

ISSN 1881-9028

# 日本IVF学会雑誌

Vol.21 No.1

2018

JSAR  
Japan Society of Assisted Reproduction

論文

—原著—

- 単一胚移植により発生した一卵性双胎の検討 ..... 3  
藤田 欣子<sup>1,2</sup>, 上林 大岳<sup>1</sup>, 堀田 美穂<sup>2</sup>, 北村 修一<sup>2</sup>, 道倉 康仁<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>金沢たまごクリニック  
<sup>2</sup>永遠幸レディースクリニック

—原著—

- SMAS から算出したパラメータと体外受精との関係 ..... 7  
古橋 孝祐, 大月 純子, 江夏 徳寿, 横田 梨恵, 岸 加奈子, 辻 優大, 岩崎 利郎, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英  
英ウィメンズクリニック

—原著—

- 胚盤胞のグレードと発生段階が臨床妊娠率と流産率に与える影響について ..... 11  
魏 興強, 古橋 孝祐, 辻 優大, 岩崎 利郎, 伊藤 宏一, 水澤 友利, 松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英  
英ウィメンズクリニック

—原著—

- ART 出生児 3,223 名のフォローアップ：胚凍結融解が児の身体発育に及ぼす影響 ..... 18  
菊地 寿美, 青野 展也, 中條 友紀子, 服部 裕充, 中村 祐介, 佐々木 千紗, 小泉 雅江, 戸屋 真由美, 五十嵐 秀樹, 京野 廣一  
医療法人社団 レディースクリニック京野

—症例報告—

- Letrozole 直前頓服で OHSS 回避, 生児出産に成功したハイリスク症例 ..... 23  
岡本 純英, 上田 泰子, 秋吉 俊明, 佐藤 春菜, 松尾 恵子, 松尾 完, 南 志穂, 福嶋 倫子, 長野 純大, 山口 敦巳  
ART 岡本ウーマンズクリニック

<b>第21回 日本IVF学会学術集会 開催概要</b> .....	27
<b>日本IVF学会雑誌発行における投稿論文募集のお知らせ</b> .....	28
<b>日本IVF学会雑誌 投稿規定</b> .....	29
<b>一般社団法人 日本IVF学会 定款</b> .....	31
<b>一般社団法人 日本IVF学会 役員</b> .....	37
<b>編集委員会</b> .....	38

# 単一胚移植により発生した一卵性双胎の検討

藤田 欣子<sup>1,2</sup>, 上林 大岳<sup>1</sup>, 堀田 美穂<sup>2</sup>, 北村 修一<sup>2</sup>, 道倉 康仁<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>金沢たまごクリニック 〒920-0016 石川県金沢市諸江町中丁 327 番 1

<sup>2</sup>永遠幸レディースクリニック 〒923-0002 石川県小松市小島町ル 50-1

**要旨:** 単一胚移植(single embryo transfer, SET)の多胎発生率は、自然妊娠より高いとの報告が多い。過去12年間で経験したSET単胎妊娠3667例とSET双胎妊娠43症例をconventionalとICSI, 初期胚(CL)と胚盤胞(BL), 新鮮胚と凍結胚にわけ、双胎発生率, 膜性, 転帰を比較検討した。

臨床的妊娠を確認できた症例の双胎発生率は1.16%であった。ICSI, 胚盤胞, 凍結胚において双胎発生率が高い傾向がみられたが、有意差は認めなかった。

膜性は二絨毛二羊膜性が3例, 一絨毛二羊膜性が39例, 一絨毛一羊膜性が1例であった。分娩27例(死産3例), 流産12例, 継続中+不明が4例であった。SET双胎分娩症例では36週以下の早産率が51.8%と高く、うち18.5%が30週未満の早産であった。単胎群よりも双胎群では優位に早産率, 死産率が高かった。

キーワード: 単一胚移植, 多胎, 一卵性, 膜性

## 緒言

1990年代より不妊治療の需要の増加, またARTによる複数胚移植により多胎妊娠は増加傾向にあったが, 2008年日本産科婦人科学会より出された単一胚移植の推奨により近年では多胎妊娠は減少傾向にある。しかしながら, ARTでは胚操作(顕微授精, 凍結処理, 胚盤胞培養, assisted hatching など)により単一胚移植でも多胎妊娠は増加するとの報告は多い。今回当院で経験したSET単胎3,677例とSET双胎43症例と比較検討し, 双胎妊娠の膜性, 周産期予後について報告する。そして, 多胎妊娠を予防するためにARTにおいてできることを考えたい。

## 方法

対象は2004年より2015年の12年間で当院にて単

一胚移植にて, 臨床的妊娠を確認した症例3,710例である。心拍を2個以上確認できた症例を双胎と診断した。クロミフェン周期あるいはshort法により排卵誘発し, 採卵をおこない, 新鮮胚の移植を行い, 余剰胚は凍結保存とした。また症例によっては全胚凍結とし, 次周期以降に凍結胚移植を行った。SET単胎妊娠3,667例とSET双胎妊娠43症例をconventional (conv)とICSI, 初期胚(CL)と胚盤胞(BL), 新鮮胚と凍結胚にわけ, 双胎発生率, 膜性, 妊娠の転帰を比較検討した。

## 成績

SET単胎妊娠3667例(平均35.0歳, 標準偏差 4.0歳)とSET双胎妊娠43症例(平均34.5歳, 標準偏差 4.2歳)の平均年齢に有意差は認められなかった(student's t test)(表1)。品胎以上の症例はなかった。

表 1

	SET 全部	単胎	双胎
妊娠	3,710	3,667	43
分娩(死産)	2,444 (16)	2,417 (13)	27 (3)
流産	999	987	12
外妊	64	64	—
中絶	3	3	0
その他転帰不明	200	196	4
平均年齢		35.0 ± 3.2 歳	34.5 ± 3.3 歳

(\* NS student's t test)

受付 2017年10月8日/受理 2018年5月31日

責任著者: 藤田 欣子 e-mail [ ysk-fjt1222@outlook.jp ]

各群の双胎発生率は、conv新鮮胚 (CL0.81%, BL0.67%), conv凍結胚 (CL1.70%, BL0.97%), ICSI新鮮胚 (CL1.20%, BL1.13%), ICSI凍結胚 (CL0.65%, BL2.11%) であった (図1). conv vs ICSI, CL vs BL, 新鮮胚vs凍結胚で双胎発生率を比較したところ, conv 1.09% vs ICSI 1.26%, CL 1.09% vs BL 1.30%, 新鮮胚0.94%vs凍結胚1.33%となり, ICSI, 胚盤胞, 凍結胚において高い傾向にあったが, いずれも有意差は認めなかった ( $\chi^2$ 検定). なお, 双胎群において, assisted hatching を行った症例はなかった.

双胎妊娠における媒精法はconv 25例 ICSI18例であった. 新鮮胚15例 (CL13例, BL2例), 凍結胚28例 (CL13例, BL15例)であった.

膜性は二絨毛二羊膜性 (DD) が3例 (7.0%), 一絨毛二羊膜性 (MD) が39例 (90.7%), 一絨毛一羊膜性 (MM) が

1例 (2.3%)であった. DD双胎は3例全例が新鮮ICSI-CL移植であった. MM双胎1例は新鮮conv-CL移植であった. 残りの39例 (新鮮conv-CL:6例, 新鮮ICSI-CL:3例, 新鮮conv-BL:1例, 新鮮ICSI-BL:1例, 凍結conv-CL:11例, 凍結ICSI-CL:3例, 凍結conv-BL:6例, 凍結ICSI-BL:8例)がMD双胎であった.

転帰は, 分娩27例, 流産12例, 継続中+不明が4例であった. 分娩例27例は, 30週未満5例, 30~36週9例, 37週以降13例であった. 分娩例のうち3例は妊娠中に1児死亡, 3例は2児とも死産, 1例は分娩後1児が新生児死亡であった.

SET単胎妊娠の流産率は28.8%に対して, 双胎群では30.8%とほぼ同等であったが, 12例中5例が15週以上の流産 (7例は12週未満)であった.

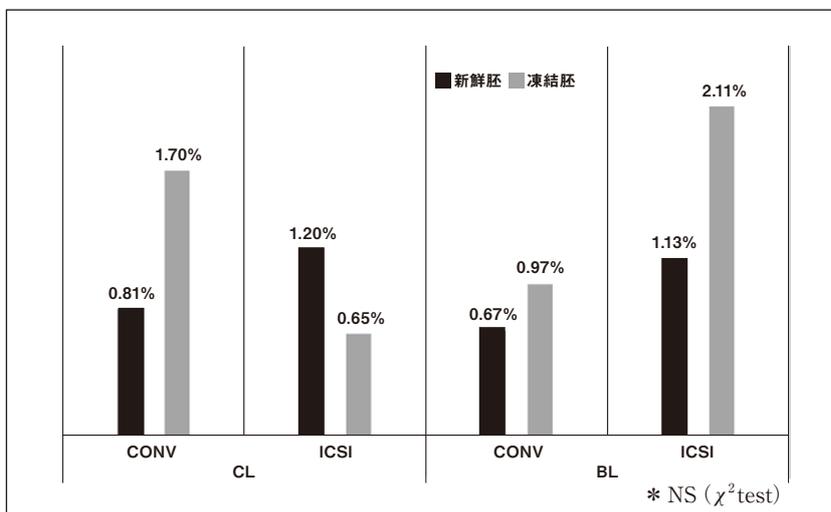


図 1

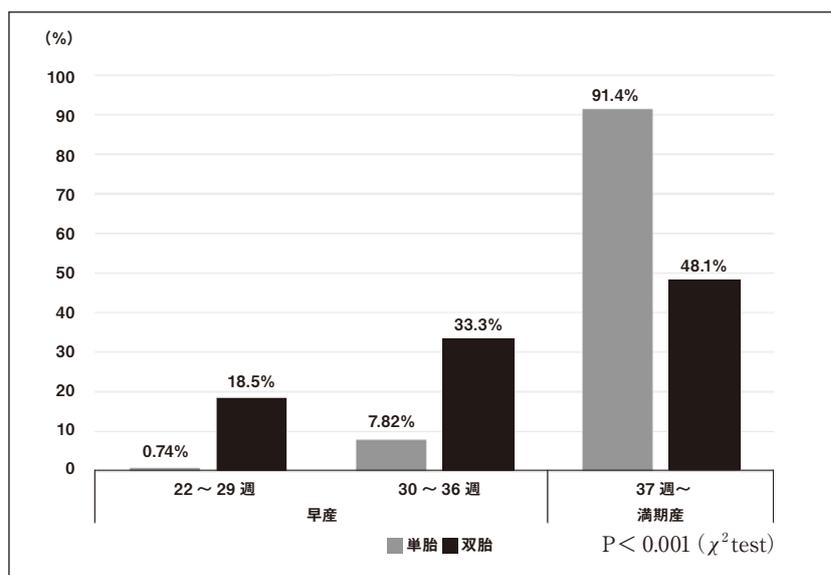


図 2

当院では単胎の流産週数は22週未満で集計しており、詳細な週数が不明であるが、教科書的には、流産の8割程度は12週未満という報告があり、当院の双胎症例においては後期流産が41.7%（12週未満が58.3%）と高い傾向にあった。双胎分娩症例では36週以下の早産率が51.8%と高く、うち18.5%が30週未満の早産であった（ $p < 0.001$ ； $\chi^2$ 検定）（図2）。また双胎群は死産率11.5%と単胎群の死産率0.54%に対して有意に高かった（ $p < 0.001$ ； $\chi^2$ 検定）。

死産症例の内訳は、MD双胎2例（2例とも29週未満）、MM双胎（30週）が1例であった。妊娠中に1児死亡となった3症例（3例ともMD双胎）は2例が8週未満で1児心拍が消失した症例であり、1例は24週で1児が胎内死亡となり、直後に生児が娩出となった症例である。生後1児が早期死亡した症例も24週での分娩であった。

DD双胎3例は全例正期産にて分娩となり、児については特に問題はなかった。

## 考 察

日本は世界的にみて双胎妊娠の頻度が最も低い国の一つであり、自然妊娠においては0.4～0.6%程度であると考えられる<sup>1)</sup>。不妊治療の普及が、多胎発生が主な原因と予想され、特に移植胚数3個では10%が多胎になるといわれている。2008年に日本産科婦人科学会の勧告により、単一胚移植が増え、現在では多胎妊娠は減少傾向にある。しかしながら単一胚移植でも多胎発生率は自然妊娠よりも高くなるとの報告が多く、当院でも1.16%と高かった。

顕微授精、培養期間の延長や、凍結処理、assisted hatchingなどの操作が多胎発生に影響しているとの報告も多く、当院でも、顕微授精、胚盤胞移植、凍結胚において高い傾向にあったが、いずれも有意差は認めなかった。河村らは、MD双胎の発生率はICSI：1.2%、胚盤胞移植：3.3%、ART全体では1.3%と自然発生頻度に比較して高かったことを報告している<sup>2)</sup>が、この数字は当院（conv 1.09% ICSI 1.26% 初期胚1.09% 胚盤胞1.30%）と同程度と思われる。また、河内谷らは、新鮮初期胚：0.65%、凍結初期胚：0.34%、新鮮胚盤胞：2.25%、凍結胚盤胞：1.17%、ART全体では1.01%と報告している<sup>3)</sup>が、当院では、新鮮初期胚：0.95%、凍結初期胚：1.26%、新鮮胚盤胞：0.84%、凍結胚盤胞：1.40%であった。いずれも明らかに多胎率上昇に関わる因子は指摘できない。

Jessica R. Kanterらは双胎の発生率はART全体で2.24%（conv初期胚：2.2%、ICSI初期胚：1.5%、

conv胚盤胞：2.7%、ICSI胚盤胞：2.4%）と報告している<sup>4)</sup>。また、凍結処理については初期胚、胚盤胞とも影響がなかったが、assisted hatchingについては初期胚においては双胎率が上昇し、胚盤胞においては変わらなかったとしている<sup>4)</sup>。初期胚でのassisted hatchingは割球の結合が弱いので、より早期に受精卵の分割が起こりやすいことが予想される。また自然妊娠における一卵性双胎の発生する時期については古典的にはDD双胎が受精後2～3日目、MD双胎は4～8日目、MM双胎は8～12日目とされているが、これを実証したものはない<sup>5)</sup>。しかしながら体内での受精卵に早期の分割を起こしうる機序が透明体の損傷であることを示唆できるかもしれない。タイムラプスによる胚培養の観察が容易になったが、培養中に胚が2個に分かれたとの報告は未だにないので、卵管から子宮までの胚が発育する過程が胚分割に影響を及ぼすことは十分予想される。

