

ISSN 1881-9028

日本IVF学会雑誌

Vol.23 No.1

2020

JSAR
Japan Society of Assisted Reproduction

日本 IVF 学会会員の皆様へ	4
一般社団法人 日本 IVF 学会 理事長 塩谷 雅英, 副理事長 古井 憲司, 名誉理事長 森本 義晴	

論文

— 原著 —

睡眠の質は受精率に影響する	6
赤松 里美, 藤井 美喜, 江夏 徳寿, 大月 純子, 岩崎 利郎, 苔口 昭次, 塩谷 雅英 英ウィメンズクリニック	

— 原著 —

高齢患者における Piezo-ICSI の有用性について	12
古橋 孝祐, 岸 加奈子, 岩崎 利郎, 江夏 徳寿, 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 —

卵管液組成に基づくシングルメディウムを用いた受精卵培養の検討	16
白岩 優綺, 佐東 春香, 田中 里美, 古橋 孝祐, 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 —

選択的単一胚盤胞移植においてどの評価因子を優先して胚選択するべきか?	21
大浦 朝美 ¹ , 富田 和尚 ² , 佐藤 学 ¹ , 中岡 義晴 ¹ , 森本 義晴 ² ¹ IVF なんばクリニック/ ² HORAC グランフロント大阪クリニック	

— 短報 —

採卵決定日に LH サージが開始された採卵周期におけるレルゴリクスの排卵抑制効果	24
中尾 佳月, 高見澤 聡, 板倉 彰子, 森山 梓, 壽圓 裕康, 堀川 隆, 黒田 恵司, 小代 裕子, 中川 浩次, 杉山 カー 杉山産婦人科 新宿	

— 症例報告 —

絨毛染色体検査を契機に診断された均衡型相互転座の一例	27
松山 毅彦, 石橋 めぐみ, 中澤 留美, 河戸 朋子, 勝木 康博, 菊池 咲希, 三宅 君果, 横田 智, 真鍋 有香, 北岡 美幸 厚仁病院 産婦人科	

第23回 日本IVF学会学術集会 開催概要	31
日本IVF学会雑誌発行における投稿論文募集のお知らせ	32
日本IVF学会雑誌 投稿規定	33
一般社団法人 日本IVF学会 定款	35
一般社団法人 日本IVF学会 役員	41
編集委員会	42

日本 IVF 学会会員の皆様へ

5月31日まで、緊急事態宣言の延長が決定されました。新型コロナウイルス（COVID-19）感染症との戦いが長期化する中で、安倍総理大臣は5月4日の記者会見にて「まん延防止対策と社会経済活動との両立を図ることが課題」と述べましたが、生殖補助医療に従事する私達にとりまして、まさに、「コロナ対策と生殖補助医療との両立を図ることが課題」と言えるでしょう。

さて、「コロナ対策と生殖補助医療との両立」を考えると、次の3点が重要と考えます。第一に、患者の皆様のみならずスタッフの健康を守ること、第二に、治療の結果生まれてくる児の健康を守ること、第三に、今回の教訓を記録し分析することで将来に備えること、です。

皆様の健康を守るために

挙児を望むものの受診を控え「Stay home」しておられる患者の皆様も少なくありません。その一方で、挙児に対して切実な思いを抱えて通院を続ける皆様も少なくないのが現状でしょう。その多くは年齢因子などにより治療を延期し難い方々です。生殖補助医療に従事する私達にとり、このような強い思いを持って治療の継続を望む皆様に、リスクについて十分な説明をした上で、より良い医療を提供したいと考えるのは自然なことです。

しかしながら、治療を継続する以上、人から人へ感染するリスクをゼロにすることはできません。従いまして、施設を利用する皆様とスタッフの健康を守るためには様々な感染抑止対策が必要となります。すでに、会員施設ではオンライン診療を取り入れるなど、それぞれに工夫を凝らしていることと存じます。日本 IVF 学会では、より安全な生殖補助医療を広く提供できるよう、会員施設間で情報共有できるような仕組みを構築したいと考えています。皆様の叡智の結集を期待します。

治療の結果生まれてくる児の健康を守るために

治療にあたっては、COVID-19 が胎児に及ぼす影響は未だ明らかになっていないこと、妊婦における重症化の可能性が否定できないこと、さらには妊娠中に使用できる安全な治療薬が無い現状、等を十分に説明する必要があります。

日本生殖医学会は、4月1日に、「不妊治療の延期という選択肢を提示するよう推奨」との見解を発表しました。しかしながら、厚生労働省（4月1日）は、COVID-19が胎児の異常や死産、流産を起こしやすいという報告は無く、妊娠中でも過度な心配は不要との見解を出しています。同様に、日本産婦人科学会（4月7日）は、妊婦が特別にこのウイルスにかかりやすい、という報告は無く、妊娠中の重症化率も一般の方と同じかむしろ低い値が報告されている、との見解を公表しています。以上を受けて、日本生殖補助医療標準化機関(JISART)は4月10日に、「現在の状況を十分に説明の上で治療を適切に行っていききたい」との声明を出しています。日本 IVF 学会の会員の皆様におかれましては、これらの関連学会の見解を尊重しながら、地域性も鑑みつつ患者の皆様十分に説明を行っていただきたいと思います。

今回の教訓を記録し分析することで将来に備える

今回の新型コロナウイルス感染症はペストやコレラ同様人類が直面した未曾有の災害の一つと言えるでしょう。会員の皆様にも多大な影響が及んでいます。戦いはまだ道半ばですが、この間に得た知見や教訓を記録に残し、かつ分析することで将来に起こりうる同様の災害に備えなければなりません。日本 IVF 学会ではなんらかの形で情報を共有できる場を設けたいと思います。その時は皆様のご協力をお願い申し上げます。

最後になりますが、会員の皆様、叡智を結集し一丸となってこの難局を乗り越えていきましょう。

一般社団法人 日本IVF学会

理事長 塩谷 雅英

副理事長 古井 憲司

名誉理事長 森本 義晴

睡眠の質は受精率に影響する

赤松 里美, 藤井 美喜, 江夏 徳寿, 大月 純子, 岩崎 利郎, 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 1-1-2 三宮セントラルビル

要 旨： 妊娠を望む女性の睡眠障害は、妊孕性の低下や不妊治療に対する反応にも及ぶと推察されているが、その報告は十分ではない。そこで、当院の不妊症患者208名を対象に、Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) を用いて睡眠の状況を調査した。PSQI総合得点5点以下を“good”, 6-8点を“fair”, 9点以上を“poor”とし、各群と受精率、胚盤胞発生率と比較した。その結果、受精率において3群間に有意な差が見られ、特に“poor”群で有意に受精率が低かった($p < 0.05$)。胚盤胞発生率と良好胚盤胞($\geq G3BB$)率ではいずれの群間にも有意差はなかったが、睡眠の質が上昇するに従い上昇傾向にあった。また、受精率をエンドポイントとした多変量解析では、アルコールの摂取と睡眠の質が受精率と関連する独立した因子と考えられた($p < 0.05$)。これらのことにより、睡眠の質や生活環境は受精率に影響するものと考えられた。
キーワード： 受精率, 睡眠の質, 妊孕性, ピッツバーグ睡眠質問票Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI), 不妊治療

緒 言

睡眠に関する研究は進歩し、国内外に関わらず睡眠障害に対するケアへの注目が高まっている。女性の睡眠については、月経周期や妊娠、閉経における健康状態と睡眠の関係を示唆する報告がみられ、妊娠を望む女性においては、内分泌環境、高血圧、糖尿病、うつ、自律神経障害など様々な症状が不妊の原因となり、不眠や睡眠障害を引き起こす、もしくは促進するといわれている¹⁾。

OECD（経済協力開発機構）加盟国における実態調査によれば、全加盟国の1日の平均睡眠時間を比較したところ、日本女性の睡眠時間は世界で最も短く、女性の睡眠時間が男性よりも短い国は28か国中合計5か国あり、日本はその中に該当している²⁾。また、厚生労働省の調査³⁾では、成人の1日の平均睡眠時間は、6時間未満の者の割合が平成19年以降有意に増加しており、女性の睡眠については、20-69歳各年代の約70-80%が7時間未満であること、また、睡眠の質に関する項目では、6時間未満の者が、男女とも全ての項目において有意に高いことがわかっている。

妊娠を望む女性にとって、次の主な4つの睡眠障害因子⁴⁾があげられる。最初に日常生活の疲労やストレスを指す社会学的因子、2番目に通院中でART経験があるなど治療に対する不安やストレスなどの心理的因子、3番目に就寝前の携帯電話およびパソコンの使用やカフェイン、アルコール摂取などによる生活習慣因子、4

番目に、女性によく見受けられる足の冷え、運動不足からの血行不良や疾患を起因とした自律神経不安定などの医学的因子が考えられる。

睡眠は、体温、自律神経、脳やホルモンバランスを整える役割がある⁵⁾。ゆえに、女性における睡眠障害は月経不順や排卵障害などをもたらす、不妊の原因となるおそれを推察するが、睡眠と妊孕性に関する研究報告は少ない。そこで、こうした日本女性の睡眠の現状を踏まえ、不妊の背景に睡眠障害が関与する可能性の考究を目的とし、当院の不妊症患者を対象に、睡眠の質についてアンケート調査し、その結果を分析および検討した。

対象と方法

2016年6月17日から同年7月25日の間に、当院を外来受診した患者の中で、過去1年間に体外受精（一般体外受精または顕微受精）を実施した不妊症患者を対象として外来でアンケート用紙を配布した。回答方法は、用紙に印刷されたQRコードの読み取りを介してWeb経由で回答するものとした。調査に対しては、対象者に目的および方法、協力は自由意志であること、調査協力の有無によって何ら不利益を受けないこと、個人を特定されないことを口頭で説明し同意を得た。

睡眠の状況を判断するものとして、これまで最も使われてきたのは睡眠時間であるが⁶⁾、年齢や環境など様々な因子による睡眠障害の可能性が考慮される。そこで、

睡眠時間と生活習慣の関係を考慮した上で睡眠の質を測定することができる、ピッツバーグ睡眠質問票 Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) の日本語版⁷⁾を用いた(表1)。PSQIは、最近1か月間における睡眠習慣や睡眠の質に関する7つの要素(主観的睡眠の評価、入眠時間、睡眠時間、有効睡眠時間、睡眠困難、睡眠薬の使用、日中に感じる過度の眠気)で構成され、18の質問項目がある。就寝時間、入眠時間、睡眠時間に関する質問項目について該当する数字を記入し、それ以外の数字で回答する質問については、4段階(0.非常によい 1.かなり良い 2.かなり悪い 3.非常に悪い)で評価した。

その合計を0-21点とし、点数が高いほど睡眠の質が低いと評価した。→「表1」

本研究においては、総合得点が5点以下を睡眠障害なし、以下“good”、6-8点を軽度障害、以下“fair”、9点以上を高度障害、以下“poor”の群とした。また、主な女性の睡眠障害の影響因子と考えられる生活習慣に関する項目(運動習慣、寝るまでの足の冷えの実感、勤務体制、就寝前のアルコール摂取、就寝前の携帯電話・パソコンの利用、サプリメントの服用、就寝時に夢を見るか)を加え、その程度を尋ねた。

不妊治療と睡眠の質の相関を検証する目的で、患者の

表1 ピッツバーグ睡眠質問票 Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) の日本語版

過去1か月間の夜間の睡眠の状態や環境についてお聞きします。

1. 通常何時ごろ寝床につきましたか? () 時 () 分
2. 寝床について眠るまでどれくらい睡眠時間を要しましたか? () 分
3. 何時頃起床しましたか? () 時 () 分
4. 実際の睡眠時間は何時間くらいでしたか?
(寝床にいた時間とは異なります) 1日平均 約 () 時間 () 分くらい
5. どれくらいの頻度で、以下の理由のために睡眠が困難でしたか?
 - a) 寝床についてから30分以内に眠ることができなかったから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - b) 夜間、または早朝に目が覚めたから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - c) トイレに起きたから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - d) 息苦しかったから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - e) 咳が出たり、大きないびきを聞いたから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - f) ひどく寒く感じたから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - g) ひどく暑く感じたから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - h) 悪い(怖い)夢を見たから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - i) 痛みがあったから
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
 - j) 上記以外(a～i以外)の理由があったから
6. ご自分の睡眠の質がどうでしたか?
 - a. 非常によい b. かなり良い c. かなり悪い d. 非常に悪い
7. 眠るために薬をどのくらいの頻度で使いましたか?
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
8. 車の運転中や食事中、社会活動中など、眠ってはいけない時に睡眠困難により、起き上がっていらなくなり困ったことがどれくらいの頻度でありましたか?
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上
9. 睡眠困難により、物事をやりとげるのに必要な意欲を持続するうえで、どのくらい問題がありましたか?
 - a. なし b. 1週間に1回未満 c. 1週間に1-2回 d. 1週間に3回以上

受精率, 胚盤胞発生率, 良好胚盤胞発生率(ガードナー分類⁸⁾ G3BB以上)をPSQIから得られた睡眠の質別に比較した. 患者の受精率は2PNの受精率とし, IVFまたはICSI後18時間から22時間の間に受精判定を行なった. また, 胚盤胞発生率はday 5およびday 6におけるGardnerの分類⁸⁾に基づいてG3BB以上とした. 2群間における比較はchi-square test, 3群間の比較はKruskal-Wallis testならびにBonferroniの調整を加えたt検定を用いて, 睡眠障害が受精卵に与える影響を検討した. 睡眠と生活習慣項目の関連については, 多重解析法(Multivariate logistic regression analysis of several parameters)を用いた.

