

= 原著論文 =

新しい胚評価法に基づく最適な胚移植時期

The ideal timing for embryo transfer with a novel embryo scoring system

古井 憲司

Kenji FURUI

医療法人愛育会 クリニックママ. 〒503-0807 岐阜県大垣市

furui@clinicmama.jp

要旨

本研究は、当院独自のDay 3胚(採卵当日をDay 0とする)のscore (F Score)に基づいたDay 3における移植胚の選択が、その後の良好胚盤胞到達率ならびに胚盤胞移植率を正確に反映しているかどうか、また妊娠率の向上に寄与できるか否かを明らかにすることを目的に検討した。F Scoreにより、Day 3胚の評価を行ない各症例の中で最良好胚(F1)を選択した。単一胚盤胞移植を施行した症例に対する検討では、F1のscoreが良好な程F1が実際に胚盤胞移植される率が高率であり、F Scoreが胚盤胞への発育を予見しうる胚評価法であることが確認された。一方、F1のscoreが不良な程、F ScoreによるDay 3での胚評価が誤っている可能性が高いことが判明した。年齢別の検討では、胚盤胞移植のキャンセル率は40歳以上になると有意に上昇しており、40歳以上の症例については、胚盤胞移植が必ずしも有利ではないことが示唆された。

キーワード: 胚評価法, 割球数, フラグメンテーション, 割球の大小不同, 胚盤胞到達率

序論

不妊症患者に対する体外受精-胚移植では、近年、多胎防止の観点から単一胚移植が推奨されている。このように少ない移植胚数で妊娠率を向上させるためには、胚移植に際し正確な胚評価方法を構築することが望まれより良好な胚を選別することが不可欠である。

胚評価方法として従来我々の施設ではVeck分類[9]で分割期胚(Day 2-3) (採卵当日をDay 0とする)の評価を行ってきたが、胚盤胞移植を行うようになるにつれVeck分類と胚盤胞到達率とが必ずしも相関しないことを経験した。そこで我々はより正確な胚評価を行うために、Day 3での割球数、フラグメンテーションの割合、割球の均一性の三因子による新しくかつ簡明な分割期胚の評価法を考案した[6]。割球数については、 ≤ 3 cellを0 point、4 cellを1 point、5もしくは、6 cellを2 point、 ≥ 7 cellを3 pointと評価した。また、フラグメンテーションについては、 $\geq 50\%$ を0 point、 $< 50\%$ を1 pointと評価した。さらに、割球の大小不同については、大小不同(+)を0 point、大小不同(-)を1 pointとした。さらに、これら三因子について各々のpointの合計をスコア化(F Score)した。このF Scoreと胚盤胞到達率およびVeck分類と胚盤胞

到達率との関係を比較検討したところ、F ScoreによるDay 5-6における胚盤胞到達率は、score 5(最良好胚)では77.5%であり(表1)[2]、Veck分類によるG1(最良好胚)では50.5%であった(表2)[3]。

これらの結果を受けて、本研究では、この当院独自のDay 3胚スコア(F Score)に基づいた移植胚の選択が本当に適切なものか否かを明らかにすることを目的に後方視的な検討をデザインした。このF Scoreと胚盤胞到達率との関係およびVeck分類と胚盤胞到達率との関係を比較検討した。また単一胚移植症例でのF1のDay 5-6における転帰を検討した(検討1)。さらに、単一分割期胚移植ならびに単一胚盤胞移植における妊娠率と流産率の比較および年齢別の胚盤胞移植キャンセル率を検討した(検討2)。

対象(材料)と方法

対象

検討1では、2006年7月から2008年12月までにlong protocolまたはアンタゴニスト法にて卵巣刺激し単一分割期胚移植を施行した39周期、単一胚盤胞移植を施行した176周期を対象とした。そしてそれらの症例について後方視的に当院独自のF scoreを用いてDay 3での

投稿日: 2010年9月30日

掲載決定日: 2010年11月15日

ウェブサイト事前公開日: 2010年12月30日

表1. F Scoreと胚盤胞到達率との関係

F Score	5	4	3	2	1	0
胚盤胞到達率(%)	77.5%*	56.0%*	39.9%*	24.0%	11.0%	4.5%

*P < 0.001. vs 他のすべての値。

「割球数によるスコア」、「フラグメンテーションによるスコア」、「割球の大小不同の有無によるスコア」の各項目の合計pointにより、5 point = score 5、4 point = score 4、3 point = score 3、2 point = score 2、1 point = score 1、0 point = score 0とした。文献[2]より改変。