胚盤胞移植によるDD双胎の報告も多く、胚の分割時期については議論の余地が大いにあると思われる<sup>6) 7) 8)</sup>。なお、当院におけるDD双胎3例全例がICSI新鮮初期胚であった。また、MM双胎1例は、理論上は最小の胚操作であるconv新鮮初期胚であった。透明体の損傷の大きさや時期などが双胎の発生時期を決定する示唆を得た。

流産率については単胎妊娠と変わらない結果を得た。また妊娠12週未満の1児死亡、vanishing twinについては2例のみであったが、今回の調査で双胎と診断したのは児心拍を2個確認できた症例であり、vanishing twinの実数はもう少し多いと考える。報告では20～60%が第一三半期にvanishing twinになるとされている<sup>5)</sup>。

早産率については、51.8%（14例）が37週未満の分娩であり、うち18.5%（5例）が30週未満の分娩であった。うち11.1%（3例）は死産であった。早産率は、DD双胎は40%程度、MD双胎は60%、MM双胎は60～70%程度と報告されている<sup>5)</sup>。また、死産率については、DD双胎は20%程度、MD双胎は30～40%、MM双胎は60%程度との報告であった。当院での単胎妊娠の早産率は8.6%（うち30週未満は0.74%）、死産率は0.54%であった。アメリカの人口動態調査によると、全分娩の早産率は11.6～15.2%、死産率は0.67～0.69%と報告しており、早産率がやや高めだが、人種的教育的背景が多様な国家であり、それらを考慮すれば当院の単胎妊娠の報告と同程度と思われる<sup>9) 10)</sup>。やはり、双胎妊娠では、単胎妊娠より明らかに早産率、死産率共に高くなると言える。DD双胎ではMD、MM双胎よりもリスクは低くなるが、ハイリスク妊娠であることには変わりない。早産による死産率および新生児死亡率は、先

天奇形などに次いで高く<sup>10)</sup>、多胎妊娠を予防するためには単一胚移植を第一義とし、さらに胚培養、胚の評価、胚移植については慎重を期すべきと思われた。

Recent Trends in Infant Mortality in the United States. NCHS Data Brief No.9 October 2008.

- 10) Mathews TJ, MacDorman MF: Infant mortality statistics from the 2007 period linked birth/infant death data set. Natl Vital Stat Rep. Jun 29; 59 (6) : 1-30, 2011.

## 結 語

単一胚移植による双胎発生症例について検討した。ARTでは単一胚移植でも自然妊娠よりも双胎発生率は高くなる。ICSI, 胚盤胞培養, 凍結処理いずれも双胎発生に関与することが示唆されたが、明らかな関連性は指摘できなかった。双胎妊娠の予後は単胎妊娠よりも早産率, 死産率共に高くなり、ハイリスク妊娠として慎重に管理する必要があり、多胎妊娠を予防するために今後更なる研究が必要であると思われた。

## 参 考 文 献

- 1) 松本美奈子, 村越毅, 尾崎智哉, 渋谷伸一, 鳥居裕一: 胚盤胞移植と一絨毛性多胎妊娠, 産婦人科の実際 54 (2): 361-3, 2005.
- 2) 河村寿宏, 後藤妙恵子, 森理子, 有地あかね, 唐澤康広, 田嶋裕子, 菅かほり, 生見早智子, 石川聖華, 河村真紀子: 生殖補助医療による一絨毛性双胎の発生因子に関する検討. 日本受精着床学会雑誌 22 (1): 138-41, 2005.
- 3) Kawachiya S, Bodri D, Shimada N, Kato K, Takehara Y, Kato O: Blastocyst culture is associated with an elevated incidence of monozygotic twinning after single embryo transfer. Fertil Steril. May; 95 (6) : 2140-2, 2011.
- 4) Jessica R. Kanter; Sheree L. Boulet; Jennifer F. Kawwass; Denise J. Jamieson; Dmitry M. Kissin : Trends and Correlates of Monozygotic Twinning After Single Embryo Transfer. Obstetrics & Gynecology. 125 (1) : 111-117, JAN 2015
- 5) F. Gary Cunningham, MD Kenneth J. Leveno, MD Steven L. Bloom, MD John C. Hauth, MD Dwight Rouse, MD Catherine Y. Spong, MD : Williams Obstetrics 23rd pp859-889 McGraw-Hill Professional 2009.
- 6) 堀越義正, 水野薫子, 米澤真澄, 俵史子: 単一胚盤胞移植後に成立した一卵性二絨毛膜二羊膜性双胎の1例. 静岡産科婦人科学会雑誌 (ISSN 2187-1914) 第2巻第1号16頁, 2013.
- 7) Kyono K.: The Precise Timing of Embryo Splitting for Monozygotic Dichorionic Diamniotic Twins: When Does Embryo Splitting for Monozygotic Dichorionic Diamniotic Twins Occur? Evidence for Splitting at the Morula/Blastocyst Stage From Studies of In Vitro Fertilization. Twin Res Hum Genet. Aug;16 (4) : 827-32, 2013.
- 8) Yuri Shibuya and Koichi Kyono : A successful birth of healthy monozygotic dichorionic diamniotic (DD) twins of the same gender following a single vitrified-warmed blastocyst transfer, J Assist Reprod Genet. Mar; 29 (3) : 255-257, 2012.
- 9) Marian F. MacDorman, Ph.D., and T.J. Mathews, M.S.:

## SMAS から算出したパラメータと体外受精との関係

古橋 孝祐, 大月 純子, 江夏 徳寿, 横田 梨恵, 岸 加奈子, 辻 優大, 岩崎 利郎,  
松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英

英ウィメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町1丁目1-2 三宮セントラルビル

**要旨:** 不妊治療における精液検査において、一般的に精子濃度・運動率などが評価の対象とされるが、精子の運動の質についてはあまり評価されていないのが現状である。今回我々は、精子の運動の質的評価が可能で Sperm Motility Analysis System (SMAS) を使用し、得られた複数のパラメータから、当院が独自に Sperm Motility Value (SMV) を算出し、得られた SMV 値と体外受精の受精率との相関を検討した。当院にて 2016 年 6 月～10 月に体外受精を行った 898 周期を検討対象とした。SMAS によって算出された原精液の SMV 値と IVF の受精率の相関を検討したところ、SMV 値 100 未満症例には ICSI 又は Split/ICSI を考慮することが望ましいのではないかと考えられた。今後はさらにデータを蓄積し、より正確な IVF の受精率の予測となり得る指標の確立を目指していきたい。

**キーワード:** 精液検査, SMAS, 体外受精, SMV

### 緒言

男性不妊は不妊原因の 40～50% 近くを占めることから、精液検査は男性不妊の診断として非常に重要で基本的な検査であるが、一般的に精子濃度・運動率などが評価の対象とされ、精子の運動の質についてはあまり評価されていないのが現状である。しかしながら、精子の運動の質的評価が可能であれば、ART 施行時に体外受精又は顕微授精どちらかを選択する上で临床上非常に重要な意味があると言える。一般的に体外受精を選択する場合、何%の受精率を達成しておくべきなのかは、各施設により異なり一定の見解は得られていない。しかしながら日本産科婦人科学会の見解として、ICSI の適応は「男性不妊や受精障害など、本法以外の治療によっては妊娠の見込みが極めて低いと判断される夫婦のみを対象」<sup>1)</sup> としており、ICSI による妊娠が次世代への影響が懸念されている<sup>2)</sup>。

当院は IVF・ICSI を選択する際、過去に橋本<sup>3)</sup>らが IVF にて受精率 30% 以上を獲得するための適応所見を定義し、その後、北風<sup>4)</sup>らが SQA-V (Medical Electronic Systems Ltd., Israel) による SMI (Sperm Motility Index) 値も適応所見に加え、SMI 値 50 以上の症例に限り IVF を実施してきた。また 2011 年からは回収卵子数 4 個以上の IVF 症例においては、採卵当日に行うレスキュー ICSI を導入するなど<sup>5)</sup>、IVF での低受精症例を可及的に避けるようにしているが、それでも尚、IVF 後完全不受精症例と遭遇することが 0.1% (3/2547)

と少なからずある<sup>6)</sup>。

精液検査は受精方法を選択する上で重要な要因の一つとして挙げられるが、Makler 計算盤を用いた目視法が一般的であるが、この方法は測定者による結果の差等が問題点として挙げられている<sup>7)</sup>。一方、欧米では Computer-aided sperm analysis (以下 CASA) による精液検査が一般化<sup>8)</sup>している。この CASA による測定では測定者間の差が少なく、通常では測定出来なかった精子運動の質の解析が可能となりつつあり、精液検査に CASA 機器を導入することで精液検査の精度を高めることへの有用性が報告されている<sup>9)10)</sup>。

今回、我々は精子の運動の質的評価を行うため CCD カメラで精子画像を経時的に撮影し、得られた画像をコンピューター解析することで、運動精子の数及び移動軌跡から得られた各パラメータを客観的に測定出来<sup>11)</sup> かつ目視法で計測された精液検査結果と正の相関を認める<sup>9)11)</sup> と報告されている Sperm Motility Analysis System (以下 SMAS: ディテクト社製) を導入するに至った。そこで当院で従来使用してきた SQA-V から計測される SMI 値と、相関性のある数値を SMAS から得られる複数のパラメータから導き出し、その値が体外受精の受精予測の指標値になり得るかどうかを検討した。

### 対象と方法

#### 1. 対象

2016 年 6 月から 2016 年 12 月までに当院にて体外

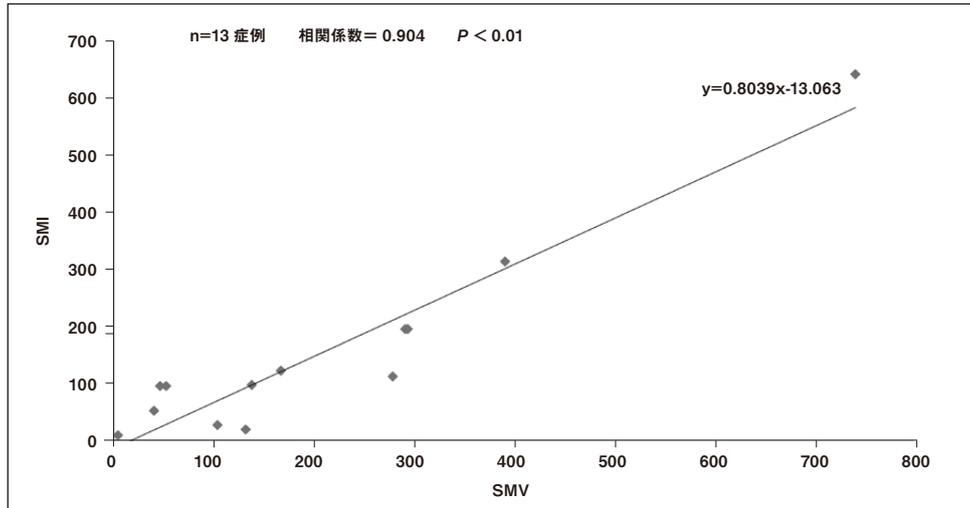


図1 SMV値とSMI値の比較

SMV値とSMI値の比較には、スピアマンの順位相関検定を行った

受精を行い、SMASを用いて精液検査を行った898周期の5,225個の卵子を検討対象とした。

## 2. 採卵, 精子調整, 媒精

卵巣刺激法は、原則としてlong protocol, short protocolまたはantagonist protocolを用い、poor responderの症例やmild stimulationを希望する症例には、自然周期またはクロミフェンあるいはレトロゾールを使用した。精子調整方法には2層パーコール法を採用し、横田ら<sup>12)</sup>の報告に準じて精子調整を行い、IVFにはUniversal IVF Medium (Origio, Denmark)を用いた。受精判定は媒精18～20時間後に行い、global medium (Life Global, Canada) +10% HSA (Life Global, Canada)を用いて胚培養を行った。卵子、胚の培養は37℃, 5.5%CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 89.5% N<sub>2</sub>の気相条件下で培養を行った<sup>13)</sup>。

## 3. Sperm Motility Value : SMVについて

当院では従来SQA-Vから算出されるSMI値を体外受精・顕微授精決定時の適応基準として利用していたため、SMAS移行時にSQA-Vから算出されるSMI値の近似値をSMASから算出出来るかを検討した。そこでSMASから得られる複数のパラメータより、SMI値の近似値を算出するため、直線速度・高速運動精子濃度及び運動精子濃度に着目し、独自に計算式を構築し、算出された値をSMVと定義した。また算出計算式は、直線速度 $\times(\sqrt{\text{pmsc}(a)} + \sqrt{\text{msc}})$ とした。SQA-Vから算出されたSMI値と、SMASから算出したSMV値を比較す

るにあたり、無相関検定としてスピアマンの順位相関検定を行った。

## 4. 評価項目

SMVの値を0～<100, 100～<200, 200～<300, 300～<400, 400～<500, 500以上別にIVF受精率を比較検討した。また、統計学的解析には $\chi^2$ 検定を行い、Bonferroniの補正後 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

## 結果

同一検体を使用し、SQA-Vから算出されたSMI値と、SMASから算出したSMV値を比較したところ正の相関が得られた(相関係数=0.904)(図1)。また、原精液において、SMV値を0～<100, 100～<200, 200～<300, 300～<400, 400～<500, 500以上に区分し、IVF受精率を比較したところ、受精率は順に59.7%(77/129), 72.7%(77/129), 74.6%(1053/1411), 76.6%(842/1099), 68.7%(516/751), 79.1%(712/900)となった(表1)。

また、同様の解析を調整後の精液においても行ったところ、受精率は順に74.2%(92/124), 70.9%(827/1167), 74.1%(1239/1672), 76.3%(954/1250), 73.9%(510/690), 80.4%(25/321)であった(表2)。上記の結果より、原精液及び調整後精液のSMV値とIVF受精率について解析したところ、原精液のSMV値において多くの区間においてIVF受精率との差を認めたが、一方で調

表 1 SMV 別 (原精液), IVF 受精率の推移

SMV 値	0 ~ < 100	100 ~ < 200	200 ~ < 300	300 ~ < 400	400 ~ < 500	500 ≤
受精率 (%)	59.7% <sup>a)</sup> (77/129)	72.7% <sup>b)</sup> (680/935)	74.6% <sup>c)</sup> (1053/1411)	76.6% <sup>d)</sup> (842/1099)	68.7% <sup>e)</sup> (516/751)	79.1% <sup>f)</sup> (712/900)

カイ二乗検定の結果 (Bonferroni 補正後)  
 P < 0.05 : a vs. b, a vs. c, a vs. f, b vs. f, c vs. e.  
 P < 0.01 : a vs. d, d vs. e, e vs. f.

