

DMSO と sucrose を用いた胚凍結保存法

荻窪病院産婦人科

久慈 直昭 境田 通泰 宮崎 豊彦
片山恵利子 杉山 武 飯田 悦郎

Human Embryo Freezing with Dimethylsulfoxide (DMSO)
and Sucrose as Cryoprotectants

Naoaki KUJI, Michiyasu SAKAIDA, Toyohiko MIYAZAKI,

Eriko KATAYAMA, Takeshi SUGIYAMA and Etsuro IIDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Ogikubo Hospital, Tokyo

概要 Dimethylsulfoxide (DMSO, 最終濃度1.5M), sucrose (0.1M) を用いたヒト胚凍結保存法の有用性を, 融解後胚形態と妊娠・分娩率から検討した。凍結された胚はすべて体外受精から得られた余剰胚(4細胞期~桑実胚期)であり, 植氷後-40℃まで緩速冷却(-0.3℃/分), その後-170℃まで急冷して凍結, 液体窒素中へ保存した。融解した胚176個中, 100%形態正常胚, 50%以上形態正常胚(生存胚)は各々103個(59%), 140個(80%)であった。融解後の胚生存率は授精後60時間以上経過した胚(8細胞期~桑実胚期)で87%(99/114), 60時間未満の胚(4~6細胞期胚)で66%(41/62)と前者で良好であり, 本法が発生ステージの進んだ胚において, より有効であることが示唆された。融解胚移植は自然周期で20mm以上の卵胞を認めた日にhCGを投与, 凍結開始時の胚のステージに関わらず投与後87時間で胚を融解して移植した。62周期に移植を行い, 妊娠例11例(移植あたり17.7%), 双胎2例を含む分娩6例(9.7%)を得た。出生児8例に染色体異常, 先天異常は認められなかった。

Synopsis 176 supernumerary human embryos following treatment by IVF were cryopreserved with dimethylsulfoxide (1.5M) and sucrose (0.1M) as cryoprotectants. The embryos were frozen at the early cleavage stage (48~96 hours after insemination) in the programmable freezer, by means of the protocol providing for slow cooling until -40°C and slow thawing. The survival rate (50% or more blastomeres were intact) after thawing was higher for the embryos at the 8 cell stage to the morulla stage (60~96 hours after insemination) than for the embryos at the 4 to 6 cell stage (48~60 hours after insemination) (87% and 66%, $p < 0.001$), and the overall survival rate was 80% (140/176). Out of 62 transfer cycles, 11 pregnancies (17.7%) and 6 deliveries (9.7%) were achieved. No fetal malformation or chromosomal aberration was observed.

Key words: Cryopreservation • Embryo • Dimethylsulfoxide (DMSO) • Sucrose

緒 言

体外受精法の妊娠率が上昇するに従い多胎妊娠率も確実に増加している。周産期のリスクが高い品胎以上の多胎妊娠を回避するため一回の移植胚は2~3個に制限する傾向にあり, 必然的に生ずる余剰胚を活用するため胚凍結保存法はますます重要な技術となってきた。

現在までいくつかの凍結融解法が報告されており, それぞれ有効性が確認されている。しかし凍結保護剤や冷却プログラムの違いにより各方法にそれぞれ特徴があり, またわが国では臨床応用の

認可が遅かったために凍結保存法についてのまとまった報告は少ない。

ここでは我々の用いている dimethylsulfoxide (以下 DMSO) と sucrose を用いた凍結保存法の, 融解後胚形態と妊娠・分娩率よりみた有用性および安全性について検討した。