結 果

アンケート配布数は計1000人, 回答数は208人, 回

答率は20.8%, 平均年齢は 37.0 ± 5.0 歳(17-47歳)であった. 208人中140人が過去1年間に採卵されていた. 回答者全体におけるPSQI総合得点の分布を図1に示した. 全体でのPSQI総合得点の平均は5.1点であり, 最も多く回答した総合点数は4点(43人)で, 17点以上の回答者はなかった(図1). 睡眠の質別の割合は, “good” 65.1% (135/208), “fair” 26.8% (56/208), “poor” 8.1% (17/208)であった(図2). 平均睡眠時間は6時間28分であり, 睡眠の質別では, “good” 6時間42分, “fair” 6時間6分, “poor” 5時間18分であり, いずれの群間にも1%以下水準で有意差が見られた. 年齢別においては, 26-30歳が6時間6分と最も短かったが, 年齢と平均睡眠時間の間に一定の傾向はなかった(図3).

睡眠の質に影響する因子について, 就労と睡眠の質では全体の就労率は57.7% (120/208)であり, 仕事あり群の中で特に夜勤を伴う群では, 睡眠の質がやや良くな

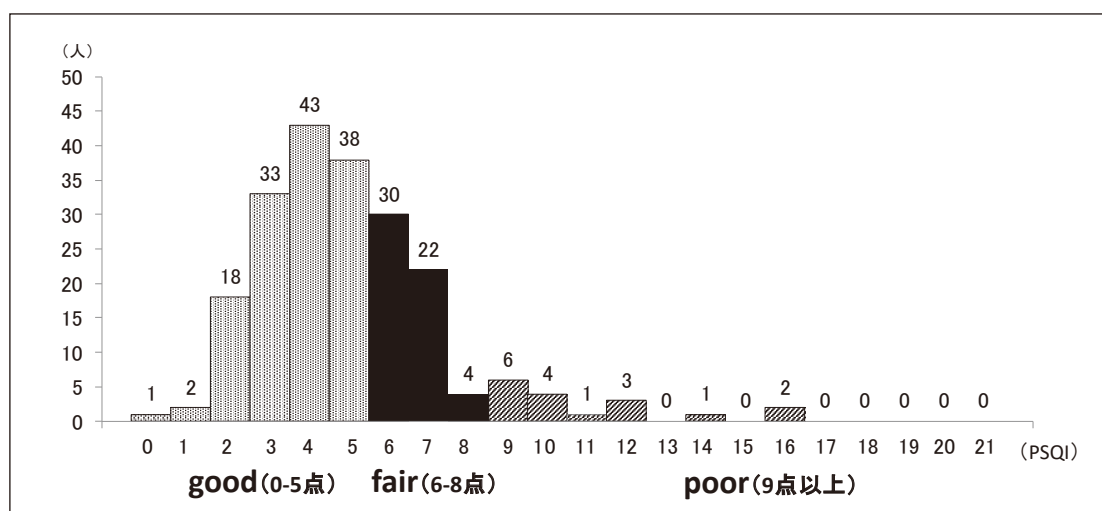


図1 PSQI 総合得点の分布

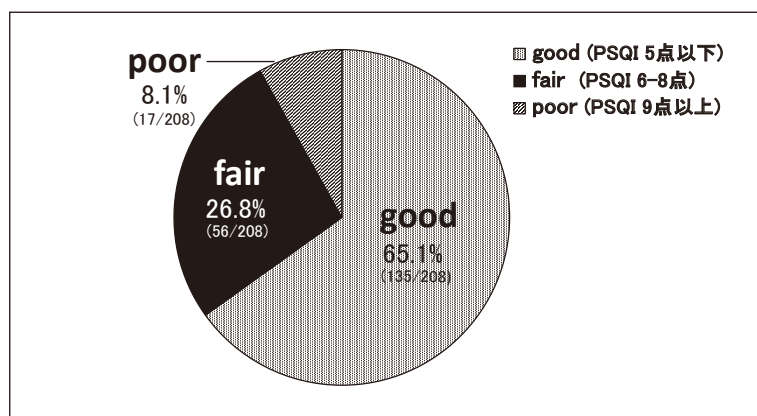


図2 睡眠の質における回答者の割合

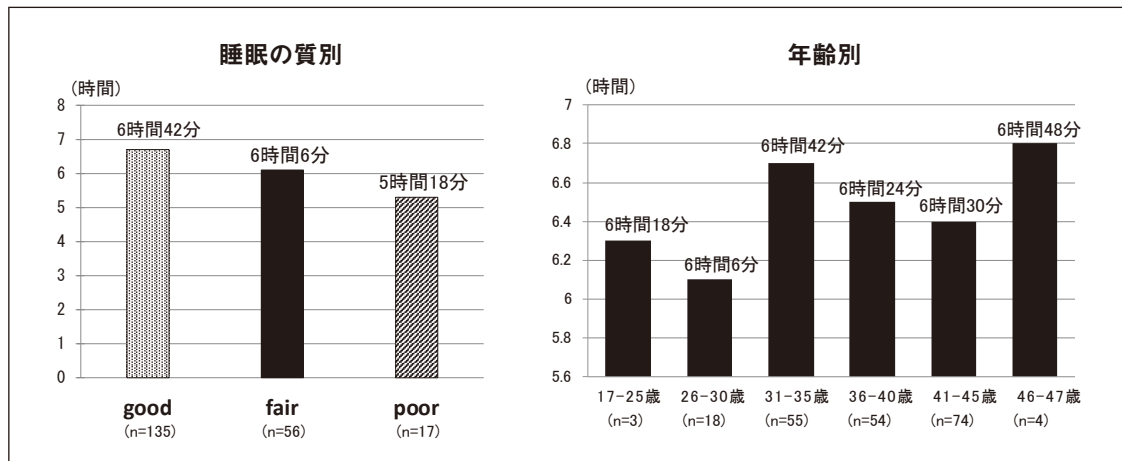


図3 平均睡眠時間

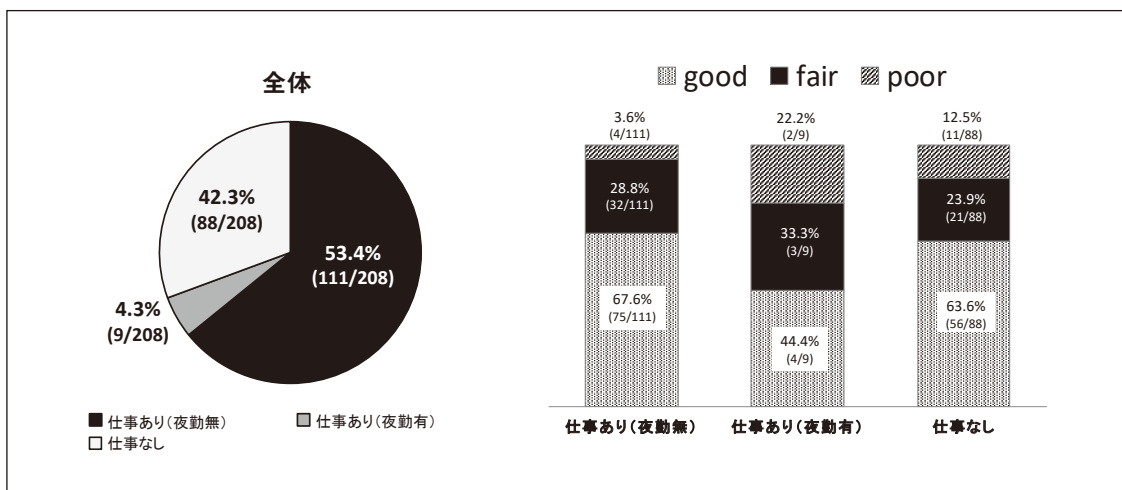


図4 就労と睡眠の質

い傾向にあった(図4). また, 睡眠薬を服用していたのは, “good” 0% (0/135), “fair” 1.8% (1/56), “poor” 17.6% (3/17)であり, 飲酒習慣があったのは, “good” 29.4% (40/135), “fair” 32.1% (18/56), “poor” 23.5% (4/17)であった. また, 何らかのサプリメントを服用している人は54.3%(113/208), 運動している人は25.0%(52/208), 布団に入って寝るまでに足の冷えを感じる人は34.1%(71/208), 就寝1時間前にパソコンやスマートフォンを使用する人は89.9%(186/207), 寝ている間に夢を見た人は81.3%(173/208)であった. それらの睡眠の質に影響する因子の中では, PSQI総合得点について睡眠の質との相関を検討した結果, アルコール摂取の習慣に有意な相関差がみられた($p < 0.05$).

睡眠の質別に受精率を比較するため, Kruskal-Wallisの多重検定を行なったところ, どの群間に差があるかは

不明であるが, 3群間に差が認められた ($p < 0.01$). それぞれの群における受精率は, “good” では67.1% (408/608), “fair” 63.1% (140/222), “poor” 48.6%(52/107)であり, 次に2群ごとにカイ自乗検定を行なったところ “good” と “fair” 間は差がなく, “good” と “fair” の群間および “fair” と “poor” の間には有意差がみられ ($p < 0.05$), “poor” 群で有意に受精率が低いと考えられた(図5). また, 同じく各群における胚盤胞発生率は “good” 63.2% (189/299), “fair” 57.1% (60/105), “poor” 48.4%(15/31)であり, 良好胚盤胞発生率($\geq G3BB$), “good” 26.1% (78/299), “fair” 21.9% (23/105), “poor” 12.9% (4/31)であった. いずれの群間においても差はなかった(図6).

受精率をエンドポイントとして多変量解析を行ったところ, アルコールの摂取とPSIQが独立した予測因子として受精率に関与していることが確認された.

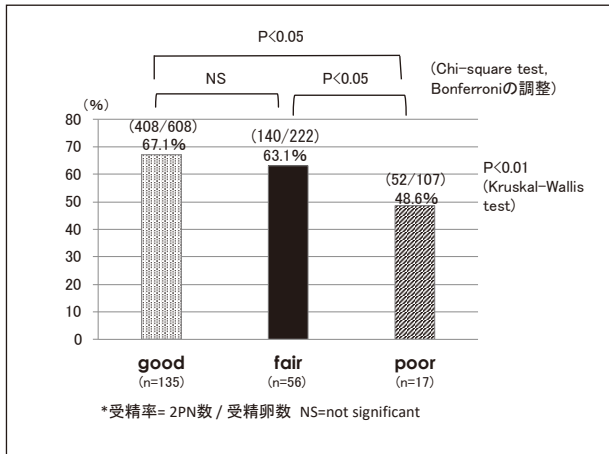


図5 睡眠の質と受精率

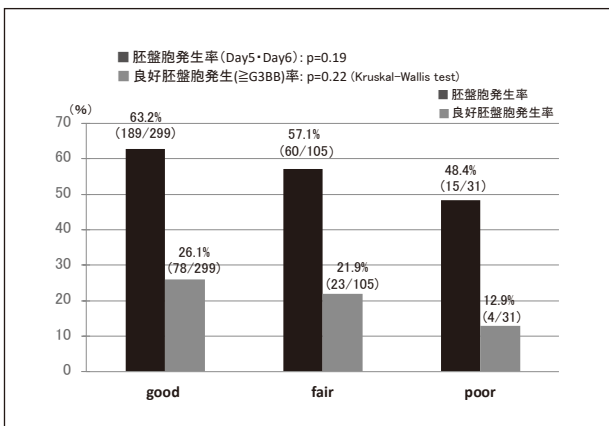


図6 睡眠の質と胚盤胞率・良好胚盤胞率

考 察

睡眠とは、生体の恒常性維持に不可欠の行動・現象であり、内分泌系に大きな影響を及ぼし、その各々の内分泌指標が睡眠・覚醒と連動して変化する⁹⁾ことより、睡眠は卵巣機能とホルモン産生能に影響を与え、不妊治療に対する反応にも及ぶと推察される。そこで、本研究は、妊娠を望む女性における睡眠の現状を把握するため、PSQIを用いて睡眠の質を評価した。PSQIは、睡眠障害の有無や程度を客観的に評価して比較することができる自記式質問票であり、日本語版においては、土井らによって信頼性、妥当性が十分に議論されている尺度である¹⁰⁾。個体間や群間での比較が可能で過去1か月間の睡眠評価として広く使用されている。

その調査結果と当院の外来患者における治療との関係を検討した結果、睡眠の質と受精率の間に正の相関が認められ、特に、“fair”と“poor”の間で有意な差を認め

ており(図5)、睡眠状態の悪い群では受精率が悪くなる可能性が示唆されている。また、睡眠の質と受精後の胚盤胞発生率の関係は、有意な差はなかったが、睡眠の質が上昇するに従い、胚盤胞発生率および、良好胚盤胞発生率は上昇傾向にあった(図6)。かつて、田村らの研究においては、マウスへ長期的にメラトニンを投与したところ、排卵に至る卵子の数が増え、受精率も上昇した¹¹⁾と報告しており、動物やヒトでの受精率や胚盤胞発生率は、メラトニンの分泌を通じて高度睡眠障害と関連しているのかもしれない。したがって、妊娠を望む女性にとって、睡眠の質の向上は、妊娠しやすい身体づくりにつながる可能性がある。

しかしながら、当院へ通院する女性の睡眠の質に対する評価では、全体の34.9% (73/208人) (図2)が良好ではなく、同様に、厚生労働省の調査においても、睡眠で休養が十分にとれていないと感じる女性は、20歳から59歳まで増加傾向にあり、各年齢層の約25%が十分な睡眠を実感することが難しい状況にある¹²⁾。したがって、睡眠に対する評価は、当院における通院女性と日本女性全体で、ほぼ同じ状況であることが分かった。また、同調査の睡眠時間では、日本女性(35-39歳)の平均時間が7時間36分であることに対し、本研究対象者(平均37歳)は6時間28分であり、日本女性の平均より約1時間短かった。