表 2 SMV 別 (調整後精液), IVF 受精率の推移

SMV 値	0 ~ < 100	100 ~ < 200	200 ~ < 300	300 ~ < 400	400 ~ < 500	500 ≤
受精率 (%)	74.2% (92/124)	70.9% <sup>a)</sup> (827/1167)	74.1% (1239/1672)	76.3% <sup>c)</sup> (954/1250)	73.9% (510/690)	80.4% <sup>b)</sup> (258/321)

カイ二乗検定の結果 (Bonferroni 補正後)  
 P < 0.05 : a vs. c, a vs. b.

調整後の SMV 値ではほとんどの区間において受精率の差は認められなかった。

### 考 察

今回、我々は SMAS から得られる複数のパラメータより計算式を構築し、SQA-V から算出される SMI 値と相関性のある数値を導き出し、Sperm motility Value : SMV と定義した。この SMAS から算出された SMV 値と、SQA-V から算出される SMI 値との相関を解析したところ正の相関を認めた (相関係数:0.904)。さらにこの SMV 値別に IVF 受精率との相関を解析したところ、原精液の SMV 値 0 ~ < 100 の区間で IVF 受精率 59.7% (77/129) と低値であった。一方で調整後の精液における SMV 値別の結果では、全ての区間において IVF 受精率 70% 以上であった。これは精子調整を行うことで良好運動精子のみが回収され、精子の質が均一化されたためと推測できた。

精液検査に CASA を利用し、その結果から精子の質的評価を行った報告として、Larsen ら<sup>14)</sup> は精液検査に CASA を利用し得られたパラメータは、男性において受精能力の予測に使用できると報告している。また、CASA で精子の評価を行うことで IVF 受精率を予測できることを示唆した報告や<sup>15)</sup>、精子の運動パラメータ及び正常形態の割合は IVF 受精率及び妊娠率を予測するために重要な因子であるといった報告もある<sup>16)17)</sup>。

今回の結果より SMV 値は、原精液において各区間において受精率との有意な差を認め、特に SMV 値 0 ~ < 100 の区間の症例では IVF 受精率が 60% 未満となったことから、SMV 値 100 未満症例には ICSI 又は Split/ICSI を

考慮することが望ましいのではないかと考えられた。一方で調整後の SMV 値別の比較では、ほとんどの群間において受精率に差が生じなかった。

この事より精液検査から、IVF 又は ICSI どちらを選択するか判断するのは、原精液の段階で行うことが適切であると考えられ、内山ら<sup>18)</sup> も同様に原精液段階での精子受精能の評価の有効性を示唆している。ART において授精方法を IVF 又は ICSI どちらを選択するかによって、その後の胚発生及び妊娠率への影響も大きいことが知られているため<sup>19)20)</sup>、その周期ごとに IVF と ICSI のどちらを選択するべきかは、非常に重要な選択であると考えられる。本検討では調節卵巣刺激法別には受精率の比較を行っていないため、今後は今回得られた SMV 値を利用し、調節卵巣刺激法別で SMV と IVF 受精率の検討を行うなどし、より適切な IVF・ICSI の選択基準を設けていきたい。

### 参 考 文 献

- 1) 日本産科婦人科学会会告：顕微授精法の臨床実施に関する見解。日産婦誌, 44: 129-130, 1992.
- 2) 星和彦：レクチャーシリーズ-クリニカル up date-ICSI による妊娠の次世代への影響。日本産科婦人科学会雑誌, 52: 183-187, 2000.
- 3) 橋本洋美・後藤栄・坪内美紀・泉陽子・吉村由香理・笠原優子・塩谷雅英：精液所見における当院の split ICSI の適応。J Mamm Ova Res, 21: 209-213, 2004.
- 4) 北風桃子・後藤栄・橋本洋美・松永雅美・苔口昭次・塩谷雅英：Sperm Motility Index (SMI) による split ICSI 適応基準。日受精着床会誌, 26: 88-92, 2009.
- 5) 後藤優介・緒方洋美・古橋孝祐・片田雄也・角本知世・梶原綾乃・十倉陽子・山田聡・緒方誠司・水澤友利・松本由紀子・岡本恵理・苔口昭次・塩谷雅英：受精障害に対する Rescue

- ICSIの臨床的有効性の検討. 日受精着床会誌, 31: 10-14, 2014.
- 6) 古橋孝祐・矢田桃子・辻優大・大月純子・岩崎利郎・伊藤宏一・水澤友利・松本由紀子・若口昭次・塩谷雅英: 受精障害に対するrescue-ICSIの培養成績及び胚移植成績について. 日本IVF学会誌, 20: 3-7, 2017.
  - 7) 宮城博恵・岡田英孝・下井華代・馬場真有美・小野淑子・岡田園子・松原高史・神崎秀陽・精子運動解析装置SMAS(Sperm Motility Analysis System)を用いたConventional IVFにおける受精率の検討. 日受精着床会誌, 28: 35-39, 2011.
  - 8) Cooper TG, Yeung CH: Computer-aided evaluation of assessment of "grade a" spermatozoa by experienced technicians. *Fertil Steril*, 85: 220-224, 2006.
  - 9) 武田信好・阿部亜佳音・船山麻由子・鈴木寛規・吉井紀子・鈴木雅美・田中可子・三箇島睦実・種村健太郎・佐藤英明・小田原靖: 生殖補助医療における細胞質内精子注入法の適応—精液検査を指標とした適応基準の明確化—. 日受精着床会誌, 33: 37-43, 2016.
  - 10) Komori K, Tsujimura A, Ishijima S, Tanjapatkul P, Fujita K, Matsuoka Y, Takao T, Miyagawa Y, Takada S, Okuyama A: Comparative study of sperm motility analysis system and conventional microscopic semen analysis. *Reprod Med Biol*, 5: 195-200, 2006.
  - 11) 小野淑子・岡田英孝・下井華代・宮城博恵・神崎秀陽: Sperm Motility Analysis System (SMAS) と一般精液検査との比較検討. 日受精着床会誌, 25: 57-60, 2008.
  - 12) 横田梨恵・古橋孝祐・辻優大・大月純子・伊藤宏一・水澤友利・松本由紀子・若口昭次・塩谷雅英: 2種類の精子調整法における培養成績の比較—2種類の精子調整法について. 日本IVF学会誌, 20, 21-24, 2017.
  - 13) 角本知世・後藤栄・橋本洋美・泉陽子・江口素子・古橋孝祐・水田真平・田中里美, 稲飯健太郎・片田雄也・宮田ちさと・米山雅子・黒田泰史・岸加奈子・松浦まき・後藤優介・東山龍一・成松美彩・松本由紀子・若口昭次・塩谷雅英: 2種類の培養液を用いた培養成績の検討. 日本臨床エンブリオロジスト学会プログラム・講演抄録集・実技書, 15: 24, 2009.
  - 14) Larsen L, Scheike T, Jensen TK, Bonde JP, Ernst E, Hjollund NH, Zhou Y, Skakkebaek NE, Giwercman A: Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. *Hum Reprod*, 15: 1562-1567, 2000.
  - 15) 北上茂樹・杉岡美智代・植村智子・白木亜紀子・古賀剛: 精子自動分析装置による精子運動能の評価とc-IVFの成績に関する検討. 日生殖医学会雑誌, 61: S61, 2016
  - 16) Donnelly ET, Lewis SE, McNally JA, Thompson W: In vitro fertilization and pregnancy rates: the influence of sperm motility and morphology on IVF outcome. *Fertil Steril*, 70: 305-314, 1998.
  - 17) Coetzee K, de Villiers A, Kruger TF, Lombard CJ: Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS). *Fertil Steril*, 71: 222-225, 1999.
  - 18) 内山一男・上野智・沖村匡史・藪内晶子・小林保・加藤恵一: 精子運動解析システム (SMAS) による原精液検査段階でのc-IVF受精能予測因子の検討. 日受精着床会誌, 33: S179, 2015.
  - 19) Dumoulin JC, Coonen E, Bras M, van Wissen LC, Ignoul-Vanvuchelen R, Bergers-Jansen JM, Derhaag JG, Geraedts JP, Evers JL: Comparison of in-vitro development of embryos originating from either conventional in-vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 15: 402-409, 2000.
  - 20) 芝原隆司・深作悠・箕浦博之: split ICSIにおけるconventional IVFとICSIの胚発生と着床能の比較. 日受精着床会誌, 25: 73-76, 2008.

## 胚盤胞のグレードと発生段階が 臨床妊娠率と流産率に与える影響について

魏 興強, 古橋 孝祐, 辻 優大, 岩崎 利郎, 伊藤 宏一, 水澤 友利,  
松本 由紀子, 苔口 昭次, 塩谷 雅英

英ウィメンズクリニック 〒650-0021 兵庫県神戸市中央区三宮町1丁目1-2 三宮セントラルビル

**要旨:** Gardner分類法は多くの施設で胚盤胞の評価法として用いられている。しかし、胚盤胞の発生段階、内細胞塊、栄養外胚葉の中でどの因子が臨床妊娠率・流産率へ与える影響が大きいかはまだ明らかでない。そこで、当院にて2011年1月～2016年12月に単一凍結融解胚盤胞移植を行った10,893周期を検討対象とした。採卵後5日目の凍結時の胚盤胞を発生段階別にグレード1～4に分類し、内細胞塊と栄養外胚葉をA, B, Cに分類し、臨床妊娠率・流産率を検討したので報告する。発生段階別ではG1～4の順に、内細胞塊及び栄養外胚葉別では共にC, B, Aの順に臨床妊娠率が高率となった。また、流産率においては内細胞塊間で差を認めなかったが、栄養外胚葉別ではCを含んだ際に最も流産率が高率となった。個々の胚において胚盤胞の発生段階や、内細胞塊及び栄養外胚葉のグレードを加味した上で移植胚を選択していくことが重要であると考えられた。

**キーワード:** 単一凍結融解胚盤胞移植, 内細胞塊, 栄養外胚葉, 臨床妊娠率, 流産率

### 緒言

従来、生殖補助医療分野において、臨床妊娠率向上のために広く複数胚移植が実施されていた。しかしながら、複数胚移植は多胎妊娠などの妊娠成立後のリスクが上昇するため、日本産科婦人科学会は2008年に「移植する胚は原則として単一とする。ただし35歳以上の女性、または2回以上続けて妊娠不成功であった女性などについては2胚移植を許容する」という会告を出した<sup>1)</sup>。そのため単一胚移植を原則とする必要性が高まってきた<sup>2) 3)</sup>。この単一胚移植においてより良い成績を得るために重要な点は、如何にして着床能の高いと推定される胚を選択するのかということである。

近年、培養技術の改善に伴い受精卵を胞胚期まで培養することが容易になっており、これらの観点から多胎妊娠の防止・臨床妊娠率向上を目的に、単一胚盤胞移植は積極的に導入されている。この胚盤胞移植を実施するにあたり良好胚盤胞を選択するため、内細胞塊(inner cell mass:以下ICM)及び、栄養外胚葉(Trophectoderm:以下TE)のグレードの違いは非常に重要であり、発生段階の違いも臨床妊娠率に大きな影響を与える。胚盤胞移植は移植する胚盤胞の形態によって治療成績が大きく異なることが報告されている<sup>4)5)</sup>、我々は以前水田<sup>6)</sup>らが胚盤胞の形態学的な指標として発生段階並びにICM, TEの形態評価が臨床妊娠率および流産率に与

る影響についての報告に従い、胚盤胞移植時の臨床妊娠率を推定しているが、移植可能な胚が複数個ある場合、どの胚を優先的に選択していくか苦慮する場合がある。また、胚の選択に当たって納得の行く説明を患者にできるよう、個々の胚に対し予測される治療成績を患者に提示することが重要である。そこで今回、我々は採卵後5日目(Day5)の単一胚盤胞移植においてGardner分類別の胚盤胞の発生段階別、内細胞塊及び栄養外胚葉のグレードの違いが臨床妊娠率に与える影響について後方視的な検討を行ったので報告する。

### 対象と方法

#### 1. 対象

2011年1月～2016年12月に当院にて凍結胚盤胞を融解し1個移植を行った10,893周期(平均年齢35.9±4.1歳)を検討対象とした。凍結時の胚盤胞をGardner分類に基づき、発生段階別にグレード(G)別1～4に分類し、ICMとTEをA, B, Cに分け、Day5の胚盤胞別にそれぞれの臨床的臨床妊娠率と流産率について後方視的に検討を行った。

また、当院では個人情報保護法に基づいて医療情報の管理を行っており、個人情報の保護に厳重な注意を払い、体外受精、顕微授精、胚移植法を施行する際にも、個人情報の守秘・プライバシーを尊重している。また、体外受

精を施行する前に、学会・論文発表などについては匿名性を保ち個人情報保護について説明し、患者の同意を文書にて得ている。

## 2. 採卵, 培養方法

卵巣刺激法は、原則としてLong protocol, Short protocolまたはAntagonist protocolを用い、卵胞発育とE2値をモニターしながら管理し、第二主席卵胞径が18 mmを超えた時点でhCG 5,000単位を投与し、36時間後に静脈麻酔下、経膈超音波ガイド下に採卵を行った。回収した卵子はUniversal IVF Medium (Origio, Denmark) 中で採卵から3～5時間の前培養を行った。精子は単層密度勾配法にて遠心分離の後にswim up法を用いて良好なものを回収した。IVFは精子濃度を10万/mlに調整して媒精に供した。ICSIは前培養後に顆粒膜細胞を除去した卵子に、形態が正常な運動精子を不動化してマイクロマニピレーター (OLYMPUS, ON2-99D-3) を装着した倒立顕微鏡 (OLYMPUS, IX-73) を用いて穿刺注入した。受精確認は媒精およびICSI後18～20時間後に行い、global medium (LifeGlobal, Canada) +10% HSA (LifeGlobal) を用いて胚培養を行った。また、卵子、胚の培養は37°C, 5.5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 89.5%N<sub>2</sub>の気相条件下で培養を行った。