表2. Veeck分類と胚盤胞到達率との関係

Veeck分類	G1	G2	G3	G4	G5
胚盤胞到達率(%)	50.5%	59.5%	36.7%*	48.3%	25.7%*

*P < 0.001. vs他のすべての値。

Veeck分類に従い、最良好胚をG1とし、以下順にG2、G3、G4、G5とした。文献[2]より改変。

表3. 単一胚移植症例(n=176)でのF1のDay 5-6における転帰

	F1 = score5 (n = 117)	F1 = score4 (n = 37)	F1 ≤ score3 (n = 22)
胚盤胞移植率	48.7% (57/117)	45.9% (17/37)	40.9% (9/22)
良好胚盤胞到達凍結保存可能率	25.6% (30/117)	5.4% (2/37)	0% (0/22)
不良胚盤胞到達凍結保存可能率	10.3% (12/117)	5.4% (2/37)	0% (0/22)
不良胚盤胞到達凍結保存不可率	0.9% (1/117)	5.4% (2/37)	4.5% (1/22)
胚盤胞非到達率	14.5% (17/117)	37.8% (14/37)	54.5% (12/22)

胚評価を行ない、各症例の中で最も良好と思われる胚(F1)を選択した。このF1がDay 5-6で実際に胚移植されたか否かを明確にする目的で単一胚盤胞移植症例でのF1のDay 5-6における転帰およびF1が移植されなかった場合のDay 5-6での転帰を検討した。同様にVeeck分類での最良好胚(V1)についても後方視的に検討した。

検討2では、2006年7月から2008年12月に施行した単一分割期胚移植症例(39周期)、単一胚盤胞移植症例(176周期)について、それぞれの妊娠率ならびに流産率について検討した。さらに、2002年4月から2008年12月に胚盤胞移植を試みた630周期について、年齢別キャンセル率を検討した。

方法

卵巣刺激方法は、long protocolまたはアンタゴニスト法を施行したものを対象とした。Long protocolでは、前周期の黄体中期よりGnRHアゴニストを開始し月経周期3-5日目からヒト下垂体性腺刺激ホルモン[hMG: HMGコーワ(興和テバ)あるいはHMG筋注用(富士製薬工業)]を投与し、主席卵胞の平均径が18 mmに到達したところでヒト絨毛性性腺刺激ホルモン[hCG: ゲストロン(興和テバ)]5,000単位を投与し35.5時間後に静脈麻酔下、経膈超音波ガイド下にて採卵を行った。GnRHアンタゴニスト法では、月経周期3-5日目からhMGを投与し、主席卵胞の平均径が14 mmから16 mmに到達したところで、GnRHアンタゴニスト(セトロタイド、塩野義製薬)0.25 mgをhCG 5,000単位投与日まで連日投与した。

その後、主席卵胞の平均径が18 mmに到達したところでhCG 5,000単位を投与し、35.5時間後に静脈麻酔薬3種[ペンタジン(第一三共)、セルシン(武田薬品工業)ならびにケタラルール(三共)]を使用した麻酔下に、経膈超音波ガイド下にて採卵を行った。

精子の調整は、Sperm Preparation Medium (Medi-Cult, Denmark)にて行った。体外受精または顕微授精後の受精確認までの胚の培養は、Universal IVF Medium (Medi-Cult)、Day 1からDay 3までをBlastAssist System 1 (Medi-Cult)、Day 3以降をBlastAssist System 2 (Medi-Cult)を用いて培養した。そして、37°C、5%CO₂、5%O₂、90%N₂の気相条件下で培養した。Day 5またはDay 6での胚盤胞移植は、胚移植用培養液としてUTM (Medi-Cult)を使用し、北里ET Catheter Guide (北里メディカル、東京)を用いて経膈超音波ガイド下にて施行した。

胚評価方法は、Day 3ではF Score [2]とVeeck分類[9]の両方によりそれぞれを評価した。またDay 5-6での胚盤胞評価はGardner分類[4]に従い、3BB以上を良好胚盤胞とした。なお、各症例でF Scoreにより最も良好なDay 3胚をF1とし、F1にはF Score 0-5のすべてを含み、同様にVeeck分類により各症例で最も良好なDay 3胚をV1とし、Veeck分類G1-5のすべてを含むものとした。