睡眠の質別では、睡眠障害の程度が高くなるにつれ、睡眠時間も短くなっていることも明らかである。通院する女性の睡眠においては、家庭・仕事・通院など生活に対するストレスによる社会的因子に、不妊治療に対する不安や思いといった心理的因子が加わった可能性が考えられる。

また、就労と睡眠の関係においては、仕事をしている女性の方が睡眠の質を保たれる傾向にあったことから、仕事をしていることで生活に規則性が生まれる可能性があると考えられた。ただし、夜勤のある仕事に就く女性は、夜勤のない仕事に就く女性に比べ、睡眠障害をもつ女性の比率が高かった。これは、日没前後より労働することで体内時計周期と明暗環境周期のズレが、睡眠の質を下げていると考えられる。夜勤のある看護師を対象とした調査では、月経周期、生殖機能の加齢の変化はサーカディアンリズムに強く依存している¹⁾とされている。

生活習慣における睡眠障害の影響因子を解析すると、就寝前のアルコール摂取との関係において有意差が見受けられた。この結果は興味深いが生例数が少ないためにアルコールと睡眠の関係についてはさらに検討する必要がある。また、生活習慣に着目する上で、長期的な睡

眠の質も調査する必要性があると考えられる。しかしながら、本研究ではPSQIが短期の睡眠の質に対する調査であるために、長期的な睡眠の質に対する影響は調査していない。長期的な睡眠の質が受精率にどのような影響を与えるかは今後の研究課題である。また、本研究では男性因子に関する調査は夫の年齢のみであったため、男性側の因子が受精率に与えた影響については推測できなかった。長期的な睡眠の質の評価とともに今後の課題である。

睡眠の質の良さに伴って受精率は有意に上昇するという結果が得られたことから、自身のこれまでの生活習慣を見直し、サーカディアンリズムに沿った規則正しい生活を送ることで、妊孕性は向上すると考えられる。Nishiharaらはメラトニン3mgを2週間以上投与することによって、受精率ならびに胚の質が向上したと報告している¹³⁾。メラトニンは一般的に睡眠の質の向上に役立つと考えられているが、Nishiharaらは抗酸化作用による可能性を指摘しているため、メラトニンの睡眠に対する作用と受精率の関連については、さらに検討が必要であろう。本研究では、睡眠の質と胚盤胞発生率および良好胚盤胞発生率の関係は、いずれも睡眠の質に比例して上昇傾向にあり、ある程度関連が見受けられたが、統計学的解析に有意差は認められなかった。このことに関しては、母集団の大きさにも問題があると考えられ、今後、症例数を増やして検討する必要があると考えられた。また、この度のアンケート回答率が20%強と低い数字となった原因の1つとして、これまでは直接用紙に回答を記入していたが、今回は印刷されたQRコードの読み取りを介してWeb経由で回答を実施したため、当院外来患者における、PCへの登録などの手間をはじめ、Web経由の操作に対する煩雑さが回答率に影響したと考えられた。

参考文献

- 1) Kloss JD, Perlis ML, Zamzow JA, Culnan EJ, Gracia CR: Sleep, sleep disturbance and fertility in women. *Sleep Med Rev*, 22: 78-87, 2015.
- 2) 経済協力開発機構編. OECD 国際比較調査 (15-64 歳の成人男女対象). 2015, 2018:<https://www.oecd.org/gender/balancing-paid-work-unpaid-work-and-leisure.htm> (2018.12.15)
- 3) 厚生労働省編. 国民健康・栄養調査結果の概要. 平成 27 年度. 2017. <https://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou-10904750-Kenkoukyoku-Gantaisakukenkouzoushinka/kekkgaiyou.pdf> (2019.02.01)
- 4) Matsuda H, Ogawa N, Tsukada R, Kodama Y, Yamazaki A, Kosako Y, Miyamoto H, Morimoto M: Factors that affect quality of sleep in female university student. *Jpn J Nurs Sci*, 35: 48-55, 2012.
- 5) 西野精治: スタンフォード式最高の睡眠. サンマーク出版: 8-13, 2017.
- 6) 西村美八・檀上和真・松坂方士・津谷亮佑・倉内静香・古川照美・高橋一平・梅田孝・兼板佳孝・大井田隆・中路重之: 一般住民における睡眠障害と生活習慣の関連について. *弘前医学*, 62: 34-43, 2011.
- 7) 土井由利子・蓑輪真澄・大川匡子・内山真: ビッツバーグ睡眠質問票日本語版の作成. *精神科治療*, 13: 755-769, 1998.
- 8) Gardner DK et al.: *Towards Reproductive Certainty: Fertility and Genetics beyond 1999*, pp.378-388, Parthenon Press, Carnforth, 1999.
- 9) 田ヶ谷浩邦: 睡眠関連ホルモンの計測. *生体医工学*, 46: 169-176, 2008.
- 10) Doi Y, Minowa M, Uchiyama M, Okawa M, Kim K, Shibui K, Kamei Y. Psychometric assessment of subjective sleep quality using the Japanese version of the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI-J) in psychiatric disordered and control subjects. *Psychiatry Res*, 97: 165-172, 2000.
- 11) Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamaru I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N. Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr J*, 60: 1-13, 2013.
- 12) 厚生労働省編. 国民健康・栄養調査結果の概要. 平成 28 年度. 2018. <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/eiyoudl/h28-houkoku.pdf> (2019.02.01)
- 13) Nishihara T, Hashimoto S, Ito K, Nakaoka Y, Matsumoto K, Hosoi Y, Morimoto Y. Oral melatonin supplementation improves oocyte and embryo quality in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. *Gynecol Endocrinol*, 30: 359-362, 2014.

高齢患者における Piezo-ICSI の有用性について

古橋 孝祐, 岸 加奈子, 岩崎 利郎, 江夏 徳寿, 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 1-1-2 三宮セントラルビル

要 旨： ARTにおいて必須の技術であるICSIは、透明帯を押し破り卵細胞質膜を破膜するが、この破膜には卵細胞質を吸引するconventional-ICSI (c-ICSI) とPiezoパルスを使用するPiezo-ICSI (P-ICSI) とがある。P-ICSIはヒト卵子において有用性が散見されるため、40歳以上の患者を対象とし、2018年1～8月にc-ICSIを行った521周期、2019年1～8月にP-ICSIを行った730周期を後方視的に検討した。比較結果は2PN率(71.3% vs 78.3% $p < 0.001$)、胚盤胞発生率(31.9% vs 43.2% $p < 0.01$)でPiezo-ICSI群が有意に高率となった。本結果より、Piezo-ICSIの有用性が確認出来、Piezo-ICSIは加齢に伴う脆弱な卵子において、少ないダメージでICSIが可能となり培養成績の向上に寄与出来ることが示唆された。

キーワード： ICSI, Piezo-ICSI, 胚盤胞発生率

ランニングヘッド： Piezo-ICSIの有用性について

緒 言

生殖補助医療において、卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection; ICSI)は必須の技術である。本邦において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」¹⁾としていたが、現在では不妊原因に関わらず年齢条件などにもその適応が広がり、全例ICSIを施行する施設も報告されている²⁾。

ICSIの際に精子を卵細胞質内へ注入するためには、インジェクションニードルで透明帯を押し破った上で、卵細胞質膜の穿破が必須である。この卵細胞質膜を破膜するためにはインジェクションニードル内へ卵細胞質を吸引して破膜する方法(conventional-ICSI: 以下c-ICSI)、又はPiezoパルスを使用して破膜する方法(Piezo-ICSI)がある。Rybouchkinらはマウス卵子の原形質膜は高い伸長性、卵細胞質は低い粘度を有し、c-ICSI後の生存率が50%未満となることを報告している³⁾。Yanagimachiら⁴⁾は、マウス卵子のc-ICSI後の生存率を改善する目的でマウス卵子にPiezo-ICSIを用い、Piezo-ICSIが有効であることを報告した。また、Yoshida⁵⁾らは、その改善に関してPiezo-ICSIはマウス卵子の原形質膜の損傷を軽減するため、卵母細胞、特に繊細な原形質膜の破膜に対し

て非常に良好な結果を与えると報告している。その後、Yanagidaら⁶⁾がヒト卵子においてもPiezo-ICSIが有効であることを報告している。c-ICSIではインジェクションニードルを卵細胞質内へ穿刺し、ニードル内へ陰圧をかけることで卵細胞質が吸引される。このニードル内へ陰圧をかけた際の流入速度の違いで卵細胞膜が破れたと判断した上で、精子を卵細胞質内へ注入するが、この一連の動作は胚培養士の習熟度による違いがあると推察できる。そのため、胚培養士のICSI技術の熟練度によっては卵細胞質をニードル内に過剰に吸引してしまうことがc-ICSIでは危惧される。Dumoulinら⁷⁾は、c-ICSIによる膜穿破時、ニードル内へ吸引した卵細胞質量は受精率に影響しないものの、吸引量が増えると胚盤胞発生率が低くなることを報告している。一方、Piezo-ICSIはPiezoパルスを使用し、卵細胞膜を破膜するためニードル内へ卵細胞質を吸引する必要がない。そのためPiezo-ICSIは卵子に与えるダメージが軽減され、受精率が上昇し、変性率が低下するということがHiraokaら⁸⁾により報告されている。また、我々は35歳以上の女性に対し、Piezo-ICSIが有効であることを報告した⁹⁾。今回、さらに40歳以上の症例についてPiezo-ICSIが培養成績の向上に有用であるかどうかを検討した。

受付 2019年10月9日 / 受理 2019年12月31日

責任著者：古橋 孝祐 e-mail [furuhashi@hanabusaclinic.com]

対象と方法

1. 対象

2018年1月から8月にc-ICSIを実施した40歳以上:521周期(MⅡ卵:1247個)をc-ICSI群(平均年齢 42.6 ± 2.0 歳)とし、2019年1月から8月にPiezo-ICSI(以下P-ICSI)を実施した40歳以上:730周期(MⅡ卵:1939個)をP-ICSI群(平均年齢 42.7 ± 2.0 歳)とし、後方視的に比較検討を行った。

2. 採卵, 精子調整, ICSI及び培養方法

卵巣刺激法は、原則としてlong protocol, short protocolまたはantagonist protocolを用い、poor responder症例やmild stimulationを希望する症例には、自然周期またはレトロゾールあるいはクロミフェンを使用した。精子調整方法は2層パーコール法にて良好精子を回収した。前培養後にリコンビナントヒアルロニダーゼ(ICSI Cumulase[®], Origio, Denmark)を使用し顆粒膜細胞を除去し、形態正常な運動精子を用いてc-ICSI, P-ICSIをそれぞれ行った。その後、SAGE 1 Step Medium (Origio, Denmark)を用いて胚培養を行った。また卵子、胚の培養は37°C, 5.5%CO₂, 5.0% O₂, 89.5% N₂の気相条件下で行った。

3. Conventional-ICSI方法

c-ICSIの方法は、OLYMPUS倒立顕微鏡(IX-73)にマイクロマニピュレーターシステム(MTK-1-03 NARISHIGE Inc., Japan)と、Injection needle (K-MPIP-3130 COOK., USA)を装着し、7%PVP (7% PVP Solution, Irvine Scientific., USA)中で形態が正常な運動精子を不動化させ、卵子の第一極体が12時か6時の方向となるように、holding pipette (KITAZATO, CORPORATION., Japan)を用いて保持後、3時の方向から、injection needleを挿入し、精子を卵子内に穿刺注入した。

4. Piezo-ICSI方法

極薄ニードル(PINU06-20FT: Primetech Ltd., Japan.)内に、慣性体としてオペレーションリキッドを注入しICSIに供した。また、本検討にはPiezoXpert[®] (Eppendorf Ltd., Germany)を使用した(図1)。インジェクションニードルにて形態が正常な運動精子を7%PVP (7% PVP Solution, Irvine Scientific., USA)中においてまず精子を極薄ニードルを用いて圧座し運動性を失くし、その後Piezoパルスをかけ不動化を完了させた。その後、卵子の第一極体を12時又は6時の方向



図1 本検討に使用した Piezo ドライブ (PiezoXpert: Eppendorf 社)

とは決めずに、囲卵腔の広い場所から穿刺することを念頭に置き挿入場所を選択した。ピエゾパルスはSpeed3.0 Intensity5.0で原則使用し透明帯を穿破した。この際、透明帯の穿破が難しいようであれば、Intensityを徐々に引き上げ、Intensity10.0をMAXとした。次に精子をニードル先端部に移動させ、卵細胞膜をピエゾパルス(Speed1.0, Intensity5.0)にて破膜し、精子を卵子内に注入した。

5. 分割期胚及び胚盤胞の形態学的評価

分割期胚の評価はVeeckの分類¹⁰⁾を用いて行い、Day2時、Grade 1, 2の4 cell及びGrade 3の5 cell以上の胚を良好分割期胚とした。また、胚盤胞の評価はGardnerの分類¹¹⁾を用いて、Grade3BB以上を良好胚盤胞とした。

6. 統計学的解析

統計学的解析には数的データには対応のないt検定を用い、質的データには χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

c-ICSI群の平均年齢は 42.7 ± 2.1 歳、P-ICSI群の平均年齢は 42.8 ± 2.1 歳であり、両群において患者背景に有意差は認められなかった。C-ICSI群及びP-ICSI群の培養成績は順に受精率(2PN, 1PN, 3PNの合算)83.0% (556/670), 86.6% (1103/1274)であった。2PN率は71.3% (478/670), 78.3% (998/1274), 1PN率は8.1% (54/670), 5.6% (71/1274), 3PN率は3.6% (24/670), 2.7% (34/1274), 変性率は5.4%

(36/670), 5.4% (69/1274) であった. 良好分割率は 52.1% (266/511), 53.6% (548/1022), 継続培養胚当たりのD5胚盤胞発生率は31.9% (89/279), 43.2% (240/556), 継続培養胚当たりのD5良好胚盤胞率は11.1%(31/279), 18.0% (100/556), 継続培養胚当たりのD5, D6胚盤胞発生率は40.5% (113/279), 49.3% (274/556)であり, 受精率, 2PN率, 1PN率, D5胚盤胞発生率, D5良好胚盤胞率, D5, D6胚盤胞発生率においてP-ICSI群が有意に高い値となった(表1).

