

博士学位論文
ヒト体外受精における
単一凍結融解胚盤胞移植に関する研究

上野 智

岡山大学環境生命科学科

平成 29 年 3 月

目次

要旨.....	4
第1章 緒論.....	8
第2章 単一凍結融解胚盤胞移植を用いた透明帯脱出卵母細胞の臨床利用に関する検討.....	22
2-1. 緒言.....	23
2-2. 対象と研究デザイン.....	25
2-3. 方法.....	26
2-4. 結果.....	31
2-5. 考察.....	35
第3章 ヒト凍結融解胚盤胞における透明帯の除去範囲が接着能に及ぼす影響.....	38
3-1. 緒言.....	39
3-2. 対象と研究デザイン.....	42
3-3. 方法.....	44
3-4. 結果.....	47
3-5. 考察.....	54
第4章 体外受精胚の発生速度が単一凍結融解胚盤胞移植における臨床妊娠率および出産 に及ぼす影響.....	56
4-1. 緒言.....	57
4-2. 対象と研究デザイン.....	59
4-3. 方法.....	61
4-4. 結果.....	63
4-5. 考察.....	70
第5章 単一凍結融解胚盤胞移植における母体年齢および妊娠極初期 β -hCG値を用いた 妊娠予後の予測に関する検討.....	72
5-1. 緒言.....	73
5-2. 対象と研究デザイン.....	75

5-3. 方法.....	77
5-4. 結果.....	78
5-5. 考察.....	85
第 6 章 総合考察.....	87
第 7 章 総括.....	92
引用文献.....	96
謝辞.....	113

要旨

1978年にEdwardsとSteptoeらが世界初の体外受精からの産児に成功して以来、世界中で体外受精（IVF）により、多くの産児が得られている。日本においても1983年に初の体外受精児が誕生して以降、IVFによる出生児数は年々増加傾向にあり、IVF施行数も増加している。IVFは、数多くのステップによって、成り立っている。その中で胚移植は、IVFの最終ステップであり、非常に重要な部分である。胚移植方法は胚移植のステージ、新鮮胚もしくは凍結胚の使用、移植胚数などで細かく分類されている。

採取された卵母細胞を胚盤胞まで培養を行い、得られたものを凍結保存し、その後適切な周期に融解した1つの胚盤胞を胚移植に供する単一凍結融解胚盤胞移植（SCBT）は、様々な利点があり、今後凍結技術の向上、単一胚移植の増加また体外培養液の改良によって、SCBTを行う施設が増加することが予想される。しかしながら、これまでの報告では、SCBTのみを解析したデータは少なく、そのデータは临床上非常に有用になると考えられる。

本研究では、SCBTのデータを体系的に解析し、SCBTの臨床成績の向上とその有効性の評価を目的とした。

第2章では、IVFを行う上で偶発的に採卵される透明帯脱出（zona-free）卵母細胞をSCBTに用いることで、臨床利用できるかどうかを調べることを目的とし、ICSIを行ったzona-free卵母細胞の臨床成績と通常の卵母細胞でICSIを行った臨床成績と比較した。その結果、zona-free卵母細胞でもZI卵母細胞と同等の臨床成績を得ることができ、zona-free卵母細胞をSCBTすることで十分臨床に使用していくことが可能であることが示された。ただし、流産率とzona-free卵母細胞の分割様式の関係については今後も注意深く観察を行っていく必要があると言える。

第3章では、胚凍結・融解によって引き起こされる透明帯硬化からの救済方法であるAHの方法について検討を行った。AHは、透明帯の除去方法によって、透明帯を菲薄化する方法、透明帯の一部を切開または除去する方法、透明帯の全てを除去する方法の3種類に分けることができる。しかしながら、これらの方法の中でどの方法が最も有効な方法かは不明確である。よって、AHにおける最も有効的な透明帯除去方法を検証することは、SCBTの臨床成績の

向上につながると考えられる。その結果、胚盤胞の透明帯完全除去は、胚盤胞の生存性に影響がなく、さらに着床能を改善することが outgrowth モデルを用いることによって、明らかとなった。よって、凍結融解胚盤胞移植を行う際には、透明帯の完全除去を行うことによって、着床の機会が増えることが予想される。ただし、本検討は In vitro モデルを使った検討であり、今後、臨床試験を行うことによって、透明帯の完全除去が凍結融解胚盤胞移植の臨床成績に影響をおよぼすか否かを検討する必要があると考えられる。

第 4 章では、胚発生速度が胚盤胞の質の評価方法の一つに成り得るかどうかを調べるために体外における胚盤胞への発生速度と凍結融解胚盤胞移植後の臨床妊娠率および出産率について後方視的に検討を行った。その結果、媒精から拡張胚盤胞への到達時間ならびに胞胚腔形成から拡張胚盤胞への到達時間を基準として用いることで胚発生速度が胚盤胞の質の評価方法の一つに成る得ることが示された。この方法を胚盤胞の質の評価に用いることでこれまでの胚盤胞の形態による主観的な評価法に比べ客観的で観察者による差異の少ない優れた方法になり得ると考えられる。

第 5 章では、SCBT 後 7 日目の β -hCG 値と母体年齢を組み合わせることで妊娠予後が推定できるかどうか検討を行った。その結果、SCBT 後 7 日目の β -hCG 値と臨床妊娠および出産率には相関関係が認められた。また、年齢群間では β -hCG 値に関係なく若い群で出産率が高くなり、加齢による流産率の増加が認められた。これらの結果、母体年齢と SCBT 後 7 日目の β -hCG 値を用いることで正確な妊娠予後の予測が行えることが示された。この方法を用いることによって胚移植後の患者に適切な情報を提供できるようになると考えられる。

本研究は、これまでに実施した SCBT の臨床データからの後方視的な解析と実験的な手法によって、臨床で実際に利用可能な多くのデータを得ることができた。本研究のデータ活用することにより、SCBT からの出産率の増加が期待される。また、本研究によって、SCBT に利用の促進が行われることによって、IVF の成功率の向上に繋がると考えられる。

宣言

本論文に含まれる研究内容は、他の研究機関および他の大学において研究報告または学位取得のために受理されたものを含まないこと、および、本論文内に引用文献として引用したものを除いて、他人がすでに公表または執筆中の内容を含まないことを宣誓します。

平成 29 年 1 月 6 日

上野 智

略語リスト

AH	孵化補助
ART	高度補助生殖医療
ATP	アデノシン三リン酸
BPL	化学流産
CC	クエン酸クロミフェン
CP	臨床妊娠
DNA	デオキシリボ核酸
EP	子宮外妊娠
FSH	卵胞刺激ホルモン
GnRH	ゴナドトロピン放出ホルモン
HBA	ヒアルロン酸結合試験
hCG	ヒト胎盤性ゴナドトロピン
hMG	ヒト閉経後尿性ゴナドトロピン
HTF	ヒト卵管組成液
ICM	内部細胞塊
ICSI	顕微授精
INTA5	インテグリン α 5
INTB1	インテグリン β 1
IVF	体外受精
LB	出産
LH	黄体化ホルモン
MET	複数胚移植
mRNA	メッセンジャーRNA
MSOME	高倍率運動精子形態評価
NPV	陰性的中率
OHSS	卵巣過剰刺激症候群
PPV	陽性的中率
RNA	リボ核酸
SCBT	単一凍結融解胚盤胞移植
SD	標準偏差
SET	単一胚移植
TE	栄養外胚葉
ZF	透明帯脱出
ZI	透明帯損傷のない
ZP	透明帯

第 1 章

緒論

1978年にSteptoeとEdwardsが世界初の体外受精からのヒト産児に成功して以来、生殖補助医療（Assisted Reproductive Technology: ART）により、世界中で多くの産児が得られている（Steptoe & Edwards 1978）。日本においても1983年に初の体外受精児が誕生してから、ARTによる出生児数は年々増加傾向にある（日本産婦人科学会, 2016）。

現在、日本では、587施設でARTが行われており、2015年に日本産科婦人科学会から報告されたデータによると、2014年分のARTによる治療数（採卵もしくは胚移植の実施例数の合算。以下周期数とする）は約37万周期であり、約47,322人の出生児が得られている（日本産婦人科学会 2016）。2014年の出生児総数は、1,003,536人（厚生労働省 2016）であることから、出生児の約4.7%、すなわち約25人に1人はARTによって生まれていることになり、その重要性が増加してきている。

ARTは主に体外にて生殖細胞や胚を操作する技術によって構成され、体外受精法（In vitro fertilization: IVF）、凍結融解胚を用いた治療を含む。IVFはin vitroで卵丘細胞卵母細胞複合体と精子を共培養することで受精させるConventional IVF（C-IVF）と、精子1個をガラスピペット内に吸引し、卵母細胞に穿刺して直接精子を卵細胞質内に注入するIntracytoplasmic sperm injection（ICSI）に大別される。2014年のARTの治療周期数約37万周期であった。その内訳は、C-IVFが約10万周期、ICSIが約12万周期、凍結融解胚移植が14万周期である。このことから、本邦のARTの特徴として、凍結融解胚移植の実施数が多いことが分かる。

IVFは、卵巣刺激から始まり、採卵、受精、体外胚培養、胚移植を経て、着床までを厳密に管理し、遂行する一連のプロセスによって構成されるので、以下に個々の構成要素について述べる。

1-1. 卵巣刺激法

ART実施の最初のステップが採卵可能な卵胞を育てることを目的とする卵巣刺激である。現在、ARTにおける卵巣刺激は、下垂体機能を抑え人工的にホルモンを調節する調節卵巣刺激

法と、体内のホルモンを利用する自然周期法の二つに大別することができる。

1-1-1. 調節卵巣刺激法

調節卵巣刺激法では、ゴナドトロピン放出ホルモン (Gonadotropin releasing hormone: GnRH) アゴニストあるいは GnRH アンタゴニストを使用し、下垂体機能の制御を行う。さらにヒト閉経後尿性ゴナドトロピン (human menopausal gonadotropin: hMG) 製剤や卵巣刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone: FSH) を用いて、人工的に体内のホルモン状態を調節し、卵巣を発育させる方法である。

下垂体機能の制御を GnRH アゴニストによって行う方法にはショート法 (Frydman *et al.* 1988) とロング法 (Wildt *et al.* 1986) がある。

ショート法は、月経開始後 3 日目以内に GnRH アゴニスト及び FSH ならびに hMG 投与を開始する方法である。GnRH アゴニストは、使用開始後 2 日間は、FSH と黄体化ホルモン (Luteinizing hormone: LH) の分泌量を増加させる効果 (フレアアップ) をもっている。そのため、月経開始の初期に GnRH アゴニストの投与を行うこの方法では、初期に FSH の一過性の上昇が起きる。そのため、ゴナドトロピン投与量が少量であっても卵巣の発育が可能となる。さらに継続して GnRH アゴニストを投与することで下垂体の GnRH 受容体の減少が起こり、下垂体機能を抑えることができる。これにより、LH の上昇を防ぎ、採卵前の排卵を防止することができる。しかしながら、この方法では、初期の FSH の上昇と共に LH も上昇するため、前周期の黄体機能の賦活化が起きる。それにより黄体からプロゲステロンが分泌され子宮内膜の形成不全や月経周期の長期化が起こるとされている (Diedrich *et al.* 1994)。卵巣機能が低下している症例では、多量の FSH/hMG が必要となるため、初期に FSH の上昇が起こるショート法が有効とされている。

ロング法は、月経周期開始以前から GnRH アゴニストの連日投与を行い下垂体 GnRH 受容体のダウンレギュレーションによる下垂体機能の脱感作を起こさせることで、外因性のゴナドトロピンのみで卵巣発育をコントロールする方法である。前周期の黄体期中期より、GnRH アゴニストの使用を開始し、月経開始後 3 日目から、FSH/hMG の投与を行う。LH の一過性の上

昇が黄体期に起こるため、発育途中の卵胞に排卵刺激を与えることがないことや脱感作が急速におこるため、LH サージを確実に抑制できることなど利点がある。しかしながら、一過性の FSH の上昇を利用できないため、FSH/hMG の投与量が多くなるという欠点がある。さらにゴナドトロピンの投与量の増加により、患者が重症例では腎不全や血栓症など様々な合併症を引き起こす卵巣過剰刺激症候群 (Ovarian hyperstimulation syndrome: OHSS) になる可能性がある。

調節卵巣刺激法には、下垂体機能の制御を GnRH アンタゴニストによって行う方法もある (Raga *et al.* 1999)。GnRH アンタゴニスト法は、月経開始後 3 日目から FSH/hMG を使用し、卵胞がある程度成長してきた段階で GnRH アンタゴニストを使用することにより、LH の上昇を防ぎ排卵を抑制することができる。下垂体機能の制御を長期間行わないため、卵母細胞の最終成熟誘起に GnRH アゴニストを使用することができ、多嚢胞性卵巣症候群のように OHSS のリスクが考えられる場合に有用な方法である。しかし、GnRH アンタゴニストは、胚発生への影響が懸念されている。Raga らは、マウス初期胚に対する GnRH アゴニスト及び GnRH アンタゴニストの影響を調べた結果、GnRH アンタゴニストと共に培養した胚の発生が抑制されたことを報告した (Smits *et al.* 1988)。このことから、GnRH アンタゴニストの初期胚発生への影響についてさらなる検討が必要と考えられる。

調節卵巣刺激法の利点としては、採卵のタイミングの調節が正確に行い得ること、また 1 回の採卵での獲得卵母細胞数が多いことなどが挙げられる (Frydman *et al.* 1988)。しかしながら、連日の通院による hMG 注射は、患者に大きな経済的負担を強いることになるばかりか、患者の身体的ストレスも大きい。また副作用として OHSS が発症する可能性もあり、重篤な場合は死に至ることもある。

1-1-2. 自然周期法

自然周期法は、内因性のホルモンを利用する方法であり、卵胞発育を促すための投薬を一切行わず、発育した一つの卵胞から採卵する完全自然周期法とクエン酸クロミフェン (clomiphene citrate: CC) の投与を行う低卵巣刺激法とがある。後者では CC 投与によって

起こるホルモンのフィードバック作用を利用し卵胞発育を誘導した後に採卵を行う。両方法ともに基本的に卵母細胞の最終成熟の誘起に前述した GnRH アゴニストによるフレアアップを利用するが、排卵直前の卵胞状態を示すホルモン値が認められた患者に対しては GnRH アゴニストを使用せずに採卵を行うこともある。

完全自然周期採卵は、卵胞発育を促すための投薬を一切使わないため患者の経済的負担が軽く、OHSS が起こることはない。ただし、この方法は、採卵のタイミングが非常に難しく、卵胞からの採卵を企図しても早期に排卵が起きてしまうことや、逆に採取した卵母細胞が未成熟であることがある。また、対象となる患者は規則的な月経周期を有する LH 基礎値の安定した若年患者でなくてはならず、LH 基礎値が不安定な高齢患者への適応には慎重を要し、また多嚢胞性卵巣症候群や下垂体機能障害例は適応外である（竹原・加藤 2012）。

低卵巣刺激法は月経3日目から CC を使用し、場合によってリコンビナント FSH または hMG を併用する方法である（Teramoto & Kato 2007）。CC は抗エストロゲン剤であり、エストロゲンリセプターに結合することによって、視床下部-下垂体に対するエストロゲンのフィードバック作用を解除し、その結果 FSH の分泌を促し、かつ LH サージを抑制する。これにより多くの薬剤を使うことなく卵胞を育てることができる。

自然周期法は、採卵個数が少なく、患者によっては採卵周期毎に確実に卵母細胞を得ることができないことがある。しかしながら、この方法は卵巣への負担が少なく、周期を空けることなく採卵することが可能であり、OHSS のリスクがないことや投薬が少ないことにより、患者の経済的・心理的負担が少ないという利点がある。さらに自然周期法は患者の負担が少ないため、ART による不妊治療を途中でやめる人が非常に少ないとされている（Verberg *et al.* 2008）。また CC を用いた低卵巣刺激採卵は、調節卵巣刺激法に比べて費用が安く、OHSS になりにくいことなどがすでに報告されている（Sophonstrotsuk *et al.* 2005）。

低卵巣刺激採卵および調節卵巣刺激法による過剰卵巣刺激にて得られた卵母細胞の質の比較についていくつか報告がされている。Baart ら（Baart *et al.* 2007）は、低卵巣刺激で獲得した卵母細胞は、調節刺激周期採卵に比べて正常な核型を持った卵母細胞を獲得できる確率が高いことを報告し、Munne（*et al.* 1997）らと Verberg（*et al.* 2009）らは、低卵巣

刺激で獲得した胚は調節卵巣刺激周期よりも形態的に良好であると報告している。これらの報告に用いられている低卵巣刺激法は、前述した GC を用いた低卵巣刺激法と卵巣刺激のプロトコールは若干異なるが、FSH 製剤の投与が少ない卵巣刺激法により得られた卵母細胞の質は過剰卵巣刺激のそれよりも良いと考えられる。しかしながら、自然周期法のような低卵巣刺激法では卵胞発育数が少なく、結果として獲得卵母細胞数が少なくなることが問題となる。そのため、一つ一つの卵母細胞が高率に受精し、高い胚発生成績を得ることにより、高率に出生児が得られることが重要である。

1-2. ヒト卵母細胞の体外受精

1-2-1. Conventional IVF (C-IVF)

Stephoe と Edwards による世界初の ART からの産児は C-IVF によるものであり、この C-IVF では、遠心分離によって精漿から分離されただけの精子が用いられた (Edward & Steptoe 1978)。現在では、成熟精子や運動能良好な精子を選択的に用いる方法が普及している。その方法の代表的なものは、密度勾配遠心法と swim-up 法である。密度勾配遠心法は、成熟精子の細胞密度が未成熟精子や死滅精子のそれより高いことを利用し、シランコートされたコロイド状シリカからなる密度勾配を通して精液を遠心分離し、成熟精子を選択的に回収する方法である。一方、swim-up 法は、培養液内の運動能良好精子が培養液の表面に上がってくることを利用し、分取回収する方法である。これらの方法を用いることにより、成熟精子や運動能の高い精子のみが C-IVF に用いられるよう工夫されている (Henkel *et al.* 2003)。精子の受精能の評価法として先体反応の評価 (Liu *et al.* 1994) や精子の卵母細胞への侵入能をテストするハムスターテスト (Yanagimachi *et al.* 1976) がある。また、精子 DNA 断片化率を評価する方法として、アポトーシスによって出来た 3' -OH 末端に fluorecein-12-dUTP を取り込ませることにより、アポトーシス細胞における DNA の断片化を測定する TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 法、DNA 二重鎖切断および片側開裂を電気泳動により検出するコメットアッセイ法、精子核周囲に拡散させた DNA が形成する

halo の状態により、DNA fragmentation 率を測定する精子クロマチン分散法などがある。これらのテストを G-IVF 施行前の患者の精液に対して行うことで精子の受精能やその DNA の正常性を確認することができ、精子要因による G-IVF の不受精を回避することができる」と報告されている (Avendaño & Oehninger 2011)。この様に G-IVF における精子要因の検討は進んでいるが、受精障害（受精率が 25%以下）が解決できない症例も存在する。そのような場合には、媒精方法は全て ICSI が用いられることになる。また、近年では、ART を初めて行う患者に対しては、複数個の獲得卵母細胞があれば、G-IVF と ICSI の併用を行う施設が多い。

1-2-2. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI)

ヒトにおいても動物種同様、精子を卵母細胞内に直接注入して受精させる方法が試みられ、囲卵腔内精子注入法 (Ng *et al.* 1976) で妊娠例が報告された。さらに 1992 年には、Palermo ら (Palerm *et al.* 1992) が、精子を卵細胞質内に注入する ICSI によって産児を得ることに初めて成功したことを報告した。その後、無精子症患者において精巣上体精子回収法や精巣内精子回収法によって得られた精子を用いての ICSI で、妊娠および出産例報告された (Craft *et al.* 1995, Silber *et al.* 1995)。これにより ICSI を用いることで男性因子による不妊の多くが解決された。その後、Kobayashi と Kato (Kobayashi & Kato 1995) は、精子の運動性を失くす不動化処理を行いその精子を ICSI に用いることで正常受精率が大幅に向上したと報告した。現在でもこの方法が多くの ART 施設の ICSI で用いられている。不動化処理は、精子細胞膜の一部を破壊する。これにより卵細胞質内に精子を注入後、精子内部に存在する卵母細胞活性化因子（卵細胞質内のカルシウムに作用し、カルシウムオシレーションを惹起させる）が卵母細胞内に流入し、受精反応がスムーズに開始されることになり、その結果 ICSI の受精率が向上したと考えられている (Gómez-Torres *et al.* 2007)。

また、ICSI に用いる精子の選別方法が数多く報告されている。精子選別法として、磁気ビーズを利用することで精子を選別する方法、透明帯付着精子を用いる方法、成熟精子のヒアルロン酸への結合能を利用する HBA 法 (Hyaluronic Binding Assay)、高倍率で精子の形態を観察して精子頭部の空胞や頸部の正常性を確認する MSOME 法 (The motile sperm organelle

morphology examination) などが報告されており、これらの精子選択方法を用いた臨床研究では流産率の低下や胚盤胞発生率の向上などが報告されている (Berkovitz *et al.* 2005, Black *et al.* 2010, Dirican *et al.* 2008, Jakab *et al.* 2005)。

動物種の ICSI では、ピエゾドライブユニットを用いた ICSI (Piezo-ICSI) が主流である。この方法では先端が平坦なガラスピペットと piezo 素子による微細な振動によって細胞膜を破膜し、精子を卵母細胞内に注入する。この方法を用いることで、卵母細胞の細胞膜が非常に脆弱であるという特徴を持つマウスのような動物種においても、ICSI によって受精卵を得ることが可能となった (Kimura & Yanagimachi 1995)。

ヒト卵母細胞の ICSI では、1999 年に Yanagida らによって、妊娠例が報告された (Yanagida *et al.* 1999)。しかしながら、ヒトにおいては、ICSI 時にピエゾパルスを用いずとも、卵母細胞が変性を起こすことが少ないため、Piezo-ICSI は、あまり普及していないのが現状である。

現在、ART では ICSI を媒精方法として用いることが多くなってきている。2015 年度日本産婦人科学会報告によると、日本では、G-IVF よりも ICSI の治療周期総数が多いと報告された (日本産婦人科学会)。同様にヨーロッパやアメリカにおいても G-IVF よりも ICSI を用いることが多くなっており、ART の中心的な役割を担いつつある (US National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion 2015, Calhaz-Jorge *et al.* 2016)。

1-3. ヒト胚の体外培養液

ART の臨床応用の初期においてヒト胚の体外培養液には、従来動物胚の培養に使用されていた Whitten 培養液 (Whitten *et al.* 1968)、Earle' s 培養液 (Menezo *et al.* 1985)、BWW 培養液 (Fukuda *et al.* 1987) などが使用されていた。その後、Quinn らがヒトの卵管液組成を元にして、組成が単純で成績の安定した Human Tubal Fluid (HTF) 培養液を開発し、広く使われるようになった (Quinn *et al.* 1985)。

ART による不妊治療が開始された当初、胚の体外培養は初期分割期までに限定されており、胚盤胞期までの培養は不可能もしくは発生率が非常に低かった (Steptoe *et al.* 1971)。ヒ

トでは胚性ゲノムの活性化は4-8細胞期で起こるといわれ (Braude *et al.* 1988)、特に利用されるエネルギー源として、胚性ゲノム活性化以前の胚はピルビン酸を、その後はグルコースに変化することが知られている (Gardner *et al.* 1996)。この変化に対応した組成の培養液を段階的に使用することで、胚盤胞までの発生率が改善され、胚盤胞期の胚移植の臨床応用が可能となった (Gardner *et al.* 1997)。胚の代謝の変化に対応した組成の培養液を段階的に使用する、連続型培養液が各社から市販されている。さらに単一の培養液を用いることで培地の交換を必要としない single step 培養液も市販されており、体外発生における各種培養液の比較検討が行われている (Schwarzer *et al.* 2012)。また、培養液の違いが産児の体重に影響を与えることなどが報告されており (Dumoulin *et al.* 2010, Nelissen *et al.* 2012)、今後培養液の組成と産児への影響の関係性に関するさらなる検討が必要と考えられる。

また、近年体外培養に用いるインキュベーターの開発も進んでおり、一定時間の間隔で胚の画像を自動で撮影するタイムラプスを付設した培養器が各社から市販され、外気に触れずに胚の観察を行うことが可能となった。タイムラプスと single step 培養液の併用の利点の一つは観察のために胚をインキュベーターから取り出す必要がないことである。それによって、胚移植もしくは凍結保存が行える状態まで、胚培養の気相を全く変化させることなく胚培養を行うことが可能となってきている。