余剰胚は、ガラス化法[5]を用いて凍結保存した。

臨床的妊娠は、超音波断層法にて胎嚢確認により判定した。

統計学的処理は、t-検定、Mann-Whitney U-検定、あるいは χ^2 -検定にて適宜行った。

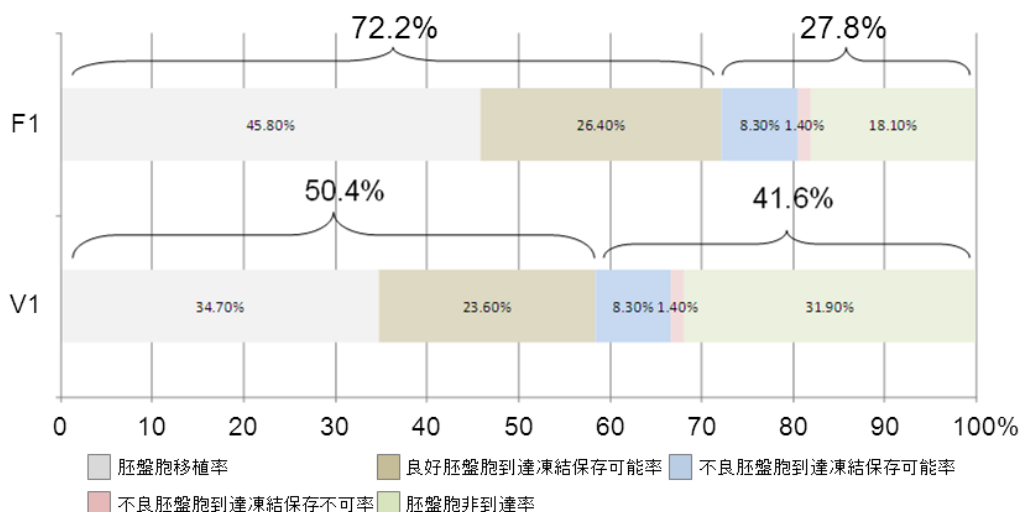


図1. 単一胚盤胞移植にて妊娠した症例 (n=72) でのF1, V1のDay 5-6における転帰
同一症例においてDay 3でのF scoreによる最良好胚をF1とし、Veeck分類での最良好胚をV1とした。

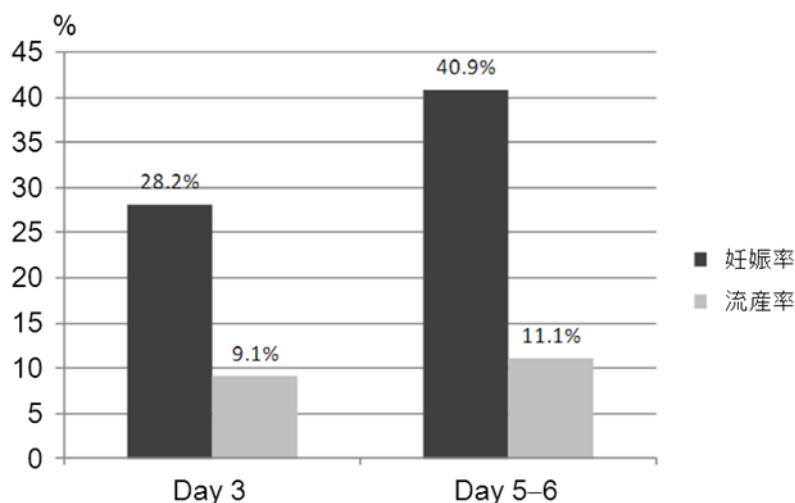


図2. 単一胚盤胞移植症例の移植日別妊娠率と流産率
単一分割期胚移植症例 (39周期) ならびに単一胚盤胞移植症例 (176周期) における妊娠率と流産率を示す。

結果

単一胚盤胞移植症例でのF1のDay 5-6における転帰 (表3) を検討した結果、実際の胚盤胞移植率については、F1 = score 5 (48.7%) は、F1 = score 4 (45.9%) および F1 ≤ score 3 (40.9%) と比較して最も高率に胚盤胞移植が施行されていた。また、良好胚盤胞に発育し凍結保存された率 (良好胚盤胞到達凍結保存可能率) も、F1 = score 5 (25.6%) が、F1 = score 4 (5.4%) および F1 ≤ score 3 (0%) と比較して有意に高率であった。また、Day 5-6 において胚盤胞に到達しなかった率 (胚盤胞非到達率) では、F1 = score 5 (14.5%) は F1 = score 4 (37.8%) および F1 ≤ score 3 (54.5%) と比較し有意に低率であった。