## 3. 胚盤胞凍結, 融解

胚盤胞の凍結融解には当院で作成した凍結融解液を用いた。7.5% ethylene glycol (v/v, Sigma-Aldrich, Germany:EG) +7.5% Dimethyl sulfoxide (v/v, Sigma-Aldrich:DMSO) +20% Serum Substitute Supplement (v/v, Irvine-Scientific, USA:SSS) 添加modified HTF (Irvine-Scientific, 以下mHTF) を平衡化液とし、胚を10分間浸漬した。ガラス化液には15% EG+15% DMSO+20% SSS添加mHTFを用いた。平衡化した胚をガラス化液に投入し、Fストロー管0.25ml (FUJIHIRA Industry Co.,Ltd.,Japan) の先端を斜めに切除した胚凍結用ストローの先端に少量のガラス化液とともに乗せ、直ちに液体窒素に投入した。ガラス化液に浸漬してから液体窒素投入までの時間を90秒以内とした。

胚の融解は、胚凍結用ストローを液体窒素から取り出し、直ちにストローの先端部を、37°Cに加温した1M Sucrose (Sigma-Aldrich:Suc) +20% SSS添加mHTFに1分間浸漬した。その後、室温の0.75M, 0.5M, 0.25M, 0.125M+20%SSS添加mHTFに、1.5分間、1.5分間、2.5分間、2.5分間と段階的に平衡化させながら胚を移動させた。その後、20%SSS添加mHTF中に5

分間浸漬し融解を行い、移植に用いるまで10%HSA添加global mediumにて培養を行った。

## 4. 胚盤胞の形態学的評価

胚盤胞の評価はGardnerの分類<sup>7)</sup>を用いて、胚の発生段階をGrade1-4, ICMをA-C, TEをA-Cに分類した。

## 5. 子宮内膜調整方法, 胚移植

子宮内膜調整はホルモン補充 (hormone replace therapy: HRT) にて行った。月経2日目よりエストラジオール貼付剤(エストラーナ<sup>®</sup>テープ0.72mg:久光製薬) 3枚/2daysの使用を開始し、月経15日目よりプロゲステロン膈座薬(Progestan<sup>®</sup>:KOCAR FARMA)900mg/day, および合成黄体ホルモン製剤ジドロゲステロン(デュファストン<sup>®</sup>錠: Mylan)30mg/dayを併用して内膜調整を行い、月経20日目に胚盤胞移植を行った。

胚移植は外陰部および膈内を生理的食塩水で洗浄し、ファイコン<sup>®</sup>IVFカテーテルI型 (Fuji Systems, Japan) 等のソフトカテーテルを用い、超音波下にて施行した。ファイコン<sup>®</sup>IVFカテーテルI型が挿入困難である場合は、フレスポイト移植カテーテル(KITAZATO Supply, Japan) 等のスタイルット付きカテーテルを使用した。

## 6. 妊娠判定

超音波検査によって、胎嚢が妊娠5～6週に確認できたものを臨床妊娠とした。また、当院での経過観察において胎児に心拍が認められなかった症例、および心拍が認められるもその後心拍が消失した症例を流産とした。

## 7. 統計学的解析

統計学的解析には $\chi^2$ 検定を行い、Bonferroniの補正後P<0.05を有意差ありとした。また、発生段階別の臨床妊娠率と流産率においては、P値に加えてオッズ比、95%信頼区間を記載した。

## 結 果

胚盤胞のグレードは3者の組み合わせで分類し、発生段階はG4, G3の順に、次にICMをA, B, Cの順に、TEも同じくA, B, Cの順に並べて分類し、各々比較検討した。なお、グレード別の平均年齢は表1の通りであった。

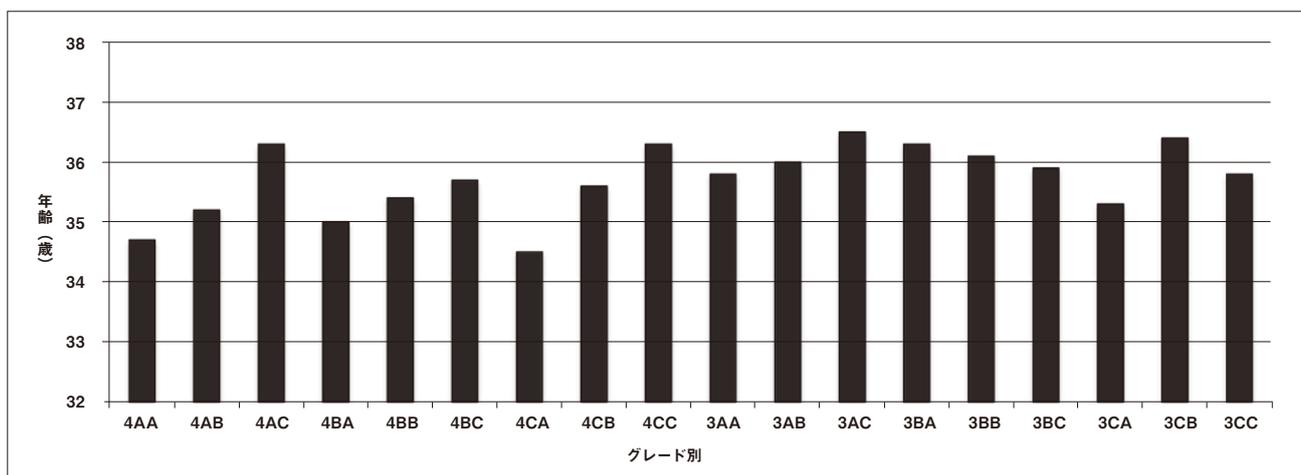
次に採卵1～3回目までのDay5凍結融解単一胚盤胞移植のすべての周期の臨床妊娠率は43.5%(4,650/10,692)であり、流産率は22.6%(1,051/4,650)

表1 グレード別の平均年齢

グレード別	4AA	4AB	4AC	4BA	4BB	4BC	4CA	4CB	4CC
平均年齢 (歳) ± SD	34.7 ± 4.0	35.2 ± 4.0	36.3 ± 4.4	35.0 ± 4.1	35.4 ± 4.0	35.7 ± 4.3	34.5 ± 3.6	35.6 ± 4.0	36.3 ± 4.3

グレード別	3AA	3AB	3AC	3BA	3BB	3BC	3CA	3CB	3CC
平均年齢 (歳) ± SD	35.8 ± 3.6	36.0 ± 4.1	36.5 ± 4.1	36.3 ± 3.9	36.1 ± 3.9	35.9 ± 4.0	35.3 ± 3.3	36.4 ± 4.0	35.8 ± 4.2



であった。胚盤胞のグレード別に臨床妊娠率を比較したところ(表2), G4でかつICMがA, Bと分類された胚に関しては, TEの程度にかかわらず臨床妊娠率が53%以上と高率であったが, TEがCと判断されたG4BCの胚のみは35.9% (52/145) と著しく低かった。G3の胚ではTEがCとされた胚では, ICMの程度に関わらず臨床妊娠率が著しく低くいずれの場合でも40%以下であった(表2(a)). 一方, G3の胚でもTEがAとされた胚は臨床妊娠率がすべて50%以上と高率であった。胚盤胞のグレード別に流産率と比較したところ, G3ACだけでは57.1% (8/14) と著しく高率となったが, 他のグレードが20%前後となった(表2(b)).

臨床妊娠率及び流産率を発生段階別に比較したところ(表3(a)), G4の臨床妊娠率が57.3% (2,203/3,845) と最も高く, 以下G3, G2, G1の順に臨床妊娠率が低下し, G4とG1群の間でオッズ比が最も高く(OR=4.85), 以下G3とG1, G4とG2の間の順にオッズ比が低くなった(表3(b)). 流産率では, G1, 2, 3, 4の順に有意に低くなった(表3(c)).

ICM別の臨床妊娠率及び流産率においては, ICMがC, B, Aの順に臨床妊娠率が有意に高率となったが, 流産率においては有意な差は認められなかった(表4). また, TE別の臨床妊娠率及び流産率では, TEがC, B, Aの順に臨床妊娠率が有意に高率となった。また, TEのグ

レードCの流産率は他の群と比し有意に高かった(C-A, C-B)(表5).

### 考 察

本研究の結果より, 胚盤胞のグレード毎に臨床妊娠率及び流産率が異なることが示された。胚盤胞のグレード別による臨床妊娠率についての報告として, ICMのグレードが良いほど臨床妊娠率が上昇するという報告<sup>8)9)</sup>や, ICMの大きさや形態が着床率に関係するといった報告<sup>10)</sup>のように, ICMが臨床妊娠率に大きく関与すると言われている。その一方で胚盤胞の拡張度が同じであった場合, ICMとTEの細胞数の違いでは臨床妊娠率に差はないといった報告<sup>11)</sup>もある。また, TEにおける報告としては, 胚盤胞の拡張度及びICMのグレードの差に比べ, TEグレードの違いは臨床妊娠率へ与える影響が大きいといった報告<sup>12)</sup>がある。また拡張度及びTEのグレードの差による他の報告として, ICMのグレードの違いよりも臨床妊娠率に与える影響が大きいといった報告<sup>13)</sup>もある。

上述した報告と同様に, 発生段階がG4, 又はG3いずれの胚盤胞であっても, ICMとTEのグレードの差が臨床妊娠率に大きく関係していることが示唆された。

また, 一般的に形態不良とされ, 移植の対象となりう

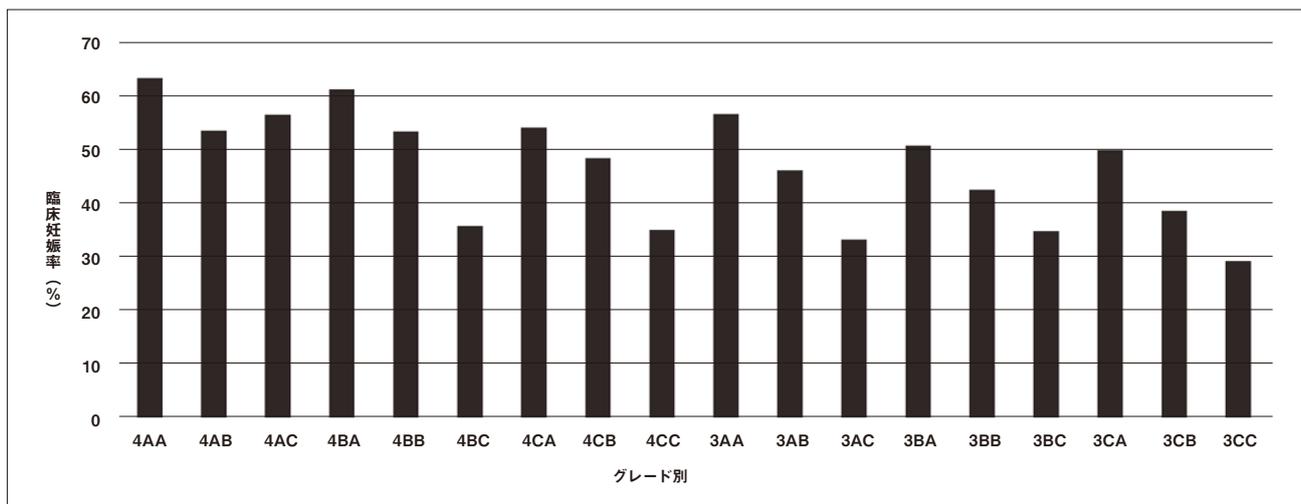
表2 グレード別の臨床妊娠率と流産率

(a) グレード別の臨床妊娠率

グレード別	4AA	4AB	4AC	4BA	4BB	4BC	4CA	4CB	4CC
臨床妊娠率 (%)	63.5%	53.7%	56.7%	61.4%	53.5%	35.9%	54.3%	48.5%	35.1%
	(710/1118)	(279/521)	(17/30)	(603/982)	(423/790)	(52/145)	(25/46)	(66/136)	(27/77)

グレード別	3AA	3AB	3AC	3BA	3BB	3BC	3CA	3CB	3CC
臨床妊娠率 (%)	56.8%	46.3%	33.3%	50.9%	42.6%	34.9%	50.0%	38.7%	29.3%
	(397/523)	(273/589)	(14/42)	(191/375)	(412/968)	(87/249)	(6/12)	(41/106)	(43/147)



(b) グレード別の流産率

グレード別	4AA	4AB	4AC	4BA	4BB	4BC	4CA	4CB	4CC
流産率 (%)	17.9%	21.1%	23.5%	20.4%	23.6%	19.2%	8.0%	22.7%	11.1%
	(127/710)	(59/279)	(4/17)	(123/603)	(100/423)	(10/52)	(2/25)	(15/66)	(3/27)

グレード別	3AA	3AB	3AC	3BA	3BB	3BC	3CA	3CB	3CC
流産率 (%)	21.9%	21.2%	57.1%	23.0%	21.6%	29.9%	16.7%	29.3%	23.3%
	(65/297)	(58/273)	(8/14)	(44/191)	(89/412)	(26/87)	(1/6)	(12/41)	(10/43)