1-4. ヒト卵母細胞及び胚の凍結保存

ヒトでは、1983年に Trounson と Mohr (Trounson & Mohr 1983) らによって初めて凍結融解胚 (8細胞期胚) の移植による妊娠、出産例が報告された。さらに1985年には、凍結保存を行った胚盤胞から初めて、産児が得られた (Cohen *et al.* 1985)。

当初、緩慢凍結保存法による胚の凍結保存が主流であったが、緩慢凍結保存法では細胞内氷晶形成が不可避であるため、融解後の生存率が低いことや、凍結保存までに長時間かかること、凍結保存を行うために高価なプログラムフリーザーが必要なことなどの欠点があった。

1985年に Rall と Fahy (Rall & Fahy 1985) によって、ガラス化保存法が報告された。ガラス化保存法は、高濃度の耐凍剤を含む溶液に細胞を浸漬し、液体窒素に直接投入するなど

して急速に冷却し、細胞内外の液をガラス化するため氷晶形成がまったく起こらないのが特徴である。現在では、様々な動物種の卵母細胞及び胚でのガラス化保存が報告されている (Saragusty & Arav 2011)

2001年に Mukaida ら (Mukaida *et al.* 2001) によって、ガラス化保存を行ったヒト胚盤胞から産児が得られた。それ以降多くのヒト胚盤胞のガラス化保存に関する報告がされ、現在では多くの施設が胚盤胞期においてガラス化保存し、融解胚移植を行うことで良好な結果を得ている (Kuwayama 2006, Osada *et al.* 2003, Reed *et al.* 2002, Stehlik *et al.* 2005, Takahashi *et al.* 2005)。

前述の様に現在、卵母細胞および胚の凍結保存は主にガラス化法を用いて行われ、様々なデバイスや凍結液が使用されている (Kader *et al.* 2009)。しかしながら、凍結融解後の生存率は100%ではなく、生存率を向上させるために様々な試みが行われている。胚盤胞の凍結融解後の生存率を向上させるために凍結保存前に胚盤胞を収縮させる方法がある。収縮を行う方法として、ガラス管やレーザーを用いて、胚盤胞を物理的に収縮させる方法 (Hiraoka *et al.* 2004, Vanderzwalmen *et al.* 2002) やピペッティングによる機械的な方法 (Mukaida *et al.* 2006) などが報告されている。これらの方法を用いることで、胞胚腔のサイズが大きい拡張期胚盤胞や孵化胚盤胞の生存率を上げることができる。

近年、ブタ卵母細胞にて凍結保存を行う前に静水圧で前処理を行う方法 (Pribenszky *et al.* 2008)、ブタ胚において中空糸をデバイスとして用いた中空糸ガラス化法 (Maehara *et al.* 2012) またウシ胚にて不凍タンパク質を凍結液に加えること (Makarevich *et al.* 2010) など卵母細胞及び胚の新しい凍結保存技術が報告されており、さらなる融解後の生存率、胚発生成績の向上が期待される。

1-5. 胚移植

1-5-1. 移植胚の種類

IVF で行われる胚移植の種類は、移植胚のステージ、移植胚の個数、そして胚の凍結保存の

有無によって以下に挙げる様に分類される。

胚移植に用いる胚のステージは、初期分割期と胚盤胞期に分けられる。分割期胚移植では、受精後2日目もしくは3日目の4-8細胞期の胚が移植される。ヒト胚において受精後の分割率は高く、多くの胚が4-8細胞期へ達するため、この方法を用いた場合は、作製された受精卵の多くが胚移植に供されることになる。一方、胚盤胞移植では、胚を体外にて胚盤胞まで発生させる必要がある。しかしながら、体外受精卵の中には胚盤胞まで発生しないものもある。よって、分割胚移植に比べると、胚移植ができない割合が高い (Johnson *et al.* 2007)。しかしながら、胚盤胞移植は分割胚移植に比べて、臨床妊娠率及び出産率が高いこと (Gardner *et al.* 1998, Glujovsky *et al.* 2012)、胚移植後の着床までの時間が分割期胚移植の場合に比べて短いため子宮外妊娠の発生率が低いこと (Fang *et al.* 2015) が報告されており、その臨床上的有用性は、高いと言える。

移植胚の個数の違い、すなわち単一胚移植 (Single embryo transfer: SET) あるいは複数胚移植 (Multiple embryo transfer: MET) の選択も胚移植の結果に影響する要因である。METの利点として胚移植あたりの妊娠率がSETに比べると高いことが上げられる。しかしながら、同時に母子ともにリスクが高い多胎妊娠の割合もSETに比べると約5倍に増加することが報告されている (McLernon *et al.* 2010)。さらにSETを2回行った場合と2個胚移植を1回行った場合の累積妊娠率はほぼ同等であることが報告されている (Pandian *et al.* 2013)。よって、反復不成功症例や高齢患者ではない場合は、胚移植はSETで行うことがファーストチョイスになりつつある。日本においても、多胎防止の観点から35歳未満のIVF初回治療周期では原則SETとすることや、40歳未満では移植数は多くても2個までとするガイドラインを、日本生殖医学会が発表している (日本生殖医学会, 2007)。

胚の凍結の有無すなわち新鮮胚と凍結胚の差異も、胚移植の結果に影響する要因である。新鮮胚移植では、凍結融解に起因する胚の死滅が起こる危険性がない。一方、凍結融解胚は凍結融解のダメージにより胚の活性が低下し、胚移植に適さない状態となる可能性がある。しかしながら、凍結融解技術の進歩により、凍結胚の生存性が向上したことから、実際には凍結胚移植が行われる場合が多い (Cobo *et al.* 2012)。

また、凍結融解胚移植と新鮮胚移植では胚移植時の子宮内環境の調整に差が生じる。新鮮胚移植では、採卵前の卵巣刺激に用いられる外因性のホルモン投与によって、複数個の卵胞が発育し、その結果子宮内膜の発育のタイミングと胚受容能が悪影響を受けることがある (Shapiro *et al.* 2011)。一方、凍結融解胚移植では、胚の凍結保存中に患者の子宮内膜環境を着床に向けて整えることができる。そのため子宮内環境として新鮮胚移植よりも優れた条件を満たす場合が多いと考えられる。実際に凍結胚移植の臨床成績は新鮮胚移植よりも良いことが報告されており、(Roque *et al.* 2013) 今後、凍結胚移植が IVF の胚移植の主流になりつつある。

1-5-2. 凍結融解胚盤胞移植

これまで述べてきたように移植に用いられる胚の種類には様々なバリエーションがある。その中で凍結融解胚盤胞移植は、凍結胚移植と胚盤胞移植の利点を併せ持っており、近年治療に用いられることが増えてきている。

新鮮胚盤胞移植の場合、発生遅延の胚盤胞は子宮内の環境と同期できず、妊娠に至る可能性が著しく低くなる。一方、凍結融解胚盤胞移植を採用すれば、発生遅延の胚盤胞を一度凍結保存し、次周期以降に凍結胚盤胞を子宮内膜の状態と同期化することで発生遅延胚盤胞を臨床利用することが可能になる。また、凍結胚盤胞移植は凍結分割胚移植に比べて、子宮外妊娠の可能性が低いことも報告されており、その有用性は ART を行う上で重要な選択肢になりつつある (Fang *et al.* 2015)。

分割胚移植と比較して、凍結融解胚盤胞移植の臨床妊娠率は高く、複数胚移植を行った場合、多胎になるリスクが高いと考えられる。よって、凍結融解胚盤胞を移植する際は、多胎防止のためにも、移植胚数について考慮する必要がある。日本生殖医学会から出されている『多胎妊娠防止のための移植胚数ガイドライン』(日本生殖医学会, 2007)では、『良好胚盤胞移植を移植する場合は必ず2個以下とする』とされており、凍結融解胚盤胞移植において必ずしも SET が行われるわけではない。しかしながら、前述したように複数胚を用いた胚移植では、多胎妊娠率が有意に増加することが報告されている (Thurin *et al.* 2004)。よって、

母子の安全を考えると単一凍結融解胚盤胞移植 (Single Cryopreserved-thawed Blastocyst Transfer:SCBT) がもっとも良い手段であると考えられる。

1-6. 本研究の目的

これまで述べてきたように ART は様々な技術の上に成り立っている。その中でも胚移植は最終段階であり、その成否が ART の結果に決定的な影響を及ぼす。

SCBT には臨床上的優位性が多く存在する。具体的には、①多胎妊娠率が低いこと、②胚の発生段階と胚移植を受ける子宮内環境とのより正確な同期化が可能となること③臨床妊娠率、着床率、出産率が分割胚移植に比べて高いこと、などが挙げられる。しかしながら、SCBT のみのデータを取り扱った臨床報告は少ない。なぜならば、これまでの凍結融解胚盤胞移植に関する多くの報告が複数胚移植と単一胚移植の結果を明確に区別していないからである。この様な背景から、SCBT のデータを体系的に解析し、その知見を臨床に利用することは ART の発展に重要だと考えられる。

SCBT には卵母細胞の有効利用を促進する効果がある。すなわち、SCBT の利用によって、通常では廃棄対象となるような卵母細胞を、通常の卵母細胞と同様に臨床利用できるようになることが期待される。透明帯が損傷によって外れた卵母細胞 (zona-free 卵母細胞) は、通常廃棄対象となる。しかしながら、zona-free 卵母細胞を受精後胚盤胞まで発生させることは技術的に可能である。これまで、ヒトの zona-free 卵母細胞の受精率、胚発生率、SCBT に用いた場合の臨床妊娠率、出産率を透明帯のある卵母細胞のものと比較した報告はされておらず、これらを比較し、結果に差がなければ zona-free 卵母細胞を通常の卵母細胞と同様に臨床利用する積極的な裏付けが得られることになる。

SCBT 実施の際の問題点の一つとして凍結・融解によって引き起こされる透明帯硬化がある。凍結・融解に起因する透明帯硬化によって、胚盤胞が透明帯からの脱出不全を起こし、その結果妊娠成立に至らない可能性がある。よって、SCBT を実施する前に、融解後の胚盤胞に対して、透明帯硬化からの救済を行う必要がある。胚盤胞の透明帯からの脱出不全は、移植前に胚の透明帯を切開または除去すること (Assisted Hatching:AH) によって、回避でき

る。近年、凍結融解胚盤胞に AH を用いて、透明帯の切開または除去を行うことで、移植後の臨床妊娠率が向上することが報告されている (Martins *et al.* 2011, Valojerdi *et al.* 2007)。AH は、透明帯の除去方法によって、透明帯を菲薄化する方法、透明帯の一部を切開または除去する方法、透明帯の全てを除去する方法の 3 種類に分けることができる。しかしながら、これらの方法の中でどの方法が最も有効な方法かは不明確である。よって、AH における最も有効的な透明帯除去方法を検証することは、SCBT の臨床成績の向上につながると考えられる。

SCBT の実施に際して、移植胚を選択し、その胚盤胞を融解する必要がある。その際の課題として移植胚選択のための胚評価方法がある。SCBT に利用可能な複数個の凍結胚盤胞がある場合、その中で臨床妊娠に至る可能性が最も高い胚盤胞を選択しなければならない。胚移植に供する胚盤胞の選択は、ART の結果に大きく影響する。しかしながら、胚盤胞の評価は、形態を基準とする胚培養士の主観的判断によって行われているのが現状であり、臨床上実用的な方法は存在していない。よって、より客観的で正確な胚盤胞の評価法を確立する必要がある。

さらに SCBT 実施後の妊娠予後の推定に関する知見も不足している。体外受精を行う多くの施設で、胚移植後早期の尿中もしくは血中 beta-human chorionic gonadotropin (β -hCG) 濃度が妊娠予後の推定の指標として使用されており、妊娠後継続して β -hCG 値を測ることにより、多胎妊娠、子宮外妊娠や流産の推定を行うことも可能である。この β -hCG 値の測定は胚移植後の治療方針の決定に重要な役割を担っている。しかしながら、これまでに SCBT 実施後早期の β hCG 値と妊娠予後の関係性を示した報告はない。SCBT 後の β hCG 値と妊娠予後の関係が明らかになれば、胚移植後の治療方針の決定に役立つと考えられる。

以上の様な背景から、SCBT の実施を積極的に推進するためには、客観的な知見に基づいた裏付けが不可欠である。そこで本研究では、SCBT の臨床成績の向上とその有効性の評価を目的とした。

第 2 章

単一凍結融解胚盤胞移植を用いた透明帯脱出 卵母細胞の臨床利用に関する検討

2-1. 緒言

近年、ART を行う上で自然周期採卵が注目されてきている (1, 2)。しかしながら、自然周期採卵は調節卵巣刺激法に比べて採取できる卵母細胞数が少ない。そのため、自然周期採卵を行う施設では、胚移植できないことによる患者の身体的精神的負担を減らすために得られた卵母細胞を最大限に利用する必要がある。

採卵は、採卵針を経膣的に卵巣の卵胞へ穿刺し、吸引によって卵胞液ごと卵母細胞を回収する。この際稀に卵母細胞の細胞質を囲む糖タンパク質の膜である透明帯が損傷することがある。これは ART を行う上で稀ではあるが付随的に起き得ることである。

透明帯の役割は、1) 卵細胞質の物理的保護、2) 卵管への着床防止、3) 母体由来の免疫システムからの保護、4) 受精時の種特異的精子-卵母細胞の相互関係への関与、5) 先体反応誘起及び多精子受精を防ぐことである (3, 4, 5)。透明帯が多精子受精を防ぐ役割を有しているため、透明帯損傷卵母細胞に G-IVF を施行した場合、多精子受精を引き起こす可能性が高い。よって、透明帯損傷卵母細胞は ICSI を施行することとなる。

ICSI を行う際には卵丘細胞及び顆粒膜細胞を取り除く必要がある。この作業を透明帯損傷卵母細胞に対して行くと、ほとんどの症例で透明帯が外れ、透明帯脱出 (zona-free : ZF) 卵母細胞となる。この ZF 卵母細胞を受精させた場合、初期分割期に胚移植を行うことは、子宮環境内において割球に与えられるダメージが大きいことが予想されるため、胚盤胞移植することが必要であると言える。

ZF 卵母細胞が受精及び胚盤胞への発生が可能であることはすでに報告がされている (6, 7, 8)。さらに ZF 卵母細胞由来胚盤胞を用いて凍結融解胚盤胞移植を行い、産児が得られたことが報告されている (9)。しかしながら、これまでの報告は全て 1-3 症例の報告であり、多症例による検討は行われていない。さらに得られた産児のデータは非常に少ない。

本検討では同一患者から得られた ZF 卵母細胞 (ZF 群) と zona-intact 卵母細胞 (ZI 群) の胚盤胞への発生能及び SCBT 後の結果を比較した。さらに ZF 卵母細胞由来胚盤胞から得られた産児の体重、先天性異常の有無、在胎週数を示した。

これにより、SCBT の有効性の一つとして、ZF 卵母細胞の ART への利用が臨床的判断として
妥当かどうか後方視的に検討を行った。

2-2. 対象と研究デザイン

2-2-1. 検討1：ZF群及びZI群間における正常受精率、異常受精率、分割率、胚盤胞発生率及び拡張期胚盤胞発生率の比較

2010年5月から2012年8月までの間（2年4ヶ月間）で、自然周期による採卵（12）を行い、卵母細胞の成熟確認時に透明帯損傷部位からの卵細胞質の突出が見られ、70 IU/ml ヒアルロニダーゼ（Sigma Chemical Co. USA）を含む10%ヒト血清（プラズマプロテインフラクション, Baxter, Japan）添加mHTFを用いた卵母細胞裸化处理時に透明帯が完全に外れた135症例を対象とした（図2-1）。この135症例のうちZF卵母細胞以外にZI卵母細胞が1個以上取れた症例が97症例あった。これらの症例においてICSI後の正常受精率、分割率、胚盤胞発生率、拡張期胚盤胞発生率をZF群及びZI群で比較した。胚盤胞は胚細胞質の全体1/3以上に胞胚腔が認められたものとし、拡張期胚盤胞は胚盤胞の内径が160 μ mを越えたものとした。また、ZF卵母細胞1個のみが得られた症例（single ZF群）は38症例あり、これらについてはICSI後の正常受精率、分割率、胚盤胞発生率、拡張期胚盤胞発生率を調べた。

2-2-2. 検討2：ZF卵母細胞及びZI卵母細胞由来凍結融解胚盤胞移植における臨床成績の比較

検討1の対象の中で、拡張期胚盤胞まで発生し、凍結保存を行ったZF卵母細胞由来胚盤胞27症例（single ZF卵母細胞群8症例含む）とZI卵母細胞由来胚盤胞36症例を対象とした。

検討2では、ZF卵母細胞及びZI卵母細胞由来拡張期胚盤胞の凍結融解後の生存率及び単一融解胚盤胞移植における臨床妊娠率及び産児率を比較した。また、それぞれの群から得られた産児の在胎期間、体重及び先天性疾患の有無を調べた。

2-3. 方法

2-3-1. 卵巣刺激法と採卵

低卵巣刺激法を行った患者は生理開始 3 日目に経膈超音波により、前周期の閉鎖不良卵胞がないことを確認後、クロミフェンクエン酸塩 50mg を服用開始した。卵胞発育が不良の場合には、少量の human menopausal gonadotropin (hMG) 製剤、もしくはリコンビナント卵胞刺激ホルモン (recombinant follicle stimulating hormone: rFSH) 製剤の投与を受けた。クロミフェンクエン酸塩の服用、hMG 製剤及び r-FSH 製剤の投与期間は、卵胞発育に依存して行われた。

卵胞一個あたりのエストラジオールの換算値が 300pg/ml 以上、黄体形成ホルモン値が基礎値とほぼ同等さらに主席卵胞径が 18mm 以上になった時点で、排卵誘発のため酢酸ブセレリン 600 μ g が点鼻投与された。採卵は酢酸ブセレリン投与後 32-35 時間後に行われた。

完全自然周期採卵を行った患者には排卵誘発のための酢酸ブセレリン以外は一切投薬を行わなかった。なお、完全自然周期採卵は、診察時に希望した患者のうち生理周期が正常 (26-35 日間) であり、自然排卵が可能な場合に限定して行われた。

採卵は、経膈超音波にて卵胞を確認し、21 もしくは 22 ゲージ針 (Kitazato biopharma, Japan) を用いて無麻酔下で行った。獲得卵母細胞は卵丘細胞の一部を 21 ゲージ注射針でカット後に倒立顕微鏡下にて観察し、透明帯損傷の有無と第一極体の確認を行った。

2-3-2. 精子調整

用手法によって得た射出精液を室温で 5-10 分静置し、十分に液化したことを確認した後に、精液全量を 1.5ml HTF (Irvine, USA) にて希釈し、その後 90% ISolate® (Irvine, USA) ならびに 90% ISolate® を HEPES 添加 HTF (mHTF) により 70% に希釈したものをを用いて二層不連続密度勾配遠心を行った (600G, 15 分)。その後沈殿した精子を回収し、6.0ml の HTF に懸濁後、遠心処理 (400G, 5 分) による洗浄を 1 回行った。

2-3-3. 顕微受精 (ICSI)

ICSI は、50%ヒト血清添加 mHTF 培地内で実施した。ZF 卵母細胞には第一極体がないことが多いため紡錘体の確認をもって成熟と判定した。紡錘体の位置は、IX-ROB0polar (OLYMPUS, Japan) にて確認した。紡錘体の確認後、卵細胞質内にインジェクションニードルを挿入し、卵細胞質を吸引することにより細胞膜を破膜、精子を注入した (図 2-2)。ICSI 後 18~20 時間目に、第 2 極体の放出と 2 前核形成をもって正常受精と判定した。また、卵母細胞内に 3 前核以上の多前核が形成されたものは異常受精とした。

2-3-4. 体外培養

受精が確認された胚は、SAGE Quinn' s Advantage Protein Plus Cleavage Medium (ORIGIO, Denmark) の小滴 (20 μ l) 中で 2 日間培養を行った。3 日目以降は、SAGE Quinn' s Advantage Protein Plus Blastocyst Medium (ORIGIO, Denmark) の小滴 (30 μ l) 内に胚を移動させ、胚培養を継続した。培養液の小滴はミネラルオイル (KITAZATO, Japan) で覆った。胚が複数個得られた場合、ZF 卵母細胞由来胚は単独で培養を行った。培養環境は 37°C、5%酸素、5%二酸化炭素、90%窒素、湿度飽和下とした。

2-3-5. ガラス化保存及び融解

受精確認後 5 日目~7 日目において、直径が 160 μ m 以上の拡張期胚盤胞もしくは ZF 卵母細胞由来胚盤胞を凍結保存した。凍結保存及び融解は、Cryotop 法 (KITAZATO Biopharma, Japan) を用いた (13)。融解後の胚盤胞の生存率を向上させるため、ピペッティングによる孵化胚盤胞の収縮を行った後 (14)、ガラス化保存を行った。

2-3-6. 凍結融解胚盤胞移植及び妊娠判定

自然周期の排卵後 4.5~5 日目に凍結胚盤胞の融解を行った。融解後の胚盤胞は、30 分から 2 時間培養し、再拡張をもって生存とし、胚移植に用いた。胚移植は、胚移植用カテーテル (3Fr ET カテーテル, KITAZATO, Japan) を用いて、経膈超音波ガイド下にて行った。移植胚は、ごく少量の 10%ヒト血清添加 mHTF とともに子宮内腔にカテーテルより射出した。胚移

植後の黄体ホルモンの補充を目的として、ジドロゲステロン（デュファストン，第一三共製薬株式会社）30mg/day を7日間経口投与した。胚移植後約4週間後に超音波診断にて、胎嚢が確認された患者を臨床妊娠とした。妊娠9週目までは妊婦健診を行い、それ以降は分娩管理可能な施設へ紹介した。妊娠の経過及び出産の有無は、患者もしくは紹介先の施設からの書面もしくは電話にて確認した。22週以降の分娩を出産例とした。

2-3-7. 統計解析

正常受精率、胚分割率、胚盤胞発生率、拡張期胚盤胞発生率、臨床妊娠率及び産児率を χ^2 二乗検定もしくは条件付きロジスティック回帰分析、年齢を student' s-t 検定を用いて、検定した。全ての統計解析は、危険率5%で行った。