単一胚盤胞移植にて妊娠に至った症例におけるF1およびV1のDay 5-6での転帰 (図1) を検討したところ、F Scoreにより評価した最良好胚F1のうち27.8%は、不良胚盤胞あるいは胚の成長が途中で停止 (胚盤胞非到達) した。一方、Veeck分類により胚を評価した場合は、最良好胚V1のうち41.6%が不良胚盤胞あるいは胚の成長が途中で停止しており、Day 3での胚評価に誤りが生ずる可能性はF Scoreと比較し高率であった。

次に単一胚移植症例の移植日別妊娠率と流産率 (図2) を示した。妊娠率は、胚移植あたりDay 3移植では28.2%、Day 5-6移植では40.9%でありDay 5-6移植の方がDay 3移植よりも有意差は認められなかったが高率であった。また流産率については、分割期胚移植では9.1%、胚盤胞移植では11.1%でほぼ同等であった。

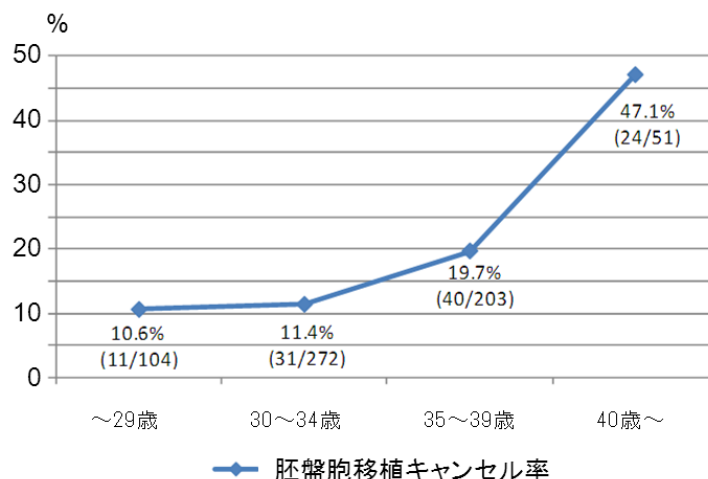


図3. 年齢別胚盤胞移植キャンセル率
胚盤胞移植を試みた630周期の年齢別キャンセル率を示す。

年齢別胚盤胞移植キャンセル率(図3)についての検討では、29歳以下では10.6%、30–34歳では11.4%、35–39歳では19.7%、40歳以上になると有意に上昇し47.1%であった。

考察

表1および表2より、当院独自のDay 3における胚評価方法(F Score)はVeck分類と比較して、Day 5–6における胚盤胞到達率をより正確に予見できる結果であった。

単一胚盤胞移植症例でのF1のDay 5–6における転帰(表3)より、F1のscoreが不良な程Day 3での評価に誤りが起こる可能性が高いことが判明した。さらにF1がDay 5に胚移植されなかった周期を検討してみると、F Scoreが0、1および2とlow scoreである程、F1がDay 5–6において胚盤胞まで到達していないことも判明した。

単一胚盤胞移植にて妊娠に至った症例でのF1およびV1のDay 5–6における転帰(図1)を検討してみると、F Scoreにより評価した最良好胚F1のうち27.8%は胚の成長が途中で停止したかもしくは胚盤胞まで発育したが不良であったため凍結保存することができなかった。つまり、この27.8%のF1をもしDay 3で胚移植していたら妊娠しなかった可能性が高いと考えられた。一方、Day 3においてVeck分類により胚を評価した場合はその可能性が41.6%とさらに高くなることが判明した。これよりDay 3における胚評価法であるF Scoreは、胚盤胞への発育をある程度予見することはできるといえるが、そしてVeck分類よりは優れているといえるが、完全なものではなくDay 3での胚評価の限界を感じる場所である。

単一胚移植症例の移植日別妊娠率と流産率(図2)の検討では、単一胚移植における妊娠率は有意差がないものの胚盤胞移植症例の方が分割期胚移植症例と比

較し高率であった。一方、流産率は分割期胚移植と胚盤胞移植との差は認められなかった。つまり、Day 3での分割期胚移植よりもDay 5での胚盤胞移植の方が妊娠率が高率であったことより、胚盤胞移植を目指すことが妊娠率向上の観点から重要であると示唆された。しかし、有意差が認められなかったことより、再三に渡り胚盤胞に到達できずに胚移植をキャンセルせざるを得ない症例に対しては、Day 3での分割期胚移植の必要性があることも示唆された。