考 察

本検討に用いたピエゾマイクロマニピュレーター(以下PMM)は,ピエゾ(圧電素子; piezo electric elements)を伸縮させることによって得られる慣性力を動力としたステップ状の駆動原理に基づき, 0.1 μ m以下の超微動域の動作を可能とさせる装置である. そのため, 卵子や胚の弾性のある透明帯や進展性の高い細胞膜でも極細ピペットがスムーズに挿入可能となり, 顕微操作による細胞の損傷を最小限にすることが可能となる.

Piezo-ICSIのヒト卵子以外の報告として, マウス卵子においてその有効性が報告されている^{3,12)}. また,

Katayoseらはウシ卵子においてPiezo-ICSIは効率的に卵子を活性化することを報告している¹³⁾. Salgadoらはウマ卵子において, c-ICSIよりもPiezo-ICSIは良好胚盤胞発生率が高かったと報告している. これは胚の発生において, Piezo-ICSIはc-ICSIと比較し, 精子注入後より迅速に精子構成リモデリング及び卵母細胞の減数分裂の再開を惹起するため, より高い良好胚盤胞率になると考えられると報告している¹⁴⁾.

ヒト卵子の報告ではYanagida⁶⁾らも我々の結果と同様にPiezo-ICSIは, c-ICSIに比べて有意に高い受精率となったことを報告している⁴⁾. また, Takeuchiらは精子を注入する際に, Piezo-ICSIは卵子をほとんど変形させることなく精子を注入することが可能なため, c-ICSIと比較しPiezo-ICSIはヒト卵子において受精率・分割率を改善するために効果的であるとも報告している¹⁵⁾. Hiraokaらは, より少ないダメージでICSI可能なPiezo-ICSIが普及することで, 一般不妊患者の受精率が広く改善されることはもとより, 従来のICSIでは耐えられない細胞膜の弱い卵子しか採取出来ない患者をも新たに救済できることが期待されると報告している⁸⁾.

加齢に伴う細胞膜の変化が, ヒトや哺乳動物の胚にどのような変化を与えるかは著者らの知る限り報告をみ

表1 両群における培養成績の比較

	c-ICSI	Piezo-ICSI	Pvalue
周期数	521	730	
平均年齢(歳)±SD	42.7±2.1	42.8±2.1	NS
受精率	83.0% (556/670)	86.6% (1103/1274)	$P<0.05$
2PN率	71.3% (478/670)	78.3% (998/1274)	$P<0.001$
1PN率	8.1% (54/670)	5.6% (71/1274)	$P<0.01$
3PN率	3.6% (24/670)	2.7% (34/1274)	NS
変性率	5.4% (36/670)	5.4% (69/1274)	NS
分割率	91.9% (511/556)	92.7% (1022/1103)	NS
良好分割胚率	52.1% (266/511)	53.6% (548/1022)	NS
D5胚盤胞発生率	31.9% (89/279)	43.2% (240/556)	$P<0.01$
D5良好胚盤胞率	11.1% (31/279)	18.0% (100/556)	$P<0.001$
D5,D6胚盤胞発生率	40.5% (113/279)	49.3% (274/556)	$P<0.05$

ないが、赤血球、リンパ球のような細胞では加齢に関連して変化することが報告されており¹⁶⁾、ヒト赤血球の低浸透圧に対する抵抗性は年齢とともに低下する¹⁷⁾。同じように卵細胞膜も加齢により変化していることが推察される。本検討結果より、Piezo-ICSIの有用性が40歳以上症例で認められたことから、Piezo-ICSIを実施することで卵子の染色体異常は克服出来ないが、卵細胞質の脆弱性は克服出来る可能性があり、Piezo-ICSIは高齢などに起因される脆弱な卵子において有用性があることが示唆された。

今回、受精率及び胚盤胞発生率の向上は認めたが、変性率に関しては差を認めなかった。以前、当院において単独の胚培養士が行ったPiezo-ICSIの有用性の検討では、変性率の低下を認めた⁹⁾。しかしながら2019年より40歳以上症例を全例Piezo-ICSIを実施するという方針に変更し、施行者を増やした結果、変性率の低下を認めなかったことから、Piezo-ICSI導入後間もないこともあり、技術者間の技量の差が生じている可能性が示唆された。また、Piezo-ICSIの変性率が5.4%と他のPiezo-ICSIにおける報告よりも高率となった理由として、対象を40歳以上と限定したことが起因している可能性が考えられた。今後はPiezo-ICSIの臨床妊娠成績において、どのような影響を与えるか解析を行っていききたい。

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) Orief Y, Dafopoulos K, Al-Hassani S: Should ICSI be used in non-male factor infertility? Reprod Biomed Online, 9: 348-356, 2004.
- 3) Rybouchkin, A., D. Dozortsev, P. de Sutter, C. Qian, M. Dhont, Intracytoplasmic injection of human spermatozoa into mouse oocytes: a useful model to investigate the oocyte-activating capacity and the karyotype of human spermatozoa. Hum Reprod, 10: 1130-1135, 1995.
- 4) Kimura Y, Yanagimachi R: Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. Biol Reprod, 52: 709-720, 1995.
- 5) Yoshida, N. and Perry AC. Piezo-actuated mouse intracytoplasmic sperm injection (ICSI) . Nat Protoc, 2: 296-304, 2007.
- 6) Yanagida Y, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K, Sato A and Yanagimachi, R. The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. Hum Reprod, 14: 448-453, 1998.
- 7) Dumoulin JM, Coonen E, Bras M, Bergers-Janssen JM, Ignoul-Vanvuchelen RC, van Wissen LC, Geraedts JP, Evers JL: Embryo development and chromosomal anomalies after ICSI: effect of the injection procedure. Hum Reprod, 16: 306-312, 2001.

- 8) Hiraoka K and Kitamura S. Clinical efficiency of Piezo-ICSI using micropipettes with a wall thickness of 0.625 μ m. J Assist Reprod Genet. 32: 1827-1833, 2015.
- 9) Furuhashi K, Saeki Y, Enatsu N, Iwasaki T, Ito K, Mizusawa Y, Matsumoto Y, Kokeguchi S, Shiotani M. Piezo-assisted ICSI improves fertilization and blastocyst development rates compared with conventional ICSI in women aged more than 35 years. Reprod Med Biol. 00: 1-5, 2019.
- 10) Veeck LL: In: Atlas of the human oocyte and early couceptus, 2nd ed., pp 151-153, Williams & Wilkins Co, 1991.
- 11) Gardner DK and Schoolcraft WB: Towards Reproductive Certainty: Fertility & Genetics Beyond. Proceedings of the 11th World Congress on in Vitro Fertilization & Human Reproductive Genetics, pp 347-371, Carnforth Parthenon Press, 1999.
- 12) Shahverdi A, Movahedin M, Rezazadeh Valojerdi M, Kazemi Ashtiani S. Comparison of embryo development between intracytoplasmic and Piezo-assisted sperm injection after treating mouse sperms by Ca2+ ionophore. Iran Biomed J. 11: 245-250, 2007.
- 13) Katayose H, Yanagida K, Shinoki T, Kawahara T, Horiuchi T, Sato A. : Efficient injection of bull spermatozoa into oocytes using a Piezo-driven pipette. Theriogenology. 52: 1215-1224, 1999.
- 14) Salgado RM, Brom-de-Luna JG, Resende HL, Canesin HS, Hinrichs K: Lower blastocyst quality after conventional vs. Piezo ICSI in the horse reflects delayed sperm component remodeling and oocyte activation. J Assist Reprod Genet, 35: 825-840, 2018.
- 15) Takeuchi S, Minoura H, Shibahara T, Shen X, Futamura N, Toyoda N: Comparison of piezo-assisted micromanipulation with conventional micromanipulation for intracytoplasmic sperm injection into human oocytes. Gynecol Obstet Invest, 52: 158-162, 2001.
- 16) Sutura, S., R. Gardner, C. Boylan, G. Carroll, K. Chang, J. Marvel, C. Kilo, B. Gonen, J. Williamson, Age-related changes in deformability of human erythrocytes. Blood, 65: 275-282. 1985.
- 17) Penha-Silva N, Firmino Cb, de Freitas Reis FG, de Costa Huss JC, de Souza TM, de Freitas MV, Netto RC. Influence of age on the stability of human erythrocyte membranes. Mech Ageing Dev, 128: 444-449, 2007.

卵管液組成に基づくシングルメディウムを用いた 受精卵培養の検討

白岩 優綺, 佐東 春香, 田中 里美, 古橋 孝祐, 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 1-1-2 三宮セントラルビル

要 旨： HiGROW OVIT PLUS (以下OVIT) は日本卵子学会と扶桑薬品工業の共同開発で作られたシングルメディウムである。特徴として卵管液組成に基づき、既存の培養液に比べ必須アミノ酸濃度は低く、非必須アミノ酸濃度は高く設定され、タウリンを高濃度に配合している。今回、既存の一般的なA社のシングルメディウムと、OVITの培養・妊娠成績を比較検討した。2018年8～12月までにARTを行い、受精判定時に2PNが4個以上得られた161周期を培養成績の対象とした。同一患者から得られた胚をA社群と、OVIT群に分けsplit培養を行った。また凍結融解胚盤胞1個を移植した155周期の妊娠成績についても比較を行った。本検討結果より培養・妊娠成績の全ての項目で両群間に有意差を認めなかったことから、OVITは既存の一般的なシングルメディウムと同等であることが示された。

キーワード： 培養液, 必須アミノ酸, 非必須アミノ酸, 卵管液

ランニングヘッド： 卵管液組成メディウムによる受精卵培養

緒 言

生殖補助医療 (ART) において、妊娠率の高い良好胚を得るために、これまで様々な研究が行われてきた。良好胚を得るための要因の1つとして培養液が挙げられ、この数十年間の開発によって培養液の品質は飛躍的に向上している。卵管液組成を基にQuinnらによって作られたHuman Tubal Fluid (HTF)¹⁾や、胚の発育段階による栄養要求性の変化に合わせて培養液を変更すべきという考えを基にGardnerら²⁾によって作られたシーケンシャルメディウム、胚自身が栄養を選択して成長するため培養液の変更は必要ないという考えに基づき、KSOM^{AA}をベースにBiggerら³⁾によって作られたシングルメディウムなど、胚培養における培養液の選択肢が広がっている。このように様々な培養液の中でどれを選択するかは、培養液交換の必要性や、成分の違い、培養成績や妊娠成績の報告などを基に、各ART施設において検討されている。

これまで、ヒト卵管液のアミノ酸濃度を詳細に解析し、その組成を模倣した培養液は報告されていなかったが、今回、日本卵子学会と扶桑薬品工業の共同開発により、初めてヒト卵管液のアミノ酸濃度を模倣した培養液であるHiGROW OVIT PLUS (以下OVIT) が開発された。OVITの特徴として卵管液の組成に基づき、既存の培養

液に比べ必須アミノ酸濃度は低く、非必須アミノ酸濃度は高く設定され、タウリンを高濃度に配合している。初期発生には非必須アミノ酸、後期発生には必須アミノ酸が重要な役割を果たしていると言われている⁴⁾。タウリンは抗酸化作用を有し、マウスでは胚のステージによらず発生を促進するという報告がある⁵⁾。OVITは既存の培養液と比較し移植後の流産率、妊娠率においてOVIT群で有意に上昇したという報告がある⁶⁾。しかし、これまでOVITを用いた胚の培養成績と妊娠成績について検討された論文はまだ発表されていない。今回、我々はこのOVITに着目し、その有用性を確認するため、既存の一般的なアミノ酸組成であるA社のシングルメディウムとOVITを用いて(表1)、受精卵培養を行い、培養・妊娠成績が改善するかどうかを比較検討した。

対象と方法

1. 対象

本研究を実施するにあたり、研究対象者へのインフォームドコンセントを得て行った。また、開示すべき利益相反状態はない。2018年8月～12月までにARTを行い、受精判定時に2PNが4個以上得られた161周期(1157個)を培養成績の比較対象とした。さらに2018年8月～2019年6月までに、A社のシングルメディウムまたは

表1 A社 1-step medium と OVIT のアミノ酸組成 (μmol/L)

	A 社	OVIT
バリン	200	108
ロイシン	200	81
イソロイシン	200	36
リジン	200	176
スレオニン	200	109
メチオニン	50	22
ヒスチジン	100	53
フェニルアラニン	100	45
トリプトファン	25	18
アルギニン	300	108
シスチン	50	48
チロシン	100	48
グルタミン誘導体	1000	398
グリシン	50	979
アラニン	50	297
グルタミン酸	50	550
アスパラギン酸	50	120
アスパラギン	50	15
プロリン	50	105
セリン	50	176
タウリン	0	1412