方 法

1. 対象胚

平成元年11月より平成4年4月までに62例の凍結保存胚融解・胚移植を行った。凍結保存胚はすべて患者本人の体外受精法¹⁾施行時に, 多胎妊娠

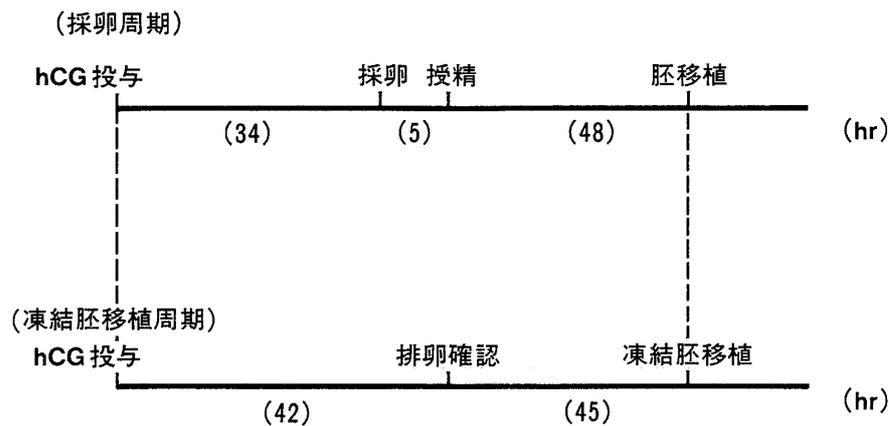


図1 胚移植のタイミング

表1 凍結保護液, 凍結プログラムの概要

凍結保護液: Dulbecco 磷酸緩衝液
15% ヒト臍帯血清
0.1M sucrose
1.5M DMSO
凍結プログラム: 植氷後, $-0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で -40°C まで冷却
-170°C まで急冷, 液体窒素中へ

回避のため移植しなかった胚である。この期間移植する新鮮胚は原則として3個に制限し、余剰分割胚はその形態上の quality に関わらずすべて凍結保存した。胚は授精後48~96時間(4細胞期~桑実期胚)で凍結開始した。

2. 凍結融解法²⁾

胚は室温で3段階にDMSOとsucroseを添加, 最終濃度DMSO 1.5M, sucrose 0.1Mの凍結保護液(表1)に移した後, プラスチックストローに封入した。その後プログラムフリーザー(大阪酸素, FFP190)中で室温より 0°C まで急冷後, 毎分 2°C で冷却, -5.5°C で植氷後, -40°C まで毎分 -0.3°C にて冷却, 以後 -170°C に急冷した。その後プログラムフリーザーから取り出し, 液体窒素中に保存した。

融解は大部分の胚で約 25°C の室温に無風状態で静置する方法を用いたが, 一部の胚では 37°C 微温湯中で急速に融解する方法も用いた。融解後, 室温にて6段階にDMSO, sucroseを希釈, $5\% \text{CO}_2$ in air で約3時間培養した後, 胚移植に供した。

3. 融解胚移植のタイミング³⁾

融解胚移植のタイミングは, hCG投与によって

調整した。図1に示したように, 経腔超音波断層法にて主席卵胞最大径が 20mm を越えた日にhCG 5,000単位(ゴナトロピン, 帝国臓器)投与(day 0), 42時間後に経腔超音波により排卵を確認, 凍結時の胚の分割時期に関わらずすべて87時間後に胚融解を開始した。なお87時間という時間は新鮮卵による体外受精の際にhMGからhCGへの切り替えを行ってから, 胚を移植するまでの時間と等しい(図1)。また, 黄体賦活のためday 2, 4, 6, 9にhCG 5,000単位を投与した。

4. 凍結開始時, 融解後の胚形態評価と統計処理

凍結開始時にfragmentationの有無, 卵割が均等であるかにより胚を良好分割胚(以下良好胚)と非良好分割胚に分類した。すなわち授精後48~60時間では4~6分割で卵割が均等であり, fragmentationが胚体積の5%以内のものを良好胚とし, また60時間以上では少なくとも8分割以上で, 割球が均等であるものを良好胚とした(写真1A, B)。

融解後, 胚体積の50%以上が正常形態である胚(生存胚)および100%正常形態である胚の融解胚

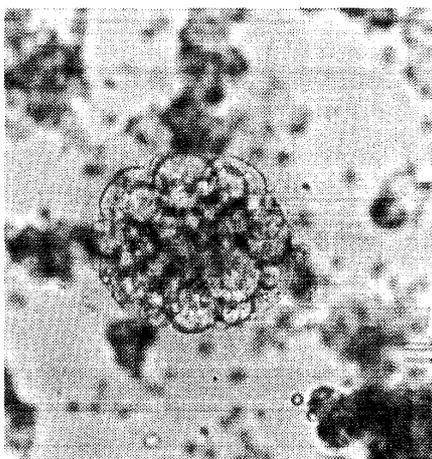
表2 凍結開始時期と融解後胚形態

授精~凍結開始 (hr)	融解胚数	100%形態正常(%)	50%以上形態正常(%)*
60>	62	24(39)	41(66)
60≤	114	79(69)	99(87)
total	176	103(59)	140(80)

