

反復 ART 不成功例に対する胚盤胞移植の臨床成績

¹⁾広島 HART クリニック

²⁾ローズレディースクリニック等々力

³⁾大阪 HART クリニック

向田 哲規¹⁾ 高橋 克彦¹⁾ 岡 親弘²⁾ 富山 達大³⁾

Clinical outcome of Blastocyst Transfer in Women with Multiple Failures of Conception after ART

Tetsunori MUKAIDA¹⁾, Katsuhiko TAKAHASHI¹⁾, Chikahiro OKA²⁾ and Tatsuhiro TOMIYAMA³⁾

¹⁾Hiroshima HART Clinic, Hiroshima

²⁾Rose Lady's Clinic Todoroki, Tokyo

³⁾Oosaka HART Clinic, Oosaka

概要 目的：反復 ART 不成功例においては、原因が胚の質にあるのか、子宮の着床条件にあるのかは、従来の方法では明らかにできなかった。本研究では胚盤胞移植(BT)を試み、原因の究明と妊娠率の向上を試みた。

方法：過去に3回以上胚移植を行っても妊娠に至らなかった204症例の患者に対して269周期のIVF, ICSI, 凍結胚移植を行い、胚盤胞になるまで培養し、1個以上の胚が胚盤胞まで発育した周期でBTを実施した。

成績：228周期でBTが可能であった(キャンセル率15.2%)。54周期で妊娠が確認でき(妊娠率BT当り23.7%, 患者当り26.5%)、すでに20例が22人の児を出産し、19例がongoing, 13例が流産, 2例が子宮外妊娠であった。妊娠率は40歳以上の高齢者で有意に低く($p < 0.05$)、また反応不良例でも低かった($p < 0.05$)。

考察：BT法にて患者当り26.5%が妊娠したことは、良好胚を移植しても子宮内では胚盤胞に発育できない症例が存在することが示唆され、一方、胚盤胞の発育が得られない症例では胚の質的不良があることが示唆された。BTで妊娠に至らない症例では、臨床的にみて子宮の着床因子の存在も含まれていることが示唆された。

結論：BT法は反復 ART 不成功例の原因究明に有用であり、不成功例でもその後の治療方針決定に重要な情報が得られる。妊娠率も今回適応とした症例では、従来法より高く、BT法は有効な治療法であると考えられた。

Abstract Objective : To search for the causes of multiple failures of conception after ART and increase the pregnancy rate (PR) in these cases by means of blastocyst transfer (BT).

Methods : The study was performed on 269 cycles in 204 patients who had failed to conceive more than 3 times after ART attempts. Fresh and thawed zygotes were cultivated in sequential medium until blastocyst formation. BT was performed on 228 cycles from those who had one or more blastocyst. Transfer was cancelled if none of them developed to a blastocyst by day 7 after insemination (cancellation rate 15.2%).

Results : Fifty-four patients conceived (PR 23.7%), indicating that their embryos could not have developed to blastocysts in their uteri after transfer on day 2 or 3 after insemination. 15.2% of patients could not have BT, indicating that they had problems in the quality of embryos. Those who failed to conceive after BT may have problems in the conditions of implantation in their uteri. PR was significantly lower in those who were more than 40 years old and had fewer than 5 oocytes collected. Twenty patients have delivered 22 babies, 19 Pregnancies are ongoing, 13 resulted in abortion and 2 had an ectopic pregnancy.

Conclusions : BT is a useful method to use in searching for the causes and to increase the PR in those

who had multiple failures of conception after ART.