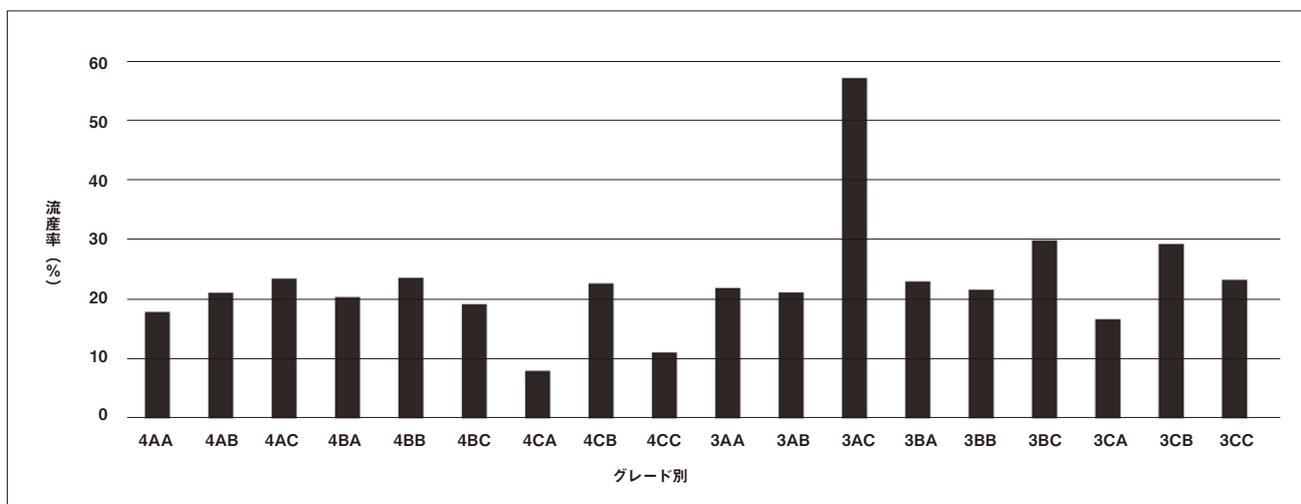


表 3 (a) 発生段階別の妊娠率及び流産率

グレード別	G4	G3	G2	G1
臨床妊娠率 (%)	57.3% (2203/3845)	45.3% (1364/3011)	31.1% (831/2669)	21.7% (253/1167)
流産率 (%)	20.1% (443/2202)	22.9% (313/1364)	26.4% (219/831)	30.0% (76/253)

表 3 (b) 発生段階別の臨床妊娠率のオッズ比

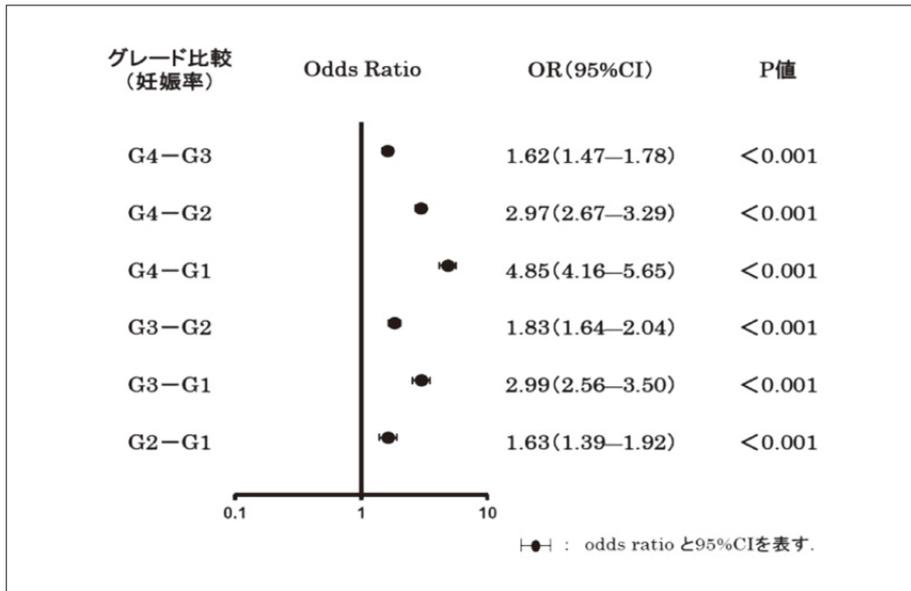
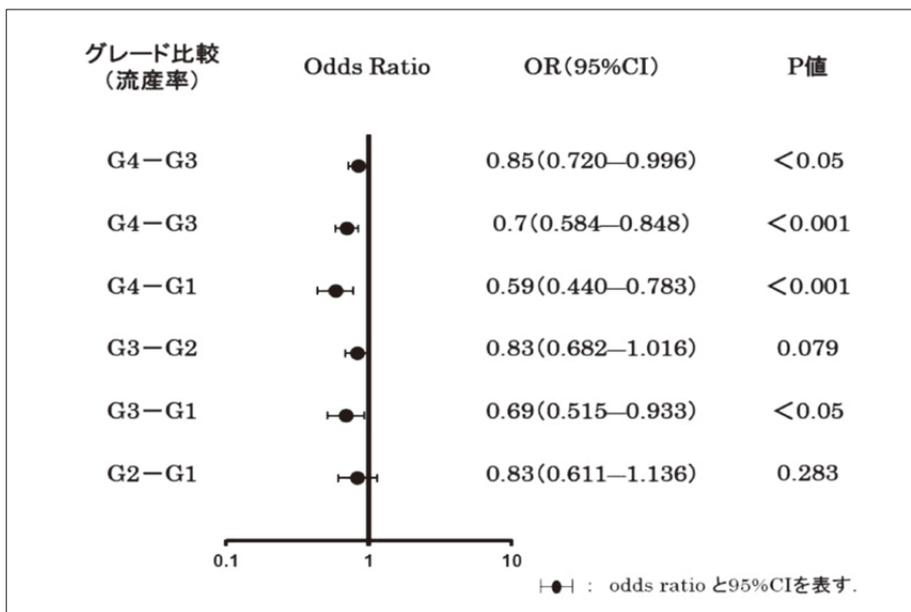


表 3 (c) 発生段階別の流産率のオッズ比



カイニ乗検定の結果 (Bonferroni 補正後)

表 4 内細胞塊 (ICM) 別の妊娠率及び流産率

ICM 別	A	B	C
臨床妊娠率 (%)	56.4% <sup>a)</sup> (1591/2823)	50.4% <sup>b)</sup> (1768/3509)	39.7% <sup>c)</sup> (208/524)
流産率 (%)	20.2% (321/1590)	22.2% (392/1768)	20.7% (43/208)

カイニ乗検定の結果 (Bonferroni 補正後)  
a<sup>-</sup>c: 異符号間に有意差あり (P < 0.001)

表 5 栄養外胚葉 (TE) 別の妊娠率及び流産率

TE 別	A	B	C
臨床妊娠率 (%)	59.9% <sup>a)</sup> (1832/3056)	48.1% <sup>b)</sup> (1495/3110)	34.8% <sup>c)</sup> (240/690)
流産率 (%)	19.8% <sup>d)</sup> (362/1832)	22.3% <sup>e)</sup> (333/1494)	25.4% <sup>f)</sup> (61/240)

カイニ乗検定の結果 (Bonferroni 補正後)  
P < 0.001: a vs. b, a vs. c, b vs. c, d vs. f, e vs. f.

ることが少ないとされる ICM もしくは TE のいずれかのグレードが C であった胚に関しても、臨床妊娠が期待出来ることが本研究において示された。

以上のことより胚盤胞の発生段階での評価は重要な因子ではあるが、ICM と TE を加味した評価も重要であることが示唆された。また、流産率に関しては ICM と TE のグレード間において関連はないという報告<sup>13) 14)</sup>があるが、一方で TE のグレードの差が流産率に関係しているという報告もある<sup>15)</sup>。本検討では、ICM のグレード間において有意差を認めなかったが、TE のグレードの差によって流産率が有意に変化したことから、ICM のグレードと比べ、TE のグレードの差は流産率に与える影響が、ICM よりも大きいことが考えられた。

本検討結果より、臨床妊娠率と流産率に与える胚盤胞の質的評価因子について、発生段階、ICM 及び TE の 3 つの因子とも大きな影響を与えることが示唆された。また、3 つの因子の中で、流産率においては胚盤胞の発生段階及び TE のグレード間に関連を認めしたが、ICM のグレードとの関連は小さいことが示唆された。以上のことより、凍結融解胚盤胞移植を行う際には、凍結時の Gardner 分類に基づき発生段階について評価するとともに、ICM 及び TE のグレードを慎重に吟味した上で胚を選択するが、TE のグレード C 胚も臨床妊娠を期待出来ることから、移植対象となり得ると考えられた。

## 参考文献

- 1) 日本産婦人科学会告「生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解」. 日本産科婦人科学会雑誌, 61: 139, 2009.
- 2) Ishihara, O., Kajihara, T., Okagaki, R., Takai, Y., Hayashi, N.: SET Guidelines in a -worldwide perspective. J.Mamm. Ova Res., 25: 98-104, 2008.
- 3) Okitsu, O.: Human embryo grading. J. Mamm. Ova Res., 25: 90-97, 2008.
- 4) Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T., Schoolcraft, W.B.: Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer., Fertil. Steril., 73 (6) : 1155-1158, 2000.
- 5) 富山達大・大久保美里・宮田広敏・吉野千尋・馬場聖子: 胚盤胞移植における胞胚腔の拡がり, 内細胞塊 (ICM), 外細胞層 (Trophectoderm) の状態の分類による臨床妊娠率の比較. 日本受精着床誌, 22: 151-154, 2005.
- 6) 水田真平・若口昭次・橋本洋美・松永雅美・後藤栄・塩谷雅英: 単一胚盤胞移植における Day5 と Day6 胚盤胞の形態別臨床妊娠率および流産率の検討. 日本受精着床誌, 25: 124-129, 2008.
- 7) Gardner, D.K., Schoolcraft, W.B.: Towards Reproductive Certainty: Fertility & Genetics Beyond 1999: The Plenary Proceedings of the 11th World Congress on in Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics, pp.347-371, Carnforth Parthenon Press, 1999.
- 8) Richter, K.S., Harris, D.C., Daneshmand, S.T., Shapiro, B.S.: Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. Fertil. Steril., 76: 1157-1167, 2001.
- 9) 橘直之・鈴木達也・廣瀬典子・吉田智香子・昇千穂美: 内細胞塊グレード良好例は臨床妊娠率が高く, 栄養外胚葉グレード不良例は流産率が高い: 当院の凍結融解単一胚盤胞移植での検討. 日本受精着床学会雑誌, 33 (1) : 16-20, 2016.

- 10) Balaban B, Urman B, Sertac A, Alatas C, Aksoy S, Mercan R. Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 74: 282-287, 2000.
- 11) Goto, S., Kadowaki, T., Tanaka, S., Hashimoto, H., Koeguchi, S., Shiotani M. : Prediction of pregnancy rate by blastocyst morphological score and age, based on 1488 single frozen-thawed blastocyst transfer cycles. *Fertil. Steril.*, 95: 948-952, 2011.
- 12) Thompson, S.M., Onwubalili, N., Brown, K., Jindal, S.K., McGovern, P.G.: Blastocyst expansion score and trophectoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET) : a national study. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 30: 1577-1581, 2013.
- 13) 大村直輝・有地あかね・村松裕崇・伊藤かほり・小峰祝敏 : 凍結融解単一胚盤胞移植における胚のグレードを妊娠成績および妊娠予後の年齢別比較・検討. *日本受精着床学会雑誌*, 34 (1) : 135-142, 2017.
- 14) Micah, J., Kevin, S., Ryan, J., James, R., Michael, J., Alan, H., Pauletto, E., Eric, D.: Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil. Steril.*, 99: 1283-1289, 2013.
- 15) Honnma, H., Baba, T., Sasaki, M., Hashiba, Y., Ohno, H., Fukunaga, T., Endo, T., Saito, T., Asada, Y.: Trophectoderm morphology significantly affects the rates of ongoing pregnancy and miscarriage in frozen-thawed single-blastocyst transfer cycle in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 98: 361-367, 2012.

# ART 出生児 3,223 名のフォローアップ： 胚凍結融解が児の身体発育に及ぼす影響

菊地 寿美, 青野 展也, 中條 友紀子, 服部 裕充, 中村 祐介, 佐々木 千紗,  
小泉 雅江, 戸屋 真由美, 五十嵐 秀樹, 京野 廣一

医療法人社団 レディースクリニック京野 〒980-0014 宮城県仙台市青葉区本町 1-1-1 三井生命仙台本町ビル 3F

**要旨：** 本研究では体外受精(IVF)と、顕微授精(ICSI)で得られた胚の凍結融解の有無が、出生児の身体発育に及ぼす影響について検討した。1996～2016年の期間にARTにて出生した児3,223名を対象とし、媒精方法別に凍結融解胚移植群と新鮮胚移植群に分け、平均在胎週数、出生時体重、出生時身長、低出生体重児率、巨大児率について比較検討した。結果、IVF、ICSIともに胚凍結融解群で有意に平均在胎週数が長く( $P<0.01$ )、出生時体重が増加し( $P<0.01$ )、低出生体重児率が低下( $P<0.01$ )した。しかし、その後の発育調査において、IVFでは3か月以降、ICSIでは6か月以降で身長、体重に有意差が無くなった。また、出生時の先天異常率に有意差は認められなかったことから、胚の凍結融解は胎児発育に何らかの影響を与えるが、出生時の先天異常率やその後の身体発育には影響を与えないことが示唆された。  
**キーワード：** ICSI, IVF, 凍結融解胚移植, 児の発育, 出生時体重

## 緒言

近年、生殖補助医療(ART)による出生児の増加に伴い、ARTがもたらす児への影響に関する調査の必要性が指摘されており、当院においてもIVF、ICSI、IVM、TESE-ICSI、卵子活性化、卵巣刺激法 (clomiphene citrate vs. letrozole)の有無などに由来する出生児の発育調査を継続的に行い、ARTの安全性について報告をしている<sup>1)~4)</sup>。日産婦の2015年の報告によると凍結融解胚移植による出生児の数はARTによる出生児全体のおよそ79%を占めている<sup>5)</sup>。現在このように凍結融解胚移植が広く用いられるようになった背景として、胚盤胞培養やガラス化凍結技術の進歩が挙げられ、その妊娠率の高さから、多くの施設で凍結融解胚盤胞移植が実施されている。これまでの報告では、凍結融解胚移植では新鮮胚移植と比較し低出生体重児や早産のリスクが低下することが多く報告されている<sup>6)~8)</sup>。一方、凍結融解胚移植で生まれた児については新鮮胚移植と比較し巨大児や在胎期間の拡大による周産期リスクの上昇と関連があるという報告もある<sup>6)</sup>。今回我々は胚凍結融解が児の発育に与える影響について更なる詳細な調査を行うため、体外受精(IVF)、顕微授精(ICSI)媒精方法別に、凍結胚移植と新鮮胚移植で出生した児の出生時状態、その後の身体発育について比較を行った。