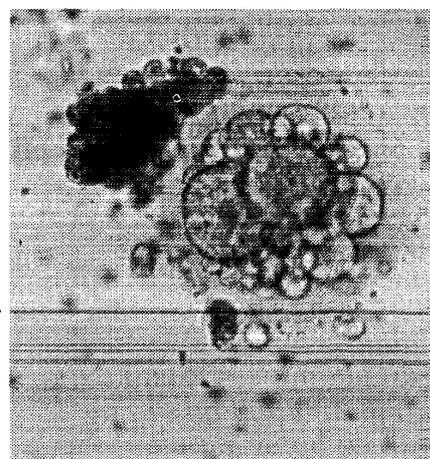
*100%形態正常胚を含む

b; $p < 0.01$

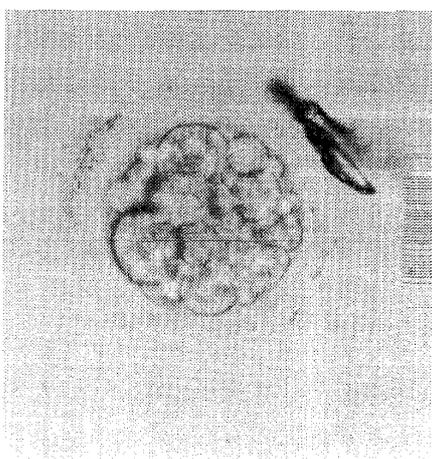
c; $p < 0.001$



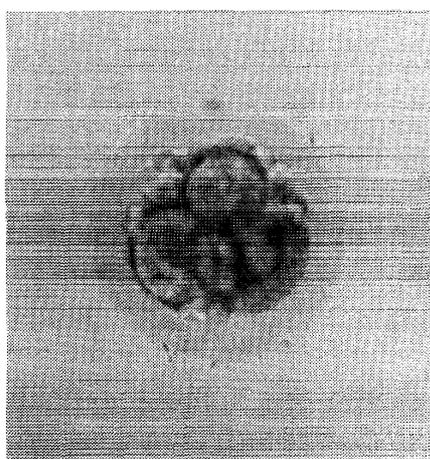
A



B



C



D

写真1 凍結前後の体外受精胚 (A, B: 凍結前, 授精後68時間 C, D: 授精後68時間胚を凍結融解直後, $\times 200$)

A: 良好胚, B: 非良好胚, A に比較して割球の大きさが不揃いである。C: 良好胚(融解後), すべての割球が立体感をもち, 変性は認められない。D: 非良好胚(融解後), 右下の大きな割球が立体感を失い, 変性している。

表3 凍結時胚 quality と融解後胚形態

授精～凍結開始 (hr)	胚 quality	融解胚数	100%形態正常(%)	50%以上形態正常(%)*
60>	良好	29	7(24)	14(48)
	非良好	32	16(50)	25(78)
60≤	良好	72	53(74)	64(89)
	非良好	43	24(59)	34(79)

*100%形態正常胚を含む

a; $p < 0.05$

総数(喪失胚も含む)に対する割合を求めた。

統計学的検定はカイ2乗検定を用い, 例数が10以下の場合 Yates の補正を行った。

結 果

1. 凍結実施の頻度

同期間(平成元年11月～平成4年4月)に464例の採卵術を施行, このうち104周期(22%)で胚凍

表4 凍結受精卵による妊娠例

症例	授精～凍結(hr)	融解胚形態 ¹⁾	転 帰
1	48	0/2/2	単胎, 男児2,600g
2	72	2/2/2	自然流産(7週)
3	48	3/3/5	子宮外妊娠
4	68	4/4/4	単胎, 男児2,718g
5	48	2/3/3	双胎, 女児2,992g 女児2,688g
6	48, 72	3/5/6	双胎(34週早産) 男児2,260g 女児2,200g
7	68	2/2/2	自然流産(7週)
8	68	2/2/2	単胎, 男児3,170g
9	48	2/3/3	単胎, 男児2,460g
10	68	3/3/3	自然流産, 8週(双胎)
11	60	0/1/2	自然流産, 7週

注. 数字は左から100%正常胚数/50%以上正常胚数/融解胚数

結を行った. 同期間の平均採卵数は4.76であった.

2. 融解胚の生存率とそれに関与する因子(表2, 表3)

凍結融解後, 176個の胚のうち80%が光顕上生存胚と考えられ, 59%の胚は全く障害を受けていなかった. 融解時に発見できなかった胚(喪失胚)が9個(5%)存在した.

これを授精から凍結開始まで60時間未満の群と60時間以上の群にわけてみると, 分割が進み, 割球の平均直径の小さい後者で100%形態正常胚, 50%以上形態正常胚(生存胚)とも高率であった(表2).