OVITで培養した胚盤胞を用いて単一凍結融解胚盤胞移植を行った155周期を妊娠成績の比較対象とした。

2. 採卵, 精子調整, 媒精, 培養

採卵した卵子はUniversal IVF Medium (Origio, Denmark)を用いて, 採卵後3~5時間の前培養を行った。精子は横田らの方法⁷⁾に従い, 2層パーコール法で遠心分離を行い, 運動良好精子を回収した。精子は濃度を 8×10^4 /mlに調整してC-IVFの媒精に供した。ICSIでは, 前培養後にマイクロマニピレーター (OLYMPUS, ON2-99D-3, Japan)を装着した倒立顕微鏡 (OLYMPUS, IX-73, Japan)を用いて, 形態

が正常で不動化された運動精子を, 顆粒膜細胞を除去したM II卵に穿刺注入した。受精の確認はC-IVFまたはICSI施行から18~20時間後に行った。同一患者の同一周期から得られた2PN胚を, A社のシングルメディウムあるいはOVITでsplit培養した。胚培養は60mmのNunc™ IVF Petri Dishes (Thermo Fisher Scientific, 150270, Japan)に, A社またはOVITいずれかの培養液20μlを滴下し, Oil for Embryo Culture (Irvine, Japan)で被覆した。得られた胚を, 37℃, 5.5%CO₂, 5.0% O₂, 89.5% N₂の気相条件下で培養した⁸⁾。

3. 分割期胚及び胚盤胞の形態学的評価

分割期胚の評価はVeeckの分類⁹⁾を用いて行った。採卵日をDay0とし, Day2時にGrade 1, 2の4 cell及びGrade 3の5 cell以上の胚を良好分割期胚とした。また, 胚盤胞の評価はGardnerの分類¹⁰⁾を用いて, Grade3BB以上を良好胚盤胞とした。

4. 胚盤胞凍結・融解胚移植

得られた胚盤胞は急速ガラス化法により凍結保存し, 融解後, 培養に使用したA社のシングルメディウムまたはOVITいずれかの培養液で5~6時間回復培養した後, 経膈超音波下で単一凍結融解胚盤胞移植を行った。検討対象は全胚凍結を行い, 出産歴が無く, 移植回数が1~3回の周期を対象とした。妊娠の判定は血中hCG, 経膈超音波検査における胎嚢(GS)に基づいて行った。

5. 評価項目及び統計学的解析について

Day2分割率, Day2良好分割率, 継続培養胚あたりのDay5胚盤胞発生率, 胚盤胞あたりのDay5良好胚盤胞率を比較検討した。また, C-IVF周期, ICSI周期の群に分け, 媒精方法で培養成績に差が無いか比較を行った。移植後の妊娠成績については, 採卵を行った翌周期以降に単一凍結融解胚盤胞移植を行った症例について, 化学妊娠率, 臨床妊娠率, 流産率を比較検討した。統計学的解析には χ^2 検定を用い, $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

培養成績を検討した患者の平均年齢は 34.8 ± 4.6 歳, 当院平均採卵回数は 1.8 ± 1.7 回であった。培養成績は, Day2分割率ではA社群が98.8% (563/570), OVIT群が98.0% (575/587), Day2良好分割率はそれぞれ51.3% (289/563), 54.3% (312/575), Day5胚盤胞発生率が57.7% (287/497), 57.7% (286/496),

表2 A社 1-step medium と OVIT における培養成績

	A 社	OVIT	P value
2PN 数	570	587	
Day2 分割率	98.8%(563/570)	98.0%(575/587)	NS
Day2 良好分割率	51.3%(289/563)	54.3%(312/575)	NS
継続培養胚あたりの Day5 胚盤胞発生率	57.7%(287/497)	57.7%(286/496)	NS
胚盤胞あたりの Day5 良好胚盤胞率	48.8%(140/287)	54.5%(156/286)	NS
継続培養胚あたりの Day5・Day6 胚盤胞発生率	66.6%(331/497)	67.3%(334/496)	NS
胚盤胞あたりの Day5・Day6 良好胚盤胞率	44.7%(148/331)	50.6%(169/334)	NS

表3 A社 1-step medium と OVIT における培養成績 (C-IVF 群)

	A 社	OVIT	P value
2PN 数	376	382	
Day2 分割率	98.9%(372/376)	98.4%(376/382)	NS
Day2 良好分割率	54.3%(202/372)	58.5%(220/376)	NS
継続培養胚あたりの Day5 胚盤胞発生率	61.8%(202/327)	60.5%(199/329)	NS
胚盤胞あたり Day5 良好胚盤胞率	49.5%(100/202)	58.3%(116/199)	NS
継続培養胚あたりの Day5・Day6 胚盤胞発生率	71.6%(234/327)	72.0%(237/329)	NS
胚盤胞あたり Day5・Day6 良好胚盤胞率	44.4%(104/234)	52.7%(125/237)	NS

Day5 良好胚盤胞率 48.8% (140/287), 54.5% (156/286) であり, 全ての項目において両群間に有意差を認めなかった (表2)。

また, 受精方法別に C-IVF 周期と ICSI 周期に分けて比較を行った結果, C-IVF 周期 (103 周期) では, Day2 分割率は A 社群が 98.9% (372/376), OVIT 群が 98.4% (376/382), Day2 良好分割率はそれぞれ 54.3% (202/372), 58.5% (220/376), Day5 胚盤胞発生率は 61.8% (202/327), 60.5% (199/329), Day5 良好胚盤胞率 49.5% (100/202), 58.3% (116/199) といずれの項目にも 2 群間の差はなかった (表3)。

ICSI 周期 (58 周期) では, A 社群の Day2 分割率は 98.5% (191/194), OVIT 群は 97.0% (199/205), Day2 良好分割率はそれぞれ 45.5% (87/191), 46.2% (92/199), Day5 胚盤胞発生率は 50.0% (85/170), 52.1% (87/167), Day5 良好胚盤胞率は 47.1% (40/85), 46.0% (40/87) であり (表4), 受精方法別に比較しても両群間に有意な差は認められなかった。

単一凍結融解胚盤胞移植 128 周期の妊娠成績におい

ては, 患者の平均年齢は A 社群では 33.6 ± 3.9 歳 (73 周期), OVIT 群は 33.2 ± 4.2 歳 (55 周期) であり, それぞれの群の平均年齢は t 検定により, 有意な差は認められなかった (両側検定 $P=0.5332$, 片側検定 $P=0.2666$)。化学妊娠率は 64.4% (47/73) と 70.9% (39/55) であり, 臨床妊娠率は 52.1% (38/73) と 47.3% (26/55), 流産率は 13.2% (5/38) と 26.9% (7/26) であり (表5), 両群間に有意な差は認められなかった。

考 察

生殖補助医療分野において胚培養液の選択肢は多岐にわたっているため, 培養液の選定には, 定期的に培養液ごとの成績を比較検討した上で, 胚の培養成績のみならず, 胚移植後の妊娠率にまで影響を及ぼす可能性があることを念頭に置き, 培養液を選択することが肝要である。

既存のシングルメディウムと, アミノ酸濃度及びタウリン濃度に特徴をもつ OVIT を比較検討した結果, OVIT

表4 A社 1-step medium と OVIT における培養成績 (ICSI 群)

	A 社	OVIT	P value
2PN 数	194	205	
Day2 分割率	98.5%(191/194)	97.0%(199/205)	NS
Day2 良好分割率	45.5%(87/191)	46.2%(92/199)	NS
継続培養胚あたりの Day5 胚盤胞発生率	50.0%(85/170)	52.1%(87/167)	NS
胚盤胞あたり Day5 良好胚盤胞率	47.1%(40/85)	46.0%(40/87)	NS
継続培養胚あたりの Day5・Day6 胚盤胞発生率	57.1%(97/170)	58.1%(97/167)	NS
胚盤胞あたり Day5・Day6 良好胚盤胞率	45.4%(44/97)	45.4%(44/97)	NS

表5 A社 1-step medium と OVIT における妊娠成績

	A 社	OVIT	P value
周期数	91	64	
採卵時年齢±SD	34.1±3.9 歳	33.7±4.7 歳	
化学妊娠率	61.5%(56/91)	68.8%(44/64)	NS
臨床妊娠率	49.5%(45/91)	48.4%(31/64)	NS
流産率	17.8%(8/45)	22.6%(7/31)	NS

の方が培養・妊娠成績が良好であった¹¹⁻¹⁴⁾という報告が散見される。しかし、これまで OVIT を用いた胚の培養成績について検討された論文はまだ発表されていない。そこで我々もこの OVIT に注目し、既存のシングルメディウムと比較検討を行った。その結果として、Day2 時の分割率および良好分割率、Day5 時の継続培養胚あたりの胚盤胞発生率および、胚盤胞あたりの良好胚盤胞発生率、凍結融解胚盤胞 1 個を移植した時の化学妊娠率、臨床妊娠率、流産率いずれにおいても A 社製の既存のシングルメディウムと OVIT の両群間に有意な差は見られず、同等な培養成績、妊娠成績が得られた。

アミノ酸は基質としてだけでなく、浸透圧や pH の調節、抗酸化作用など、様々な働きに関与している。胚の初期発生には非必須アミノ酸が必要であり、発生の後期には必須アミノ酸が必要であり、胚発生の段階によってアミノ酸の要求性が異なり、良好な胚を得るにはこれらの種類だけではなく濃度も重要である。シングルメディウムでは胚発生のステージの違いによって培養液交換

を行わないため、非必須アミノ酸とアミノ酸がそれぞれ不足しないよう、また過剰でないようにバランスよく配合されている。今回検討に用いた OVIT は、既存の培養液と比較して、より生体内つまり卵管液のアミノ酸濃度を模倣して配合されている。しかし、結果としては既存の培養液と OVIT の間に有意な差は見られなかった。これは、胚発生に必要な基本的な成分は、Eagle らによる、胚のアミノ酸に対する用量応答研究^{3) 15) 16)}などから導き出された結果と同じく、培養液中の濃度に関わらず、ある程度は胚自身で選択し、利用しているのではないかという考えに至った。

OVIT は国内製の培養液の選択肢の 1 つとして、既存の培養液と比較して同等の成績をもたらしたことから有用であると考えられ、また国内 ART 施設の多くが培養液の供給を海外からの輸入に頼っている状況を鑑みると、国内製培養液である OVIT は培養液供給におけるリスク分散に寄与するものと考えた。

参考文献

- 1) Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril*, 44: 493-498, 1985.
- 2) Gardner DK, Pool TB, Lane M: Embryo nutrition and energy metabolism and its relationship to embryo growth, differentiation, and viability. *Semin Reprod Med*, 18: 205-218, 2000.
- 3) Biggers JD, Racowsky C: The development of fertilized human ova to the blastocyst stage in KSOM (AA) medium : is a two-step protocol necessary? *Reprod Biomed Online*, 5: 133-140, 2002.
- 4) Lane M, Gardner DK: Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil*, 109: 153-164, 1997.
- 5) 八尾竜馬：培養液の基礎理論。日本卵子学会編，生殖補助医療（ART）胚培養の理論と実際，pp200-211，近代出版，2017.
- 6) Utsunomiya T, Kumasako Y, Kai Y, Kawabe F. The new embryo culture medium based on the amino acid concentration of human oviductal fluid enhance the embryo developmental ability; randomized trial. *Fertil Steril*, 110 (Suppl 4), e355, 2018.
- 7) 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・荅口昭次・塩谷雅英：2種類の精子調整法における培養成績の比較。日IVF会誌。20: 21-24, 2017.
- 8) 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・荅口昭次・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講演抄録集・実技書，15: 24, 2009.
- 9) Veeck LL: Atlas of the human oocyte and early conceptus, 2nd ed, pp. 151-153, Williams & Wilkins Co, Baltimore, 1991.
- 10) Gardner DK and Schoolcraft WB: Towards reproductive certainty: Fertility & genetics beyond. Proceedings of the 11th World Congress on in vitro fertilization & human reproductive genetics, pp. 347-371, Carnforth Parthenon Press, 1999.
- 11) 中村祐介・高橋瑞穂・服部裕充・中條友紀子・青野展也・小泉雅江・戸屋真由美・五十嵐秀樹・京野廣一：新規培養液HiGROW OVITを用いた培養成績及び臨床成績の検討。日本卵子学会誌，3: S18, 2018.
- 12) 大津英子・熊迫陽子・小池恵・神田晶子・城戸京子・後藤香里・長木美幸・甲斐由布子・宇津宮隆史：新しく開発されたヒト卵管内組成類似培養液の臨床的有用性について－前方視的無作為比較試験－。日本卵子学会誌，36: S46, 2019.
- 13) 垣井麻莉・天野奈美子・小島美智子・高野智枝・川北彩夏・石川瑞紀・川口章子・中森萌・小林幸奈・林佳奈子・中村嘉孝：新規培養液導入の際の培養成績の検討（従来品 vs HiGROW OVIT）。日本卵子学会誌，36: S47, 2019.
- 14) 結城笑香・菊地裕幸・山田健市・菅野弘基・岸田拓磨・岸田理英・佐藤那美・吉津葵・佐々木郁弥・片桐未希子・吉田仁秋：HiGROW OVIT Plusを用いた培養成績と臨床成績の検討。日本卵子学会誌，36: S47, 2019.
- 15) Eagle H. Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130: 432-7, 1959.
- 16) Summers MC. A brief history of the development of the KSOM family of media. *J Assist Reprod Genet*. 30: 995-999, 2013.