## 対象と方法

1996年から2016年の期間に当院にてARTを実施し、単胎児として出生した児3,223名を対象とした。調査は両親へのアンケート形式で実施し、調査内容は、在胎週数、児の出生時体重と身長、その後、出生時から1歳までは3か月毎、1歳6か月、2歳から6歳までは1年毎に身長、体重および先天異常の有無を調査した。さらに身体的・運動的発達を調査するため、表1に示す項目について、各調査時期で達成度を調査した。

媒精方法が出生児に与える影響を考慮し、媒精方法別に検討を行った。検討1ではIVF、検討2ではICSIを新鮮胚移植群と凍結融解胚移植群に分け、母体平均年齢、在胎週数、出生時体重、出生時身長、低出生体重児(2,500 g未満)率、巨大児(4,000 g以上)率、先天異常率を比較検討した。先天異常の分類には疾病および関連保健問題の国際統計分類第10回修正(国際疾病分類)(International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision=ICD10)による分類を使用している。また出生時から6歳までの身長、体重、身体的・運動的発育の項目について比較検討した(表1)。

統計学的解析は、スチューデントt検定と $\chi^2$ 乗検定を用い、 $P<0.05$ を有意差ありと判定した。尚、これらの研究は院内倫理委員会の承認の下、患者の同意を得た上で行われた。

受付 2018年3月23日/受理 2018年5月31日

責任著者：京野 廣一 e-mail [ info@ivf-kyono.or.jp rec-sec@ivf-kyono.or.jp ]

表 1 各年齢における質問項目例

	運動機能	言語機能	精神発達
3-4ヶ月	・首が据わる		・あやすと笑う ・声をかけられた方向へ顔を向ける
6-7ヶ月	・寝返りをする ・おすわりをする	・話しかけるような声を出す	・テレビやラジオの音がするとそちらを向く
9-10ヶ月	・はいはいをする ・つかまり立ちをする		・ささやき声に振りむく
1歳	・つたい歩きをする	・大人のいう簡単な言葉がわかる	・音楽に合わせて体を動かす
1.5歳	・ひとりで歩く	・ママなど意味のある言葉をいくつか話す	・後ろから名前を呼ぶと振り向く
2歳	・走ることができる	・二語文を言う	・大人の身振りをまねる
3歳	・手を使わずに階段をのぼる	・自分の名前を言える	・衣服の着脱をひとりでしたがる
4歳	・片足でケンケンをする	・自分の経験を話せる	・友達とごっこ遊びをする
5歳	・でんぐり返しができる	・はっきりした発音で話ができる	・動物や花をかawaiiがるなど他人を思いやる気持ちをもっている
6歳	・片足で5~10秒間立っていられる	・ひらがなの自分の名前を読んだり書くことができる	・約束やルールを守って遊ぶことができる

表 2 出生時の比較

A. C-IVF

	新鮮胚移植群 333名	凍結融解胚移植群 550名	P
母体平均年齢(歳)	35.6±3.9	35.0±3.8	N.S.
平均在胎週数(週)	38.6±2.4	39.1±2.1	p<0.01
平均出生時体重(g)	2919	3102	p<0.01
平均出生時身長(cm)	48.5	49.1	p<0.01
低出生体重児率(%)	16.2	6.5	p<0.01
巨大児率(%)	0.3	1.1	N.S.
先天異常率(%)	3.3	3.1	N.S.

B. ICSI

	新鮮胚移植群 952名	凍結融解胚移植群 1388名	P
母体平均年齢(歳)	35.1±4.5	34.8±4.5	N.S.
平均在胎週数(週)	39.0±1.9	39.2±2.2	p<0.05
平均出生時体重(g)	2963	3083	p<0.01
平均出生時身長(cm)	48.8	49.4	N.S.
低出生体重児率(%)	12.4	8.4	p<0.01
巨大児率(%)	0.6	1.1	N.S.
先天異常率(%)	3.4	2.7	N.S.

結果

検討1 (IVF)における平均在胎週数, 出生時体重, 出生時身長, 低出生体重児率, 巨大児率は新鮮胚移植群(333名)と凍結融解胚移植群(550名)それぞれで38.6±2.4

週 vs. 39.1±2.1週 (P<0.01), 2,919g vs. 3,102g (P<0.01), 48.5cm vs. 49.1cm (P<0.01), 16.2% vs. 6.5% (P<0.01), 0.3% vs. 1.1% で, 巨大児率以外で有意差を認めた. 先天異常率は3.3% vs. 3.1%と有意差を認めなかった(表2-A). その後の体重と身長は

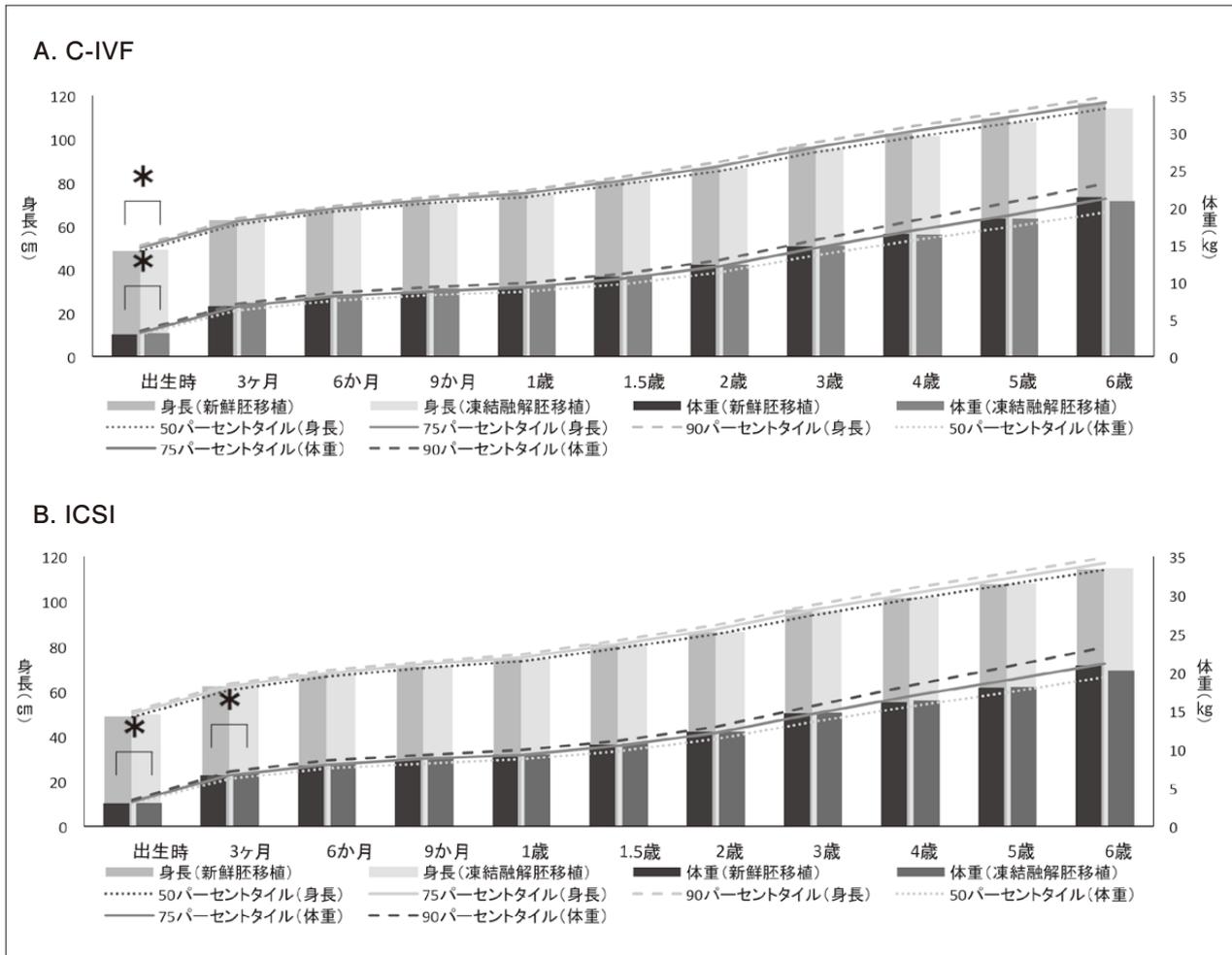


図1 出生時から6歳までの身長・体重推移

50, 75, 90 パーセントタイル曲線は、厚生労働省による平成 22 年乳幼児発育調査<sup>9)</sup>によるものを示している。\*: P < 0.01

生後3か月で差が認められなくなった(図1-A). 身体的・運動的発育の達成度には6歳までの全ての項目において有意差を認めなかった(表3-A,B).

検討2(ICSI)では、新鮮胚移植群(952名)と凍結融解胚移植群(1,388名)それぞれで39.0±1.9週 vs. 39.2±2.2週 (P<0.05), 2,963g vs. 3,083g (P<0.01), 48.8cm vs. 49.4cm, 12.4% vs. 8.4%(P<0.01), 0.6% vs. 1.1%で、出生時身長と巨大児率以外で有意差を認めた。先天異常率は3.4% vs.2.7%と有意差を認めなかった(表2-B). その後の身長に有意差は見られず、体重は生後6か月で差が認められなくなった(図1-B). 身体的・運動的発育の達成度には6歳までの全ての項目において有意差を認めなかった(表3-C,D).

### 考 察

本研究では、IVF, ICSIともに胚凍結融解により有

意に出生時体重が重くなり、低出生体重児率が低下する結果となった。この原因のひとつとして、凍結融解胚移植で使用されるホルモン周期におけるE<sub>2</sub>値の上昇が出生時体重へ影響を与えるということが報告されている<sup>10)~12)</sup>。また、今回の検討では、新鮮胚移植はDay2, Day3の初期胚移植の割合が約8割(IVF:78% ICSI:79%), 凍結融解胚移植では胚盤胞移植の割合が約9割(IVF:94% ICSI:92%)であったことから胚の移植時期による影響も考えられる。胚の培養日数と出生児の体重に関して、KalraらはDay3とDay5, Day6の新鮮胚移植について比較し、長期の胚培養が妊娠期間を減少させるが、出生時体重へ影響は与えないと報告している<sup>13)</sup>。培養日数が出生児所見に影響を与えないと仮定した場合、今回の検討では、凍結融解胚移植群で有意に出生時体重が重かったことから、体重の増加には胚凍結融解の影響が関与している可能性が考えられる。出生児体重の増加について、Licciardiらは移植する胚盤胞のICMグレードが

表3 身体的・運動的発育の達成度

	達成度 (%)	A	B	P (A vs B)	C	D	P (C vs D)
3-4ヶ月	声に反応する	95.3	99.0	N.S.	94.7	95.1	N.S.
	あやすと笑う	99.3	98.5	N.S.	97.9	98.1	N.S.
	首が据わる	87.1	89.3	N.S.	86.5	88.9	N.S.
6-7ヶ月	離乳食を喜んで食べる	86.1	89.9	N.S.	93.0	87.3	N.S.
	テレビ等に反応する	99.3	99.5	N.S.	99.1	98.0	N.S.
	話しかけるような声を出す	98.6	98.0	N.S.	98.7	97.7	N.S.
	おもちゃに手を伸ばす	97.1	100.0	N.S.	99.6	98.5	N.S.
	お座りをする	75.4	83.6	N.S.	62.7	81.7	N.S.
9-10ヶ月	寝返りをする	89.4	87.9	N.S.	87.4	90.1	N.S.
	ささやくと振り向く	97.9	98.9	N.S.	98.9	97.6	N.S.
	つかまり立ちできる	86.9	86.5	N.S.	84.5	84.4	N.S.
	物をつかむ	86.9	86.5	N.S.	84.5	84.4	N.S.
	機嫌よく一人で遊ぶ	98.6	100.0	N.S.	96.9	97.2	N.S.
1歳	離乳食が順調である	92.4	95.3	N.S.	93.7	87.0	N.S.
	はいはいをする	84.1	85.9	N.S.	84.2	85.4	N.S.
	食事を3回食べる	93.9	96.8	N.S.	94.9	93.5	N.S.
	相手になると喜ぶ	100.0	100.0	N.S.	100.0	99.8	N.S.
	おいでなどの言葉を理解する	97.0	96.8	N.S.	96.5	97.0	N.S.
	音楽に合わせて体を動かす	94.0	95.2	N.S.	94.4	94.7	N.S.
	バイバイなどの身振りをする	94.7	92.6	N.S.	93.3	89.6	N.S.
1.5歳	つたい歩きをする	93.3	94.1	N.S.	95.6	93.8	N.S.
	名前を呼ぶと振り返る	98.3	98.8	N.S.	99.0	99.6	N.S.
	目の動きが気になる	7.6	6.8	N.S.	8.0	6.7	N.S.
	哺乳瓶を使用している	18.6	18.0	N.S.	26.4	21.6	N.S.
	コップを持って水を飲む	88.3	90.6	N.S.	90.6	91.0	N.S.
2歳	ママ等の言葉を話す	97.5	93.8	N.S.	94.3	94.6	N.S.
	一人で歩く	97.5	97.5	N.S.	98.7	97.8	N.S.
	肉や野菜を食べる	92.7	92.5	N.S.	89.5	93.3	N.S.
	二語文等を言う	91.7	89.1	N.S.	87.3	88.4	N.S.
	大人の身振りを真似する	100.0	98.6	N.S.	100.0	99.6	N.S.
	クレヨン等で図り書きをする	99.1	98.6	N.S.	99.4	99.6	N.S.
	スプーンを自分で使える	97.2	98.6	N.S.	98.6	98.5	N.S.
走ることができる	96.3	98.6	N.S.	99.7	99.8	N.S.	