Key words : Blastocyst transfer · IVF · Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) · Cryopreservation

緒 言

体外受精・胚移植(IVF-ET)を初めとするヒト補助生殖技術(ART)の進歩には目を見張るものがある。しかしながら実験動物や家畜のそれと比較した場合、ヒトのART成績はいまだ低く、満足できるものではない。わが国のヒトARTにおける胚移植当りの妊娠率が16~24%(平成8年度)¹⁾と報告されているが、動物では60%に達している²⁾。ヒトの妊娠率が低い原因として、動物実験と違い採卵、胚移植を同一人物で行うため、卵や精子の質、受精率、胚の質の問題と、早期に胚移植が行われるために生じる子宮内膜との非同期性の問題が考えられる。細胞質内精子注入法(ICSI)の出現で受精の問題はほぼ解決をみたが、胚の質及び、ET時の胚分割状態と子宮内膜との非同期性によると考えられる着床不全に関しては依然解決されていない。これらの問題の解決法としてBolton et al.は1989年胚盤胞移植(BT)をヒトで行ったが、成績は期待したほどでなかった³⁾。その後、いろいろな細胞を使用した共培養法でBTが行われ、高い妊娠率が報告されるようになった^{4)~6)}。しかし共培養法については、細胞からの感染の可能性がある、また煩雑な手技が必要なために限られた施設のみで行われてきた。しかし近年ヒト胚の初期培養の研究が進み、新しい培養液が市販され、高率に胚盤胞まで培養が可能となり、BTによる高い妊娠率が報告されている^{7,8)}。

我々は反復ART不成功の患者に対して、Assisted Hatching⁹⁾、黄体期エストロゲン(E2)療法¹⁰⁾、E2製剤による内膜作成凍結胚移植法¹¹⁾、黄体期子宮鏡検査法¹²⁾など試み、成績を報告してきたが、これらの方法でも妊娠に至らなかった症例では不成功の本当の原因が明らかにできなかった。すなわち良好胚を採卵後2~3日目に移植しても、子宮内で正常に胚盤胞まで成育しているのか否かが不明であった。そこで今回これらの症例に対してBT法を行い、その原因を探求し、知見を得たので報告する。

研究対象と方法

1. 研究対象

対象は過去3回以上、少なくとも1個以上形態学的に良好な胚を移植(凍結胚移植も含む)しても妊娠に至らなかった症例のうち患者が希望し同意が得られた204症例で、詳細はTable 1に示す。患者の平均年齢は34.4歳(27~43)、平均ET回数は3.6回(3~16)であった。ARTの適応では、男性不妊が51例と多く、ついで卵管因子、原因不明が多かったが、原因不明受精障害も原因不明としてICSIを行った。卵巣機能不全は多嚢胞性卵巣症候群や、通常の排卵誘発を行っても十分な卵胞が得られず、通常の不妊治療では妊娠に至らなかった症例である。子宮因子は、採卵日の子宮内膜の厚さが8mm以下、子宮体前後の幅が30mm以下¹³⁾の小さい子宮、双角子宮など先天性奇形、Adenomyosisなどである。

2. 研究方法

1997年8月より1998年12月までに広島HARTクリニック、大阪HARTクリニック、ローズレディースクリニック等々力で、204症例に対して269周期のBTを試みた。内訳はIVF 78症例、106周期、ICSI 62症例、85周期、凍結胚移植64症例、78周期であった(Table 2)。IVF及びICSIの方法についてはすでに報告した通りであるので、文献を参考にして頂きたい^{14,15)}。媒精あるいはICSI後16~18時間で受精の確認をして、平衡化しておいたS-1培養液(Scandinavian IVF Science AB, Gothen-

Table 1 Patients' characteristics

No. of patients	204
Mean age	34.4(27-43)
No. of previous ET cycles	3.6(3-16)
Diagnosis	
Male factor	51
Tubal factor	45
Uterine factor	27
Ovarian factor	13
Endometriosis	23
Unknown	45

Table 2 Results of BT

No. of patients		204
No. of attempted cycles		269
ART methods	IVF	106
	ICSI	85
	FET	78
Mean No. of eggs retrieved		12.7(1-32)
No. of BT cycles	(%/total cycles)	228(84.8)
No. of cancelled cycles	(%/total cycles)	41(15.2)
Mean No. of blastocysts transferred		2.7(1-4)
No. of pregnant cycles	(%/BT)	54(23.7)