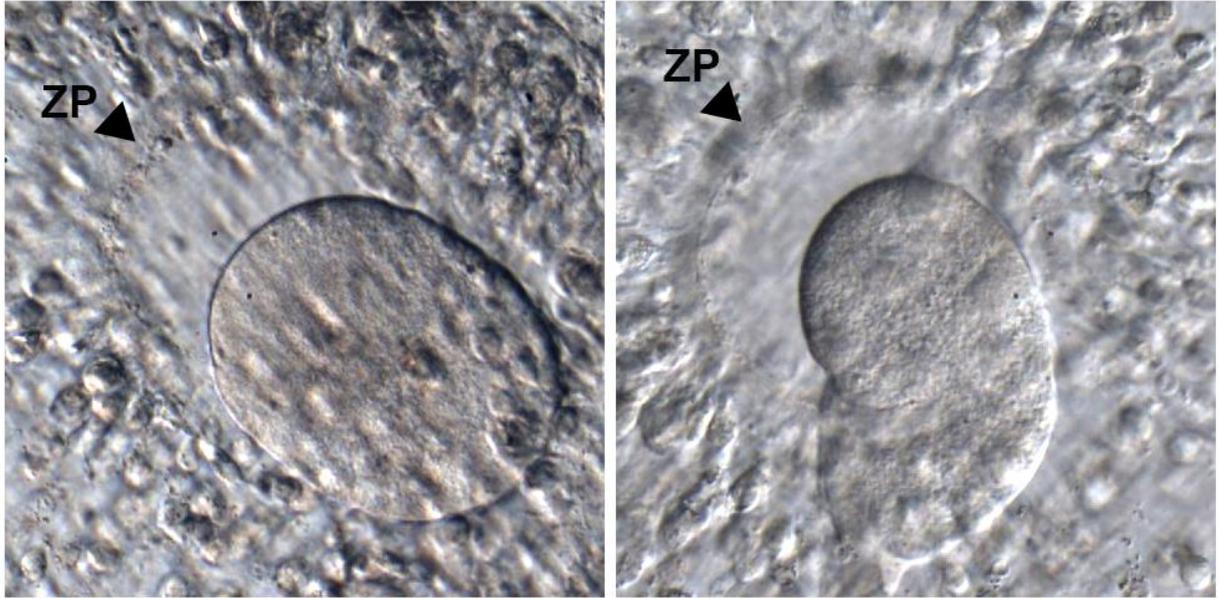


図 2-1. 採卵直後における透明帯損傷部位からの卵母細胞の細胞質の突出

ZP : 透明帯

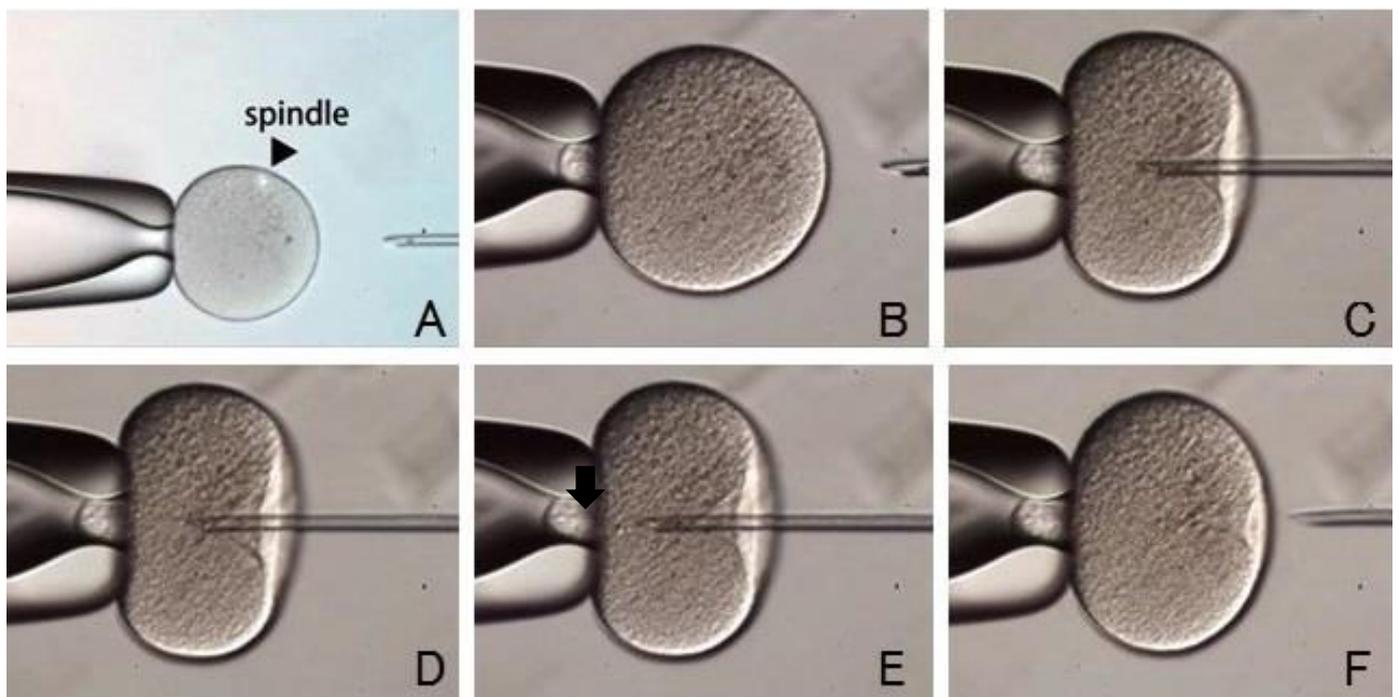


図 2-2. ZF 卵母細胞への ICSI

A) IX-ROBO polar による紡錘体の確認 矢印：紡錘体 B-C) 卵細胞質へのインジェクションピ
 ペットの挿入 D) 吸引破膜 E) 精子の注入 矢印：精子 F) インジェクションピペットの抜去

2-4. 結果

本検討期間中に ZF 卵母細胞が得られた症例の割合は 0.3% (135/44,460) であった。

2-4-1. ZF 群及び ZI 群間における正常受精率、異常受精率、分割率、胚盤胞発生率及び拡張期胚盤胞発生率の比較 (検討 1)

Table. 2-1 に ZF 群及び ZI 群の正常受精率、異常受精率、分割率、胚盤胞発生率及び拡張期胚盤胞発生率を示した。同一患者から得られた ZF 群及び ZI 群間で正常受精率 (77% vs. 77%, P=1.0)、分割率 (75% vs. 75%, P=1.0)、胚盤胞発生率 (39% vs. 32%, P=0.11) 及び拡張期胚盤胞発生率 (28% vs. 26%, P=0.37) において有意差は見られなかった。Single ZF 群ではそれぞれ 92、90、34、32%であった。以上の結果より、ZF 群及び ZI 群間において正常受精率、異常受精率、分割率、胚盤胞発生率及び拡張期胚盤胞発生率に差がないことが明らかとなった。

2-4-2. ZF 卵母細胞及び ZI 卵母細胞由来凍結融解胚盤胞移植における臨床成績の比較 (検討 2)

Table. 2-2 に凍結融解胚盤胞移植の結果を示した。2012 年 12 月までのガラス化保存した胚盤胞の追跡調査を行った結果、ZF 由来群 (single ZF 群を含む) で 27 症例、ZI 卵母細胞由来群で 36 症例の凍結融解胚盤胞移植が行われた。ZF 群及び ZI 群から得られた凍結胚盤胞の融解胚盤胞移植の結果を比較した。その結果、融解胚盤胞移植後の臨床妊娠率 (37% vs. 44%, P=0.59) 及び産児率 (37% vs. 36%, P=0.96) において有意差は見られなかった。

ZF 卵母細胞由来群及び ZI 卵母細胞由来群からそれぞれ計 9 名と 17 名の産児が得られた。それぞれの産児の在胎期間 (38.3 ± 3.7 vs. 39.5 ± 1.5 weeks, P=0.40) 及び体重 (3115 ± 946 versus 3010 ± 441 g, P=0.77) に有意差は見られなかった。先天性異常は ZF 卵母細胞由来群において 1 例のみ確認された。

以上の結果より、ZF 卵母細胞由来胚盤胞及び ZI 卵母細胞由来胚盤胞の発生能に差がない

ことまた、それらからの産児の出生時の状態に差がないことが明らかとなった。

Table.2-1 : ZF卵子群及びZI卵子群の胚培養成績

検討群	ZF (採取卵子1個)	同一患者由来		p*
		ZF由来	ZI由来	
治療周期数, n	38	97		-
患者平均年齢 (±SD)	40.1±3.3	39.3±4.3		-
卵子獲得数	40	322		
ICSI施行数	38	97	216	-
正常受精数, n (%) ^b	35 (92)	75 (77)	167 (77)	1.00 ^a
胚分割数, n (%) ^b	34 (90)	73 (75)	162 (75)	1.00 ^a
胚盤胞発生数, n (%) ^b	13 (34)	38 (39)	70 (32)	0.11 ^a
拡張期胚盤胞発生数, n (%) ^b	11 (29)	27 (28)	56 (26)	0.37 ^a

^a条件付きロジスティック回帰分析, ^b/ICSI施行数, *培養成績の比較は同一患者から得られたZF卵子群及びZI卵子群間で行った。ZI卵子群では18個の胚を分割胚で胚移植に供しており、4個の分割胚は凍結保存を行っている。

Table.2-2：凍結融解胚盤胞移植後の臨床成績

検討群	ZF由来 (採取卵子1個)	同一患者由来		p**
		ZF由来	ZI由来	
患者平均年齢 (±SD)	41.1±2.2	36.7±4.3	38.6±4.2	0.12
融解胚盤胞数, n	8	19	36	-
生存胚盤胞数, n	7 (88)	17 (90)	36(100)	-
臨床妊娠数, n (%) ^b	3 (38)	7 (37)	16 (44)	0.59 ^a
産児数, n (%) ^b	2 (25)	7 (37)	13 (36)	0.96 ^a

^a t検定, ^b χ^2 二乗検定, °/融解胚盤胞数, *胚移植成績の比較は同一患者から得られたZF卵子群及びZI卵子群間で行った。ZI卵子群においてはこの結果に加え、新鮮及び凍結融解分割胚移植にて4名の産児が得られている。

2-5. 考察

本検討の結果、ZF 卵母細胞は ZI 卵母細胞と受精率、胚盤胞発生率、胚移植後の結果において同等であった。さらに産児の基本的なデータに差は見られなかった。

ZF 卵母細胞由来胚は、透明帯がないため割球同士が離れてしまうことがある。よって、慎重に胚操作を行う必要がある。本章の結果より、体外培養液の交換時など割球同士が離れてしまわないように慎重に胚の操作を行うことができれば、ZI 卵母細胞と同様の臨床成績を得ることが可能であることが示された。

また、ZF 卵母細胞由来胚盤胞の凍結融解胚移植後の臨床妊娠率及び産児率は、ZI 卵母細胞由来のそれとほぼ同等であることが示された。ZF 由来胚は、透明帯が存在しないため分割様式が ZI 由来胚と異なる。この特殊な分割様式が妊娠の継続に影響を与えることが知られている (7, 12)。ZF 卵母細胞の発生過程を Fig. 2-2 に示した。症例 A の胚は、day2 にて横並びに分割がおこり、day4 で compaction が起こらずそのまま退行した (図 2-3a, d 及び g)。さらに、症例 B と症例 C は、day2 における分割形態は異なるが day4 にて割球の compaction が起こり、同じような時期に胚盤胞まで発生した。しかし、症例 C は妊娠・出産まで至ったが、症例 B は妊娠に至らなかった。Suzuki らは、マウス胚において、症例 C のような卵割をした ZF 卵母細胞の胚移植後の妊娠率は、ZI 卵のそれと同等であること、また症例 A のように ZF 卵母細胞特有の卵割をした胚は症例 B 及び症例 C のような卵割をした胚に比べ、産子率が有意に低くなること、さらに内部細胞塊の数も有意に少なくなることを報告している (15)。また、Shu らは、症例 A のように第二卵割の際に横並びに分割した胚は、胚盤胞まで発生したが、胚移植の結果、22 週で流産したことを報告している (7)。ヒト胚の胚性ゲノム活性化は、4-細胞期以降に起こることが知られており、今回の結果から、4-細胞期における胚の分割様式特に割球同士の接着面の数の違いが胚性ゲノムの活性化以降の胚発生に影響を与えていることが示唆される。実際、本検討中の ZF 群において症例 A と同じ分割様式であるものが 6 症例あり、そのうち胚盤胞まで発生したのは 1 症例のみであった。今後、割球の結合様式と流産率の関係性を検討する必要があると考えられる。

これまで ZF 卵母細胞からの出産例が報告されているが、特に出生児の異常は報告されていない (7)。本検討においても、1 症例のみ先天性異常が確認されたが、顕著な早産率の増加、低体重もしくは巨大児率の増加、先天性異常率の増加などは見られておらず、透明帯の有無は出生児に影響を及ぼさない可能性が示唆されるが、出産例がまだ少ないため今後もデータを注視する必要があると考えられる。

本検討より、ZF 卵母細胞の SCBT を行った際の臨床成績は、ZI 卵母細胞と同等であり、ZF 卵母細胞の ART への利用が臨床的判断として妥当であることが示された。今後、産児率、流産率並びに生下時の産児の状態等についてさらに詳細に観察を行っていく必要があると考えられた。

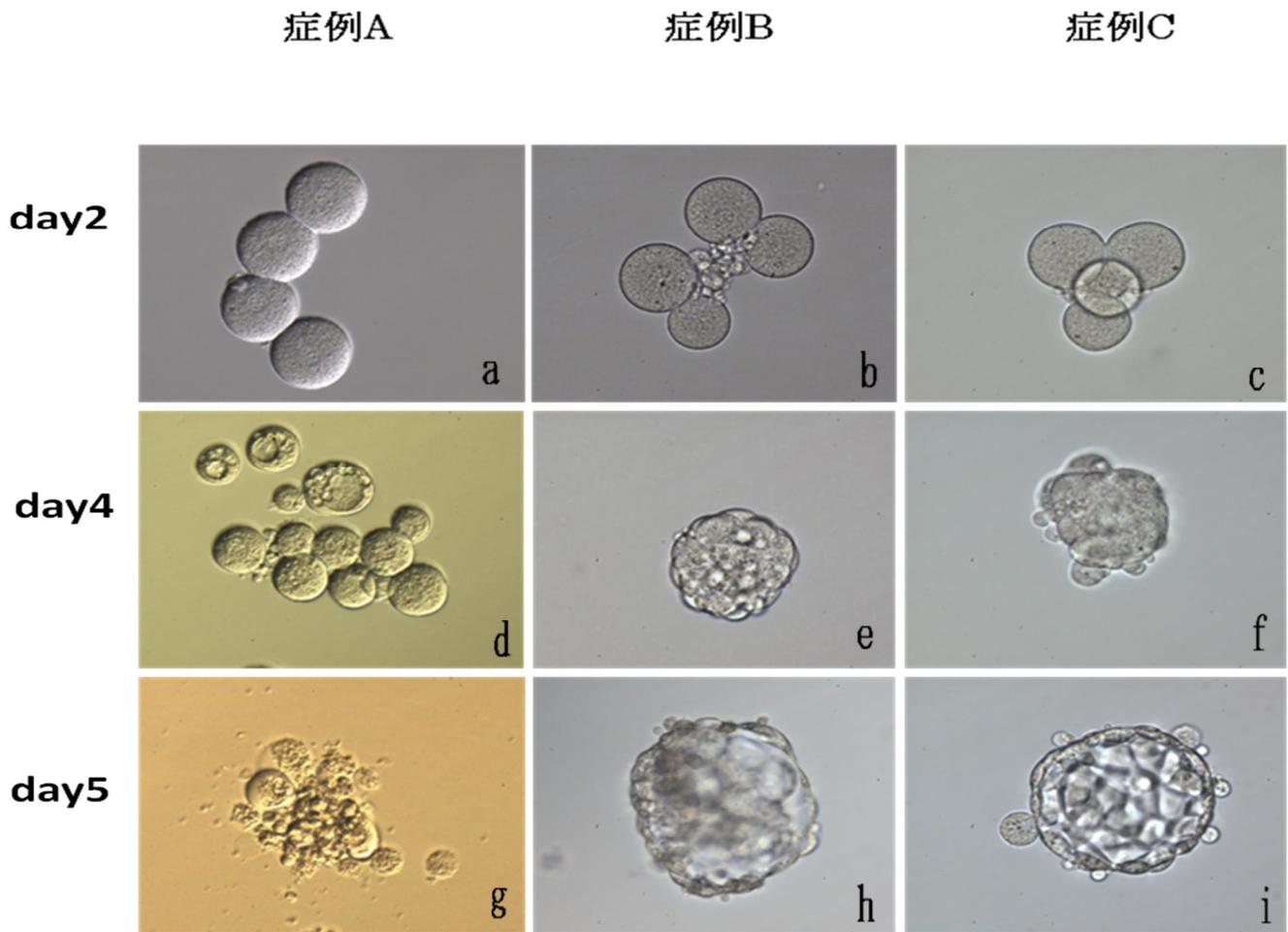


図 2-3. zona-free 卵母細胞の発生過程

縦に症例、横にそれぞれの発生過程を示した。症例 A) day2 の分割時に割球が直線状に並んだ (a) その後、分割は見られた (d) が、day5 にて胚が死滅した (g)。症例 B) day2 の分割時に割球が 2 個ずつに分かれた。その後、day4 にて桑実胚 (e)、day5 にて胚盤胞まで成長した (h) が、胚移植の結果妊娠には至らなかった。症例 C) day2 の分割時に全て割球が互いに接点を持つ形で分割した (c)。その後、day4 にて桑実胚 (f)、day5 にて胚盤胞まで成長した (i)。胚移植の結果妊娠、出産に至った。

第3章

ヒト凍結融解胚盤胞における透明帯の除去範囲が
接着能に及ぼす影響

3-1. 緒言

単一凍結融解胚盤胞移植 (single cryopreserved-thawed blastocyst transfer: SCBT) は、体外受精を行う際の重要な方法の一つとして、その利用が増えてきている。SCBT は、事前に子宮内の環境を良好な状態に整えた上で、凍結した胚盤胞を融解し、胚移植する方法であり、これにより、多胎妊娠を防ぐだけでなく、高い着床率と臨床妊娠率を得ることができる (Thurin *et al.* 2004, Shapiro *et al.* 2011, Glujovsky *et al.* 2012, Roque *et al.* 2013)。

胚盤胞が透明帯から脱出することは、着床するために必要不可欠なステップである。胚盤胞の透明帯脱出は、胞胚腔の増大 (Bergstrom *et al.* 1972, Surani *et al.* 1975, Lopata *et al.* 1989)、胚から分泌されるプロテアーゼ様の因子 (Denker *et al.* 1979, Perona *et al.* 1986, Menino *et al.* 1987) および子宮から分泌される zona lysin によって促進される (Joshi *et al.* 1974, Gonzales *et al.* 1995)。

卵母細胞および胚の透明帯は、凍結融解の過程で硬化が起こる。その結果、胚盤胞が、透明帯からの脱出不全を起こすことが報告されている (Vincent *et al.* 1990, Cohen 1991, Manna *et al.* 2001, Ko *et al.* 2008)。透明帯硬化は、細胞膜からの早期の表層顆粒放出によって、透明帯を構成する糖タンパク質同士が架橋結合することによって起きる (Vincent *et al.* 1990)。この現象は、卵母細胞または胚の低温への曝露、凍結保存の過程で使用されるジメチルスルフォキシドへの曝露およびカルシウムが添加されている培養液への曝露、によって起きる (Vincent *et al.* 1990, Cohen 1991)。凍結保存法の一つであるガラス化保存法を行う際にも、ヒト卵母細胞において表層顆粒の減少が起きることが報告されている (Bianchi *et al.* 2014)。また、げっ歯類の卵母細胞では、ガラス化保存する際にカルシウム無添加の培地を使用することによって、精子の透明帯通過率が改善することが報告されている (Larman *et al.* 2006, Fujiwara *et al.* 2010)。これらの報告より、ガラス化保存法は、透明帯硬化の一因になり得る可能性が示唆されている。

一般的に、胚盤胞の透明帯脱出不全は、透明帯硬化によって栄養外胚葉 (trophectoderm:

TE) から分泌される zona-lysin に対する透明帯の抵抗性の増加によって起こることが知られている (Larman *et al.* 2006, Fujiwara *et al.* 2010)。この透明帯脱出不全はアシステッドハッチング (Assisted Hatching: AH) を行うことによって、改善することができる。実際にこれまで、凍結融解胚移植の施行前に AH を行うことによる、臨床成績の改善が報告されている (Check *et al.* 1996, Vanderzwalmen *et al.* 2003, Martins *et al.* 2011)。

近年、赤外線ダイオードレーザーを用いた AH (laser assisted hatching: LAH) が多くの体外受精を行う施設で用いられており、AH の方法の中で主流になっている。LAH を用いて、透明帯の部分除去や透明帯の菲薄化をすることによって胚移植後の臨床妊娠率が改善することが報告されている (Mantoudis *et al.* 2001, Valojerdi *et al.* 2008)。しかしながら、発生能が低い胚盤胞では、LAH による透明帯の部分除去や透明帯の菲薄化を行っても、透明帯からの脱出が起こらない可能性がある。また、透明帯部分除去によって作られた開孔部が狭い場合、そこから胚盤胞が脱出すると胚が歪み、物理的なダメージを負ってしまう可能性があると報告されている (Vajta *et al.* 2010)。そのため、Vajta らは、胚盤胞移植では、透明帯を完全に除去することで透明帯部分除去よりも着床率が改善すると報告している。同様に Hiraoka らは、凍結融解胚盤胞移植において、透明帯完全除去と部分除去の臨床成績の比較を行った結果、透明帯完全除去は部分除去に比べ、着床率、臨床妊娠率、出産率が高くなることを報告している (Hiraoka *et al.* 2007)。しかしながら、*in vivo* における胚盤胞の透明帯からの脱出には、前述したように様々な母体由来の因子が関与しているため、AH による透明帯の除去範囲の影響を *in vivo* で検証することは、難しいと考えられる。よって、AH を用いた透明帯の完全除去あるいは部分除去を行った際の着床能に関する検討を行う際には *in vitro* での検証が必要である。

着床能を評価する一つの指標として、接着能による評価がある。接着は、胚盤胞と子宮内膜とのクロストークにより始まる着床過程の初期段階である。*In vitro* において、胚盤胞の子宮内膜への接着能を評価する方法の一つとして胚盤胞とフィブロネクチンコート dish を用いた outgrowth assay がある (Schultz *et al.* 1995)。*In vivo* における胚盤胞の子宮内膜への接着には、細胞外基質の受容体として働くインテグリンが子宮内膜および胚盤

胞の両方で発現し、それらが相互作用することが必要である (Kaneko *et al.* 2013)。インテグリンの発現が子宮内膜で増大すると、TE におけるインテグリンの発現も増大する。その結果、胚盤胞が子宮内膜上の細胞接着因子であるフィブロネクチンへの接着能を獲得し、着床が進行していく (Schultz *et al.* 1995, Schultz *et al.* 1997, Wang *et al.* 2002)。In vitro において、インテグリンの発現が起き、接着能を獲得した胚盤胞をフィブロネクチンコート dish 上で培養すると、栄養外胚葉 (Trophoectderm: TE) がフィブロネクチンと結合し、dish の底面に接着する。その後、dish 底面上にてフィブロネクチンと結合した胚盤胞は成長し、その面積を広げていく。これを outgrowth と呼ぶ。この現象を利用した outgrowth assay (図 3-1) は、着床における TE の子宮内膜への接着とその後の胚の成長を in vitro で観察するためのモデルとして適切であるとされている (Armant *et al.* 1986)。さらに、outgrowth assay は子宮から分泌される zona-lysin などの母体由来の因子が存在しないため、胚盤胞の透明帯からの脱出または接着能を評価することに非常に適している。これらのことから、outgrowth assay は AH の方法を評価する上で非常に優れたモデルであるといえる。

本研究では、LAH による透明帯除去の範囲が、胚盤胞の接着能に及ぼす影響を調べるため、透明帯を完全除去した胚盤胞と透明帯を部分除去した胚盤胞で outgrowth assay とタイムラプス搭載型インキュベーターによる観察を行い、比較試験を行った。さらに、両方法における胚盤胞のインテグリンの発現量を計測し、その比較を行った。

3-2. 対象と研究デザイン

3-2-1. 提供胚

胚盤胞の廃棄を希望し、かつ研究への提供に同意した患者から、6日目凍結胚盤胞 217 個を提供していただき、試験に供した。本研究は、加藤レディスクリニック倫理委員会にて承諾を得ている (IRB approval number: 14-19, 承認日: 2014 年 9 月 2 日)。提供された 6 日目凍結胚盤胞を融解前に、透明帯部分除去群 (Partial 群, n=79) と透明帯完全除去群 (Complete 群, n=79) LAH を行なわない ZP-intact 群 (Intact 群, n = 59) の 3 グループに分けた。これら 3 群の胚盤胞は、提供患者年齢が同じ (平均年齢: 35.4 ± 0.3 歳) かつ胚盤胞の形態評価すなわちガードナー分類 (Gardner *et al.* 2000) において同じ評価が得られたものを分けている。これら 217 個の胚盤胞を融解した結果、すべての胚盤胞が生存していた。生存していた胚盤胞のうち、158 個を検討 1 および 2 に、59 個を検討 3 に用いた。

3-2-2. 検討 1: LAH による凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去が再拡張率および透明帯脱出率に及ぼす影響

レーザー照射およびガラス管でのピペッティングを用いた LAH による透明帯の完全除去および部分除去が胚へ及ぼす影響について調べるために、各群における LAH 後の胚盤胞の再拡張率、透明帯からの脱出率を調べた。胚盤胞の再拡張は、胞胚腔の確認をもって、再拡張とし、また、胚盤胞が完全に透明帯外に脱出したことを確認し、透明帯からの脱出とした。

3-2-3. 検討 2: AH による凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去が胚盤胞の接着能および outgrowth に及ぼす影響

LAH による凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去が胚盤胞のフィブロネクチンへの接着能および outgrowth におよぼす影響を調べるために、各群における接着率、接着までに要した時間を調べた。また、接着した細胞が伸長した範囲である outgrowth 面積および接着した細胞が伸長した速度である outgrowth 速度を outgrowth assay 開始後 96 時間で調べた。胚盤胞のフィブロネクチンへの接着の有無の確認は、培養終了時にピペッティングによって行い、胚が剥がれずに接着していたものを接着あり、剥がれたものを接着なしとした。接着までに要した時間は、タイムラプス動画を用いて調べた。Outgrowth 面積は、NIS Elements D Imaging Software (Nikon, Japan) を用いて測定した。また、outgrowth 速度は、接着開始から培養終了まで時間と outgrowth 面積から算出した。

3-2-4. 検討3 : LAHによる凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去後の胚盤胞を用いた outgrowth assay におけるインテグリン mRNA 発現量の解析

LAHによる凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去が、胚盤胞のフィブロネクチンへの接着に関与するインテグリン α 5 (ITGA1) および β 1 (ITGB1) の mRNA 発現量に及ぼす影響について調べた。各群における、培養後0、12、18 および 24 時間での胚盤胞の ITGA1 および ITGB1 の mRNA 発現量を、それぞれ5個、8個、8個および8個の胚盤胞を用いて、定量 RT-PCR によって測定した