選択的単一胚盤胞移植においてどの評価因子を優先して胚選択すべきか？

大浦 朝美¹, 富田 和尚², 佐藤 学¹, 中岡 義晴¹, 森本 義晴²

¹ IVF なんばクリニック 〒550-0015 大阪府大阪市西区南堀江 1-17-28

² HORAC グランフロント大阪クリニック 〒530-0011 大阪府大阪市北区大深町 3-1 グランフロント大阪タワー B15F

要 旨： 胚盤胞移植は分割期胚移植と比べ臨床成績が高く、良好胚選別の方法として普及した。一方で、選択的単一胚盤胞移植の場合にどの評価因子を優先して選択すべきかが課題であった。そこで2009年1月から2012年12月の凍結融解単一胚盤胞移植を行なった1750症例を対象にロジスティック回帰分析を用いて生産に影響を及ぼす評価因子を解析した。影響する因子はオッズ比順に培養日数、TE、拡張ステージであることを明らかにし、形態よりも胚盤胞形成の早さを優先することが重要と考えられた。この結果を踏まえ胚選択の基準を変更した2015年1月から2017年2月の臨床成績を変更前のデータと比較した結果、臨床的妊娠率、流産率に有意差はみられなかった。評価因子をさらに増やして再検討することで、より精度の高い胚盤胞選択を行う検討をしていく必要がある。

キーワード： 胚評価、選択的単一胚盤胞移植、Gardner分類、培養日数

ランニングヘッド： 選択的単一胚盤胞移植における胚選択基準

緒言 (目的, 背景)

胚盤胞移植は分割期胚移植と比較して生産率が高く^{1,2)}、単一胚移植の有効な手段となった。選択的単一胚盤胞移植(e-SBT)の場合、多くは胚盤胞の形態評価を選択基準にしている。胚盤胞の形態評価はGardner分類³⁾が普及しており、栄養外胚葉が不良では流産率が高い^{4,5)}ことや5日目胚盤胞は6日目よりも妊娠率が高い⁶⁾ので發育速度も加味するべきだが、どれを優先すべきなのか検討の余地がある⁷⁾。本検討では、ロジスティック回帰分析を用い統計学的に胚盤胞の評価因子の選択順位付けを試みた。また、その解析結果に基づいて胚盤胞の選択基準を設定し、臨床成績を選択基準設定前と比較し有効性を評価した。

対象と方法

(検討1) 2009年1月から2012年12月に同意を得て移植を行った妻年齢39歳以下の1750症例を対象とした。GnRH antagonist法, GnRH agonist法,あるいはクエン酸クロミフェン法を用いた調節卵巣刺激にて採卵を行った。IVFまたはICSI後、マルチガスインキュベーター (AP30, ASTEC, Japan) を用い、5.0% CO₂, 5.0% O₂条件下でglobal medium (Cooper

Surgical, USA)を用いて培養を行った。D5またはD6にGardner分類³⁾でBL3BC以上の胚盤胞をCryoTop (Kitazato, Japan)にてプロトコールに従ってガラス化凍結後、ホルモン補充周期にて単一胚盤胞移植した。生産の有無を従属変数、培養日数(D5 or D6)、拡張ステージ(BL3~6)、内細胞塊(ICM:A or B)、栄養外胚葉(TE:A~C)ならびに、既報⁸⁾に従って算出したBlastocyst Quality Score(BQS)の胚盤胞評価に加え、女性因子として妻年齢とET既往回数、さらに男性因子として原精液の総精子濃度($\times 10^6/\text{ml}$)の計8項目を交絡因子としてロジスティック回帰分析を行い、オッズ比順に交絡因子を順位付けし、胚盤胞の選択基準を設定した。

(検討2) 検討1で得た選択基準をもとに、2015年1月から2017年2月に複数の凍結胚盤胞を所有し、初回e-SBTを行った243症例(基準設定後)と、比較対象として2013年1月から2014年12月に複数の凍結胚盤胞を所有し、初回e-SBTを行った基準設定前173症例の臨床的妊娠率と流産率を比較した。妻年齢はともに39歳以下を対象とし、検討1と同様に採卵し、IVFもしくはICSIで受精後、ドライインキュベーター (EC6, ASTEC, Japan)を用い6.0% CO₂, 5.0% O₂条件下でContinuous Single Culture Complete with HSA (Irvine, USA)を用いて培養、胚盤胞凍結を行った。

統計学的解析はStatView5.0を用いてFisherの正確検定あるいはt検定を用い、 $P<0.05$ を統計学的に有意とした。

結 果

(検討1) 解析結果を表1にまとめた。生産に影響を及ぼす上位3因子はオッズ比順に、培養日数、TE、拡張ステージであった。

(検討2) 基準設定前と基準設定後の妻年齢 (mean $\pm$ SD) に差はなく (33.9 ± 3.27 vs. 34.0 ± 3.31)、初回e-SBTの臨床的妊娠率 (56.6 vs. 63.4)、流産率 (16.3 vs. 23.4) 共に有意差はなかった(図1)。

表1 生産に影響を及ぼす胚盤胞の因子

	OR	95%CI	P値
培養日数	1.779	1.407-2.249	<0.05
拡張ステージ	1.702	1.267-2.285	<0.05
ICM	1.604	0.921-2.792	0.0947
TE	1.725	0.968-3.074	0.0643
BQS	0.966	0.911-1.025	0.2536
総精子濃度	1.000	0.998-1.001	0.7518
ET回数	0.930	0.876-0.987	<0.05
妻年齢	0.929	0.900-0.959	<0.05

考 察

胚盤胞の評価項目の中で、どの部分を重視して胚選択し移植していくかを決定することは、妊娠成立までの期間短縮や患者負担を減らす意味でも重要な意義がある。

検討1で評価優先項目は培養日数、TE、拡張ステージの順であることが明らかとなった。この選択基準を設けると例えば、培養日数が早い胚盤胞を選択するが、複数あれば2番目はTEなのでTE評価の高い胚盤胞を選択する。さらに同じTE評価の胚盤胞がある場合は、拡張ステージのグレードの順に選択するシステムとなり、選び方は明確となった。本検討から形態評価よりも胚盤胞形成の早さが重要であると考えられる。Sunkaraらは、D6胚盤胞とD5胚盤胞の妊娠率および流産率に差がないと報告⁹⁾しているが、本検討ではBruceらの報告⁶⁾と同様、生産に一番影響を及ぼした。次にTEが大きく影響を及ぼしており、同様の報告^{4,5)}も踏まえTEの細胞数は着床とその継続に重要な因子であると考えられる。一方で、オッズ比の低かったBQSは発育ステージ、ICMおよびTE評価を平等に係数にするため評価因子にならなかった可能性がある。同様にICMは本検討ではグレードCの胚盤胞は除外され、細胞数が比較的十分にある胚盤胞に限ったため選択基準に含まれなかった可能性が考えられた。

e-SBT症例の初回移植に可能性の高い胚盤胞が選ばれていれば成績が設定前よりも向上するのではないかと仮定し検討2を行ったが差はなかった。これは胚盤胞移植が元から比較的臨床成績が良好であり、成績を有意に上昇させるこ

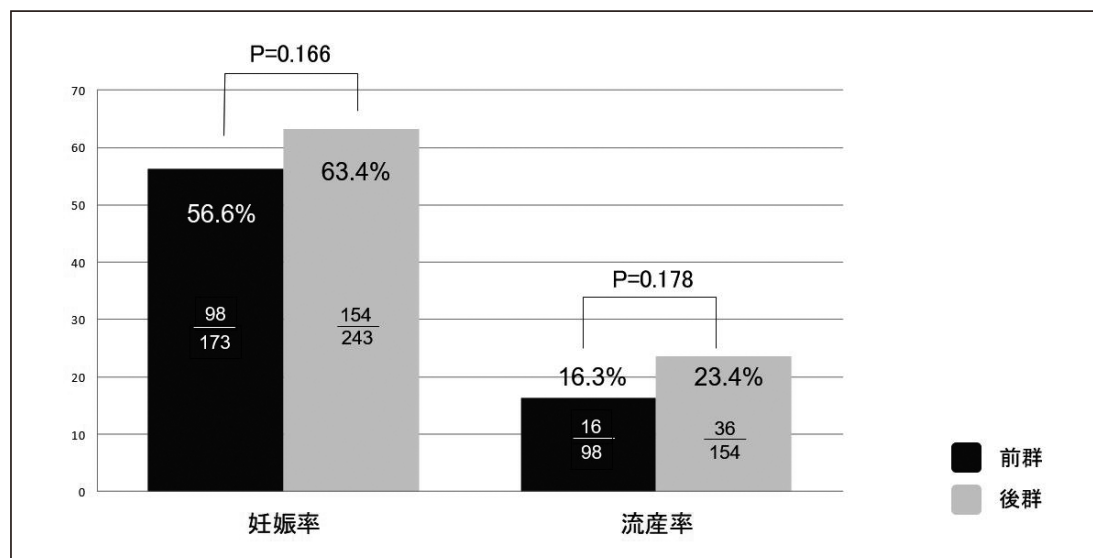


図1 初回e-SBTを行った症例の妊娠率、流産率

とが難しい可能性が考えられる。本検討では評価因子の順位を統計学的に設定することで培養日数、TE、拡張ステージの順に重要であることを明らかにし、選択方法が明確になったことはメリットであった。最近では、タイムラプスインキュベーターの普及により経時的変化を踏まえた胚評価が可能^{10,11)}となり、初期卵割異常でも良好胚盤胞に発生し、正常卵割由来の胚盤胞と比べても妊娠率に差はない¹²⁾ことや胚盤胞の胞胚腔収縮を起こす回数の影響¹³⁾など検討した因子以外の評価因子も含めることでより可能性の高い胚盤胞選択につながるものと期待される。

本検討では特にe-SBTにおける胚盤胞選択における評価因子の順位付けを統計学的に行い、その結果に基づき選択を行ったものの臨床成績での有効性は見出すことができなかったが培養日数、TE、拡張ステージの順に生産に重要であることを明らかにした。評価因子をさらに増やして再検討することでより精度の高い胚盤胞選択を行う検討をしていく必要がある。

参 考 文 献

- 1) Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB: Culture and Transfer of Human Blastocysts Increases Implantation Rates and Reduces the Need for Multiple Embryo Transfers. *Fertil Steril*. 69 (1) :84-88, 1998.
- 2) Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J: A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in in-vitro fertilization. *Hum Reprod*. 13 (12) : 3434-3440, 1998.
- 3) Gardner DK, Schoolcraft WB. In vitro culture of human blastocysts. In: *Towards Reproductive Certainty: Infertility and Genetics Beyond 1999* (eds. Jansen R, Mortimer D) . Carnforth: Parthenon Press, 378-388, 1999.
- 4) Hill MJ, Richter KS, Heitmann RJ, Graham JR, Tucker MJ, DeCherney AH, Browne PE, Levens ED: Trophectoderm grade predicts outcomes of single-blastocyst transfers. *Fertil Steril*. 99 (5) : 1283-1289, 2013.
- 5) 橘直之・鈴木達也・廣瀬典子、吉田智香子、昇千穂美、今井賢、内田真一郎、池田伴衣、松原茂樹：内細胞塊グレード良好例は妊娠率が高く、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での検討。日受精着床会誌 33(1) : 16-20, 2016.
- 6) Shapiro BS, Richter KS, Harris DC, Daneshmand ST: A comparison of day 5 and day 6 blastocyst transfers. *Fertil Steril*. 75 (6) : 1126-1130, 2001.
- 7) Ahlström A, Westin C, Reisner E, Wikland M, Hardarson T: Trophectoderm morphology: an important parameter for predicting live birth after single blastocyst transfer. *Hum Reprod*. 26 (12) : 3289-3296, 2011.
- 8) Rehman KS, Bukulmez O, Langley M, Carr BR, Nackley AC, Doody KM, Doody KJ: Late stages of embryo progression are a much better predictor of clinical

- pregnancy than early cleavage in intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization cycles with blastocyst-stage transfer. *Fertil Steril*. 87 (5) : 1041-1052, 2007.
- 9) Sunkara SK, Siozos A, Bolton VN, Khalaf Y, Braude PR, El-Toukhy T: The influence of delayed blastocyst formation on the outcome of frozen-thawed blastocyst transfer: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 25 (8) : 1906-1915, 2010.
 - 10) Kovacs P: Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. *Reprod Biol Endocrinol*. 12: 124, 2014.
 - 11) 中野達也・佐藤学・橋本周・中岡義晴・森本義晴：第一卵割における早期正常分割の確認が発育予測に重要。第59回日本生殖医学会雑誌, 192, 2014.
 - 12) Zhan Q, Ye Z, Clarke R, Rosenwaks Z, Zaninovic N: Direct Unequal Cleavages: Embryo Developmental Competence, Genetic Constitution and Clinical Outcome. *PLoS One*, 11 (12) : e0166398, 2016.
 - 13) 渡辺真一・上畑みな子・永川恵介・見田渉・三浦恵・小林勇毅・宮田佳苗・田中豊美・松永利恵・山中葉保子・与那覇斉、桑波田暁子、越智正憲、堀内俊孝：ヒト胚盤胞の収縮が凍結融解胚移植成績に及ぼす影響：タイムラプス動画を用いた解析。日受精着床会誌, 32 (1) : 45-48, 2015.