次に胚の quality や個々の割球の大きさと凍結融解への抵抗性の関係を見るために, 良好胚と非良好胚の融解成績を検討してみた(表3). 授精から60時間以上経過してから凍結した胚では, 良好胚群で生存胚の割合が高い傾向にあり, 100%形態正常胚は74%と有意に高率であった. これに対して60時間未満では良好胚(48%)より非良好胚(78%)に生存胚が有意に高率であり, これらの非良好胚では, 不均等に分割した割球のうちの小さい割球に融解後正常形態を示す細胞が多く, 大きな割球は変性していることが多かった(写真1D).

3. 妊娠例とその経過

胚移植を62周期に行い妊娠11例(17.7%), 分娩

6例(9.7%)を得た(表4). 内訳は双胎2例, 単胎4例, 自然流産4例, 子宮外妊娠1例である. 妊娠例では, 融解した胚のほとんどが凍結融解による損傷を受けていない例が多いが, 生存胚1個を移植した場合や(症例11), 非良好胚で一部損傷した胚のみを移植した場合(症例1)にも妊娠例が認められた. 胚あたりの着床率は8.0%(14/176), 胚あたりの生児出生率は4.6%(8/176)であった(なお, 症例10は流産であるが, 子宮内に胎児エコーを含む胎嚢が明瞭に二つ確認されたため, 着床胚は2個とした).

授精から48~60時間の胚と60時間以上の胚を比べてみると, 妊娠数は4例と6例, 分娩数は3例と2例であった(症例6は授精後48時間で凍結した胚と68時間で凍結した胚を同時に移植している). 着床数は5個と6個で, 妊娠率・着床率からみるとこの2群に差がなかった.

出産例の胚保存期間は最長で11カ月であった(症例5).

考 察

ヒト胚凍結保存法は Trounson et al.⁴⁾によって最初の妊娠例が報告されて以来, 主として多胎妊娠の予防と採卵術に伴う患者の身体的負担の軽減を目的として急速に普及してきた. 最近の報告⁹⁾では米国の体外受精登録施設の72%が胚凍結保存を実施しており, この方法が体外受精やGIFTを行ううえでなくてはならないものになってきていることを示している.

胚凍結保存法として現在まで多くの報告があるのはDMSOを用いた-80℃までの緩速冷却法(以下, DMSO単独法)とpropanediol(PROH)とsucroseを用いた-30℃までの緩速冷却法である(以下, PROH法). 前者では8細胞期の胚の生存率が優れており⁶⁾, 後者では前核期~4細胞期までの胚, 特に前核期胚で有効であるといわれている^{7,8)}.

今回我々の用いた方法(DMSO-sucrose法)はすでにわが国で妊娠例が報告された方法⁹⁾を改良したものであるが, DMSOとsucroseの組み合わせは超急速凍結法(プログラムフリーザーを用いずに室温から液体窒素に投入する)でも用いられ

ており、ヒトでの妊娠例の報告もある¹⁰⁾。超急速法ではDMSO, sucrose濃度はそれぞれ3.0~4.5 M, 0.25~0.3Mと高いが、二つの凍結保護剤の配合比は我々の方法に近いことは興味深い。

融解時の胚生存率からみると、我々の用いたDMSO-sucrose法は授精から凍結開始までの培養時間が長く、分割の進んだ胚に有効であり、前述のDMSO単独法に類似した傾向を示した。また胚障害の程度は胚のqualityより、個々の割球の大きさに影響される傾向があり、割球が小さいほど形態学的な変化(胚障害)は少なかった。

現在DMSO単独法で胚凍結保存を行う施設が少ない理由は、有効性及安全性が劣るからではなく、この方法が凍結操作に5時間近くを要するため一般病院で応用するのが時間的に困難なためである。DMSO-sucrose法はPROH法と所要時間は大差なく、この方法がDMSO単独法と同じく8細胞期以降の胚に有効であるならば、前核期~4細胞期胚にはPROH法、それ以降の胚にはDMSO-sucrose法と、各々の時間的制約を補完しあうものとして臨床上有用であると考えられる。また、4細胞期を越えて培養すれば胚の分割の様子も確かめることが可能であり、ある程度移植した胚のqualityも類推することができる。

前述した米国の報告では、凍結保存胚移植による妊娠・分娩率は移植あたりそれぞれ12%、9%である。また現在最も普及しているPROH法では総融解胚数617個に対して、胚あたりの移植率71.3%、着床率8.6%、移植周期あたりの妊娠率は12.9%、分娩率5.7%との報告¹⁰⁾があり、現在の技術水準では凍結受精胚移植の妊娠・分娩率は一般にこの程度であると思われる。わが国の最近の報告では移植あたりの妊娠率は11.1%、分娩率8.5%でありそれほどの遜色はないが、胚凍結保存を報告した施設は実施施設数の8%に過ぎず¹¹⁾、多胎による低出生体重児や極小未熟児の発生とその予後を考えれば、わが国でも今後ますます普及していく技術であるといえる。