3-3. 方法

卵巣刺激および採卵 (2-3-1)、精子調整 (2-3-2)、G-IVF (2-3-3)、ICSI (2-3-4)、体外培養 (2-3-5) および凍結保存法 (2-3-6) は、前章の方法に準じて行った。

3-3-1. LAH

LAH は、融解胚盤胞が収縮している際にはただちに行なった。融解胚盤胞が拡張していた場合は、0.25M スクロース添加 Heps-buffered TCM199 を用いて、収縮させ、その後 LAH を行なった (図 3-2 A, B)。LAH は、レーザーシステム (Wavelength: 1.48 μm , OCTAX laser shot™, OCTAX Microscience GmbH, Bruckberg, Germany) を搭載した倒立顕微鏡 (IX-71, Olympus, Tokyo, Japan) 下で行い、Hiraoka らの方法に準じた (1)。LAH を行う際には、胚盤胞の栄養外胚葉と透明帯の間に十分なスペースがあることを確認した。その後、レーザーの照射によって、透明帯の全周の 30-40% に開孔した (Partial 群, 図 3-2C)。開孔後、ピペッティングを数回行い、透明帯を完全除去した (Complete 群, 図 3-2D-F)。

3-3-2. 胚盤胞の outgrowth assay および time-lapse imaging

胚盤胞の outgrowth assay は、Green らの方法に準じて行った (Green *et al* 2015)。12 ウェル dishes (GPS® Dishware, Life Global, Ljubljana, Slovenia) に 10 $\mu\text{g/ml}$ フィブロネクチン (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) をコーティングし、4°C 下で一晩静置した。その後、20 μl の Quinn's Advantage Protein Plus blastocyst medium with insulin (ORIGIO) をそれぞれのウェルに加え、ミネラルオイルで覆った。

LAH を行なった胚盤胞をそれぞれ個別にウェルの中に入れ、リアルタイム受精卵観察システム搭載の無加湿型インキュベーター (CCM-iBIS, Astec, Japan) にて 96 時間胚培養を行なった。培養環境は、37°C 5% O₂, 5% CO₂, and 90% N₂ の気相条件で行なった。画像は、15 分ごとに 10 箇所 of 焦平面を撮影した。撮影した画像からイメージングソフト (Phototune, Astec, Japan) を用いて、タイムラプス動画を作成し、解析を行った。

3-3-3. INTGA5 と INTGB1 の定量 RT-PCR

回収した胚盤胞を室温の 0.1% PVA-PBS で 3 回洗浄後、RNA 抽出に供した。RNA 抽出には Cells-to-cDNATMII Kit (4399002, Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。また、Cells-to-cDNATMII Kit に推奨された手法に準じて RNA 抽出を行った。すなわち、氷上においた 0.2 ml の PCR チューブに 5 μl ずつ Cell Lysis II Buffer を分注し、各々のチューブに対し、回収した胚を加えた。尚、加えた液量は 0.1% PVA-PBS と胚を含めて約 0.5 μl とし

た。チューブをすばやく 75°C で 10 分間処理し、細胞を溶解させると共に各種の RNase を不活性化した。その後チューブを氷上におき、最終濃度が 0.04 U / μ l になるように 0.44 U / μ l DNase I を 0.5 μ l 加え、穏やかに混合し遠心した。尚、DNase I は予め 2 U / μ l DNase I を Cell Lysis II Buffer にて希釈し 0.44 U / μ l とした。DNase I の反応は 37°C で 15 分間行い、完全にゲノム DNA を分解した。その後、75°C で 5 分間処理し、DNase を不活性化した。得られた RNA を含む細胞溶解物は直ちに逆転写反応に用いた。5.5 μ l の RNA を含む細胞溶解物の入ったチューブに dNTP Mix、および Oligo (dT) 18 Primers をそれぞれ 2.2 μ l および 1.1 μ l ずつ加え、穏やかに混合し遠心した。その後、RNA の二次構造を変性させるため 70°C で 3 分間処理した。氷上に 1 分間静置した後、1.1 μ l の 10 \times RT buffer、0.55 μ l の M-MLV Reverse Transcriptase、0.55 μ l の RNase inhibitor を加え、穏やかに混合し、遠心した。42°C で 60 分間逆転写反応を行い、95°C で 10 分間処理し、逆転写酵素を不活性化させた。得られた cDNA は -30°C で保存した

Real-time RT-PCRにはTaqMan® Gene Expression assays (Applied Biosystems, USA) およびTaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用し、その方法に準じてStepOnePlus™ Real-time PCR System (Applied Biosystems) で行った。INTGA5のプライマーとしてTaqMan® Gene Expression assays Hs01547673_m1、INTGB1のプライマーとしてTaqMan® Gene Expression assays Hs00559595_m1を用いた。TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 10 μ l、TaqMan® Gene Expression assays 1 μ l、Nuclease-free water 7 μ l、cDNAサンプル2 μ lを混合し、MicroAmp Optical Adhesive Cover Compression Pad (Applied Biosystems) に添加後、MicroAmp® Optical 96-Well Reaction PlateとMicroAmp Optical Adhesive Covers (Applied Biosystems) を密着させた。PCRサイクルは95°Cで15分間処理することでHotStarTaq DNA Polymeraseを活性化させた後、94°C—15秒、57°C—30秒、72°C—35秒の処理を45サイクル繰り返した。内在性コントロールとしてH2A histone family member Z (H2afz) のmRNAをTaqMan® Gene Expression assays Hs01888362_g1

(Applied Biosystems) を用いて定量した。INTGA5、INGB1、H2afzの解析は同一プレート上で行い、反応は各サンプルにつき二連で行った。また、ネガティブコントロールにおいて非特異的増幅が生じる以前のCt値を定量可能範囲として採用した。MVHおよびVEGFのmRNAの相対的発現量はStepOne software version 2.1を用いて検量線法により解析し、H2afzのmRNA量で補正した。

3-3-4. 統計解析

胚盤胞の拡張率と接着率の比較は、カイニ乗検定を用いた。また、期待値が5未満の比較に対してはFisherの正確確率検定を用いた。

接着までに要した時間、outgrowth 速度および outgrowth area は対応のない t-検定を用いて、統計解析を行った。mRNA の発現レベルの比較は ANOVA-PLSD 法を用いた。すべての統計解析は、危険率 5%以下を持って有意差ありとした。

3-4. 結果

3-4-1. 検討1：LAHによる凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去が再拡張率および透明帯脱出率に及ぼす影響

各群における再拡張率は、Partial 群で 88.0% (44/50)、Complete 群 92.0% (46/50)、Intact 群で 93.3% (28/30) であり、すべての群間で同等であった。この結果、レーザー照射およびピペッティングによる透明帯の完全及び部分除去は、胚盤胞の発生能に影響が無いことが示された。

透明帯からの脱出率において Partial 群 (64.0%, 32/50) は、Intact 群 (10.0%, 3/30) に比べ有意に高いことが示された ($P < 0.05$)。Partial 群は、透明帯からの脱出率が Intact 群よりも高いことが示されたが、36% (18/50) 胚盤胞は孵化することができなかった。

以上の結果より、透明帯の部分除去では、胚盤胞が透明帯から脱出できないことがあり、これを防ぐためには透明帯の完全除去が必要であることが示唆された。

3-4-2. 検討2：LAHによる凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去が胚盤胞の接着能および outgrowth に及ぼす影響

LAH 後の胚盤胞のフィブロネクチンへの接着率は Complete 群が Partial 群および Intact 群に比べて、各経過時間において有意に高かった (24h : 16%, 4%, 0%, 36h : 46%, 22%, 0%, 48 h : 66%, 42%, 6%, 72h : 80%, 58%, 10%, 96 : 80%, 60%, 10%, $P < 0.05$, 図 3-3A)。透明帯から脱出した胚盤胞で接着しなかった胚盤胞はなかった。

Intact 群は、透明帯からの脱出後、接着した胚盤胞が 3 個であったため、統計解析には不適であった。よって、以下の Intact 群の接着時間、outgrowth 面積および outgrowth スピードは、他群との比較は行っていない。

Complete 群、Partial 群および Intact 群における接着までに要した平均時間は、それぞれ 44.6 ± 2.9 h ($n = 30$)、 36.2 ± 2.2 h ($n = 40$)、 48.4 ± 2.5 h ($n = 3$) であり、Complete 群と Partial 群の間に有意な差が生じた ($P < 0.05$; 図 3-3B)。

Outgrowth 面積は、Complete 群、Partial 群および Intact 群において、 $3.5 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ($n = 30$)、 $2.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ($n = 40$) であり、Complete 群と Partial 群の間に有意な差が生じた (図 3-3C)。

Outgrowth 速度は、Complete 群、Partial 群および Intact 群において、 $4.7 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ 、 $5.8 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ および $2.4 \times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{h}$ であり、Complete 群が Partial 群に比べて、outgrowth 速度が速い傾向が得られたが、有意差は認められなかった (図 3-3D)。

以上の結果、LAHによる胚盤胞の透明帯の完全除去は、胚盤胞の接着と outgrowth を促進することが示された。

3-4-3. 検討3 : LAHによる凍結融解胚盤胞の透明帯部分除去および完全除去後の胚盤胞を用いた outgrowth assayにおけるインテグリン mRNA 発現量の解析

LAH後の胚盤胞における ITGA5 と ITGB1 の mRNA 発現量を培養 12、18 および 24 時間で測定した。Complete 群の ITGA5 の mRNA 量は、培養開始後 12h 以降において、AH 直後に比べて、有意に高くなり、18 時間まで mRNA 発現量は増加した (図. 3-4A)。Partial 群と Intact 群において ITGA5 の mRNA 発現量は、LAH 後 18 時間までは、時間経過とともに増加が認められた。しかし、その ITGA5 の mRNA 発現量は、Complete 群よりも有意に低かった ($P < 0.05$)。Complete 群における ITGB1 の mRNA 発現量は、LAH 後 12 時間まで有意な増加が認められた (図. 3-4B, $P < 0.05$)。しかしながら、Partial 群および Intact 群において、LAH 後 24 時間までに ITGB1 の mRNA 発現量の有意な増加は認められなかった。

これらの結果、胚盤胞における透明帯の完全除去は、outgrowth assay において ITGA5 と ITGB1 の mRNA 発現量を増進させることが示された。

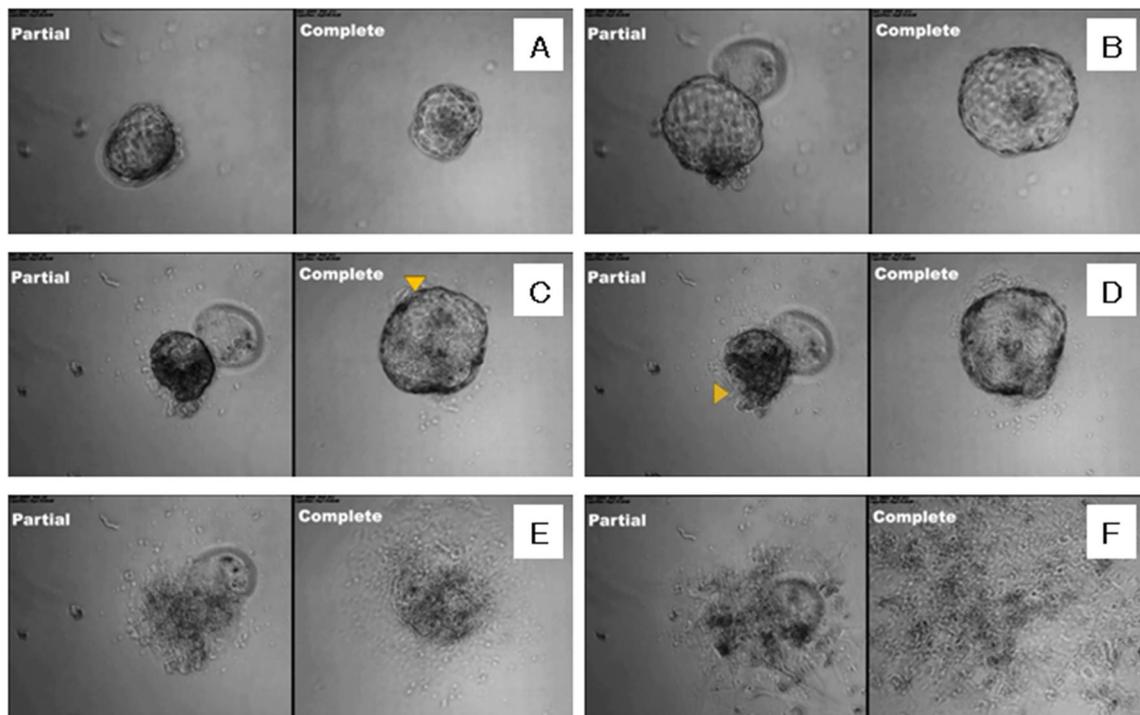


図 3-1. 凍結融解胚盤胞における outgrowth assay

- A) フィブロネクチンコート dish 上に融解した胚盤胞を静置し、培養を開始する B) Partial 群にて孵化が確認された C) Complete 群において、Arrowhead 部分から接着が開始された D) Partial 群において、Arrowhead 部分から接着が開始された E) 両群において胚盤胞全体が接着した F) 接着した細胞が伸長していく。

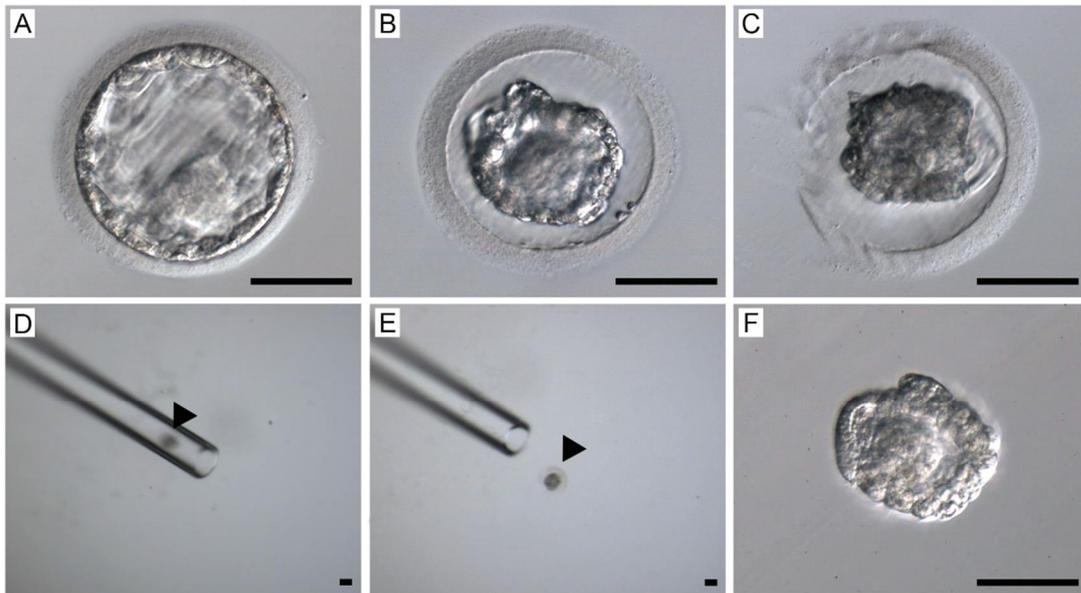


図 3-2. 凍結融解胚盤胞におけるアシステッドハッチング

A) 融解後の胚盤胞 B) 高浸透圧液への曝露とピペッティングにより、収縮した胚盤胞 C) レーザーシステムを用いた透明帯の部分除去 D and E) ピペッティングによる透明帯の完全除去 F) 透明帯を完全除去した胚盤胞

矢印：胚盤胞 スケールバー：100 μ m.

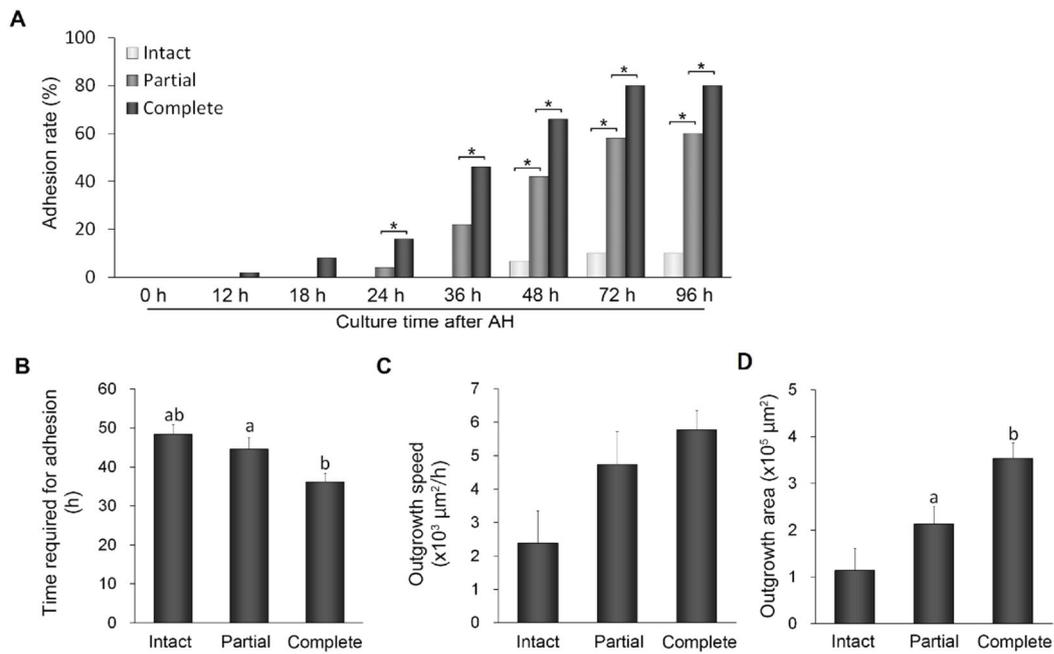


図 3-3. アシステッドハッチング後の胚盤胞の接着率、接着に要した時間および outgrowth 速度

A) AH 後、0, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 時間における胚盤胞の累積接着率 *は、それぞれの群間において有意差があることを示す ($P < 0.05$)。B) 培養開始から接着までに要した時間 C) 胚盤胞の outgrowth 速度 D) AH 後 96 時間における outgrowth area B-D) 異符号間において、有意差があることを示す ($P < 0.05$)。

グラフは平均値±標準誤差を示す。Intact 群において接着に至った胚盤胞の数が少なかった ($n=3$)。そのため、Intact 群における接着時間および outgrowth 速度は、Partial 群および Complete 群のものと統計的な比較は、行っていない。

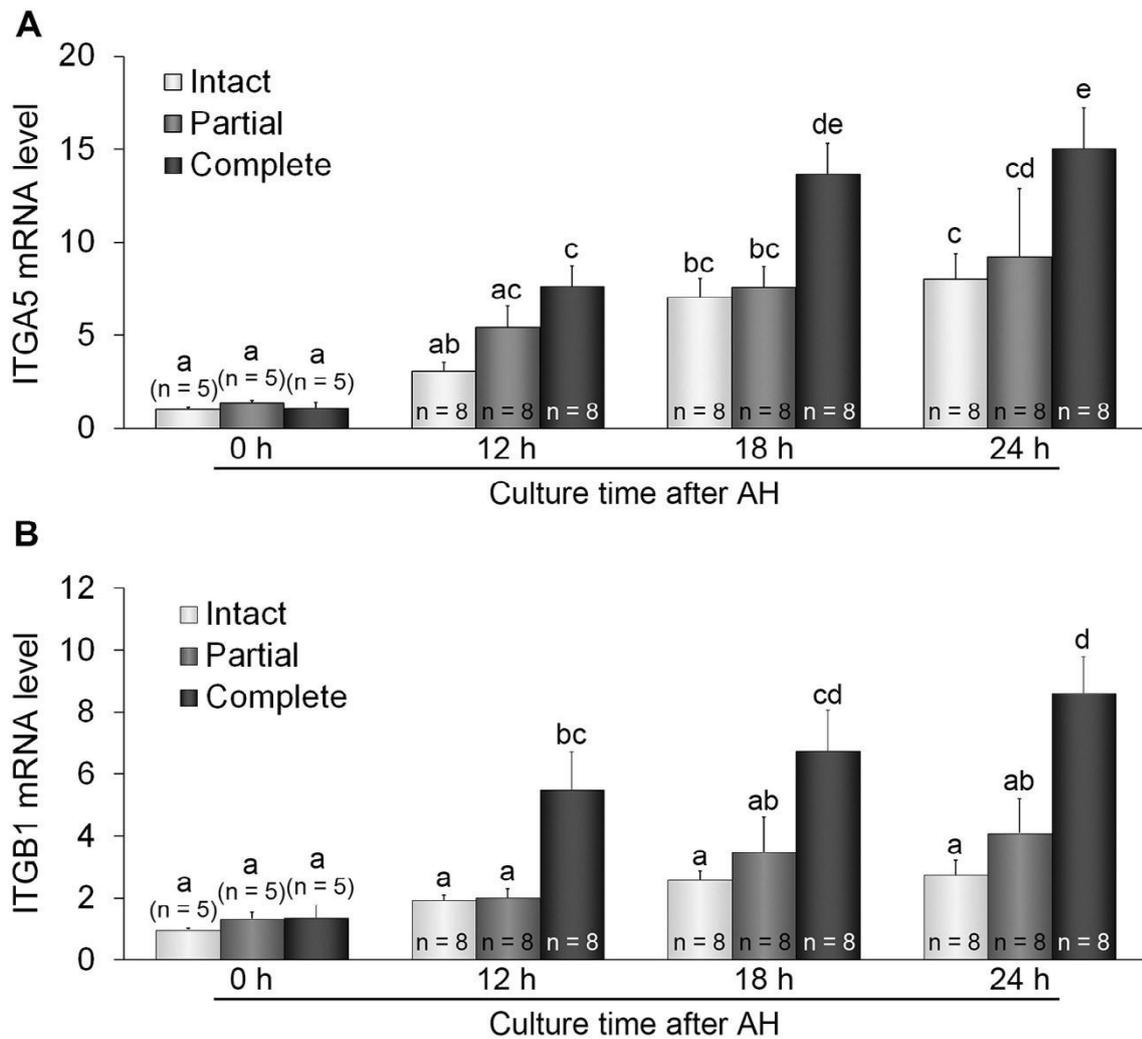


図 3-4. アシステッドハッチング後の胚盤胞におけるインテグリン mRNA の発現量の比較

A) アシステッドハッチング後の胚盤胞における ITGA5 の mRNA 発現量 B) アシステッドハッチング後の胚盤胞における ITGB1 の mRNA 発現量

グラフは平均値±標準誤差を示す。異符号間において、有意差があることを示す (P < 0.05)。

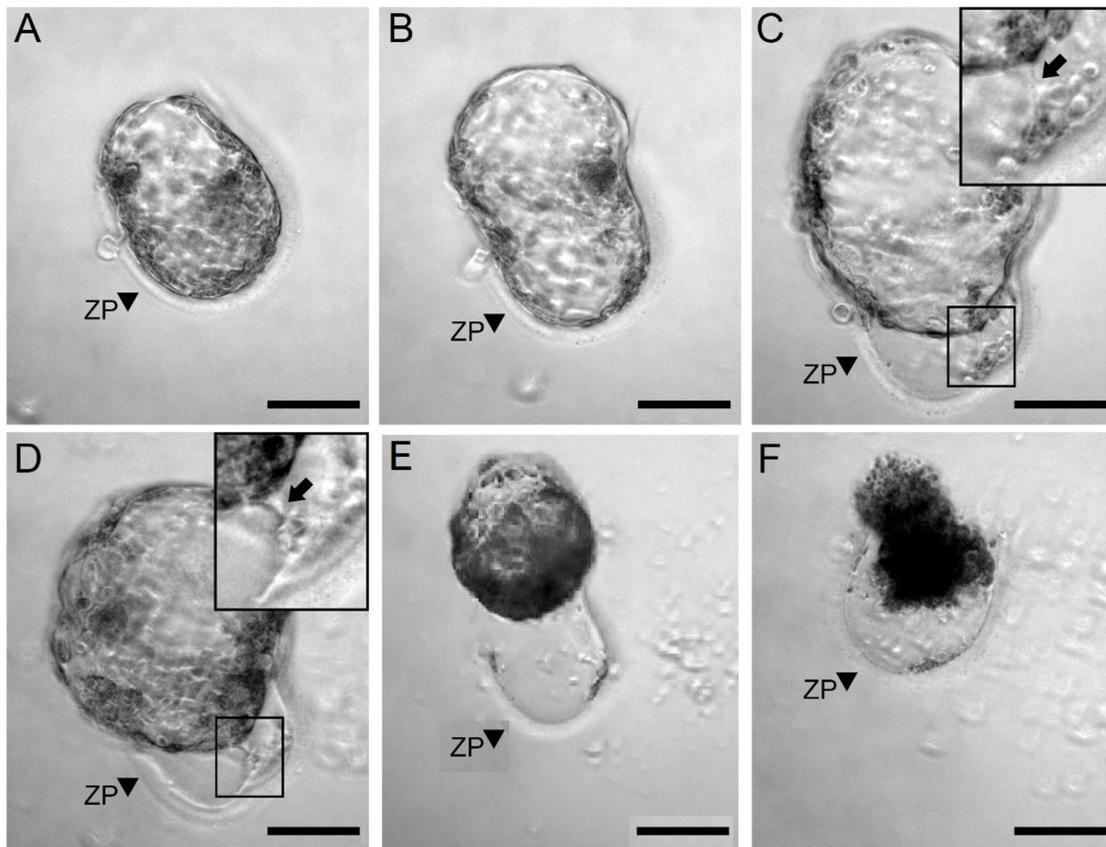


図 3-5. 透明帯の部分除去群における透明帯からの脱出不全とその後の胚の死滅

A) 透明帯部分除去後に再拡張を確認 B) 孵化中胚盤胞 C 及び D) 一時的な胚盤胞の孵化 透明帯の内側と TE にわずかではあるがつながりが確認できる E) 孵化した胚盤胞の一部が退行してきた F) 孵化胚盤胞が完全に退行し、透明帯内に戻った

Arrowhead : zona pellucida (ZP). Scale bars : 100 μ m.