採卵決定日に LH サージが開始された採卵周期における レルゴリクスの排卵抑制効果

中尾 佳月, 高見澤 聡, 板倉 彰子, 森山 梓, 壽圓 裕康, 堀川 隆, 黒田 恵司,
小代 裕子, 中川 浩次, 杉山 力一

杉山産婦人科 新宿 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 1-19-6 山手新宿ビル

要 旨： ART採卵決定日にLHサージが開始された低刺激採卵周期（162周期）で、排卵抑制目的でGnRHアンタゴニスト注射薬を投与した周期（G群）、レルゴリクスを内服した周期（R群）、NSAIDs（メロキシカム）を内服した周期（M群）、レルゴリクスとメロキシカムを内服した周期（R+M群）の4群で検討した。採卵時の既排卵率は、R群でG群、M群と比較して有意に高かった。LHサージ開始後の排卵抑制にレルゴリクスは適さないと考える。

キーワード： ART, 排卵抑制, レルゴリクス

緒 言

2019年3月に発売された経口GnRHアンタゴニスト製剤（レルゴリクス）は、国内初の1日1回経口投与のGnRHアンタゴニスト製剤である。従来のGnRHアンタゴニスト製剤と同様に下垂体GnRH受容体に競合的に結合し、下垂体抑制を介して卵巣からのE2産生を抑制して子宮筋腫に基づく諸症状を改善する治療薬である¹⁾。レルゴリクスは注射薬より安価で投与が容易であり、その利便性から、ART卵巣刺激においても今後使用の増加が予想される。

目 的

下垂体抑制を併用しない卵巣低刺激法の採卵周期では、採卵決定日にLHサージが開始している症例に遭遇することがある。その際、排卵抑制を目的に、GnRHアンタゴニスト製剤やNSAIDs製剤を投与することがある²⁾。経口GnRHアンタゴニスト製剤であるレルゴリクスの排卵抑制効果を検討した。

対 象

2018年12月から2019年5月の間、卵巣低刺激法による採卵周期において、採卵2日前のLH値が10mIU/mL以上に上昇した症例から、基礎LH値が高値の卵巣予備能低下症例と多嚢胞性卵巣症候群を除外した162周期を対象とした。

方 法

排卵抑制のため採卵2日前にGnRHアンタゴニスト注射薬（ガニレスト[®]/セトロタイド[®] 0.25mg）を投与した10周期（G群）、採卵2日前にレルゴリクス（レルミナ[®] 40mg）を投与した26周期（R群）、採卵1日前にNSAIDs（メロキシカム：モービック[®] 10-20mg）を内服した102周期（M群）、採卵2日前にレルゴリクスと採卵1日前にメロキシカムを内服した24周期（R+M群）の4群に分け、後方視的に比較検討した。3群間以上の統計学的な比較はKruskal-wallis検定を行い、 $P<0.05$ を統計学的有意差ありとした。

結 果

G群、R群、M群、R+M群の年齢、AMH値、採卵2日前のLH値、E2値、P4値は、4群間において採卵時排卵の有無に関わらず有意差はなかった（表1）。一方、採卵時の既排卵率は、0%（0/10周期）、46.2%（12/26周期）、14.7%（15/102周期）、20.8%（5/24周期）であり、R群はG群、M群と比較して有意に高かった（図1）。

考 察

採卵決定日にLHサージが開始している採卵周期における排卵率は、GnRHアンタゴニスト注射薬やNSAIDs製剤に比べて、レルゴリクスが有意に高かったことが分

表 1 4 群間における採卵可能周期および排卵済み周期の比較

	G群		R群		M群		R+M群		a-h群間の 有意差
	a.採卵	b.排卵済み	c.採卵	d.排卵済み	e.採卵	f.排卵済み	g.採卵	h.排卵済み	
周期数	10	0	14	12	87	15	19	5	
年齢*	36.0		37.5	35.0	41.0	38.0	39.0	38.0	P=0.15
AMH* (ng/ml)	3.47		0.62	2.57	0.85	1.74	1.77	1.28	P=0.08
2日前LH* (mIU/ml)	15.3		15.3	18.1	16.3	17.7	18.7	21.6	P=0.20
2日前E2* (pg/ml)	1005		606	462	469	379	826	325	P=0.11
2日前P4* (ng/ml)	1.38		0.675	0.790	0.680	0.510	1.09	0.590	P=0.18
排卵率		0.0% (0/10)		46.2% (12/26)		14.7% (15/102)		20.8% (5/24)	P=0.001

*中央値

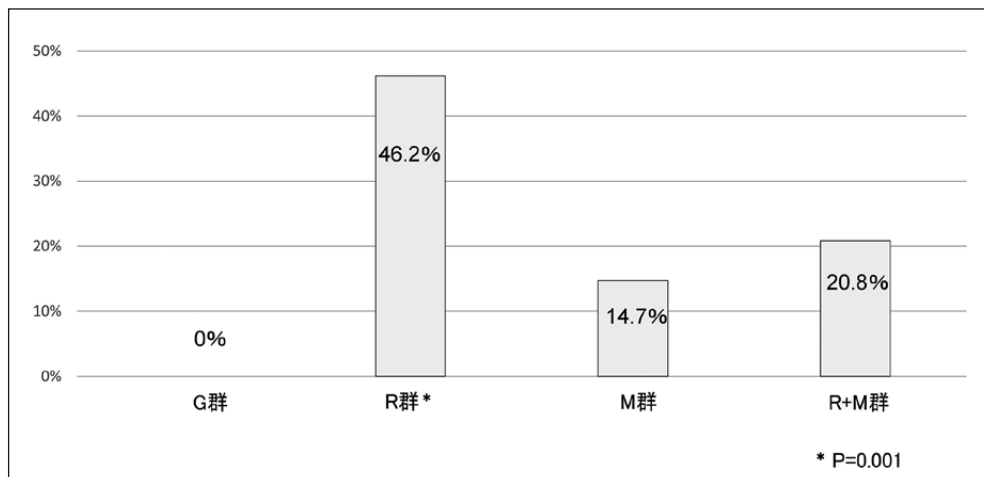


図 1 4 群間の採卵時既排卵率

かった.理由として,レルゴリクスの薬物動態から,吸収は速やかであるが効果発現の遅延が考えられる.

レルゴリクスの単回投与での血中濃度は,内服約1.5時間後に最高値に達した後は低下し,約8時間後には低値(最高値の $<1/4$)になるが,その後の血中濃度低下は遷延するため,血中半減期は45時間と長時間になる³⁾.作用発現として血中E2値は,内服約8時間後に半減値に達し,内服24時間後まで減少を続ける³⁾.カニクイザルへの投与では,血中LH値は内服薬約8時間後に最低値(投与前の $<1/4$)に達し,24時間持続する⁴⁾.一方,GnRHアンタゴニスト製剤注射薬(ガニレスト[®])の血中濃度は,投与1時間で最高値となり,速やかに低下,半減期は約12時間である.血中LH値は,投与約4時間後に最低値となり,投与終了24時間で投与前値に回復する⁵⁾.

レルゴリクスの血中濃度上昇は注射薬同様,比較的速やかであるが,作用発現は緩やかで遅延する.また,食事の影響が大きく,食後の内服では顕著に吸収低下・血中濃度の上昇不良がみられる³⁾.GnRHアンタゴニストを用いた早急なLHサージ抑制には,作用発現が速やかかつ食事の影響がない注射薬が適している.

結 論

レルゴニクスは,採卵決定日LHサージ開始症例での排卵抑制には適さない.LHサージを抑制する目的でGnRHアンタゴニスト製剤を投与する場合は,速やかかつ安定した効果が期待できるという観点から,経口剤よりも注射薬が適している.

参考文献

- 1) レルミナ錠 40mg. あすか製薬株式会社. https://www.asaka-pharma.co.jp/iryouiyaku/lp/prd_relumina, (2019.10.20)
- 2) Kawachiya S, Matsumoto T, et al: Short-term, low-dose, non-steroidal anti-inflammatory drug application diminishes premature ovulation in natural-cycle IVF. *Reprod Biomed Online*, 24 : 308-13, 2012.
- 3) レルミナ錠 40mg. あすか製薬株式会社. <https://www.asaka-pharma.co.jp/iryouiyaku/news/filedownload.php?name=45323490d025b8d3df65aa5c4316ec8f.pdf>, (2019.10.20)
- 4) Kazuhiro Miwa, Takenori Hitaka, et al: Discovery of 1-[4-[1-(2,6-Difluorobenzyl)-5-[(dimethylamino)methyl]-3-(6-methoxypyridazin-3-yl)-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrahydrothieno[2,3-d]pyrimidin-6-yl]phenyl]-3-methoxyurea (TAK-385) as a Potent, Orally Active, Non-Peptide Antagonist of the Human Gonadotropin-Releasing Hormone Receptor. *J Med Chem*, 54 : 4998-5012, 2011.
- 5) ガニレスト. MSDConnect. https://www.msconnect.jp/static/mcijapan/images/pi_ganirest_st025s.pdf, (2019.10.20)

絨毛染色体検査を契機に診断された均衡型相互転座の一例

松山 毅彦, 石橋 めぐみ, 中澤 留美, 河戸 朋子, 勝木 康博, 菊池 咲希, 三宅 君果,
横田 智, 真鍋 有香, 北岡 美幸

厚仁病院 産婦人科 〒763-0043 香川県丸亀市通町 133

要 旨： 絨毛染色体検査を契機に診断された均衡型相互転座の症例を経験した。

31歳, 1妊0産, ヒューナーテストやや不良にてAIH施行. 8回目のAIHで妊娠成立するも妊娠8週で心拍停止となりD&Cを施行, 絨毛染色体は正常核型[46, XX]であった. その後2回AIH施行するも妊娠に至らずIVFを行い, 6個採卵, 3個胚盤胞凍結した. 1回目の凍結融解胚盤胞移植では妊娠せず. 2回目の移植で妊娠が成立した. 胎児心拍確認もされるも, その後消失しD&Cを施行, 絨毛染色体は均衡型相互転座[46, XX, t(3; 22) (p21; q13)]であった. そこで夫婦の染色体検査を行い, 本人は均衡型相互転座[46, XX, t(3; 22) (p21; q13)], 夫は正常核型[46, XY]と判明した.

絨毛染色体検査の結果がなければ本人の均衡型相互転座は見つかっていなかった可能性が高い.

キーワード： 絨毛染色体検査, 均衡型相互転座, 着床前胚染色体異数性検査

はじめに

均衡型相互転座は先天異常を有する子で不均衡型転座が判明し, その両親の検査で明らかになる場合や, 不育症検査としての染色体検査で判明する場合がある¹⁾.

今回は初期流産時の絨毛染色体検査を契機に診断された均衡型相互転座の症例を経験したので報告する.

症 例

31歳女性, 1妊0産 (1妊の転帰は人工中絶), X年7月初診. 月経周期28~32日型, 子宮卵管造影検査(hysterosalpingography: HSG): 両側卵管通過良好, LH-RHテスト: 視床下部型, 精液検査は正常(Normozoospermia), ヒューナーテスト: やや不良, 抗リン脂質抗体の異常は認めなかった(表1).

経 過

タイミング指導を数回行ったが, ヒューナーテストがやや不良のためAIHの方針とした.

X+1年10月, 8回目のAIHで妊娠成立, 胎嚢, 卵黄嚢の確認の後, 胎児心拍確認するも妊娠8週で心拍停止となりX+1年12月子宮内清掃術(D&C)を施行した. 絨毛染色体は正常核型[46, XX](写真1)であった. その後2回AIHを施行するも妊娠に至らず, 原因不明不妊の診

表1 抗リン脂質抗体の異常は認めなかった

検査項目	検査結果	単位	基準値
第12凝固因子	55	%	50-150
ループスアンチコアグラント	0.9		1.3未満
プロテインC活性	81	%	64-146
プロテインS活性	86	%	56-126
抗PE IgG 抗体	*****		
キニノーゲン (+)	0.132		0.3未満
キニノーゲン (-)	0.222		0.3未満
抗PEIgM 抗体	*****		
キニノーゲン (+)	0.147		0.45未満
キニノーゲン (-)	0.206		0.45未満
抗核抗体	*****		
抗体価	40	倍	40未満
HOMOGENEOUS	(+)		
SPECKLED	(-)		
NUCLEOLAR	(-)		
CENTROMERE	(-)		
PERIPHERAL	(-)		
GRANULAR	(+)		
核膜型	(-)		
カルジオ抗体 IgM	5以下	U/ml	8未満
抗CLB2GPI 抗体	0.7未満	U/ml	3.5以下
カルジオ抗体 IgG	8以下	U/ml	10未満

断の元にIVFの方向とした。

X+2年6月, clomiphene-HMG周期にてIVFを行った。月経3日目の血中E2 20.3 pg/ml, P4 0.48 ng/ml, FSH 8.3 mIU/ml, LH 4.7 mIU/ml, AMH 4.87ng/mlであった。同日よりclomiphene内服 (50mg/day) 開始, 7日目と10日目にHMG (FSH: LH≒1:1) 150IU筋注, 13日目の血中E2 1355.3pg/ml, LH 6.2mIU/mlを確認し14日目の夜にGnRHaスプレー噴霧を行い16日目に採卵を行った。6個採卵, conventional IVFにて3個正常受精, 残りの2個は3PN, 1個はMIにて受精せず。正常受精の3個が胚盤胞 (3AA, 3BB, 4AB) と

なり凍結した。

X+2年8月, ホルモン補充周期にて周期管理を行い, 3AA胚盤胞(移植時シュリンク)移植を行うも妊娠せず。

X+2年10月, ホルモン補充周期にて管理, 4AB胚盤胞(移植時4AA)移植を行い妊娠が成立した。胎嚢, 卵黄嚢の確認ができたが胎児心拍の出現は遅く, 妊娠7週で一時的に発現するもその後消失し, 稽留流産の診断にてX+2年11月子宮内清掃術(D&C)を施行した。