	達成度 (%)	A	B	P (A vs B)	C	D	P (C vs D)
3歳	よく噛んで食べる	92.7	96.2	N.S.	93.0	92.8	N.S.
	歯磨きや手洗いをする	99.0	100.0	N.S.	100.0	99.7	N.S.
	自分の名前が言える	100.0	97.1	N.S.	97.6	99.0	N.S.
	衣服の着脱を一人でできる	89.6	94.2	N.S.	94.4	93.3	N.S.
	クレヨンで丸を描く	98.9	100.0	N.S.	99.7	99.0	N.S.
4歳	階段を一人で上る	99.0	97.1	N.S.	96.9	97.4	N.S.
	おしっこを一人でする	100.0	98.6	N.S.	98.6	97.3	N.S.
	歯磨き、口すすぎ、手洗いをする	100.0	100.0	N.S.	100.0	100.0	N.S.
	友達とごっこ遊びをする	96.8	97.1	N.S.	98.1	98.1	N.S.
	はさみを上手に使える	96.8	95.7	N.S.	96.2	94.3	N.S.
5歳	自分の経験を親に話す	100.0	97.1	N.S.	98.6	99.6	N.S.
	片足でケンケンする	96.8	95.7	N.S.	91.3	93.6	N.S.
	階段から飛び降りて遊ぶ	96.8	95.7	N.S.	91.3	93.6	N.S.
	食事の時間が決まっている	96.0	98.1	N.S.	95.2	96.1	N.S.
	他人を思いやる気持ちがある	100.0	98.1	N.S.	100.0	100.0	N.S.
6歳	集団生活を楽しく過ごす	100.0	100.0	N.S.	99.3	100.0	N.S.
	大便を一人でする	100.0	94.1	N.S.	97.9	97.2	N.S.
	はっきりした発音で話せる	93.9	98.1	N.S.	97.3	95.0	N.S.
	色がわかる	98.0	98.1	N.S.	100.0	100.0	N.S.
	思い出して絵に描ける	94.0	98.1	N.S.	93.1	94.4	N.S.
7歳	でんぐり返しができる	94.0	96.2	N.S.	96.6	96.7	N.S.
	約束やルールを守って遊べる	100.0	97.1	N.S.	99.1	98.3	N.S.
	平仮名で名前を書いたり読んだりする	100.0	97.1	N.S.	99.1	98.3	N.S.
	衣服の着脱が一人でできる	100.0	100.0	N.S.	100.0	99.2	N.S.
	前後・左右がわかる	100.0	97.1	N.S.	99.1	100.0	N.S.
8歳	四角の形をまねて描ける	100.0	97.1	N.S.	99.1	99.2	N.S.
	片足で5~10秒立っていられる	100.0	97.1	N.S.	99.1	100.0	N.S.

A : C-IVF新鮮胚移植群  
 B : C-IVF凍結融解胚移植群  
 C : ICSI新鮮胚移植群  
 D : ICSI凍結融解胚移植群

高い方がより出生時体重が重くなることを報告している<sup>14)</sup>。凍結胚移植では良好胚から優先的に移植することが一般的であることから、移植胚のグレードが胎児体重に影響している可能性が示唆される。また、Kleijkersらは2種類の異なる培養液由来の出生児を調べた結果、使用する培養液で出生児体重に有意差が認められたことを報告している<sup>15)</sup>。このことから、今後は胚のグレードや胚培養液が児に与える影響について検討する必要があると考えられる。

今回、胚凍結融解が在胎週数、出生時身体所見へ影響を与える可能性が示唆されたが、その後IVFでは3か月以降、ICSIでは6か月以降で有意差が無くなり、身体発育は短期間でのキャッチアップが認められた。さらに、先天異常率に有意差が無かったことから、胚の凍結融解は胎児発育に何らかの影響を与える可能性があるが、出生時の先天異常率やその後の身体発育には影響を与えないことが示唆された。今後も凍結融解胚移植により生まれる児の数は増加すると予想されるため、さらなる児の予後調査が必要と考えられる。

## 参考文献

- 1) Nakajo Y, Fukunaga N, Fuchinoue K, Yagi A, Chiba S, Takeda M, Kyono K, Araki Y: Physical and mental development of children after in vitro fertilization and embryo transfer. *Reprod Med Biol*, 3: 63-67, 2004.
- 2) Kyono K, Takisawa T, Nakajo Y, Doshida M, Toya M: Birth and follow-up of babies born following ICSI with oocyte activation using strontium chloride or calcium ionophore A23187. *J Mamm Ova Res*, 29: 35-40, 2012.
- 3) Nakajo Y, Nakamura Y, Hirata K, Doshida M, Takeuchi T, Kyono K: Pregnancy and neonatal outcome following ovulation induction with aromatase inhibitor letrozole and clomiphene citrate. *Fertil Steril*, 100: s269-270, 2013.
- 4) Matsukawa N, Shibasaki S, Takahashi M, Sasaki C, Nakamura Y, Sato Y, Hattori H, Nakajo Y, Aono N, Okuyama N, Takeuchi T, Kyono K: Follow-up of child growth regarding new technologies: testicular sperm extraction (TESE), in vitro maturation (IVM), and assisted oocyte activation (AOA). *Fertil Steril*, 104: e290, 2015.
- 5) ART データブック. 公益社団法人日本産科婦人科学会 登録調査小委員会.  
[http://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/2015data\\_201709.pdf](http://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/2015data_201709.pdf) (2018.2.2).

- 6) Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C: Clinical rationale for cryopreservation of entire embryo cohorts in lieu of fresh transfer. *Fertil Steril*, 102: 3-9, 2014.
- 7) Khudhari A, Hemmings R, Phillips S, Badeghiesh AM, Jamal W: How does ART singletons differ from naturally conceived (NC) singletons; comparison of perinatal data of 872 ART to 19317 (NC) singleton babies. *Fertil Steril*, 106: 176-177, 2016.
- 8) Pinborg A, Loft A, Aaris Henningsen AK, Rasmussen S, Andersen AN: Infant outcome of 957 singletons born after frozen embryo replacement: The danish national cohort study 1995-2006. *Fertil Steril*, 94: 1320-1327, 2010.
- 9) 乳幼児身体発育調査平成 22 年. 厚生労働省.  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/73-22-01.pdf>  
(2018.3.4).
- 10) Shih W, Rushford DD, Bourne H, Garrett C, McBain JC : Factors affecting low birthweight after assisted reproduction technology: difference between transfer of fresh and cryopreserved embryos suggests an adverse effect of oocyte collection. *Hum Reprod*, 231: 1644-1653, 2008.
- 11) Vidal M, Vellvé K, González-Comadran M, Robles A, Prat M, Torné M, Carreras R, Checa MA: Perinatal outcomes in children born after fresh or frozen embryo transfer: a Catalan cohort study based on 14,262 newborns. *Fertil Steril*, 107: 940-947, 2017.
- 12) Pereira N, Tsoiakian I, Petrini AC, Stone LD, Lekovich J, Elias R, Rosenwaks Z: Does the hyperestrogenic milieu in programmed frozen embryo cycles impact pregnancy and perinatal outcomes? *Fertil Steril*, 108.: e373-374, 2017.
- 13) Kalra SK, Ratcliffe SJ, Barnhart KT, Coutifaris C: Extended embryo culture and an increased risk of preterm delivery. *Obstet Gynecol*, 120: 69-75, 2012.
- 14) Licciardi F, McCaffrey C, Oh C, Schmidt-Sarosi C, David H, McCulloh DH: Birth weight is associated with inner cell mass grade of blastocysts. *Fertil Steril*, 103: 382-387, 2015.
- 15) Kleijkers SH, Mantikou E, Slappendel E, Consten D, van Echten-Arends J, Wetzels AM, van Wely M, Smits LJ, van Montfoort AP, Repping S, Dumoulin JC, Mastenbroek S: Influence of embryo culture medium (G5 and HTF) on pregnancy and perinatal outcome after IVF: a multicenter RCT. *Hum Reprod*, 31: 2219-2230, 2016.

## Letrozole 直前頓服で OHSS 回避, 生児出産に成功したハイリスク症例

岡本 純英, 上田 泰子, 秋吉 俊明, 佐藤 春菜, 松尾 恵子, 松尾 完,  
南 志穂, 福嶋 倫子, 長野 純大, 山口 敦巳

ART 岡本ウーマンズクリニック 〒850-0861 長崎県長崎市江戸町 7-1

**要旨:** Trigger投与直前にOHSS発症を回避するLetrozole頓服投与法を考案した。

症例: 32歳, 挙児希望. 159cm, 53kg, 月経不順, 前医多嚢胞性卵巣を指摘しClomiphene Citrate投与. 28年3月当院初診, ART希望. 調節卵巣周期はGnRH antagonist-agonist法を選択. 消退出血D3からリコンビナント-FSH150IU 2日間, D5からHMG150IU 8日間投与. D7 卵胞直径: 13, 11, 9, 8 mm 血中E<sub>2</sub>: 708pg/ml, D9 卵胞直径: 16, 14, 12mm 血中E<sub>2</sub>: 2,054pg/ml, Antagonist0.25mg開始. D11 卵胞直径: 21, 19, 16, 16mm, 血中E<sub>2</sub>: 4,391pg/ml Letrozole(2.5mg錠)3錠投与, 2時間後血中E<sub>2</sub>: 1,727pg/mlに下降. D12 卵胞直径: 20, 20, 19, 18mm 血中E<sub>2</sub>: 485pg/ml, 準夜 leuprolide acetate 2mg投与しD13血中LH: 35IU/L, P4: 12ng/ml上昇を確認. D14採卵およびconventional IVF実施. 穿刺卵胞数: 42個 採卵数: 42個 2PN: 33個, 分割胚: 33個, 良好胚盤胞: 22個. 遷延性OHSS回避目的で全胚保存(Vitrification法): 22個. 月経開始後続く周期にWarmingした胚盤胞1個を超音波断層ガイド下pinpoint法で胚移植した. D31血中hCG: 86IU/L 陽性(余剰胚盤胞21個保存中), 40週1日3,264g健康男児を無事経膈分娩. 尚, 現在21個の良好胚盤胞を個々にVitrification保存中である.  
キーワード: 多嚢胞性卵巣, ゴナドトロピン高反応性, OHSS, Letrozole, 3D-Ultrasonography

### 緒言

挙児を希望して外来を訪れる「経過の長い不妊症患者夫婦」の中に、比較的多数の排卵障害症例が存在する。無月経あるいは稀発月経があり、初診の超音波でantral follicleの数が多い。前医での排卵誘発に苦勞の跡がうかがえる。AMHは高値、LH-RH testでLHの解離性上昇をきたす。このような症例は少子高齢化で卵巣の低反応性が問題となっている時、ゴナドトロピン高反応性予見され、ART予後良好かに見える。しかし採卵前のtrigger投与の段階で、しばしば深刻な状況に陥る。OHSSのリスクが顕在化し危険回避のため、やっとたどり着いた採卵を前にしてキャンセル余儀なしの決断を迫られる。OHSS回避法はARTに残された最大の課題である。「難治性不妊と呼ばれる経過の長い不妊症例において卵子あるいは胚の質が悪い理由の一つにtriggerの際の卵子の未熟性が関わっているのではないか、OHSSを回避出来れば、あと一歩踏み込んで、卵子の成熟が得られるのではないか」との着想を得た。卵巣顆粒膜細胞を培養した経験からすると、E<sub>2</sub>の前駆物質Androgenの供給が無いとE<sub>2</sub>産生は止まる。そこで、「顆粒膜細胞の芳香化酵素をLetrozoleで抑制し、trigger

投与直前の血中E<sub>2</sub>レベルを下げればOHSSを回避可能ではないか」と推測した。Letrozoleの半減期は45時間であるが、生体に投与後どれくらいで奏功しだすのかが解らなかつた。OHSSの緊急回避の決め手が乏しい中、乳がん患者のARTが注目されはじめ安全性も確認された。

LetrozoleのART応用がようやく公認され始めた。そこでtrigger直前のE<sub>2</sub>の高い症例にインフォームドコンセントを実施し、頓服2時間後のE<sub>2</sub>を迅速測定したところ、E<sub>2</sub>は安全域まで急速に下降していた。超音波断層とE<sub>2</sub>迅速測定を綿密に行いながら調節卵巣刺激を重ねたところ、ゴナドトロピン高反応性のART症例で良好な成績が得られた。OHSSハイリスクの典型的症例でOHSS回避し健児を得たので報告する。

### 症例

32歳, 挙児希望. 159cm, 53kg. 結婚後1年4ヶ月. 2年程前から月経不順の相談で前医(一般産婦人科医師)受診し, 多嚢胞性卵巣を指摘され, Clomiphene, Cabergoline 投与を受けていた. 30歳で結婚, 挙児を希望して28年3月当院を初回受診した. 3か月に1

受付 2017年10月31日/受理 2018年5月31日

責任著者: 岡本 純英 e-mail [ sumihide-okamoto@okamotoclinic.gr.jp ]

回程度の少量出血をみる稀発月経症例で、超音波断層でPCOMを認めた。AMH8.89ng/ml, LH-RH test LH前値12, 投与後15分値51および投与後30分値69IU/LでFSH前値6, 投与後15分値9および投与後30分値10IU/Lと、顕著なLH解離性上昇を認めた。発毛も陰裂全周を覆い濃かった。真正のPCOSと診断した。夫の精子検査は正常範囲内, Swim up testも良好で, Immunobeads Testも陰性であった。夫婦ともクラミジアなどの感染症は無かった。前医の経過も含め、多胎防止と排卵誘発によるOHSS回避についてインフォームドコンセントを実施しART希望となった。同意を得て同7月調節卵巣周期を計画, GnRH antagonist-agonist法を選択した。前周期 月経 D16経口ピルを10日間内服して最終月経が開始した。D2のE<sub>2</sub>は20pg/mlでP<sub>4</sub>は0.3ng/mlを確認した。D3よりリコンビナント-FSH: 150IU 2日間D5よりHMG150IUを8日間投与した。D7で超音波断層による卵巣の観察を行った。計測した卵胞直径は13, 11, および9.8mm 血中E<sub>2</sub>は708pg/mlであった。D9では、卵胞直径が14, 14,