3-5. 考察

これまでの報告において、凍結融解胚盤胞移植前の融解胚盤胞の透明帯を菲薄化、一部除去または完全除去することによって、臨床成績が向上することが示されている (Kinget *et al.* 2002, Wong *et al.* 2003, Sifer *et al.* 2006)。本検討は、透明帯の完全除去によって、胚盤胞のフィブロネクチンコート dish への接着率および outgrowth が改善することを示した初めての報告である。これは、透明帯の完全除去をすることによって、部分除去で起こりうる胚盤胞の透明帯脱出不全を防げたことやインテグリンの発現が増進したことが理由である。この結果から、透明帯の完全除去によって、着床の機会が増え、SCBT 時の臨床成績の向上が期待できる。

本検討の結果、透明帯の完全除去は、透明帯脱出不全を防ぐことが示された。これまで、透明帯硬化によって、胚盤胞の透明帯脱出不全が起こることが報告されていた Vincent *et al.* 1990, Cohen 1991, Manna *et al.* 2001, Ko *et al.* 2008。本検討においても、Intact 群において 90%の胚盤胞が透明帯脱出不全を起こしていた。さらに、これまでの報告

(Wong *et al.* 2003) と同様に透明帯部分除去によって、透明帯脱出率の向上が本検討においても認められた。しかし、透明帯部分除去を行ったにも関わらず、30%以上の胚盤胞において透明帯脱出不全が見られた (図 3-5)。この現象は、胚移植後の母体内においても起こりうる。よって、透明帯の完全除去は、胚盤胞の着床の機会を増加させる効果があると考えられる。

また、本検討では、透明帯の完全除去によって、フィブロネクチンへの接着とその後の outgrowth が改善することが示された。胚盤胞の栄養外胚葉は通常、トロホブラスト細胞へと分化し、子宮内へと侵入し、着床する (Wang *et al.* 2003)。胚盤胞の outgrowth assay は、この過程を模したものであり、胚の子宮への着床能を反映させることができる方法である (Sherman *et al.* 1975, Glass *et al.* 1979, Wang *et al.* 2002)。フィブロネクチンコート dish を用いた胚盤胞の outgrowth assay において、Complete 群は、Partial 群に比べて、接着率の改善、接着までに要した時間の短縮が起こることが示され、検討 1 と同様に Complete による臨床成績の改善が示唆された。

インテグリンは、着床時に子宮内膜の上皮細胞に発現することが知られている (Sutherland *et al.* 1993, Kaneko *et al.* 2011a, Kaneko *et al.* 2011b) 栄養外胚葉においてインテグリンは、胚盤胞の子宮内膜上皮への接着に関与する。また、子宮内膜と胚盤胞でのインテグリンの発現は、着床が成立する上で欠かせないものである。インテグリン $\alpha 5$ と $\beta 1$ は、フィブロネクチンのレセプターであり、着床時に重要な役割を果たす。本検討の結果、AH 直後のすべての群の胚盤胞において、同量のインテグリン $\alpha 5$ と $\beta 1$ の発現

が確認された。ところが、AH 後 24 時間では、Complete 群のインテグリン $\alpha 5$ と $\beta 1$ の発現が、他群に比べ、有意に増加していた。胚盤胞のフィブロネクチンへの接着は、インテグリンによるアップレギュレーションによって制御されており、接着の開始後、さらに接着を強固にするためにインテグリンの発現を誘導する (Wang *et al.* 2002)。したがって、透明帯の完全除去によって、胚盤胞の栄養外胚葉が直接フィブロネクチンに接する時間が他群に比べ長くなり、その結果、インテグリンの発現量が増え、着床能が他群に比べ、改善したと考えられる。

本検討の結果、凍結融解胚盤胞移植において、透明帯の完全除去は、一部除去に比べ、着床能が改善することが示された。しかしながら、透明帯の完全除去を行う際の LAH による細胞質への物理的ダメージが懸念される。本検討において、透明帯完全除去および部分除去をレーザーシステムおよびピペッティングにて行った後の生存率を比較したところ、両群間に差は認められなかった。さらに第 2 章において、透明帯の有無は、受精率や胚発生能および妊娠率に影響を及ぼさないことを示した。よって、透明帯の完全除去を行う際の胚操作による、胚移植後の臨床成績への影響はないと考えられる。また、レーザー照射による胚へのダメージも同様に懸念される。本検討においては、透明帯へのレーザー照射をする際には、栄養外胚葉と透明帯の間を十分にとっており、レーザー照による熱が細胞質に影響がないように行った。よって、本検討におけるレーザー照射の影響は、ないと言える。

本検討の研究限界として、In vivo と In vitro における胚盤胞の透明帯からの脱出過程が異なることが挙げられる。よって、outgrowth assay による解析は、本検討のウィークポイントであるが、胚盤胞の透明帯からの脱出に関与する zona lysine などの母体由来の因子を除去し、AH の効果のみを検証できた点は強みであると言える。また、透明帯完全除去を行った胚盤胞を用いた凍結融解胚移植によって、化学流産率の増加が懸念されるため、今後、透明帯完全除去胚盤胞を用いた凍結融解移植の臨床成績について調べる必要があると言える。

本検討の結果、胚盤胞の透明帯完全除去は、胚盤胞の生存性に影響がなくさらに着床能を改善することが outgrowth モデルを用いることによって、明らかとなった。よって、凍結融解胚盤胞移植を行う際には、透明帯の完全除去を行うことによって、着床の機会が増えることが予想される。ただし、本検討は In vitro モデルを使った検討であり、今後、臨床試験を行うことによって、透明帯の完全除去が凍結融解胚盤胞移植の臨床成績に影響をおよぼすか否かを検討する必要がある。

第 4 章

体外受精胚の発生速度が単一凍結融解胚盤胞移植
における臨床妊娠率および出産率に及ぼす影響

4-1. 緒言

第3章の結果より、胚盤胞の透明帯完全除去は、胚盤胞の生存性に影響がなく、さらに着床能を改善することが *In vitro* モデルによって示された。この結果から、臨床においても単一凍結融解胚盤胞移植 (Single Cryopreserved-thawed Blastocyst Transfer: SCBT) の実施の際には、発生能が低い胚盤胞の透明帯を完全除去することにより、着床の機会を増やすことができることを示した。

SCBT 実施の際の課題の1つとして移植胚の選択基準がある。SCBT の実施において、複数個の凍結胚盤胞が保存されている場合、その中で最も臨床妊娠に至る可能性が高い胚盤胞を選択する必要がある。この移植胚の選択は、臨床妊娠率に大きく影響する。現在、臨床妊娠に至る可能性が高い胚盤胞を選択するための評価方法として、Gardner らによって報告された胚盤胞の形態を用いた方法が多く、体外受精を行う施設で用いられている (Gardner *et al.* 1999)。しかしながら、この胚盤胞の形態を用いた評価方法では、評価が観察者の主観に左右される可能性があり、より客観的な評価方法が必要である。

客観的に胚の評価を行う方法の一つとして、媒精時間を起点とする胚発生速度が利用されている。この方法はすでに、初期分割胚移植の際の移植胚の選択に用いられており、胚移植時の発生段階が進んだ胚ほど臨床妊娠率が高い傾向があることが報告されている (Ray *et al.* 1995, Check *et al.* 2001, Lee *et al.* 2012, 井上ら, 2014)。このことから、胚盤胞移植においても、発生の速い胚を選択的に移植することで、臨床妊娠率と出産率が向上する可能性が考えられる。

胚盤胞移植における胚発生速度と臨床妊娠率および出産率との相関については、これまで体系的な解析は報告されていない。Liebermann らの既報 (Liebermann *et al.* 2006) では、受精後5日目および6日目の胚盤胞の移植結果が解析されているが、この報告では媒精時間が考慮されておらず、胚発生速度と臨床妊娠率や出産率の関係の正確な解析にはなっていない。よって、胚発生速度と臨床妊娠率や出産率の関係を詳細に解析し、胚発生速度が SCBT における移植胚選択のための評価基準として適切か否かを明らかにすることは、より高い臨床

妊娠率や出産率を達成するために極めて重要である。

本章では、体外受精胚の胚盤胞への発生速度と SCBT 後の臨床妊娠率および出産率の相関を後方視的に解析し、SCBT における移植胚選択のための評価基準としての胚発生速度の妥当性について検討した。

4-2. 対象と研究デザイン

4-2-1. 対象患者

本検討では、2006年1月から2012年12月までの間にSCBTを施行した症例の中で、1)移植に供した胚盤胞の採卵時の年齢が30-44歳、2)移植に供した拡張期胚盤胞の内径が175-184 μ m、という2つの条件を満たした7679症例を対象とした。これらの症例を採卵時年齢別に30-34歳群(n=1241)、35-39歳群(n=3253)、40-44歳群(n=3185)、の3群に分けた。これらの群の臨床妊娠率と出産率の比較を行ったところ、各群間に有意差が生じた(臨床妊娠率:54.5%vs.48.0%vs.30.5%, $P < 0.05$; 出産率:47.5%vs.38.8%vs.17.9%, $P < 0.05$)。そのため、本検討では、年齢群別に後方視的解析を行った。また、本章では、媒精した時間から、各胚発育ステージまでの発生に要した時間を、胚発生速度とした。この胚発生時間の計算は、30分までは切り下げ、31分以降は切り上げて行った。

4-2-2. 検討1: 胚盤胞形成時間がSCBT後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響

検討1では、媒精から胚盤胞形成までに要した時間、すなわち胚盤胞形成時間が、SCBT後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響を調べることを目的とした。胚の体積の1/3以上に相当する胞胚腔の確認をもって胚盤胞形成とし、媒精から胚盤胞形成までに要した時間を、胚盤胞形成時間(hr)とした。SCBTを施行した症例を胚盤胞形成時間別に、119時間以下、120-129時間、130-139時間、140-149時間の4グループに分け、胚盤胞形成時間と臨床妊娠率及び出産率の関係性について解析を行った。

4-2-3. 検討2: 拡張期胚盤胞形成時間がSCBT後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響

検討2では、媒精から拡張期胚盤胞形成に要した時間すなわち拡張期胚盤胞形成時間がSCBT後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響を調べることを目的とした。本検討では、胚盤胞の内径が175-184 μ mに達したものを拡張期胚盤胞とし、媒精から拡張期胚盤胞形成までに要した時間を拡張期胚盤胞形成時間(hr)とした。SCBTを施行した症例を拡張期胚盤胞形

成時間別に、119 時間以下、120-129 時間、130-139 時間、140-149 時間、150 時間以上の 5 グループに分け、拡張期胚盤胞形成時間と臨床妊娠率及び出産率の関係性の解析を行った。

4-2-4. 検討 3：胚盤胞の拡張時間が SCBT 後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響

検討 3 では、胚盤胞形成から拡張胚盤胞形成への発生に要した時間すなわち拡張時間が SCBT 後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響を調べることを目的とした。検討 1 で記録した胚盤胞形成から検討 2 で記録した拡張期胚盤胞形成までの時間を拡張時間 (hr) とした。SCBT を施行した症例を拡張時間別に、0-9 時間、10-19 時間、20-29 時間、30 時間以上の 4 グループに分け、拡張時間と臨床妊娠率及び出産率の関係性の解析を行った。

4-3. 方法

卵巣刺激および採卵（2-3-1）、精子調整（2-3-2）、C-IVF（2-3-3）、ICSI（2-3-4）および体外培養（2-3-5）は、前章の方法に準じて行った。

4-3-1. 胚盤胞の観察、凍結保存、融解及び評価法

胚の観察は、媒精後5日目、6日目の朝、昼、夕方と7日目の朝の計7回を行った。胚の観察には、倒立顕微鏡（IX-71, Olympus, Japan）を用いて行い、胚盤胞の内径の計測には、OCTAX EyeWare™（OCTAX Microscience GmbH, Germany）によって行った。凍結保存および融解は、Cryotop法（7）を用いて行った。

4-3-2. 凍結融解胚盤胞移植及び妊娠判定

自然周期の排卵後4.5～5日目に凍結胚盤胞の融解を行った。融解後の胚盤胞は、再拡張を持って生存とし、2時間培養後胚移植に用いた。胚移植は、胚移植用カテーテル（3Fr ETカテーテル, KITAZATO, Japan）を用いて、経膈超音波ガイド下にて行った。移植胚は、ごく少量の10%ヒト血清添加mHTFとともに子宮内腔にカテーテルより射出した。胚移植後の黄体ホルモンの補充を目的として、ジドロゲステロン（デュファストン, 第一三共製薬株式会社）30mg/dayを7日間経口投与した。胚移植後約4週間後に超音波診断にて、胎嚢が確認された患者を臨床妊娠とした。妊娠9週目までは妊婦健診を行い、それ以降は分娩管理可能な施設へ紹介した。妊娠の経過及び出産の有無は、患者もしくは紹介先の施設からの書面もしくは電話にて確認した。22週以降の分娩を出産例とした。媒精から拡張期胚盤胞までにかかった経過時間が130時間（培養6日目）を超えたものに関しては、第3章の結果より、胚盤胞移植の前に透明帯を完全に除去した。透明帯の完全除去はOCTAXレーザーシステム（OCTAX Microscience GmbH, Germany）とガラス管でのピッペティングによって行った。

4-3-3. 統計解析

本検討では、胚盤胞形成時間、拡張期胚盤胞形成時間および拡張時間と臨床妊娠率と出産

率の関係性を調べるために、カイ二乗検定を用いて、各群間で比較を行った。全ての統計解析において、危険率 5%を有意差判定の基準とした。

4-4. 結果

4-4-1. 検討1：胚盤胞形成時間が SCBT 後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響

胚盤胞形成時間と SCBT 後の臨床妊娠率及び出産率に関係性があるか否かを調べるため、各胚盤胞形成時間における臨床妊娠率と出産率を比較した（表 4-1）。30-34 歳群では、119 hr 以下グループは他の胚盤胞形成時間グループに比べて、有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。一方、120-129 hr、130-139 hr、140-149 hr の 3 グループ間の臨床妊娠率には有意差が認められなかった。この結果は、出産率の比較においても同様であった。

35-39 歳群における臨床妊娠率では 119 hr 以下グループは他の胚盤胞形成時間グループに比べて、有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。また、120-129 hr グループの臨床妊娠率が 130-139 hr グループに比べて有意に低い結果となった（ $P < 0.05$ ）。同様に出産率の比較を行った結果、119 hr 以下グループは他の胚盤胞形成時間グループに比べて、有意に出産率が高かった（ $P < 0.05$ ）。120-129 hr、130-139 hr、140-149 hr の 3 グループ間の出産率に有意差は認められなかった。

40-44 歳群では、119 hr 以下グループは他の胚盤胞形成時間グループに比べて、有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。一方、120-129 hr、130-139 hr、140-149 hr の 3 グループ間の臨床妊娠率に有意差は認められなかった。この結果は、出産率の比較においても同様であった。

以上の結果、胚盤胞形成時間が 119 hr 以内であった場合、他のグループに比べ、患者年齢に関わらず臨床妊娠率と出産率が有意に高いことが示された。一方、胚盤胞形成時間が 120 hr 以上の場合、SCBT 後の臨床妊娠率および出産率は、胚盤胞形成時間に関わらず、35-39 歳群の例外を除き、ほぼ同等であった。よって、胚盤胞形成時間は、SCBT 後の臨床妊娠率および出産率との関係性は低いことが示唆された。

4-4-2. 検討2：拡張期胚盤胞形成時間が SCBT 後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響

拡張期胚盤胞形成時間と SCBT 後の臨床妊娠率及び出産率に関係性があるか否かを調べる

ために、各拡張期胚盤胞形成時間における臨床妊娠率と出産率を比較した (表. 4-2)。

30-34 歳群では、拡張期胚盤胞形成時間の短い 2 グループ (119 hr 以下グループおよび 120-129 hr グループ) は、他のより長い 3 グループ (130-139 hr、140-149 および 150 hr 以上) に比べて有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。さらに 130-139 hr グループは 140-149 hr、150 以上の 2 グループに比べて、有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。また、119 hr 以下グループと 120-129 hr グループ間、140-149 hr グループと 150 hr 以上グループ間に有意差は認められなかった。この結果は、出産率においても同様であった。

35-39 歳群では、拡張期胚盤胞形成時間の短い 2 グループ (119 hr 以下グループおよび 120-129 hr グループ) は、他のより長い 3 グループ (130-139 hr、140-149 および 150 hr 以上) に比べて有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。さらに 130-139 hr グループは 140-149 hr、150 以上の 2 グループに比べて有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。また、140hr-149hr グループは 150 hr 以上グループに比べて有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。119 hr 以下グループと 120-129 hr グループ間、140-149 hr グループと 150 hr 以上グループ間に有意差は認められなかった。この結果は、出産率においても同様であった。

40-44 歳群において、拡張期胚盤胞形成時間の短い 2 グループ (119 hr 以下グループおよび 120-129 hr グループ) は、他のより長い 3 グループ (130-139 hr、140-149 および 150 hr 以上) に比べて有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。さらに 130-139 hr グループは 140-149 hr、150 以上の 2 グループに比べて有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。また、140hr-149hr グループは 150 hr 以上グループに比べて有意に臨床妊娠率が高かった ($P < 0.05$)。119 hr 以下グループと 120-129 hr グループ間、140-149 hr グループと 150 hr 以上グループ間に有意差は認められなかった。出産率では、119 hr 以下グループと 120-129 hr グループは 130-139 hr、140-149、150 hr 以上の 3 グループに比べて有意に出産率が高かった ($P < 0.05$)。また、130-139 hr グループと 140-149 hr グループは 150 hr 以上グループに比べて有意に出産率が高かった ($P < 0.05$)。119 hr 以下グループと 120-129 hr グループ間、130-139 hr グループ と 140-149 hr グループ間の出産率に有意差は認められなかった。

以上の結果より、患者年齢に関わらず、拡張期胚盤胞形成時間が増加するに伴い、SCBT 後

の臨床妊娠率と出産率の低下が起こることが明らかとなった。すなわち、拡張期胚盤胞形成時間が短く、発生速度が速い胚盤胞ほど、SCBT後の臨床妊娠および出産率が高いことが示された。よって、拡張期胚盤胞形成時間は、患者年齢に関わらず、SCBT後の臨床妊娠率および出産率に影響を及ぼすことが示唆された。

4-4-3. 検討3：胚盤胞の拡張時間がSCBT後の臨床妊娠率及び出産率に及ぼす影響

胚盤胞の拡張時間とSCBT後の臨床妊娠率及び出産率に関係性があるか否かを調べるために、各年齢群における胚盤胞の拡張時間ごとの臨床妊娠率と出産率を比較した（表. 4-3）。

30-34歳群では、胚盤胞の拡張時間が短いグループ（0-9 hr グループおよび10-19 hr グループ）は、長いグループ（20-29 hr および30 hr 以上）に比べて有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。さらに20-29 hr グループは30以上グループに比べて、有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。また、0-9 hr グループと10-19 hr グループ間の臨床妊娠率に有意差は認められなかった。この結果は、出産率においても同様であった。

35-39歳群では、最も胚盤胞の拡張時間が短いグループ（0-9 hr グループ）は他のグループ（10-19 hr、20-29 hr、30 hr 以上）に比べて有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。さらに10-19 hr グループは20-29 hr、30以上の2グループに比べて有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。また、20-29 hr グループは30 hr 以上グループに比べて有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。この結果は、出産率においても同様であった。

40-44歳群では、胚盤胞の拡張時間が短いグループ（0-9 hr グループおよび10-19 hr グループ）は、長いグループ（20-29 hr および30 hr 以上）に比べて有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。さらに20-29 hr グループは30以上グループに比べて、有意に臨床妊娠率が高かった（ $P < 0.05$ ）。また、0-9 hr グループと10-19 hr グループ間の臨床妊娠率に有意差は認められなかった。この結果は、出産率においても同様であった。

以上の結果、患者年齢に関わらず、拡張時間の増加に伴い、SCBT後の臨床妊娠率及び出産率が低下することが明らかとなった。すなわち、拡張時間が短い胚盤胞ほど、SCBT後の臨床妊娠および出産率が高いことが示された。よって、拡張時間は、SCBT後の臨床妊娠率と出産

率の予測に影響を及ぼすことが示唆された。

表 4-1. 媒精から胚盤胞形成までに要した時間ごとの臨床妊娠率および出産率

		媒精～胚盤胞形成 (hr)			
		119 以下	120-129	130-139	140-149
CPR	30-34 歳群	58.7% a (518/882)	40.0% b (56/140)	46.1% b (71/154)	46.70% b (28/60)
	35-39 歳群	51.1% a (1157/2262)	36.9% b (137/371)	44.2% c (207/468)	41.1% bc (62/151)
	40-44 歳群	33.5% a (706/2106)	24.2% b (100/413)	26.4% b (130/493)	19.9% b (33/166)
LBR	30-34 歳群	51.8% a (457/882)	35.0% b (49/140)	38.3% b (59/154)	36.7% b (22/60)
	35-39 歳群	40.8% a (924/2262)	25.9% b (96/371)	32.1% c (150/468)	30.5% b (46/151)
	40-44 歳群	20.0% a (421/2106)	14.8% b (61/413)	14.6% b (72/493)	9.7% b (16/166)

*CPR : 臨床妊娠率 LBR : 出産率 各年齢群において、異符号間で有意差あり (P < 0.05)

表 4-2. 媒精から拡張期胚盤胞形成までに要した時間ごとの臨床妊娠率および出産率

		媒精～拡張期胚盤胞形成 (hr)				
		119 以下	120-129	130-139	140-149	150 以上
CPR	30-34 歳群	66.4% a (305/459)	66.7% a (126/189)	53.8% b (86/160)	37.5% c (153/408)	24.0% c (6/25)
	35-39 歳群	59.7% a (573/960)	56.9% a (373/656)	44.5% b (189/425)	36.0% c (413/1147)	23.1% d (15/65)
	40-44 歳群	42.6% a (338/793)	39.5% a (220/557)	27.2% b (113/415)	21.8% c (292/1341)	10.1% d (8/79)
LBR	30-34 歳群	61.4% a (282/459)	56.6% a (107/189)	44.4% b (71/160)	30.4% c (124/408)	20.0% c (5/25)
	35-39 歳群	48.6% a (467/960)	46.6% a (306/656)	32.5% b (138/425)	25.8% c (296/1147)	13.8% d (9/65)
	40-44 歳群	26.9% a (213/793)	22.6% a (126/557)	15.4% b (64/415)	12.2% b (163/1341)	6.3% c (5/79)

*CPR : 臨床妊娠率 LBR : 出産率 各年齢群において、異符号間で有意差あり (P < 0.05)

表 4-3. 拡張時間ごとの臨床妊娠率および出産率

		拡張時間 (hr)			
		0-9	10-19	20-29	30 以上
CPR	30-34 歳群	62.5% a (445/712)	57.4% a (113/197)	39.2% b (103/263)	21.7% c (15/69)
	35-39 歳群	55.2% a (1051/1905)	48.8% b (225/461)	34.5% c (240/696)	24.9% d (47/189)
	40-44 歳群	36.3% a (637/1754)	31.4% a (123/392)	23.0% b (178/774)	12.5% c (33/265)
LBR	30-34 歳群	55.1% a (392/712)	52.3% a (103/197)	30.8% b (81/263)	18.8% c (13/69)
	35-39 歳群	43.8% a (834/1905)	38.2% b (176/461)	25.4% c (177/696)	15.3% d (29/189)
	40-44 歳群	21.3% a (373/1754)	17.6% a (69/392)	14.9% b (115/774)	5.3% c (14/265)