また、年齢別胚盤胞移植キャンセル率(図3)の検討では、胚盤胞移植のキャンセル率は40歳以上になると有意に上昇しており40歳以上の症例については胚盤胞移植が必ずしも有利であるとはいえないことを示唆していた。度重なる採卵にも関わらず胚盤胞が得られない症例を度々経験する。このように体外培養では胚盤胞への発育が見込めない症例に対しては、F ScoreによりDay 3での胚評価を行い患者との十分なインフォームド consentのもとに患者の精神的なストレスの軽減にも配慮し、Day 3での胚移植に踏み切ることも必要であると思われる。

我々のDay 3胚スコア(F Score)は、Day 3における胚評価をVeck分類より正確に反映し妊娠率の改善に寄与できると考えられたが、Day 3での形態学的な胚評価の限界を考えさせられる結果でもあった。しかし、Day 3における胚の質が良好であればキャンセル率が低く胚盤胞移植における妊娠率が有意に高いという報告もある[1]。このことより、Day 3での正確な胚評価方法の意義は大きく、F Scoreのさらなる改善に期待が寄せられる。

今後は、周産期医療におけるリスクを考えると多胎妊娠は絶対に予防すべきである。そのためには単一胚移

植に移行することが必須であり、その観点からも胚盤胞までの培養が胚の選別には有利であると考えられた。しかし、40歳以上の症例では、胚盤胞まで到達せずに胚移植がキャンセルとなる症例についての対策も必要である。また、少数の胚しか得られなかった症例については、Day 2で胚移植をした方が良いという報告もあり[8]、症例毎に患者年齢、胚の数およびその質について配慮すべきであると考えられる。さらに胚の長期培養による影響についても考慮する必要がある。受精から分割期胚、そして胚盤胞への成長の過程でエピジェネティックな遺伝子発現制御機構に混乱が生じる可能性があると言われており、動物実験で同一の個体にもかかわらず異なる培養環境のもとで発育させると胚盤胞での遺伝子の発現が異なっていたという報告もある[7]。これらの問題点に関しては今後の検討課題であると思われる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、診療にご協力頂いた当院の北川武司先生、野村昌男先生、ならびに当院の看護スタッフ、また胚評価およびデータ整理を担当したラボスタッフ(エンブリオロジスト)に厚く御礼申し上げます。

参考文献

1. **Blake D, Farquhar CM, Johnson N, Proctor M.** Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted conception. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2007; CD002118.
2. **Furui K, Nomura M, Kitagawa T, Matsui Y, Yoshikawa M, Sano T.** Day 3分割期胚の新しい評価方法の検討. *日本受精着床学会雑誌* 2007; 24: 114-119.
3. **Furui K.** 胚移植の時期. *卵子学*. 医歯薬出版. 2010; 180-183.
4. **Gardner DK, Schoolcraft WB, Wagley L, Schlenker T, Stevens J, Hesla J.** A prospective randomized trial of blastocyst culture and transfer in *in-vitro* fertilization. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 3434-3440.
5. **Kuwayama M, Kato O.** All round vitrification of human oocytes and embryos. *J. Assist. Reprod. Genetic.* 2000; 17: 477.
6. **Nomura M, Iwaser A, Furui K, Kitagawa T, Matsui Y, Yoshikawa M, Kikkawa F.** Preferable correlation to blastocyst development and pregnancy rates with a new embryo grading system specific for day 3 embryos. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2007; 24: 23-28.
7. **Rizos D, Lonergan P, Boland M.P, Arroyo-Garcia R, Pintand B, Fuente J.** Analysis of Differential Messenger RNA Expression Between Bovine Blastocysts Produced in Different Culture Systems : Implication for Blastocyst Quality. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 589-595.
8. **Shen S, Rosen MP, Dobson AT, Fujimoto VY, McCulloch CE, Cedars MI.** Day 2 transfer improves pregnancy outcome in *in vitro* fertilization cycles with few available embryos. *Fertil. Steril.* 2006; 86: 44-50.
9. **Veeck LL.** Oocyte Assessment and Biological Performance. *Ann. NY Acad. Sci.* 1988; 541: 259-295.



Japan Society for Reproduction Engineering