13および11mm血中E<sub>2</sub>は2,054pg/mlであった。GnRH antagonist0.25mg投与を開始した。D10では卵胞直径が16, 14, 12および11mmで血中E<sub>2</sub>が2,054pg/mlであった。D11では2D超音波での卵胞直径が21, 19, 16および11mmであったが、3D超音波断層での、olumeから正球近似した直径d(V)を参考にしてtrigger投与を翌日に延期した。血中E<sub>2</sub>は4,391pg/mlと危険領域の上限3,500-4,000pg/mlを超えていたのでLetrozole(2.5mg錠)3錠頓服投与し2時間後測定した血中E<sub>2</sub>は1,727pg/mlに下降していた。D12の卵胞直径3D計測値d(V)は20, 20, 19および18mmで、血中E<sub>2</sub>は2,485pg/mlであった。準夜にtriggerのGnRH agonist, leuprolide acetate 2mgを投与した。投与翌日のD13血中LHは35IU/LおよびP<sub>4</sub>は12ng/mlと共に上昇していることを確認し、翌日の採卵術を決定した。静脈麻酔準備で前日準夜の絶食開始を指導した。D14に採卵およびconventional IVFをおこなった。結果は穿刺卵胞数42個、採卵数42個、受精を確認出来た2PNが33個、33個が分割し良好胚盤胞が22個得られた。遷

表1 ART 調節卵巣して刺激及び採卵, INF-ET 結果と選択的胚盤胞 vitrification 法での個別全胚保存へ

28年7月16日 調節卵巣周期計画 GnRH Antagonist-Agonist 法選択  
 前周期 MP7月15日 D16 プラノバル内服10日間  
 LMP 8月12日(消退出血) D2 E<sub>2</sub>: 20pg/ml, P<sub>4</sub>: 0.3ng/ml  
 D3 recombinant - FSH: 150IU 2日間  
 D5 HMG150IU 8日間  
 D7 卵胞直径: 13, 11, 9, 8 mm 血中 E<sub>2</sub>: 708pg/ml  
 D9 卵胞直径: 14, 14, 13, 11mm 血中 E<sub>2</sub>: 2,054pg/ml Antagonist0.25mg 開始  
 D10 卵胞直径: 16, 14, 12, 11mm 血中 E<sub>2</sub>: 2,054pg/ml  
 D11 卵胞直径: 21, 19, 16, 11mm  
 血中 E<sub>2</sub>: 4,391pg/ml Letrozole (2.5mg錠) 3錠投与 2時間後血中 E<sub>2</sub>: 1,727pg/ml に下降  
 D12 卵胞直径: 20, 20, 19, 18mm 血中 E<sub>2</sub>: 2,485pg/ml 準夜 leuprolide acetate 2mg 投与  
 D13 血中 LH: 35IU/L, P<sub>4</sub>: 12ng/ml 上昇確認  
 D14 採卵および conventional IVF  
 穿刺卵胞数: 42個 採卵数: 42個 2PN: 33個, 分割胚: 33個, 良好胚盤胞: 22個  
 遷延性の OHSS 回避目的全胚保存 (Vitrification 法): 22個

表2 HRT 下単一胚盤胞超音波断層誘導下 pinpoint 胚移植法

28年9月6日 ホルモン補充療法計画  
 9月12日プラノバル内服10日間 スプレキュアー 24日間  
 LMP 9月26日  
 D 4エストラーナ 2枚隔日投与 4回  
 D12 エストラーナ 3枚 1回  
 D16 エストラーナ 4枚 1回  
 D13 エストラーナ 2枚 7回  
 D18 プレマリン 3錠内服 14日間  
 D18 準夜からプロゲステロン錠 3回/日 14日間  
 D22 超音波断層ガイド下ピンポイント単一保存胚盤胞移植  
 D31 血中 HCG86IU/L 陽性(余剰胚盤胞 21個 保存中)  
 分娩予定日 2017年7月5日 7月6日 3,264g 男児出産

延性のOHSSを回避する目的で全胚保存とした。Vitrification法で良好胚盤胞22個を個々に分けて保存した(表1)。翌々周期にホルモン補充療法により子宮内膜の着床環境を整え Warmingした Expanded blastocyst (4AB)を Assisted Hatchingを施した後、超音波断層誘導下 pinpoint胚移植法で選択的単一胚盤胞移植した(表2)。すなわち28年9月6日に移植のためのホルモン補充療法を計画し、9月12日EP剤内服10日間とスプレキチャー投与24日間を行った。最終月経9月26日よりホルモン補充を開始D 4 エストラナ2枚隔日投与4回、D12 エストラナ3枚1回、D16 エストラナ4枚1回、D13 エストラナ2枚7回、投与した。D18よりプレマリン3錠内服14日間実施、D18 準夜からプロゲステロン錠3回/日14日間行った。D22に Warmingした超音波断層ガイド下ピンポイント単一保存胚盤胞移植を行った。D31に実施した妊娠反応で血中HCG86IU/Lと陽性検出。余剰胚盤胞21個は現在も保存中である。分娩予定日2017年7月5日としていたが、7月6日40週1日で3,264gの男児を経膣分娩、健常児を確認した。本来であればOHSS回避のtrigger投与を断念し採卵術キャンセルに追い込まれかねない経過であったが Letrozole投与で無事健児出産まで漕ぎ着けた。

## 考 察

岡垣<sup>1)</sup>は「ゴナドトロピン製剤」と題された記述の中で「OHSSと多胎妊娠は、絶対に避けるべき合併症である。世界的なコンセンサスとして、単胎満期産の生児が得られた場合のみ、不妊治療の成功とみなされる」と総括している。藤井<sup>2)</sup>は「PCOSの生殖補助医療による治療」の中で「PCOSそれ自体はARTの適応ではないが、」と断ったうえで「適切な数の卵胞発育をコントロールできない場合は、」[多発卵胞発育をきたしやすいPCOSに特徴的な適応条件]とし、「多胎妊娠の予防およびOHSSの発症・重症化の予防を目的とし緊急避難的に行われることもある」と述べ、「OHSSのリスクが高い症例に対しては、他に適応がなくても積極的にARTを勧めることがある。」としている。ARTの現場では多胎妊娠予防について、選択的単一胚盤胞Vitrification保存 Warming移植でほぼ解決を見たが、IVMを除けばOHSSのリスクと予防については、課題山積のテーマである。杉本ら<sup>3)</sup>はPCOSの70%の症例がOHSSを発症し40%が重症例であり、本庄ら<sup>4)</sup>によれば重症OHSS症例の4人に1人はPCOSであるという。柴原<sup>5)</sup>の示す GnRH antagonist protocol (Multiple-dose fixed法)を 当院ではOHSSリスク症例の第一選択としている。必

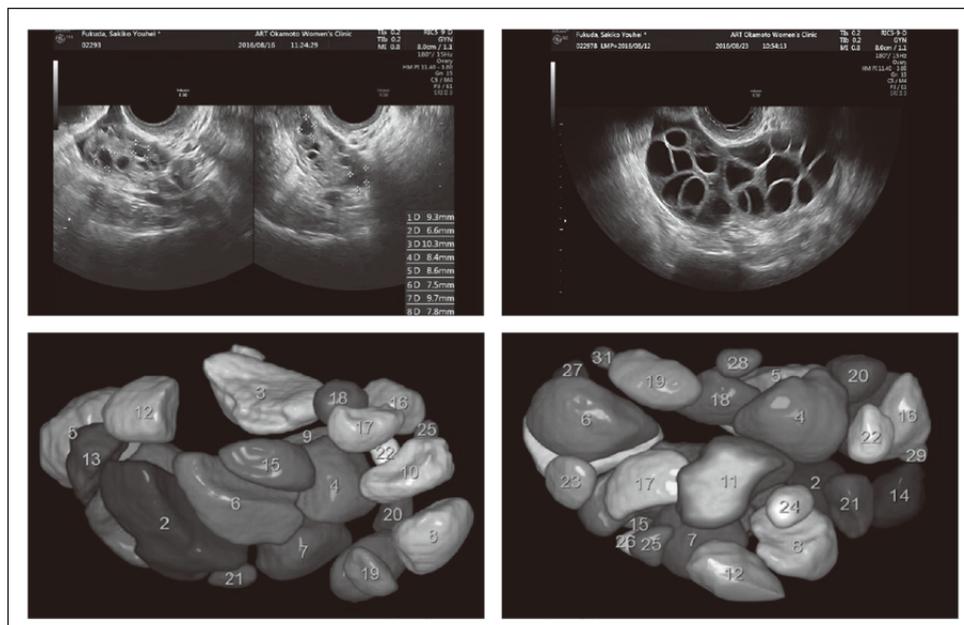


写真1 呈示した症例の調節卵巣刺激中の超音波断層画像

卵胞発育に伴い両側卵巣像と卵胞像の変化が確認できる。  
画面左上D5における両側卵巣2D超音波断層画像 胞状卵胞が多数みられる。  
画面右上D11における両側卵巣2D超音波断層画像 発育した卵胞が卵巣を覆っている  
画面左下D12における左卵巣3D超音波断層画像 Volson e-10のview pal 解析画像  
画面右下D12における右卵巣3D超音波断層画像 同、卵胞は相互に圧排して不定形。  
不定形の卵胞大きさは卵胞容積Vで表し、大きい順に自動的に番号が付く

SonoAVC™ (Semi-) Automatic													
Left Ovary				Total#: 25			Right Ovary				Total#: 32		
Nr.	d(V) mm	dx mm	dy mm	dz mm	mean d mm	V cm <sup>3</sup>	Nr.	d(V) mm	dx mm	dy mm	dz mm	mean d mm	V cm <sup>3</sup>
1	15.5	24.1	19.5	9.0	17.5	1.96	1	16.6	33.7	18.2	12.9	21.6	2.41
2	14.3	27.2	12.7	11.1	17.0	1.53	2	15.8	20.2	15.4	13.2	16.2	2.05
3	14.2	22.9	15.2	9.7	16.0	1.51	3	15.5	22.3	16.8	11.4	16.9	1.97
4	13.5	19.3	15.4	11.4	15.4	1.28	4	14.3	18.1	15.5	11.4	15.0	1.53
5	13.4	18.3	13.1	11.0	14.2	1.27	5	14.2	19.8	15.4	10.8	15.4	1.51
6	13.2	20.8	13.5	9.0	14.4	1.20	6	13.9	18.6	14.3	11.3	14.7	1.40
7	13.0	17.3	13.6	9.7	13.5	1.15	7	13.0	14.1	13.0	12.2	13.1	1.14
8	12.1	17.3	12.9	8.3	12.9	0.92	8	13.0	18.9	13.6	9.9	14.1	1.14
9	11.9	16.1	12.2	9.5	12.6	0.88	9	12.9	16.9	12.9	11.3	13.7	1.14
10	10.9	14.6	13.6	7.2	11.8	0.68	10	12.9	17.1	13.5	10.4	13.7	1.13
11	10.7	14.6	11.6	7.5	11.2	0.64	11	12.7	18.9	12.4	9.8	13.7	1.07
12	10.5	12.0	10.9	9.6	10.8	0.60	12	11.3	16.5	10.6	8.7	12.0	0.76

写真2 3D超音波断層画像 SonoAVC 解析結果

3D超音波断層画像 SonoAVC 解析結果, 左右の卵胞の卵胞液(V)cm<sup>3</sup>を正球体近似し直径d(V)mmを自動的に算出する。2Dでの直径dX,dYおよびdZとの誤差に注目。この結果 trigger 投与日を1日延期した。その結果, 好成績(成熟卵)を得た。

要例には Letrozole<sup>6)</sup> および Cabergoline<sup>7)</sup> を用いて重症 OHSS の回避に努めている。森<sup>8)</sup> は「多嚢卵巣という形態像は PCOS に特異的ではなく、程度の差はあっても正常周期婦人でも観察される」としている。そこで、本稿では「ART ゴナドトロピン高反応性」として一括し、緊急回避策として提案した。一般の ART 調節卵巣刺激は、hCG もしくは LH を trigger として投与しないことには成り立たないが同時に重症 OHSS の回避という課題が待ち受ける。今回示した Letrozole の速効性 E<sub>2</sub> 産生抑制効果を応用した重症 OHSS の回避法は未だ文献的に見かけない着想と方法である。Letrozole は登場以来、様々な経緯を経て今日に至った。同じく抗 E<sub>2</sub> 作用のある Clomiphene Citrate と比較され、E<sub>2</sub> が穏やかな排卵誘発効果に注目が集まり過ぎた感がある。周期始め5日目から開始する連日投与法をベースとして論じられて来た。直接 E<sub>2</sub> 抑制的投与法も散見されるが、中間期がなく、卵胞期もしくは黄体期投与の報告に限られている。おそらく E<sub>2</sub> モニタリングが出来なくなる難しさが理由であると思われる。本法によるゴナドトロピン高反応性 ART 症例の OHSS 回避に成功したので選択的単一胚盤胞保存胚移植による単体妊娠成立と健児出産について、治療過程の詳細を報告した。

## 参考文献

- 岡垣龍吾：ゴナドトロピン製剤。百枝幹雄編，基礎からわかる女性内分泌，pp.107-109，診断と治療社，2016。
- 藤井俊策：PCOS の生殖補助医療による治療。森崇英編，卵子学，pp1057-1067，京都大学学術出版社，2011。
- 杉本修，青野敏博，森崇英ら：本邦婦人における多嚢胞性卵巣症候群の診断基準設定に関する小委員会（平成2年度～平成4年度）検討結果報告，日産婦誌，45: 1359-1367, 1993。
- 本庄英雄，田中俊誠，伊吹令人ら：生殖・内分泌委員会報告，日産婦誌，54:860-868，2002。
- 柴原浩章，：クリニカルカンファレンス9（生殖）－排卵誘発 Update-3. ちょうせつ卵巣刺激法，日産婦誌，66: 2149-2152, 2014。
- Reddy,J., Oktay, K.:Ovarian stimulation and fertility preservation with the use of Aromatase inhibitors in women with breast cancer.Fertil.Steril., 98: 1363-1369, 2012.
- Ata,B., Seyhan,A., Orhaner,S., Urman,B.: High dose cabergoline in management of ovarian hyperstimulation syndrome. Fertil. Steril., 92: 1168.e1 2009.
- 森崇英：多嚢胞性卵巣症候群の病態と発生病理，森崇英編，卵子学，pp972-982，京都大学学術出版社，2011。