*CPR : 臨床妊娠率 LBR : 出産率 各年齢群において、異符号間で有意差あり (P < 0.05)

4-5. 考察

これまでの報告では、体外受精卵の発生速度と胚盤胞移植後の臨床妊娠率の関係について媒精時間が考慮されていないなど詳細な解析はされていなかった。本章では、体外受精卵の発生速度と SCBT 後の臨床妊娠率および出産率の関係について後方視的に解析を行い、SCBT における移植胚選択のための評価基準の一つとして胚発生速度が適切か否かを調べることを目的とした。その結果、拡張期胚盤胞形成時間および拡張時間が、短い胚盤胞は、長い胚盤胞に比べ、臨床妊娠および出産率が高くなることが示され、胚の発生速度と臨床妊娠率および出産率との間に相関があることが明らかになった。よって、胚発生速度が SCBT における移植胚選択のための評価基準として適切であることが示唆された。

本章では、拡張期胚盤胞形成時間および拡張時間が臨床妊娠率だけでなく、出産率とも相関していることが明らかとなった。これまでの報告では、Gardner 分類による形態的評価と出産率の間に相関が見られたとの報告はなく、胚発生速度による評価の精度の高さが示唆された。

また、本章において、拡張が短時間で起きた胚盤胞は、長い時間を要した胚盤胞に比べて、移植後の臨床妊娠および出産率が高かった。胚盤胞の拡張は、ナトリウムポンプを介した、胚の外部からの胞胚腔内への水分の流入および細胞数の増加によって起こるとされている (Montag *et al.* 2000, Houghton *et al.* 2003)。ナトリウムポンプによる初期胚盤胞の胞胚腔への水分流入には、細胞の代謝によって産生されるアデノシン三リン酸 (ATP) が必要である。同様に細胞数の増加のための細胞分裂にも ATP が必要である。よって、胞胚腔の拡張が、速やかに進むためには、活発な細胞代謝による多くの ATP の産生が必要である。さらに ATP 産生量の多い胚は、その後の胚発生も良好であることが報告されている (Van Blerkom *et al.* 1995, Yamanaka *et al.* 2011)。以上のことより、胞胚腔の拡張が短時間で起こった胚盤胞は、細胞の代謝が活発であったため、ATP 産生量も多く、移植後の臨床妊娠率および出産率が、胞胚腔の拡張に時間を要した胚盤胞に比べて、高くなったと考えられる。

一方、媒精から胚盤胞形成までに要した時間と臨床妊娠率および出産率との関係を調べた結果、胚盤胞形成時間は、胚盤胞の評価の一因にはなり得ないことが示唆された。胚盤胞は、

収縮を繰り返していることが知られており、初期胚盤胞にて収縮が起きた場合、胞胚腔が確認できなくなることが多い (Niimura 2003)。本検討において観察時に初期胚盤胞の胞胚腔が収縮によって確認できなかった可能性がある。そのため、胞胚腔形成時間が不正確になり、その結果、臨床妊娠率および出産率との関係性が認められなかったと考えられる。

本検討の研究限界は、タイムラプス観察機能を搭載したインキュベーターを使用していないため受精後の前核形成から胚盤胞の発生までの時間を正確に測定することはできていないことである。今後、タイムラプスによる観察を行うことでより正確に発生速度と臨床妊娠および出産率との関係性を調べることが可能になると考えられた。

本章の結果、拡張期胚盤胞形成時間および拡張時間を SCBT における移植胚選択のための評価基準として用いることが適切であることが示唆された。これまでに客観的な胚盤胞の評価方法として、胚盤胞の内径 (加藤ら 2010, Du *et al.* 2016) が報告されている。よって、採卵時の年齢、拡張期胚盤胞形成時間、拡張時間および胚盤胞の内径を組み合わせ、客観的な胚盤胞の評価を行うことにより、観察者による差のない、正確な SCBT における移植胚選択のための評価基準になり得ると考えられる。この評価基準を用いた場合の実際の臨床妊娠率や出産率を患者に提供することにより、妊娠に対する高齢患者の過度な期待や若年患者の過剰な心配などを取り除くことができると考えられる。さらにこれは、客観的なデータに基づいているため、医療者側にとっても患者への説明が容易であり、診療の手助けとなると考えられる。

第 5 章

単一凍結融解胚盤胞移植における母体年齢および
妊娠極初期 β -hCG 値を
用いた妊娠予後の予測に関する検討

5-1. 緒言

第 2-4 章において、単一凍結融解胚盤胞移植 (SCBT) の有用性の検証と実施に際する方法の改善を行った。しかしながら、SCBT 後の妊娠予後に関するデータは、これまで報告されていない。そこで、本章では、SCBT 実施後の妊娠予後の推定について検討を行った。

体外受精を行った患者において胚移植後早期に妊娠予後を推定することは、その後の治療方針の決定の手助けになることや患者の不安を取り除くことに対して有用である。

妊娠予後の推定には、妊娠の維持に必須であるプロゲステロンや妊娠の維持、恥骨結合の弛緩を行うリラキシンなどのいくつかのホルモンが使われている (Witt *et al.* 1990, Hahlin *et al.* 1991)。その中でも、Human chorionic gonadotropin (hCG) のサブユニットである β -hCG は、妊娠予後の推定において最も古くから使用されており、多くの報告でその有用性が示されている (Confino *et al.* 1986, Dor *et al.* 1988, Heiner *et al.* 1992, Pearlstone *et al.* 1992)。 β hCG は栄養外胚葉によって産生され、子宮内膜の増殖及び脱落膜への分化、黄体維持、プロゲステロンの産生、合胞体性栄養膜の形成など着床期と初期の妊娠維持に重要な役割を果たしている (Yang *et al.* 2003, Ticconi *et al.* 2007, Licht *et al.* 2007, Cole *et al.* 2010)。体外受精を行う多くの施設で、尿中もしくは血中の β hCG 濃度が妊娠の指標として使用されており、妊娠後継続して β hCG 値を測ることにより、多胎妊娠、子宮外妊娠や流産の推定を行うことも可能である (Alam *et al.* 1999, Urbancsek *et al.* 2002)。しかしながら、血中 β hCG は、採卵時の卵母細胞成熟のトリガーとして使用した hCG の残存による偽陽性反応がでてしまうことやその検出感度から胚盤胞移植では移植後 9-12 日目、初期分割期胚移植では移植後 12-14 日目に測定されてきた (Bjercke *et al.* 1999, Poikkeus *et al.* 2002)。それ故、妊娠予後の推定までに時間がかかり、なるべく早期にすべき次の治療方針決定が遅くなりがちであった。

近年、hCG の測定機器が進歩したことにより、胚移植後早期の血中 β hCG 値による妊娠予後の推定が可能であることが報告された (Papageorgiou *et al.* 2001, Shapiro *et al.* 2012)。これらの報告は、複数個の胚盤胞を移植しているケースと採卵時の卵母細胞成熟のトリガー

として hCG を使用しているケースが含まれている。尿中もしくは血中の β hCG 値は、着床した胚の数に依存しており、多胎妊娠の β hCG 値は単胎妊娠のそれより高いことが知られている (Urbancsek *et al.* 2002)。また、外因性の hCG は、注射後 7-11 日間は体内に残ると言われている (Stenman *et al.* 1997)。よって、これまでの早期の β hCG 値が胚盤胞移植後の妊娠予後を推定するという報告は、複数胚を移植していることと採卵時の卵母細胞成熟のために hCG の注射を行っていることから、正確ではなく、いまだに早期の β hCG 値と産児率の関係は不透明である。さらに、母体年齢は胚の着床や胎児の成長に大きく影響を与える因子であり、妊娠の推定を行う際には β -hCG だけでなく、母体年齢も加味すべきである。実際に母体年齢と胚移植後 14-16 日目の β -hCG 値を組み合わせることで妊娠の推定がより正確にできることが報告されている (McCoy *et al.* 2009)。

本研究では、外因性の hCG が無い状態である SCBT 後 7 日目の β -hCG 値と母体年齢を組み合わせることで妊娠予後が推定できるかどうか検討を行った。

5-2. 対象と研究デザイン

5-2-1. 対象患者

本研究では、2004-2011年において、SCBTを行った21,882症例のうち下記のa-cの基準全てを満たした14,642症例を対象とし、後方視的に解析を行った。(a: SCBT後7日目の β hCG値が1.0 mIU/ml以上 b: 母体の採卵時年齢が44歳以下 c: 妊娠予後の追跡が可能である)。なお、本研究では多胎妊娠の症例は除外している。また、本研究では、第4章と同様に症例を採卵時の母体年齢別に34歳以下群(21-34歳, n=3,832,)、35-39歳群(n=6,521)、40-44歳群(n=4,238)の3群に分け、解析を行った。

5-2-2. 検討1: SCBT後7日目の血中 β hCG値および母体年齢によって分類した際の臨床妊娠率および出産率の解析

検討1では、SCBT後7日目の血中 β hCG値および母体年齢が臨床妊娠および出産に及ぼす影響を調べることを目的とした。3つの年齢群をさらにSCBT後7日目の β hCG値によって、1.0-4.9、5.0-9.9、10.0-19.9、20.0-29.9、30.0-39.9、40.0-49.9、50.0-59.9、60.0-69.9、70.0-79.9、80.0 mIU/ml以上の10区に細分化し、それぞれの年齢群における各 β hCG値区の臨床妊娠率および出産率を調べ、 β hCG値および母体年齢の相関を解析した。また、 β hCG値の各区において、臨床妊娠率および出産率を年齢群間で比較した。

5-2-3. 検討2: SCBT後7日目の血中 β hCG値からの臨床妊娠および出産予測のカットオフ値の解析

検討2では、SCBT後7日目における臨床妊娠および出産予測の最適なカットオフ値の探索を目的とし、 β hCG値5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 mIU/mlをカットオフ値とした際の陽性的中率(ある検査において「陽性と判定された場合に、真の陽性である確率」、陰性的中率(ある検査において「陰性と判定された場合に、真の陰性である確率」)およびYouden index(カットオフ値の設定に用いる)を年齢群別に算出した。

5-2-4. 検討3：SCBT後7日目の β hCG値および母体年齢と子宮外妊娠および化学流産の関係についての解析

検討3では、母体年齢とそれぞれの初期 β hCG値に関連性を調べることを目的とし、各母体年齢群における子宮外妊娠または化学流産となった症例の初期 β hCG値を解析した。子宮外妊娠（Ectopic pregnancy: EP区）および化学流産（ β hCG値が1.0 mIU/ml以上測定されたがその後胎嚢が認められなかった症例, Biochemical pregnancy loss: BPL区）に至った症例のSCBT後7日目の β hCG値を、臨床妊娠（Clinical pregnancy: CP区）または出産（Live birth: LB区）に至った症例のそれと比較し、さらにそれぞれの妊娠予後における年齢群間で β hCG値の比較を行った。

5-3. 方法

卵巣刺激および採卵 (2-3-1)、精子調整 (2-3-2)、G-IVF (2-3-3)、ICSI (2-3-4)、体外培養 (2-3-5)、凍結保存法 (2-3-6)、凍結融解胚盤胞移植及び妊娠判定 (4-3-2) は、前章の方法に準じて行った。

5-3-1. β hCG 値の測定

単一凍結融解胚盤胞移植後の β hCG 値の測定には Enzyme Immunoassay System (TOSOH BIOSCIENCE, Japan) を用いて行った。測定前には 6 点較正を行った。

5-3-2. 統計解析

SCBT 後 7 日目の β hCG 値と臨床妊娠率および出産率との相関関係の解析には、コクラン-アーミテージ傾向検定を用いた。また、各 β hCG 値区における年齢群間の臨床妊娠率および出産率の比較には、カイ二乗検定を用いた。妊娠予後間の SCBT 後 7 日目の β hCG 値の比較では、マンホイットニーの U 検定とクラスカルウォリス検定を用いて検定を行った。全ての統計解析は、危険率 5% で行った。

5-4. 結果

5-4-1. 検討1：SCBT 後7日目の血中 β hCG値および母体年齢にて分類した際の臨床妊娠率および出産率の解析

検討1では、SCBT 後7日目の血中 β hCG値および母体年齢が臨床妊娠および出産に及ぼす影響を調べることを目的とした。結果を表5-1に示した。

年齢群ごとにSCBT 後7日目の β hCG値と胚移植結果の相関を解析したところ、SCBT 後7日目の β hCG値と臨床妊娠率および出産率の間に正の相関が認められた($P < 0.05$)。よって、SCBT 後7日目の β hCG値が高い場合、臨床妊娠および出産率が低い場合に比べ、高くなることが示された。

また、 β hCG値の各区において、臨床妊娠率を年齢群間で比較した。その結果、 β hCG値が60 mIU/ml 以上の場合、年齢群間に有意差は見られず、初期の β hCG値が高ければ、年齢関わらず、臨床妊娠に至る可能性が高いことが示された。

一方、60.0未満の場合、40-44歳群は、1.0-4.9の例外を除き、他の若い群に比べて、有意に臨床妊娠率が低かった($P < 0.05$)。さらに β hCG値が5.0-9.9、10.0-19.9、20.0-29.9の場合、35-39歳群は30-34歳群に比べて有意に臨床妊娠率が低かった($P < 0.05$)。

この結果、SCBT 後7日目の β hCG値の初期値が高いと臨床妊娠率は増加するが、 β hCG値が60 mIU/ml 未満の場合、それは年齢に依存していることが示された。

さらに β hCG値の各区において、出産率を年齢群間で比較した。その結果、1.0-4.9と30.0-39.9の例外を除き、各 β hCG値区の出産率において、すべての年齢群間に有意差が認められた($P < 0.05$)。これは、臨床妊娠率では、 β hCG値が60 mIU/ml 以上の場合、年齢群間に有意差は見られなくなったが、それとは異なる結果となった。よって、 β hCG値の初期値が高いと臨床妊娠率と同様に出産率も増加するが、その出産率は年齢によって、大きく異なることが示された。

以上の結果、SCBT 後初期の血中 β hCG値と患者年齢を組み合わせることによって、SCBT 後の臨床妊娠率および出産率を推定できることが示唆された。

5-4-2. 検討2：SCBT後7日目の血中 β hCG値からの臨床妊娠および出産予測のカットオフ値の解析

検討2では、SCBT後7日目における臨床妊娠および出産予測の最適なカットオフ値を設定することを目的とし、 β hCG値5.0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0 mIU/mlをカットオフ値した際のPPV、NPVおよびYouden's indexを調べた。

臨床妊娠および出産におけるPPV、NPVおよびYouden's indexを表5-2および表5-3にそれぞれ示した。

患者年齢が39歳以下（30-34歳群および35-39歳群）においては、臨床妊娠および出産の予測の両方においてカットオフ値が30 mIU/mlの場合でもっともYouden's indexが高くなった。よって、患者年齢が39歳以下の場合、30 mIU/mlが臨床妊娠および出産の予測のためのカットオフ値になり得ることが示唆された。一方、40-44歳群において、臨床妊娠予測のカットオフ値が20および30 mIU/mlにおいてもっとも高いYouden's indexが得られ、39歳以下のそれと同じであった。しかし、出産予測のカットオフ値40 mIU/mlにおいてもっとも高いYouden's indexが得られた。よって、出産予測のカットオフ値は、39歳以下と40歳以上で異なることが示された。

以上の結果より、SCBT後7日目の血中 β hCG値から臨床妊娠予測をする場合、カットオフ値として30 mIU/mlが適していることが示された。一方、出産予測する際のカットオフ値は、39歳以上では、30 mIU/mlとなり、40歳以上では、40 mIU/mlとなった。よって、出産予測のための、SCBT後7日目の血中 β hCG値のカットオフ値は、年齢に依存することが示された。

5-4-3. 検討3：SCBT後7日目の β hCG値および母体年齢と子宮外妊娠および化学流産の関係についての解析

SCBT後7日目の β hCG値および母体年齢の子宮外妊娠または化学流産との関係を調べるために、子宮外妊娠および化学流産となった症例の初期 β hCG値を解析した。

表5-4にSCBT後7日目における β hCG値を胚移植結果別に比較したものを示した。

妊娠予後間で β hCG値の比較を行った結果、BPL区およびEP区の β hCG値は、CP区のそれと比べて、有意に低くなった ($P < 0.05$)。また、LB区の β hCG値は、他の全ての区と比べ、有意に高い値となった ($P < 0.05$)。よって、化学流産や子宮外妊娠に至る症例は、SCBT後7日目の β hCG値が臨床妊娠や出産に至る症例より、低くなることが明らかとなった。

また、BPL区とEP区において年齢群間で β hCG値を比較した。BPL区では、年齢群間で有意差は認められなかった。一方、EP区では、30-34歳群の β hCG値は35-39歳群および40-44歳群に比べて有意に低いことが明らかとなった ($P < 0.05$)。よって、SCBT後7日目の β hCG値からEPを予測する場合は、年齢も加味する必要があることが示された。

以上の結果より、BPLもしくはEPとなった症例のSCBT後7日目の β hCG値は臨床妊娠に至った症例よりも有意に低いことが示された。よって、SCBT後7日目の β hCG値が、低値を示した場合、BPLおよびEPを考慮し、患者に妊娠の経過を説明する必要があることが示唆された。

表 5-1. 母体年齢にて層化を行った際の SCBT 後 7 日目における β hCG 値と臨床妊娠率
および出産率

グループ	SCBT 後 7 日目の β hCG 値 (mIU/ml)										P*	
	1.0-4.9	5.0-9.9	10.0-19.9	20.0-29.9	30.0-39.9	40.0-49.9	50.0-59.9	60.0-69.9	70.0-79.9	≥ 80		
CPR	30-34 歳 群	1.8% ^a (5/271)	18.4% ^a (40/217)	41.8% ^a (155/371)	67.2% ^a (270/402)	83.7% ^a (340/406)	93.7% ^a (402/429)	97.4% ^a (455/467)	98.1% ^a (411/419)	98.4% ^a (305/310)	98.5% ^a (532/540)	P < 0.05
	35-39 歳 群	2.4% ^b (15/622)	10.7% ^b (45/422)	34.3% ^b (232/676)	64.1% ^b (442/690)	84.9% ^a (567/668)	91.5% ^a (653/714)	95.9% ^{ab} (662/690)	97.9% ^a (607/620)	97.8% ^a (491/502)	99.0% ^a (908/917)	P < 0.05
	40-44 歳 群	1.2% ^{ab} (8/663)	7.0% ^c (32/457)	26.5% ^c (150/567)	55.4% ^c (242/437)	76.5% ^b (326/426)	87.5% ^b (344/393)	94.0% ^b (359/382)	96.7% ^a (293/303)	94.6% ^a (212/224)	98.2% ^a (379/386)	P < 0.05
LBR	30-34 歳 群	1.5% ^a (4/271)	10.6% ^a (23/217)	26.1% ^a (97/371)	50.0% ^a (201/402)	64.5% ^a (262/406)	79.3% ^a (340/429)	84.8% ^a (396/467)	87.1% ^a (365/419)	87.4% ^a (271/310)	93.7% ^a (506/540)	P < 0.05
	35-39 歳 群	0.8% ^a (5/622)	3.6% ^b (15/422)	17.2% ^b (116/676)	39.0% ^b (269/690)	59.4% ^a (397/668)	66.8% ^b (477/714)	75.7% ^b (522/690)	82.6% ^b (512/620)	84.3% ^b (423/502)	87.9% ^b (806/917)	P < 0.05
	40-44 歳 群	0.6% ^a (4/663)	1.5% ^c (7/457)	9.5% ^c (54/567)	20.8% ^c (91/437)	30.5% ^b (130/426)	47.6% ^c (187/393)	58.1% ^c (222/382)	66.3% ^c (201/303)	64.3% ^c (144/224)	76.2% ^c (294/386)	P < 0.05

*コクランアーミテージ傾向検定, 異符号間で有意差あり (年齢群間, P < 0.05)

B-hCG : β -human chorionic gonadotropin; CPR (clinical pregnancy rate) : 臨床
妊娠率; LBR (live birth rate) : 出産率

表 5-2. SCBT 後 7 日目の各 β hCG 値の臨床妊娠に対する、陽性的中率、陰性的中率
 および Youden' s index

	patients group	Cut-off value						
		5.0 mIU/ml	10 mIU/ml	20 mIU/ml	30 mIU/ml	40 mIU/ml	50 mIU/ml	60 mIU/ml
PPV	30-34 歳群	0.817	0.858	0.913	0.951	0.972	0.981	0.983
	35-39 歳群	0.781	0.833	0.902	0.946	0.965	0.978	0.984
	40-44 歳群	0.654	0.739	0.845	0.905	0.940	0.960	0.968
NPV	30-34 歳群	0.982	0.908	0.767	0.627	0.514	0.422	0.349
	35-39 歳群	0.976	0.943	0.830	0.695	0.577	0.485	0.416
	40-44 歳群	0.988	0.964	0.887	0.797	0.703	0.626	0.561
Youden' s Index	30-34 歳群	0.288	0.468	0.650	0.701*	0.657	0.548	0.405
	35-39 歳群	0.316	0.505	0.689	0.724*	0.654	0.545	0.417
	40-44 歳群	0.343	0.553	0.710*	0.710*	0.623	0.503	0.362

* : 各年齢群でもっとも Youden' s index が高値

B-hCG, β -human chorionic gonadotropin; SCBT (single cryopreserved-thawed blastocyst transfer) : 単一凍結融解胚盤胞移植; PPV (positive predictive value) : 陽性的中率; NPV (negative predictive value) : 陰性的中率

表 5-3. SCBT 後 7 日目の各 β hCG 値の出産に対する、陽性的中率、陰性的中率
 および Youden' s index

	patients group	Cut-off value						
		5.0 mIU/ml	10 mIU/ml	20 mIU/ml	30 mIU/ml	40 mIU/ml	50 mIU/ml	60 mIU/ml
PPV	30-34 歳群	0.691	0.729	0.787	0.832	0.867	0.886	0.900
	35-39 歳群	0.600	0.643	0.709	0.763	0.796	0.829	0.854
	40-44 歳群	0.372	0.424	0.497	0.557	0.621	0.665	0.700
NPV	30-34 歳群	0.985	0.945	0.856	0.742	0.648	0.558	0.484
	35-39 歳群	0.992	0.981	0.921	0.832	0.739	0.663	0.598
	40-44 歳群	0.994	0.990	0.961	0.927	0.888	0.839	0.791
Youden' s Index	30-34 歳群	0.194	0.326	0.487	0.553*	0.552	0.479	0.370
	35-39 歳群	0.206	0.338	0.493	0.559*	0.538	0.482	0.391
	40-44 歳群	0.224	0.374	0.510	0.561	0.565*	0.496	0.385

* : 各年齢群でもっとも Youden' s index が高値

B-hCG, β -human chorionic gonadotropin; SCBT (single cryopreserved-thawed blastocyst transfer) : 単一凍結融解胚盤胞移植; PPV (positive predictive value) : 陽性的中率; NPV (negative predictive value) : 陰性的中率

表 5-4. 各妊娠予後における SCBT 後 7 日目の各 β hCG 値の比較

胚移植結果 (n)	平均 β hCG 値 \pm SD (range)				p 値 (臨床妊娠との比較)
	All	30-34 歳群	35-39 歳群	40-44 歳群	
生産 (LB, 7, 342)	61.1 \pm 27.6 (1.3-210.2)	59.9 \pm 27.2 (3.2-186.6)	61.8 \pm 27.8 (2.7-198.0)	61.3 \pm 27.6 (1.3-210.2)	< 0.05
化学流産 (BPL, 1, 522)	28.7 \pm 17.9 (2.1-84.6)	29.0 \pm 21.4 (2.1-84.6)	28.2 \pm 16.7 (7.4-83.5)	29.2 \pm 16.7 (2.1-72.8)	< 0.05
子宮外妊娠 (EP, 52)	14.2 \pm 12.9 (1.6-55.5)	6.6 \pm 6.5 (1.6-23.1) ^a	14.2 \pm 11.9 (1.6-42.9) ^b	18.9 \pm 15.3 (1.9-55.5) ^b	< 0.05
臨床妊娠 (CP, 9, 883)	57.0 \pm 27.6 (1.1-156.0)	57.4 \pm 27.3 (3.0-186.6) ^a	57.9 \pm 28.0 (1.1-198.0) ^a	54.5 \pm 27.3 (1.3-210.2) ^b	-

異符号間で有意差あり (P < 0.05)

B-hCG : β -human chorionic gonadotropin;

SD (standard deviation) : 標準偏差;