新しい生殖医学技術で常に問題となるのは安全性、すなわち胎児への影響である。凍結保存のように浸透圧・耐凍剤・低温などさまざまな非生理

的条件が存在する技術ではこの点が特に問題であり、治療をうける患者にとって最大の関心事である。米国の報告³⁾では凍結融解胚移植による妊娠で染色体異常は妊娠382例に対して2例(0.5%)、先天異常は分娩291例に対して1例認められたただけであった(0.3%)。同じ報告で新鮮胚の染色体異常が2%(10/476)、先天異常が5.1%(19/371)認められたこと、前述のTestart et al.のグループがPROH法のみで凍結保存を行って50例の妊娠例で先天異常は1例しか認めておらず¹²⁾、例数は少ないが今回の8例の出生児にも全く異常がみられていないことから、少なくとも凍結操作により染色体異常や先天異常が増加することは考えにくい。体外受精以上に胚にストレスをかける凍結保存法で異常の発生が統計学上低率である理由は、着床不全や流産といった自然淘汰のほかに、現状では余剰胚の凍結保存が主流であり、凍結胚が得られる症例は比較的若年で卵巣の反応がよい例に限られているためかもしれない。児の長期予後に関しては、今後検討を続けていきたい。

稿を終るにあたり、労を惜しまず協力していただいた荻窪病院検査部の藤沢洋子、武田公位、安部和子、鈴木久仁子の各氏に感謝いたします。

文 献

1. 片山恵利子, 久慈直昭, 遠藤勝英, 菅原正人, 杉山 武, 飯田悦郎. 良好な妊娠成績の得られる体外受精-胚移植のプロトコール. 日産婦誌 1990; 42: 211-214
2. 久慈直昭, 宮崎豊彦, 菅原正人, 片山恵利子, 杉山 武, 藤沢洋子, 武田公位, 飯田悦郎. ヒト胚凍結保存法における融解法と凍結溶液の影響. 日産婦東京地方部会誌 1991; 40: 216-218
3. 久慈直昭, 宮崎豊彦, 菅原正人, 片山恵利子, 杉山 武, 飯田悦郎. ヒト胚凍結保存法と外因性hCG投与による同期化の試み. 日受精着床会誌 1991; 8: 119-122
4. Trounson AO, Leeton JF, Wood C, Webb J, Wood J. Pregnancies in humans by Fertilization in vitro and embryo transfer in the controlled ovulatory cycle. Science 1981; 212: 681-682
5. Medical Research International. Society for Assisted Reproductive Technology. In vitro fertilization-embryo transfer in the United States: 1990 results from the IVF-ET registry. Fertil Steril 1992; 57: 15-24

6. Camus M, Wisanto A, Van den Abbeel E, Devroey P, Van Waesberghe L, Van Stierteghem A. Human embryo viability after freezing with dimethylsulfoxide as a cryoprotectant. *Fertil Steril* 1989; 51: 460-465
7. Testart J, Belaisch-Allart J, Lassale B, Hazout A, Forman R, Rainhorn J, Gazengel A, Frydman R. Factors influencing the success rate of human embryo freezing in an in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 1987; 48: 107-112
8. Troup SA, Matson PL, Critchlow JD, Morroll DR, Lieberman BA, Burslem RW. Cryopreservation of human embryos at the pronucleate, early cleavage, or expanded blastocyst stages. *Eur J Obstet Gynecol Rep Biol* 1990; 38: 133-139
9. 飯塚理八, 青木 類. ヒト受精卵の凍結保存. 凍結および乾燥研究会誌 1990; 36: 3-9
10. Gordts S, Roziars P, Campo R, Noto V. Survival and pregnancy outcome after ultrarapid freezing of human embryos. *Fertil Steril* 1990; 53: 469-472
11. 日本産科婦人科学会理事会内委員会. 平成3年度, 生殖医学の登録に関する委員会報告. 日産婦誌 1992; 44: 499-511
12. Frydman R, Forman RG, Belaisch-Allart J, Hazout A, Fernandez H, Testart J. An obstetric analysis of fifty consecutive pregnancies after transfer of cryopreserved human embryos. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 160: 209-213

(No. 7383 平5・4・7 受付)