Humaidan, P.: Pregnancy loss after frozen-embryo transfer a comparison of three protocols. *Fertil. Steril.*, 98 (5) :1165-1169, 2012.
- 3) Mitwally, M., Diamond, M., Abuzeid, M.: Vaginal micronized progesterone versus intramuscular progesterone for luteal support in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 93 (2) :554-569, 2010.
- 4) Silverberg, M., Vaughn, C., Hansard, J., Burger, Z., Minter, T.: Vaginal (Crinone 8%) gel vs. intramuscular progesterone in oil for luteal phase support in in vitro fertilization: a large prospective trial. *Fertil. Steril.*, 97 (2) :344-348, 2012.
- 5) Bergh, C., Lindenberg, S.: A prospective randomized multicentre study comparing vaginal progesterone gel and vaginal micronized progesterone tablets for luteal support after in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection. *Hum.Reprod.*, 27 (12) :3467-3473, 2012.
- 6) Ganesh, A., Chakravorty, N., Mukherjee, R., Goswami, S., Chaudhury, K., Chakravarty, B.: Comparison of oral dydrogesterone with progesterone gel and micronized progesterone for luteal support in 1,373 women undergoing in vitro fertilization: a randomized clinical study. *Fertil. Steril.*, 95 (6):1961-1965, 2011.
- 7) 佐久本哲郎・寺田陽子・徳永義光・東 政弘：着床と臨床。IVF J NEWS, 53:7-8, 2012.
- 8) Marselos, M.: Carcinogenic properties of pharmaceutical agents evaluated in the IARC Monographs programme. *Carcinogenesis*, 12 (10) :1751-66, 1991.
- 9) Thomas, D.: Breast cancer and specific types of combined oral contraceptives. The WHO Collaborative Study of Neoplasia and Steroid Contraceptives. *Br. J. Cancer*, 65 (1) :108-13, 1992.