5-5. 考察

本研究より、妊娠や出産の可能性を患者に説明する際には β hCG 値だけでなく、母体年齢も考慮する必要があることが示された。本研究は、大規模なデータを後方視的に解析した研究であり、既報 (Shamonki *et al.* 2009) と同様の結果であるが、より早期の β hCG 値と SCBT のみを扱っている点は異なっている。この結果は、今後 SCBT の実施が他の IVF 施設で増えた際に非常に有用なデータになると考えられる。

本研究は SCBT のみを用いて、早期の β hCG 値および母体年齢と妊娠予後の関係性を調べた最初の研究である。これまでの報告では、複数胚移植や卵母細胞成熟のために外因性の hCG を用いている症例が含まれている (Bjercke *et al.* 1999, Van den Abbeel *et al.* 2013)。そのため、既報では、一つの胚が着床した際の早期の β hCG 値と妊娠予後の関連性は不透明であった。本研究では、SCBT のみを自然排卵後 4.5-5 日目もしくはホルモン補充周期で行っている。そのため、着床した胚一つあたりの β hCG 値を正確に検出することができ、その結果、SCBT 後 7 日目の β hCG 値によって妊娠予後を推定できることが示唆された。

本研究により、既報 (Urbancsek *et al.* 2002, Shapiro *et al.* 2012) と同様に血中 β hCG 値と臨床妊娠および出産率に正の相関があることが示された。SCBT 後 7 日目の時点で β hCG 値が低い症例は、臨床妊娠率および出産率共に低い傾向が見られた。Van den abbeel らは、形態的評価が低グレードの胚盤胞は、高グレードの胚盤胞よりも移植後の β hCG 値が低値になりやすく、着床に至らないことが多いことを報告している (Van den Abbeel *et al.* 2013)。さらに Alfarawati らは胚盤胞の形態的評価が低グレードの場合、その胚の染色体異常率が高いことを報告している (Alfarawati *et al.* 2011)。これらの既報と本研究の結果から、移植した胚盤胞の栄養外胚葉が染色体異常を起こし、異常を来たしている場合、SCBT 後 7 日目の β hCG が低値になると考えられた。

また本研究では、臨床妊娠率は、SCBT 後 7 日目の β hCG 値が 60 mIU/ml 以上の場合、年齢間に有意差は見られなかったが、出産率は、 β hCG 値に関係なく、年齢が高くなると有意に低くなることが示された。染色体の異常率は母体年齢が上がると上昇すること (Liu *et al.* 2012)

が知られており、加えて妊娠初期（16週まで）に起こる自然流産の多くは胚の染色体異常が原因であると報告されている（Lathi *et al.* 2011）。これらのことより、各 β hCG値における40-44歳群の出産率が β hCG値に関わらず他群に比べて低い原因は母体年齢に起因する流産率の高さにあると言える。

本研究の結果より、SCBT後の7日目の β hCG値から臨床妊娠および出産を予測する際のカットオフ値は母体年齢に依存することが示された。現在、多くのIVF施設では、年齢によって、妊娠のカットオフ値を分けることはしていない。これは、高齢患者の過度な期待や若年患者の過剰な心配を生むと考えられる。よって、年齢によって、カットオフ値を設定することによって、高齢患者の過度な期待や若年患者の過剰な心配を取り除くことができると考えられる。

また、本研究ではBPLもしくはEPとなった症例のSCBT後7日目の β hCG値は臨床妊娠に至った症例よりも有意に低いことが示された。よって、早期の β hCG値が低い場合はBPLもしくはEPを疑うことも必要である。同様のことが分割胚移植において報告されている（Confino *et al.* 1986）が、SCBTにおいて初めて示すことができた。さらに子宮外妊娠に至った35歳以上の症例においてSCBT後7日目の β hCG値は34歳以下の症例に比べて有意に低いことが示された。この理由については解明できなかったが、EPを早期の β hCG値から予測するには年齢も考慮するべきだと考えられた。

本研究の研究限界は、EPの結果については症例数が少ないため、今後大規模調査が必要であることまた、本検討はSCBTのみを対象としているため他の胚移植方法には応用することができないことである。

本研究の結果、母体年齢とSCBT後7日目の β hCG値を用いることで妊娠予後の予測が行えることが示された。この方法を用いることによって胚移植後の患者に適切な情報を提供できるようになると考えられる。また、高齢患者の過度な期待や若年患者の過剰な心配を取り除くことができると考えられる。

第 6 章

総合考察

6-1. 総合考察

近年、日本では少子化が進み、平成 26 年における合計特殊出生率は 1.42 であり、過去最低であった 10 年前である平成 17 年の 1.26 から、上昇は見られている（厚生労働省 2016）ものの、以前他国と比べても低い水準である。この主な原因の一つとして挙げられるのが、晩婚化とそれに伴う、不妊症の増加である。

不妊症の増加により、補助生殖医療（ART）が盛んに行われるようになり、2014 年度の出生数 1,003,539 人のうち 4.7%にあたる 47,322 人が ART にて誕生している（日本産婦人科学会 2016）。

IVF の施行は、ART の 9 割以上を占め、主要な方法である。また、本邦では、ART によって、誕生した 47,322 人のうち 77%にあたる 36,579 人が凍結胚移植から誕生している。これは、近年の凍結融解技術の進歩により、凍結胚の生存性が向上したことから、凍結胚移植が行われる場合が多くなったからである（Cobo *et al.* 2012）。凍結胚移植に用いる胚のステージは、分割期よりも、より発生段階が進んだ胚盤胞が良いと考えられる。なぜならば、移植後の妊娠率の向上（Glujovsky *et al.* 2012）や子宮外妊娠率の低下（Fang *et al.* 2015）などから有益な点が多いからである。さらに、日本生殖医学会より、多胎妊娠防止のための移植胚数ガイドラインが出され、1 個の胚を移植に供する単一胚移植も同様に IVF 治療において重要な役割を担っている（日本生殖医学会倫理委員会, 2007）。よって、凍結融解胚盤胞を 1 個移植に供する SCBT が今後 ART を行う上で重要な役割を担うと考えられる。

これまで、SCBT に関する臨床データの報告は少ないのが現状である。なぜならば、凍結融解胚盤胞移植に関する多くの報告が複数胚移植と単一胚移植の結果を明確に区別していないためである。よって、SCBT のみのデータを取り扱った報告が少なく SCBT のデータを体系的に解析し、その知見を臨床に反映させることにより、IVF の成功率が向上すると考えられる。

SCBT の有用性について、これまでにいくつか報告がされている。その有用性として、反復不成功症例の患者に SCBT を適応することで、臨床妊娠率が増加することが報告されている（Shapiro *et al.* 2011, Shapiro *et al.* 2014）。特に、新鮮胚盤胞移植で臨床妊娠に至らなかった症例は、次周期以降に同様に新鮮胚盤胞移植を行った場合、その臨床妊娠率は低いこ

とが報告されている (Shapiro *et al.* 2011)。これは卵巣刺激による子宮内膜の胚の受容能の低下が起こることが原因であり、SCBT の利用によって、臨床妊娠率の改善が見られる (Shapiro *et al.* 2014)。また、SCBT の有用性として、分割胚移植や新鮮胚移植に比べて、子宮外妊娠率が低いことが報告されている。この理由として、胚盤胞の体積が分割胚に比べて、大きいことため子宮内で移動しにくいこと (Chang *et al.* 2010) や胚盤胞の着床までの時間が短いことため胚の移動が起こるに着床すること (Ishihara *et al.* 2011)、また、新鮮胚移植よりも着床環境が整っているため着床が速やかに起こることなどが挙げられている (Jun *et al.* 2007)。本研究の第 1 章では、透明帯損傷卵母細胞に対して、zona-free ICSI を行い、胚盤胞まで培養することで正常な卵母細胞と同等の受精率、分割率および胚盤胞発生率が得られ、さらに SCBT 後の臨床妊娠率、流産率および出産率も同等であることを示した。これは、透明帯の無い通常なら廃棄してしまう卵母細胞でも体外で胚盤胞まで培養を行うことで、有効に IVF に利用することができることを示し、これは IVF からの出産率の増加に貢献すると考えられる。これは、SCBT の新しい有用性であり、SCBT を促進する一つのエビデンスになり得ると考えられる。

SCBT を実施する際に透明帯の除去もしくは菲薄化を行い、着床を補助するアシステッドハッチング (AH) を行うことがある。AH は 1992 年に Cohen らによって初めて報告された (Cohen *et al.* 1992)。それ以降、凍結融解胚盤胞移植症例および反復不成功症例に対して、胚移植前の AH の施行が有用であると報告された (Mansour *et al.* 2000, Valojerdi *et al.* 2008, Carney *et al.* 2012)。しかしながら、AH の有効性に対して、否定的な報告もあった (Sifer *et al.* 2006, Ren *et al.* 2013)。2014 年にアメリカ生殖医学会から、AH に関してこれまでに出生率の向上が促進したというエビデンスが得られていないため、IVF を行った患者全員に適応すべきではないとの見解が出され (ASRM 2014)、AH に関してさらなる研究であることが示された。本研究の第 3 章において、透明帯の完全除去によって、胚盤胞のフィブロネクチンコート dish への接着率および outgrowth が改善することを初めて示した。これは、透明帯の完全除去をすることによって、部分除去で起こりうる胚盤胞の透明帯脱出不全を防げたことが理由の一つである。今回の結果から、これまでに報告されている AH の方法である透明

帯の部分除去や菲薄化を行っても、透明帯脱出不全が起こる可能性が考えられる。よって、これまで AH の有用性に対して、否定的な結果が得られた報告では、胚盤胞が透明帯脱出不全を起こし、孵化補助が成されなかったために良い結果が得られなかった可能性がある。以上のことより、AH の効果を正確に検討する際には完全に透明帯をはずす必要があることが示唆される。今後、この透明帯完全除去胚盤胞の移植を実施していき、臨床妊娠率の向上が見られるか検討を行う必要がある。

SCBT 実施の際には、凍結保存中の胚盤胞が複数ある場合、最も着床が期待できる胚盤胞を 1 つ選択し、移植に供する必要がある。胚盤胞の評価方法は、多くの施設において Gardner によって報告された形態的評価が用いられている (Gardner *et al.* 1999)。Gardner 分類は胚盤胞の拡張、内部細胞塊 (ICM)、栄養外胚葉 (TE) の 3 つを基準にして行う。胚盤胞の拡張は、初期胚盤胞 (胞胚腔形成) から完全孵化胚盤胞までの 6 段階で評価を行い、ICM および TE は、細胞の密集の度合いによりそれぞれ 3 段階で評価される。この評価方法は、観察した胚盤胞の形態によって、評価をするため、観察者によってその評価が変わる可能性がある。よって、より客観的で精度の高い胚盤胞の評価方法を確立する必要があるといえる。客観的な胚の評価方法としてこれまでに報告されているものとして、電気化学的計測法により、ミトコンドリアの呼吸量を測定し、胚の評価に用いる方法 (Goto *et al.* 2010)、細胞によって代謝される分子を解析し、胚の評価を行うメタボローム解析 (Hardarson *et al.* 2012) などがある。胚の呼吸量の測定やメタボローム解析による評価は、すでにヒトにおいて、胚移植後の妊娠率と相関関係が得られており、その有用性が証明されている (Goto *et al.* 2010, Hardarson *et al.* 2012)。しかし、これらの方法には、測定するための機器が必要となる。

本研究の第 4 章では、媒精から拡張期胚盤胞形成に要した時間および初期胚盤胞から拡張期胚盤胞形成に要した時間が、短い胚盤胞は、長い胚盤胞に比べ、臨床妊娠および出産率が高くなることを示し、胚の発生速度と臨床妊娠率および出産率との間に相関があることが明らかにした。この胚の発生速度を利用する方法は、客観的な指標に基づいた方法であり、観察者の差異による評価の変化がない簡便な方法である。さらに高価な機器も必要なく、臨床非常に有用な方法であるといえる。胚盤胞の評価は移植胚決定に必要不可欠であるため、

今後、様々な客観的な指標を組み合わせ、それに基づいた評価方法を作製していくことが重要になると考えられた。

胚移植を行った際の妊娠予後の予測は臨床上非常に重要である。なぜならば、母体を守るために子宮外妊娠や胎状奇胎の場合、迅速に処置を実施する必要があるからである。

妊娠予後の予測に関する報告は、IVF 開始当初からされている。妊娠予後の推定に用いることができるホルモンは、リラキシン (Whitt *et al.* 1990) やプロジェステロン (Hahlin *et al.* 1991)、 β -hCG (Confino *et al.* 2012) などが報告されている。これらの中で、 β hCG が臨床上の有用性がもっとも多く報告されている。

これまでに β hCG を測定することによって、臨床妊娠および出産だけでなく流産や子宮外妊娠の危険性をあらかじめ予測することができると報告されていた (Alam *et al.* 1999)。しかしながら、これまでの報告では、外因性の hCG の影響や複数胚移植が行われていた (Bjercke *et al.* 1999) ことより、移植された胚 1 個が産生する β hCG と妊娠予後の関係性は明らかになっておらず、SCBT 後の β hCG 値と妊娠予後についても明らかにされていなかった。本研究の第 5 章では、SCBT を行った際の β hCG 値と妊娠予後の関係について解析し、母体年齢を加味した移植後 7 日目の β hCG 値と臨床妊娠率および出産率に相関関係があることを示した。この結果より、移植された胚 1 個が産生する β hCG 値と妊娠予後の関係を明らかにすることができ、また、SCBT 後の患者に適切な情報を提供できるようになると考えられる。さらに、高齢患者の過度な期待や若年患者の過剰な心配を取り除くことができると考えられる。

本研究では、SCBT の実施を積極的に推進するために客観的な知見に基づいた裏付けを得るために、SCBT の有用性の評価と臨床成績向上を目的とした。本研究の結果、SCBT に関する多くのデータを蓄積することができ、透明帯損傷卵母細胞の有効利用という SCBT の新しい有用性、SCBT を行う際の AH の方法の改善、SCBT に供する移植胚の選択方法の改善および SCBT 後の妊娠予後に関する新しい知見を得ることができた。今後 SCBT を利用が増えた際にこれらのデータは非常に有用であると考えられる。SCBT の最も大きな欠点は、体外受精卵が胚盤胞まで発育し、それを凍結保存する必要があることである。よって、今後、胚発生に大きな影響を及ぼす培養液について研究を行っていく必要があると考えられた。

第 7 章

総括

8-1. 本研究の成果

胚移植は多くのステップがある ART において最終ステップであり、非常に重要な部分である。胚移植方法は胚移植のステージ、新鮮胚もしくは凍結胚の使用、移植胚数などで細かく分類されている。

採取された卵母細胞を胚盤胞まで培養を行い、得られたものを凍結保存し、その後適切な周期に融解した1つの胚盤胞を胚移植に供する SCBT は、これまで述べてきたように様々な利点があり、今後多くの施設でこの方法が活用されるようになると考えられる。今後凍結技術の向上、単一胚移植の増加また体外培養液の改良によって、SCBT を行う施設が増加することが予想される。しかしながら、これまでの報告では、SCBT のみを後方視的に解析したデータは少なく、そのデータは臨床上非常に有用になると考えられる。

本研究では、SCBT のデータを体系的に解析し、SCBT の臨床成績の向上とその有効性の評価を目的とした。

第2章では、ART を行う上で偶発的に採卵される zona-free 卵母細胞を SCBT に用いることで臨床利用できるかどうかを調べることを目的とし、ICSI を行った zona-free 卵母細胞の臨床成績と通常の卵母細胞で ICSI を行った臨床成績と比較した。その結果、zona-free 卵母細胞でも ZI 卵母細胞と同等の臨床成績を得ることができ、zona-free 卵母細胞を SCBT することで十分臨床に使用していくことが可能であることが示された。ただし、流産率と zona-free 卵母細胞の分割様式の関係については今後も注意深く観察を行っていく必要があると言える。

第3章では、胚凍結・融解によって引き起こされる透明帯硬化からの救済方法である AH の方法について検討を行った。AH は、透明帯の除去方法によって、透明帯を菲薄化する方法、透明帯の一部を切開または除去する方法、透明帯の全てを除去する方法の3種類に分けることができる。しかしながら、これらの方法の中でどの方法が最も有効な方法かは不明確である。よって、AH における最も有効的な透明帯除去方法を検証することは、SCBT の臨床成績の向上につながると考えられる。その結果、胚盤胞の透明帯完全除去は、胚盤胞の生存性に影響がなく、さらに着床能を改善することが outgrowth モデルを用いることによって、明らか

となった。よって、凍結融解胚盤胞移植を行う際には、透明帯の完全除去を行うことによって、着床の機会が増えることが予想される。ただし、本検討は In vitro モデルを使った検討であり、今後、臨床試験を行うことによって、透明帯の完全除去が凍結融解胚盤胞移植の臨床成績に影響をおよぼすか否かを検討する必要があると考えられる。

第 4 章では、胚発生速度が胚盤胞の質の評価方法の一つに成り得るかどうかを調べるために体外における胚盤胞への発生速度と凍結融解胚盤胞移植後の臨床妊娠率および出産率について後方視的に検討を行った。その結果、媒精から拡張胚盤胞への到達時間ならびに胞胚腔形成から拡張胚盤胞への到達時間を基準として用いることで胚発生速度が胚盤胞の質の評価方法の一つに成る得ることが示された。この方法を胚盤胞の質の評価に用いることでこれまでの胚盤胞の形態による主観的な評価法に比べ客観的で観察者による差異の少ない優れた方法になり得ると考えられる。

第 5 章では、SCBT 後 7 日目の β -hCG 値と母体年齢を組み合わせることで妊娠予後が推定できるかどうか検討を行った。その結果、SCBT 後 7 日目の β -hCG 値と臨床妊娠および出産率には相関関係が認められた。また、年齢群間では β -hCG 値に関係なく若い群で出産率が高くなり、加齢による流産率の増加が認められた。これらの結果、母体年齢と SCBT 後 7 日目の β hCG 値を用いることで正確な妊娠予後の予測が行えることが示された。この方法を用いることによって胚移植後の患者に適切な情報を提供できるようになると考えられる。

本研究は、これまでに実施した SCBT の臨床データからの後方視的な解析と実験的な手法によって、臨床で実際に利用可能な多くのデータを得ることができた。本研究のデータ活用することにより、SCBT からの出産率の増加が期待される。また、本研究によって、SCBT に利用の促進が行われることによって、IVF の成功率の向上に繋がると考えられる。

今後、新しい技術が次々に開発され ART に導入されるであろう。新しい技術を ART に導入する際には、安全性はもちろんのこと倫理面での議論も必ず必要であり、どこまで生殖という生命誕生の過程に人為操作を加えてよいかについて論議される。そのような議論も必要だが、生まれてくる子の出自を知る権利や福祉など、体外受精児に起こることが予想される社

会的な問題を法的に整備していくことが大切である。生殖補助医療に携わる者は、技術的な問題だけでなく、このような社会的な問題にも目を向け、法整備などを行政機関に働きかけを行う義務も負うべきであるとする。

引用文献

- Alam V, Altieri E & Zegers-Hochschild F 1999 Preliminary results on the role of embryonic human chorionic gonadotrophin in corpus luteum rescue during early pregnancy and the relationship to abortion and ectopic pregnancy. *Hum Reprod* 14 2375–2378.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG & Wells D 2011 The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril* 95 520–524.
- Avendaño C & Oehninger S 2011 DNA fragmentation in morphologically normal spermatozoa: how much should we be concerned in the ICSI era? *J. Androl* 32 356–363.
- Baart EB, Martini E, Eijkemans MJ, Van Opstal D, Beckers NG, Verhoeff A, Macklon NS & Fauser BC 2007 Milder ovarian stimulation for in-vitro fertilization reduces aneuploidy in the human preimplantation embryo: a randomized controlled trial. *Hum Reprod.* 22 980–988.
- Barnea ER 2004 Insight into early pregnancy events: the emerging role of the embryo. *Am J Reprod Immunol* 51 319–322.
- Berkovitz A, Eltes F, Yaari S, Katz N, Barr I, Fishman A & Bartoov B 2005 The morphological normalcy of the sperm nucleus and pregnancy rate of intracytoplasmic injection with morphologically selected sperm. *Hum Reprod* 20 185–190.
- Black M, Liu de Y, Bourne H & Baker HW 2010 Comparison of outcomes of conventional intracytoplasmic sperm injection and intracytoplasmic sperm injection using spermbound to the zona pellucida of immature oocytes. *Fertil Steril* 93 672–674.
- Braude P, Bolton V & Moore S 1988 Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332 459–461.
- Bronson RA & McLaren A 1970 Transfer to the mouse oviduct of eggs with and without the zona pellucida. *J Reprod Fertil* 22 129–137.

Carney SK, Das S, Blake D, Farquhar C, Self MM & Nelson L 2012 Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI)). *Cochrane Database Syst Rev* CD001894.

Check JH, Wilson C, Summers-Chase D, Choe JK, Nazari A & Lurie D 2001 Pregnancy rates (prs) according to embryo cell number at time of embryo transfer (ET). *Clin Exp Obstet Gynecol* 28 73-77.

Cobo A, de los Santos MJ, Castellò D, Gámiz P, Campos P & Remohí J 2012 Outcomes of vitrified early cleavage-stage and blastocyst-stage embryos in a cryopreservation program: evaluation of 3,150 warming cycles. *Fertil Steril* 98 1138-1146.

Cohen J, Alikani M, Trowbridge J & Rosenwaks Z 1992 Implantation enhancement by selective assisted hatching using zona drilling of human embryos with poor prognosis. *Hum Reprod* 7 685-691.

Cohen J, Simons RF, Fehilly CB, Fishel SB, Edwards RG, Hewitt J, Rowland GF, Steptoe PC & Webster JM 1985 Birth after replacement of hatching blastocyst cryopreserved at expanded blastocyst stage. *Lancet*. 1 647.

Cole LA 2010 Biological functions of hCG and hCG-related molecules *Reprod Biol Endocrinol* 8 102.

Confino E, Demir RH, Friberg J & Gleicher N 1986 The predictive value of hCG beta subunit levels in pregnancies achieved by in vitro fertilization and embryo transfer: an international collaborative study. *Fertil Steril* 45 526-531.

Craft IL, Khalifa Y, Boulos A, Pelekanos M, Foster C & Tsirigotis M 1995 Factors influencing the outcome of in-vitro fertilization with percutaneous aspirated epididymal spermatozoa and intracytoplasmic sperm injection in azoospermic men. *Hum Reprod* 10 1791-1794.

Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, Al-Hasani S, Reissmann T, Krebs D & Klingmüller D 1994 Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the

gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod* 9 788–791.

Ding J, Rana N & Dmowski WP 1999 Intracytoplasmic sperm injection into zona-free human oocytes results in normal fertilization and blastocyst development. *Hum Reprod* 14 476–478.

Dirican EK, Ozgün OD, Akarsu S, Akin KO, Ercan O, Uğurlu M, Camsari C, Kanyilmaz O, Kaya, A & Unsal, A 2008 Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction. *J. Assist. Reprod. Genet* 25 375–381.

Dor J, Rudak E, Rotmench S, Levran D, Blankstein J, Lusky A, Nebel L, Serr DM & Mashiach S 1988 The role of early post-implantation beta-HCG levels in the outcome of pregnancies following in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 3 663–667.

Du QY, Wang EY, Huang Y, Guo XY, Xiong YJ, Yu YP, Yao GD, Shi SL & Sun YP 2016 Blastocoele expansion degree predicts live birth after single blastocyst transfer for fresh and vitrified/warmed single blastocyst transfer cycles. *Fertil Steril* 105 910–919.

Dumoulin JC, Land JA, Van Montfoort AP, Nelissen EC, Coonen E, Derhaag JG, Schreurs IL, Dunselman GA, Kester AD, Geraedts JP & Evers JL 2010 Effect of in vitro culture of human embryos on birthweight of newborns. *Hum Reprod* 25 605–612.

Fang C, Huang R, Wei LN & Jia L 2015 Frozen-thawed day 5 blastocyst transfer is associated with a lower risk of ectopic pregnancy than day 3 transfer and fresh transfer. *Fertil Steril* 103 655–661.

Fausser BC, Nargund G, Andersen AN, Norman R, Tarlatzis B & Boivin J 2010 Mild ovarian stimulation for IVF: 10 years later. *Hum Reprod* 25 2678–2684.

Frydman R, Forman RG, Belaisch-Allart J, Hazout A, Rainhorn JD, Fries N & Testart J 1988 Improvements in ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Ann NY Acad*

Sci 541 30–36.

Fukuda A, Noda Y, Tsukui S, Matsumoto H, Yano J & Mori T 1987 Influence of water quality on in vitro fertilization and embryo development for the mouse. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 4 40.

Gardner DK, Lane M, Calderon I & Leeton J 1996 Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. *Fertil Steril* 65 349–353.