絨毛染色体は均衡型相互転座 [46, XX, t (3; 22) (p21; q13)] (写真2)であった。

以上の結果から, 夫婦のどちらかに均衡型相互転座

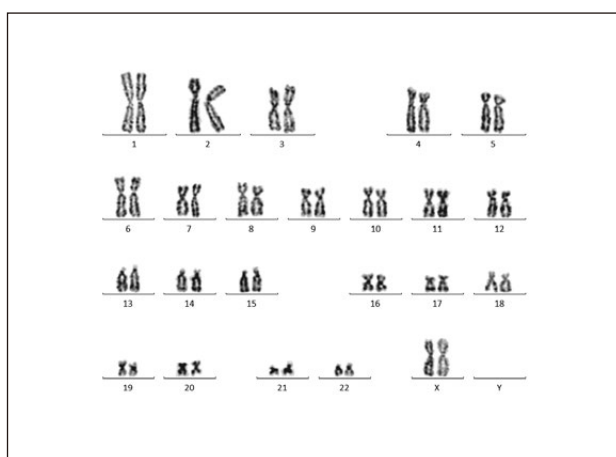


写真1 8回目のAIHで妊娠成立, 胎嚢, 卵黄嚢の確認の後, 胎児心拍確認するも妊娠8週で心拍停止となりX+1年12月D&Cを施行した。絨毛染色体は正常核型 [46, XX] であった。

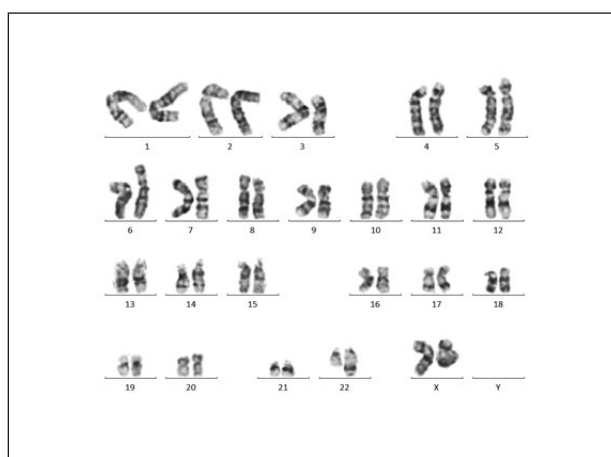


写真2 ホルモン補充周期にて管理, 4AB胚盤胞(移植時4AA)移植を行い妊娠が成立した。胎嚢, 卵黄嚢の確認ができたが胎児心拍の出現は遅く, 妊娠7週で一時的に発現するもその後消失し, 稽留流産の診断にてX+2年11月D&Cを施行した。絨毛染色体は均衡型相互転座 [46, XX, t (3; 22) (p21; q13)] であった。

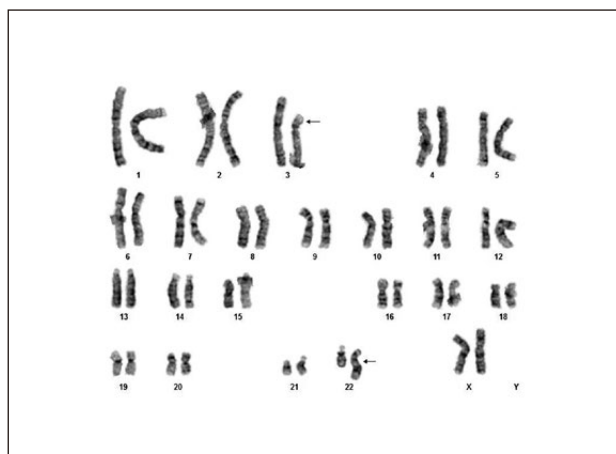


写真3 本人の核型は均衡型相互転座 [46, XX, t (3; 22) (p21; q13)] であった

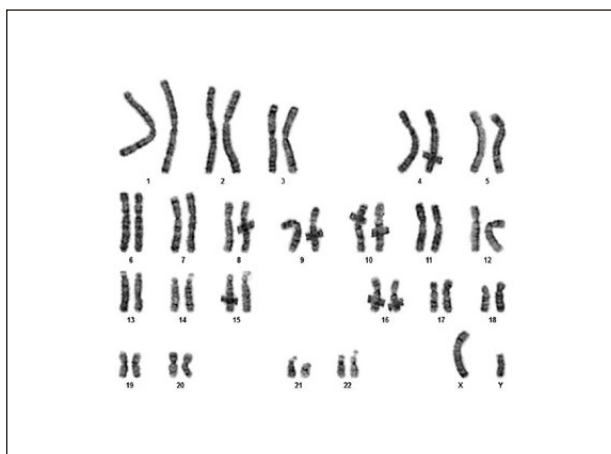


写真4 夫は正常核型 [46, XY] であった

がある可能性も考えられたため、X+3年1月夫婦の染色体検査を行った所、本人の核型は均衡型相互転座[46, XX, t(3; 22) (p21; q13)] (写真3)、夫は正常核型[46, XY] (写真4)であった。

本人の核型について説明し、現時点では当院では着床前診断などができないことを話した。着床前診断を御希望される場合は他院に紹介できることも説明したが、本人は当院での管理、治療を希望したため、今後も当院にてIVFを行っていくこととした。

2回目の流産後のX+3年2月にホルモン補充周期にて管理、3BB胚盤胞(移植時5BB)移植を行うも妊娠に至らず。

X+3年3月clomiphene(+letrozole)-HMG周期にてIVFを行った。月経3日目の血中E2 33.0 pg/ml, P4 0.35 ng/ml, FSH 8.2mIU/ml, LH 5.3mIU/ml, AMH 6.35ng/mlであった。AMH値やや高めと判断し、同日よりletrozole 2.5mgを2日間内服、同時にclomipheneを50mg/dayで内服開始、8日目と10日目にHMG(FSH: LH ≒ 1:1) 150IU筋注、12日目の血中E2 671.6pg/ml, LH 11.6mIU/mlを確認しHMG (FSH: LH ≒ 1:1) 75IU筋注、同日の夜にGnRHaスプレー噴霧を行い14日目に採卵を行った。5個採卵、conventional IVFにて1個のみ正常受精(残りの4個は受精せず)、分割するも胚盤胞にならず。

同年4月clomiphene-HMG周期にてIVFを行った。月経3日目の血中E2 <L (測定限界以下) pg/ml, P4 0.34ng/ml, FSH 6.6 mIU/ml, LH 8.3 mIU/ml, AMH 4.64ng/mlであった。前回、前々回の採卵状況をふまえ、同日よりclomipheneの内服(100mg/day)開始、7日目と10日目にHMG (FSH: LH ≒ 1:1) 150IU筋注、12日目の血中E2 2368.1pg/ml, LH 12.2mIU/mlを確認し同日夜にGnRHaスプレー噴霧を行い14日目に採卵を行った。7個採卵、conventional IVFにて5個正常受精、1個は3PN、1個はMIにて受精せず。正常受精の5個は分割するも胚盤胞にならず。

同年7月clomiphene-HMG周期にてIVFを行った。月経2日目の血中E2 37.4 pg/ml, P4 0.57 ng/ml, FSH 6.2mIU/ml, LH 5.5mIU/ml, AMH 5.49ng/mlであった。過去歴を考え3日目よりclomiphene内服(150mg/day)開始、7日目と10日目にHMG (FSH: LH ≒ 1:1) 150IU筋注、13日目の血中E2 2996.4pg/ml, LH 14.3mIU/mlを確認し同日夜にGnRHaスプレー噴霧を行い15日目に採卵を行った。7個採卵、conventional IVFにて6個正常受精、1個はMIにて受精せず。正常受精の6個が分割、1個のみ胚盤胞(3BA)となり凍結した。

同年9月ホルモン補充周期にて管理、3BA胚盤胞(移植時6BA)の移植を行ったが妊娠に至らず。

X+3年現在もIVFを中心とした管理を行っている。

考 察

均衡型相互転座とは染色体間で染色体の一部分が交換されたものである。表現型は基本的には正常であるが、その子に不均衡型の染色体異常を発生することがある。一般的な頻度は400人に1人とされている。

成因は別々の染色体の2か所で切断が起こり、断片を交換するために生じたもので、切断の原因は一般には不明とされている。

第一減数分裂中期において、2本の派生染色体と2本の正常染色体の相同部分はペアリングし、四価染色体を形成する。四価染色体の分離様式は2:2分離、3:1分離、4:0分離があり、2:2分離はさらに交互分離、隣接1型分離、隣接2型分離に分離される。形成された配偶子が正常配偶子と受精した時、遺伝的均衡となるのは交互分離のみである。

親が均衡型転座をもち、それが子に伝わる場合と、新しくできる場合(de novo)がある。

均衡型転座では染色体の過不足はないと考えられ、多くの場合保因者の表現型は正常である¹⁾。

保因者が妊娠した場合は、不均衡型相互転座を有する子を出生する可能性が高くなる場合があり、遺伝カウンセリング上の留意が必要である²⁾。

当院では、夫婦の染色体検査はルチンでは行っておらず、不育症の可能性がある場合などにのみ行っていた。

今回のケースではタイミング法、AIHなどの一般不妊治療を行っていた期間が長かったため、1回目の初期流産と診断された際に医療サイドからの絨毛染色体検査の提案に対して了解していただき検査を施行することができた。結果は正常核型であり、抗リン脂質抗体検査なども行ったが、正常範囲であった。

その後IVFに移行し、2回目の移植で妊娠成立するも初期流産となり、絨毛染色体検査を本人が強く希望し、検査を施行した。その結果は均衡型相互転座であった。

その結果からは流産した側のde novoかまたは夫婦のどちらかの均衡型相互転座が推測されることとなり、改めて血液染色体検査をお願いした結果、本人の均衡型相互転座が判明した。今回の場合は流産の回数から不育症と診断することはできず、2回目の流産時の絨毛染色体検査の結果がなければ、いまだに本人の染色

体異常は見つかっていなかった可能性が高い。夫婦の染色体検査を勧めるタイミングを再考しなければならないだろう。

この夫婦の今後の不妊治療を提案する場合、過去歴（AIH無効）から考えてもIVFを治療の中心としていくことに異論は無いと思われるが、その際の排卵誘発法などの再考も必要と思われる。

女性が転座保因者の場合は卵巣刺激による反応性が悪いことも報告されているが³⁾、本症例の場合は、排卵誘発剤に対する反応性は良く、むしろOHSSのリスク回避を考えながらの排卵誘発とならざるを得なかった。胚盤胞到達率がやや低めであるが、同時期の他症例の胚盤胞到達率は決して悪くないため、培養液をはじめとする培養環境などに問題があったとは考えにくい。したがって、今後は排卵誘発法としてHMG-アンタゴニスト法なども考えていく必要があると思われる。

また、本人の均衡型相互転座に対する対策も避けて通ることはできないと考えられる。着床前診断などを提案していくことも必要となってくると考えられるが、当院では現在のところ着床前診断に関する実施施設認可を受けていないため、当院でIVFを行う場合は着床前診断などを行うことができない。

また、今回の症例はAIH妊娠流産が1回、胚盤胞移植妊娠の流産が1回で合計2回の稽留流産歴のみである。したがって、反復流産ではあるが習慣流産の定義に当てはまらないため、着床前診断（習慣流産の場合）の症例には該当しない。本人の染色体構成が均衡型相互転座であるため、着床前胚染色体異数性検査の対象にはなりそうである。⁴⁾ この症例の場合は、受精卵が正常核型か均衡型相互転座であることが望ましいので、着床前胚染色体異数性検査の必要度は高いと考えられる。

習慣性流産（均衡型相互転座保因者）の場合は、最終的に生児を得る期待値は着床前診断を行った場合と行わなかった場合で同等である⁵⁾とも言われているが、本症例の場合は過去の治療歴から考えてもむしろ不妊症として管理をする必要があると思われる。

したがって、今後の管理方針を本人と相談する際には、最終的な生児を得る期待値の話はせず、IVFに着床前診断を併用した場合には流産率を低下させる可能性があることや生児を得るまでの期間の短縮が期待できることを話したが、本人は通院の都合なども考慮した上で、着床前診断を併用せずに当院にてのIVFを希望した。

このような場合、流産率の低下や生児を得るまでの期間の短縮が期待できるため着床前診断を行う価値はあると思われるが、現時点では着床前診断ができる施設

が非常に限られているため、当院でIVFを行う場合は、採卵1回あたりの卵子回収個数を増やす、採卵回数を増やす、胚（胚盤胞）移植の回数を増やすなどの方法しかないと思われる。

今回のような症例では着床前診断の必要性が高いことを痛感したが、同時に現時点では少なくとも当院で着床前診断を行うためのハードルが高いことも実感した。

着床前診断を行うためにはまずIVFの基本的なレベルが高いことが必要である。さらに検体採取のテクニックの習得、検査そのもののクオリティが高いこと、専門家による遺伝カウンセリングなどが必要となり、それらをクリアして初めて精度の高い着床前診断が成立すると考えている。また着床前診断に関する実施施設認可を受ける必要もある。着床前診断が世の中に受け入れられていくためにはそのような高いハードルも止むを得ないであろう。

今回経験した様な症例に出会う可能性は今後も高いと思われる。当院においても精度の高い着床前診断が可能となる体制作りが早急に必要と思われた。

参考文献

- 1) 清水健司：染色体異常。日本人類遺伝学会編、臨床遺伝学テキストノート、pp54-67、診断と治療社、2018。
- 2) 佐村修：均衡型相互転座。関沢明彦・佐村修・四元淳子編、周産期遺伝カウンセリングマニュアル、pp39-42、中外医学社、2015。
- 3) Chen,S.H., Escudero,T., Cekleniak,N.A., Sable, D.B., Garrisi, M.G. and Munne, S. (2005) :Patterns of ovarian response to gonadotropin stimulation in female carriers of balanced translocation. Fertil. Steril., 83, 1504-1509.
- 4) 着床前診断に関する見解。公益社団法人日本産科婦人科学会。http://www.jsog.or.jp/modules/statement/index.php?content_id=31 (2019.09.15)
- 5) 杉浦真弓：習慣流産の着床前診断。現代医学, 54: 39-44, 2006。