Gardner DK & Lane M 1997 Culture and selection of viable blastocysts: a feasible proposition for human IVF? *Hum Reprod Update* 3 367–382.

Gardner DK, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T & Schoolcraft WB 1998 Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduces the need for multiple embryo transfers. *Fertil Steril* 69 84–88.

Gardner DK & Schoolcraft WB 1999 *In vitro culture of human blastocyst*, pp 378–388. Eds R Jansen and D Mortimer. Carnforth, UK: Parthenon Press.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T & Schoolcraft WB 2000 Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril* 73 1155–1158.

Gómez-Torres MJ, Ten J, Girela JL, Romero J, Bernabeu R & De Juan J 2007 Sperm immobilized before intracytoplasmic sperm injection undergo ultrastructural damage and acrosomal disruption. *Fertil Steril* 88 702–704.

Goto K, Koike M, Kumasako Y, Utsunomiya T, Araki Y & Abe H 2010 Evaluating the safety and quality of human embryos with measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy. *J Fertil Implant* 27 53–58.

Glass RH, Spindle AI & Pedersen RA 1979 Mouse embryo attachment to substratum and interaction of trophoblast with cultured cells. *J Exp Zool* 208 327–336.

Glujovsky D, Blake D, Farquhar C & Bardach A 2012 Cleavage stage versus blastocyst

stage embryo transfer in assisted reproductive technology. *Cochrane Database Syst Rev* 11 CD002118.

Green CJ, Fraser ST & Day ML 2015 Insulin-like growth factor 1 increases apical fibronectin in blastocysts to increase blastocyst attachment to endometrial epithelial cells in vitro. *Hum Reprod* 30 284–298.

Hahlin M, Sjoblom P & Lindblom B 1991 Combined use of progesterone and human chorionic gonadotropin determinations for differential diagnosis of very early pregnancy. *Fertil Steril* 55 492–496.

Hardarson T, Ahlstrom A, Rogberg L, Botros L, Hillensjo T, Westlander G, Sakkas D & Wikland M 2012 Non-invasive metabolomics profiling of Day 2 and 5 embryo culture medium: a prospective randomized trial. *Hum Reprod* 27 89–96.

Heiner JS, Kerin JF, Schmidt LL & Wu TC 1992 Can a single, early quantitative human chorionic gonadotropin measurement in an in vitro fertilization-gamete intrafallopian transfer program predict pregnancy outcome? *Fertil Steril* 58 373–377.

Henkel R, Franken DR & Habenicht UF 1998 Zona pellucida as physiological trigger for the induction of acrosome reaction. *Andrology* 30 275–280.

Henkel RR & Schill WB 2003 Sperm preparation for ART. *Reprod Biol Endocrinol* 14 108.

Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M & Kinutani K 2004a Case report: successful pregnancy after vitrification of a human blastocyst that had completely escaped from the zona pellucida on day 6. *Hum Reprod* 18 988–990.

Hiraoka K, Hiraoka K, Kinutani M & Kinutani K 2004b Blastocoele collapse by micropipetting prior to vitrification gives excellent survival and pregnancy outcomes for human day 5 and 6 expanded blastocysts. *Hum Reprod* 19 2884–2888.

Hiraoka K, Fuchiwaki M, Horiuchi T, Murakami T, Kinutani M & Kinutani K 2007 Zona pellucida removal and vitrified blastocyst transfer outcome: a preliminary study.

Reprod Biomed Online 15 68–75.

Houghton FD, Humpherson PG, Hawkhead JA, Hall CJ & Leese HJ 2003 Na⁺, K⁺, ATPase activity in the human and bovine preimplantation embryo. *Dev Biol* 15 360–366.

Ishihara O, Kuwahara A & Saitoh H 2011 Frozen–thawed blastocyst transfer reduces ectopic pregnancy risk: an analysis of single embryo transfer cycles in Japan. *Fertil Steril* 95 1966–1969.

井上 陽子, 上野 智, 内山 一男, 沖村 匡史, 奥野 隆, 小林 保, 加藤 恵一 2014 選択的単一分割胚移植における簡易的な移植胚選択法の確立, *日本臨床エンブリオロジスト学会誌* 16 9–12.

Jakab A, Sakkas D, Delpiano E, Cayli S, Kovanci E, Ward D, Revelli A & Huszar G 2005 Intracytoplasmic sperm injection: a novel selection method for sperm with normal frequency of chromosomal aneuploidies. *Fertil Steril* 84 1665–1673.

Jun SH, & Milki AA 2007 Ectopic pregnancy rates with frozen compared with fresh blastocyst transfer. *Fertil Steril* 88 629–631.

Johnson N, Blake D & Farquhar C 2007 Blastocyst or cleavage–stage embryo transfer? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 21 21–40.

Kader AA, Choi A, Orief Y & Agarwal A 2009 Factors affecting the outcome of human blastocyst vitrification. *Reprod Biol Endocrinol* 16 99.

Kaneko Y, Day ML & Murphy CR 2011a Integrin beta3 in rat blastocysts and epithelial cells is essential for implantation in vitro: studies with Ishikawa cells and small interfering RNA transfection. *Hum Reprod* 26 1665–1674.

Kaneko Y, Lecce L, Day ML & Murphy CR 2011b β 1 and β 3 integrins disassemble from basal focal adhesions and beta(3) integrin is later localised to the apical plasma membrane of rat uterine luminal epithelial cells at the time of implantation. *Reprod Fertil Dev* 23 481–495.

Kimura Y & Yanagimachi R 1995 Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol*

Reprod 52 709–720.

Kinget K, Nijs M, Cox AM, Janssen M, Jacobs P, Bosmans E & Ombelet W 2002 A novel approach for patients at risk for ovarian hyperstimulation syndrome: elective transfer of a single zona-free blastocyst on day 5. *Reprod Biomed Online* 4 51–55.

Kobayashi K & Kato O 1995 Effect of sperm immobilization treatment on pronuclear formation of human oocytes after intracytoplasmic sperm injection. *J. Assist. Reprod. Genet* 97 446.

Kuwayama M 2006 Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: the Cryotop method. *Theriogenology* 67 73–80.

加藤 恵一, 竹原 祐志, 河内谷 敏, 岩本 佳子, 沖村 匡史, 谷田部 典之, 和田 恵子, 宮内 修, 篠原 一朝, 奥野 隆, 瀬川 智也, 小林 保, 長田 尚夫, 加藤 修 2010 ガラス化凍結法による胚盤胞凍結における至適凍結時期の検討. *日本受精着床学会雑誌* 27 178–181.

厚生労働省 2016 平成 27 年人口動態統計 3–6.

Lathi RB, Gray Hazard FK, Heerema-McKenney A, Taylor J & Chueh JT 2011 First trimester miscarriage evaluation. *Semin Reprod Med* 29 463–469.

Lee MJ, Lee RK, Lin MH & Hwu YM 2012 Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet* 29 745–750.

Licht P, Fluhr H, Neuwinger J, Wallwiener D & Wildt L 2007 Is human chorionic gonadotropin directly involved in the regulation of human implantation? *Mol Cell Endocrinol* 269 85–92.

Liebermann J & Tucker MJ 2006 Comparison of vitrification and conventional cryopreservation of day 5 and day 6 blastocysts during clinical application. *Fertil Steril* 86 20–26.

Liu J, Wang W, Sun X, Liu L, Jin H, Li M, Witz C, Williams D, Griffith J, Skorupski J, Haddad G & Gill J 2012 DNA microarray reveals that high proportions of human blastocysts from women of advanced maternal age are aneuploidy and mosaic. *Biol*

Reprod 87 148.

Liu DY & Baker HW 1994 Disordered acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: a newly discovered sperm defect causing infertility with reduced sperm-zona pellucida penetration and reduced fertilization in vitro. *Hum Reprod* 9 1694–1700.

Maehara M, Matsunari H, Honda K, Nakano K, Takeuchi Y, Kanai T, Matsuda T, Matsumura Y, Hagiwara Y, Sasayama N, Shirasu A, Takahashi M, Watanabe M, Umeyama K, Hanazono Y & Nagashima H 2012 Hollow fiber vitrification provides a novel method for cryopreserving in vitro maturation/fertilization-derived porcine embryos. *Biol Reprod* 87 133 2012.

Makarevich AV, Kubovicová E, Popelková M, Fabian D, Cikos S, Pivko J & Chrenek P 2010 Several aspects of animal embryo cryopreservation: anti-freeze protein (AFP) as a potential cryoprotectant. *Zygote* 18 145–153.

Mansour RT, Rhodes CA, Aboulghar MA, Serour GI & Kamal A 2000 Transfer of zona-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. *Hum Reprod* 15 1061–1064.

Martins WP, Rocha IA, Ferriani RA & Nastri CO 2011 Assisted hatching of human embryos: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Hum Reprod Update* 17 438–453.

Massip A & Mulnard J 1980 Time-lapse cinematographic analysis of hatching of normal and frozen-thawed cow blastocysts. *J Reprod Fertil* 58 475–478.

McCoy TW, Nakajima ST & Bohler HC Jr 2009 Age and a single day-14 beta-HCG can predict ongoing pregnancy following IVF. *Reprod Biomed Online* 19: 114–120.

McLernon DJ, Harrild K, Bergh C, Davies MJ, de Neubourg D, Dumoulin JC, Gerris J, Kremer JA, Martikainen H, Mol BW, Norman RJ, Thurin-Kjellberg A, Tiitinen A, van Montfoort AP, van Peperstraten AM, Van Royen E & Bhattacharya S 2010 Clinical

effectiveness of elective single versus double embryo transfer: meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *BMJ* 21 c6945.

Menezo L, Anker D & Salat-Baroux J 1985 Conception and realization of artificial dried embryo for training in IVF. *Acta Eur Fertil* 16 1.

Montag M, Koll B, Holmes P & van der Ven 2000 Significance of the number of embryonic cells and the state of the zona pellucida for hatching of mouse blastocysts in vitro versus in vivo. *Biol Reprod* 62 1738–1744.

Mukaida T, Nakamura S, Tomiyama T, Wada S, Kasai M & Takahashi K 2001 Successful birth after transfer of vitrified human blastocysts with use of a cryoloop containerless technique. *Fertil Steril* 76 618–620.

Mukaida T, Oka C, Goto T & Takahashi K 2006 Artificial shrinkage of blastocoeles using either a micro-needle or a laser pulse prior to the cooling steps of vitrification improves survival rate and pregnancy outcome of vitrified human blastocysts. *Hum Reprod* 21 3246–3252.

Munne S, Magli C, Adler A, Wright G, de Boer K, Mortimer D, Tucker M, Cohen J & Gianaroli L 1997 Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* 12 780–784.

Nelissen EC, Van Montfoort AP, Coonen E, Derhaag JG, Geraedts JP, Smits LJ, Land JA, Evers JL & Dumoulin JC 2012 Further evidence that culture media affect perinatal outcome: findings after transfer of fresh and cryopreserved embryos. *Hum Reprod* 27 1966–1976.

Ng SC, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, Hagglund L, Anandakumar C, Wong YC & Goh VH 1988 Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* 332 790.

Niimura S 2003 Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev* 49 413–423.

Nijs M & Van Steirteghem A 1990 Developmental potential of biopsied mouse blastocysts. *J Exp Zool* 256 232–236.

日本産婦人科学会 2015 平成 27 年度倫理委員会登録調査小委員会報告 *日本産婦人科学会誌* 68 2077–2122.

日本生殖医学会倫理委員会 2007 多胎妊娠防止のための移植胚数ガイドライン http://www.jsrm.or.jp/guideline-statem/guideline_2007_01.html (accessed, 2016)

Osada H, Aono F, Kuwayama M, Morita H, Teramoto S & Kato O 2003 Clinical efficiency of vitrification on blastocysts transfer cycles. *Fertil Steril* 80 S63.

Palermo G, Joris H, Devroey P & Van Steirteghem AC 1992 Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340 17–18.

Pandian Z, Marjoribanks J, Ozturk O, Serour G & Bhattacharya S 2013 Number of embryos for transfer following in vitro fertilisation or intra-cytoplasmic sperm injection. *Cochrane Database Syst Rev* 29 CD003416.

Papageorgiou TC, Leondires MP, Miller BT, Chang AS, Armstrong AB, Scott LA & Segars JH 2001 Human chorionic gonadotropin levels after blastocyst transfer are highly predictive of pregnancy outcome. *Fertil Steril* 76 981–987.

Pearlstone AC, Oei ML & Wu TC 1992 The predictive value of a single, early human chorionic gonadotropin measurement and the influence of maternal age on pregnancy outcome in an infertile population. *Fertil Steril* 57 302–304.

Poikkeus P, Hiilesmaa V & Tiitinen A 2002 Serum HCG 12 days after embryo transfer in predicting pregnancy outcome. *Hum Reprod* 17 901–905.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine and Practice Committee of the Society for Assisted Reproductive Technology 2014 Role of assisted hatching in in vitro fertilization: a guideline. *Fertil Steril* 102 348–351.

Pribenszky C, Du Y, Molnár M, Harnos A & Vajta G 2008 Increased stress tolerance of

matured pig oocytes after high hydrostatic pressure treatment. *Anim Reprod Sci* 106 200–207.

Quinn P, Kerin JF & Warnes GM 1985 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.

Raga F, Casañ EM, Kruessel J, Wen Y, Bonilla-Musoles F & Polan ML 1999 The role of gonadotropin-releasing hormone in murine preimplantation embryonic development. *Endocrinology* 140 3705–12.

Rall WF & Fahy GM 1985 Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 degrees C by vitrification. *Nature* 313 573–575.

Ray PF, Conaghan J, Winston RM & Handyside AH 1995 Increased number of cells and metabolic activity in male human preimplantation embryos following in vitro fertilization. *J Reprod Fertil* 95 165–171.

Reed ML, Lane M, Gardner DK, Jensen NL & Thompson J 2002 Vitrification of human blastocysts using the cryoloop method: successful clinical application and birth of offspring. *J Assist Reprod Genet* 19 304–6.

Ren X, Liu, Q, Chen W, Zhu G & Zhang H 2013 Effect of the site of assisted hatching on vitrified-warmed blastocyst transfer cycles: a prospective randomized study. *J Assist Reprod Genet* 30 691–697.

Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R & Checa MA 2013 Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 99 156–162.

Saragusty J & Arav A 2011 Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification. *Reproduction* 141 1–19.

Schultz JF, Mayernik L, Rout UK & Armant DR 1997 Integrin trafficking regulates adhesion to fibronectin during differentiation of mouse peri-implantation

blastocysts. *Dev Genet* 21 31–43.

Schwarzer C, Esteves TC, Araúzo-Bravo MJ, Le Gac S, Nordhoff V, Schlatt S & Boiani M 2012 ART culture conditions change the probability of mouse embryo gestation through defined cellular and molecular responses. *Hum Reprod* 27 2627–2640.

Shamonki MI, Frattarelli JL, Bergh PA & Scott RT 2009 Logarithmic curves depicting initial level and rise of serum beta human chorionic gonadotropin and live delivery outcomes with in vitro fertilization: an analysis of 6021 pregnancies. *Fertil Steril* 91 1760–1764.

Shapiro BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M, Hudson C & Thomas S 2011 Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen-thawed embryo transfer in normal responders. *Fertil Steril* 96 344–348.

Shapiro BS, Daneshmand ST, Restrepo H & Garner FC 2012 Serum HCG measured in the peri-implantation period predicts IVF cycle outcomes. *Reprod Biomed Online* 25 248–253.

Shapiro, BS, Daneshmand ST, Garner FC, Aguirre M & Hudson C 2014 Freeze-all can be a superior therapy to another fresh cycle in patients with prior fresh blastocyst implantation failure. *Reprod Biomed online* 29 286–290.

Sherman MI 1975 The culture of cells derived from mouse blastocysts. *Cell* 5 343–349.

Shu Y, Peng W & Zhang J 2010 Pregnancy and live birth following the transfer of cryopreserved-thawed blastocysts derived from zona- and corona-cell-free oocytes. *Reprod Biomed Online* 21 527–532.

Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, Martin-Pont B, Bottero J, Porcher R, Cedrin-Durnerin I, Hugues JN & Wolf JP 2006 A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo

transfers. *Hum Reprod* 21 2384–2389.

Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H & Devroey P 1995 High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod* 10 148–152.

Smitz J, Devroey P, Camus M, Deschacht J, Khan I, Staessen C, Van Waesberghe L, Wisanto A & Van Steirteghem AC 1988 The luteal phase and early pregnancy after combined GnRH-agonist/HMG treatment for superovulation in IVF or GIFT. *Hum Reprod* 3 585–90.

Stanger JD, Stevenson K, Lakmaker A & Woolcott R 2001 Pregnancy following fertilization of zona-free, coronal cell intact human ova: Case Report. *Hum Reprod* 16 164–167.

Stehlik E, Stehlik J, Katayama KP, Kuwayama M, Jambor V, Brohammer R & Kato O 2005 Vitrication demonstrates significant improvement versus slow freezing of human blastocysts. *Reprod Biomed Online* 11 53–57.

Stenman UH, Unkila-Kallio L, Korhonen J & Alfthan H 1997 Immunoprocudures for detecting human chorionic gonadotropin: clinical aspects and doping control. *Clin Chem* 43 1293–1298.

Sophonsritsuk A, Choktanasiri W, Weerakiet S & Rojanasakul A 2005 Comparison of outcomes and direct cost between minimal stimulation and conventional protocols on ovarian stimulation in in vitro fertilization. *J. Obstet. Gynaecol. Res* 31 459–463.

Steptoe PC, Edwards RG & Purdy JM 1971 Human blastocysts grown in culture. *Nature* 229 132–133.

Steptoe PC & Edwards RG 1978 Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 12 366.

Sutherland AE, Calarco PG & Damsky CH 1993 Developmental regulation of integrin expression at the time of implantation in the mouse embryo. *Development* 119 1175–

1186.

Suzuki H, Togashi M, Adachi J & Toyoda Y 1995 Developmental ability of zona-free mouse embryos is influenced by cell association at the 4-cell stage. *Biol Reprod* 53 78–83.

Takahashi K, Araki Y & Motoyama M 1999 Normal development of a zona-free oocyte to the blastocyst stage following ICSI. *Hum Reprod* 14 2677.

Takahashi K, Mukaida T, Goto T & Oka C 2005 Perinatal outcome of blastocyst transfer with vitrification using cryoloop: a 4-year follow-up study. *Fertil Steril* 84 88–92.

Teramoto S & Kato O 2007 Minimal ovarian stimulation with clomiphene citrate: a large-scale retrospective study. *Reprod Biomed Online* 15 134–148.

Trounson A & Mohr L 1983 Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. *Nature* 305 707–709.

Thurin A, Hausken J, Hillensjö T, Jablonowska B, Pinborg A, Strandell A, & Bergh C 2004 Elective single-embryo transfer versus double-embryo transfer in in vitro fertilization. *New England Journal of Medicine* 351 2392–2402.

Ticconi C, Zicari A, Belmonte A, Realacci M, Rao Ch V & Piccione E 2007 Pregnancy-promoting actions of HCG in human myometrium and fetal membranes. *Placenta* 28 S137–143.

竹原祐志, 加藤修 2012 低刺激排卵誘発法 *産科と婦人科* 79 891–896.

Ueno S, Ezoe K, Abe T, Yabuuchi A, Uchiyama K, Okuno T, Kobayashi T & Kato K 2014 Maternal age and initial beta-hCG levels predict pregnancy outcome after single vitrified-warmed blastocyst transfer. *J Assist Reprod Genet* 31 1175–1181.

Urbancsek J, Hauzman E, Fedorcsak P, Halmos A, Devenyi N & Papp Z 2002 Serum human chorionic gonadotropin measurements may predict pregnancy outcome and multiple gestation after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 78 540–542.

Valojerdi MR, Eftekhari-Yazdi P, Karimian L & Ashtiani SK 2007 Effect of laser zona pellucida opening on clinical outcome of assisted reproduction technology in patients with advanced female age, recurrent implantation failure, or frozen-thawed embryos. *Fertil Steril* 90 84-91.

Van Blerkom J, Davis PW, & Lee J 1995 Fertilization and early embryology: ATP content of human oocytes and developmental potential and outcome after in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 10 415-424.

Van den Abbeel E, Balaban B, Ziebe S, Lundin K, Cuesta MJG, Klein BM, Helmgard L & Arce JC 2013 Association between blastocyst morphology and outcome of single-blastocyst transfer. *Reprod Biomed Online* 27 353-361.

Vanderzwalmen P, Bertin G, Debauche Ch, Standaert V, van Roosendaal E,

Vandervorst M, Bollen N, Zech H, Mukaida T, Takahashi K & Schoysman R 2002 Births after vitrification at morula and blastocyst stages: effect of artificial reduction of the blastocoelic cavity before vitrification. *Hum Reprod* 17 744-751.

Verberg MF, Eijkemans MJ, Heijnen EM, Broekmans FJ, De Klerk C, Fauser BC & Macklon NS 2008 Why do couples drop-out from IVF treatment? A prospective cohort study. *Hum Reprod* 23 2050-2055.

Verberg MF, Eijkemans MJ, Macklon NS, Heijnen EM, Baart EB, Hohmann FP, Fauser BC & Broekmans FJ 2009 The clinical significance of the retrieval of a low number of oocytes following mild ovarian stimulation for IVF: a meta-analysis. *Hum Reprod Update* 15 5-12.

Verberg MF, Macklon NS, Nargund G, Frydman R, Devroey P & Broekmans FJ 2009 Mild ovarian stimulation for IVF. *Hum Reprod Update* 15 13-29.

Wang H & Dey SK 2006 Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 7 185-199.

Wang J & Armant DR 2002 Integrin-mediated adhesion and signaling during blastocyst

implantation. *Cells Tissues Organs* 172 190–201.

Wang J, Mayernik L & Armant DR 2002 Integrin signaling regulates blastocyst adhesion to fibronectin at implantation: intracellular calcium transients and vesicle trafficking in primary trophoblast cells. *Dev Biol* 245 270–279.

Whitten WK & Biggers JD 1968 Complete development in vitro of the pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium. *J Reprod Fertil* 17 399–401.

Wildt L, Diedrich K, Van der Ven H, Al Hasani S, Hübner H & Klasen R 1986 Ovarian hyperstimulation for in-vitro fertilization controlled by GnRH agonist administered in combination with human menopausal gonadotrophins. *Hum Reprod* 1 15–19.

Witt BR, Wolf GC, Wainwright CJ, Johnston PD & Thorneycroft IH 1990 Relaxin, CA-125, progesterone, estradiol, Schwangerschaft protein, and human chorionic gonadotropin as predictors of outcome in threatened and nonthreatened pregnancies. *Fertil Steril* 53 1029–1036.

Wong BC, Boyd CA & Lanzendorf SE 2003 Randomized controlled study of human zona pellucida dissection using the zona infrared laser optical system: evaluation of blastomere damage, embryo development, and subsequent hatching. *Fertil Steril* 80 1249–1254.

Yanagida K, Katayose H, Yazawa H, Kimura Y, Konnai K & Sato A 1976 The usefulness of a piezo-micromanipulator in intracytoplasmic sperm injection in humans. *Hum Reprod* 14 448–453.

Yanagimachi R, Yanagimachi H & Rogers BJ 1976 The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 15 471–476.

Yang M, Lei ZM & Rao Ch V 2003 The central role of human chorionic gonadotropin in the formation of human placental syncytium. *Endocrinology* 144 1108–1120.

Yamanaka M, Hashimoto S, Amo A, Ito-Sasaki T, Abe H, & Morimoto Y 2011 Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption. *Hum Reprod* 26 3366-3371.

謝辞

本論文ならびに発表資料を作成するにあたり御指導、御鞭撻を賜り、また予備審査申請の書類作成より、始終親切な御助言を賜りました岡山大学農学部舟橋弘晃教授に深甚なる謝意を表します。本研究に関して終始ご指導ご鞭撻を頂きました国枝哲夫教授に心より感謝致します。また、本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました岡山大学農学部木村康二教授、同若井拓哉准教授に深謝致します。本学位論文をまとめるに当たり、多くの御指導を賜り、院内データ使用の許可を頂きました加藤レディスクリニック院長加藤恵一先生に深く感謝致します。また、博士号取得にあたり、舟橋教授をご紹介して頂きました、三宅医院生殖医療センター培養室長沖津撰博士に深く感謝いたします。本学位論文を作製するにあたり多大なご支援、ご指導を賜りました加藤レディスクリニック研究開発部部长藪内晶子博士および同研究員江副賢二博士に深く感謝致します。本学位論文を遂行するに当たり、日々の業務だけでなく多くのご指導をしていただき、辛抱強く見守って下さいました加藤レディスクリニック培養部部长内山一男には深く感謝致します。

最後に、本研究を陰ながら支えて下さいました妻・冬都に対してここに改めて感謝の意を表します。