FET : Frozen-Thawed embryo BT

berg, Sweden)に移した。翌日も分割状態を観察し、3日目にS-2培養液(Scandinavian IVF Science AB)に移し、胞胚腔を形成した胚盤胞に発育するまで培養し、最長7日目まで観察を続け、1個以上胚盤胞に発育した段階でBTを行った。7日目になっても胚盤胞に発育しなかった症例では、胚移植はキャンセルとした。BT後は連日プロゲステロン(P)投与を行い、採卵後16日目に血中HCGを測定した。凍結胚移植の患者は全員、生理3日目よりプレマリン3.75mg/日を開始し、生理14日目以後内膜の厚さが8mm以上になった日にP50mg、あるいはP90mg入り腔クリーム(Crinone 8% Wyeth-Ayerst Laboratories, Philadelphia, PA, USA)を開始し、胚解凍後は新鮮胚BT同様に胚盤胞に発育するまで培養、BTを行った。P開始後16日目にHCGテストを行い、陽性の患者は妊娠8

週の終わりまでプレマリン、Pの投与を続けた¹¹⁾。妊娠の成立は胎嚢(GS)の確認、あるいは腹腔鏡による子宮外妊娠の確認のみとした。妊婦は全員心拍確認後、希望する産科施設へ紹介した。成績は χ^2 検定を使用して統計処理を行った。

研究成績

8分割胚から胚盤胞、さらにハッチングまでの発育状況をPhoto. 1~8に示す。媒精3日目の8分割(Photo. 1)、4日目の桑実胚にて一部compactionあり(Photo. 2)、さらに完全なcompaction(Photo. 3)胚胞腔ができ始めの初期胚盤胞(Photo. 4)、そして完全な胚盤胞(Photo. 5)、拡大胚盤胞(expanded blastocyst)(Photo. 6)、6日目ハッチング中の胚盤胞(Photo. 7)で、完全に透明帯より脱出した胚盤胞である(Photo. 8)。Photo. 9~11は胞胚腔(blastocele)を形成しているが、栄養外胚葉(trophectoderm)の細胞数が少なく、良質胚盤胞とはいえない。Gardner et al. が提唱し広く用いられている胚盤胞gradingのcriteria⁷⁾をTable 3に示した。

臨床成績をTable 2に示す。204症例に対して269周期の治療を試みたが、BTができたのは228周期であった(キャンセル率15.2%)。平均2.7個のBTを行ったところ、54周期で妊娠が確認でき、BT周期当りの妊娠率は23.7%であった。3施設間の成績に差は認められなかった。そして20例より22人の児が出産、19例がongoing、13例が流産、2例が

Table 3 Blastocyst grading

Blastocysts are first given a numerical score from 1 to 6 based upon the degree of expansion and hatching status ;

- (1) early blastocyst ; the blastocoel being less than half the volume of the embryo.
- (2) blastocyst ; the blastocoel being greater than half the volume of the embryo.
- (3) full blastocyst ; the blastocoel completely fills the embryo.
- (4) expanded blastocyst ; the blastocoel volume is now greater than that of the early embryo and the zona is thinning.
- (5) hatching blastocyst ; the trophectoderm has started to herniate though the zona.
- (6) hatched blastocyst ; the blastocyst has completely escaped from the zona.

The initial phase of the assessment can be performed on a dissection microscope.

The second step in scoring the blastocysts should be performed on an inverted microscope.

For blastocysts graded as 3 to 6 (i.e. full blastocysts onwards) the development of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm can then be assessed ;

ICM grading

- A. Tightly packed, many cells
- B. Loosely grouped, several cells
- C. Very few cells

Trophectoderm grading

- A. Many cells forming a cohesive epithelium
- B. Few cells forming loose epithelium
- C. Very few cells

From D. Gardner, et al.⁷⁾

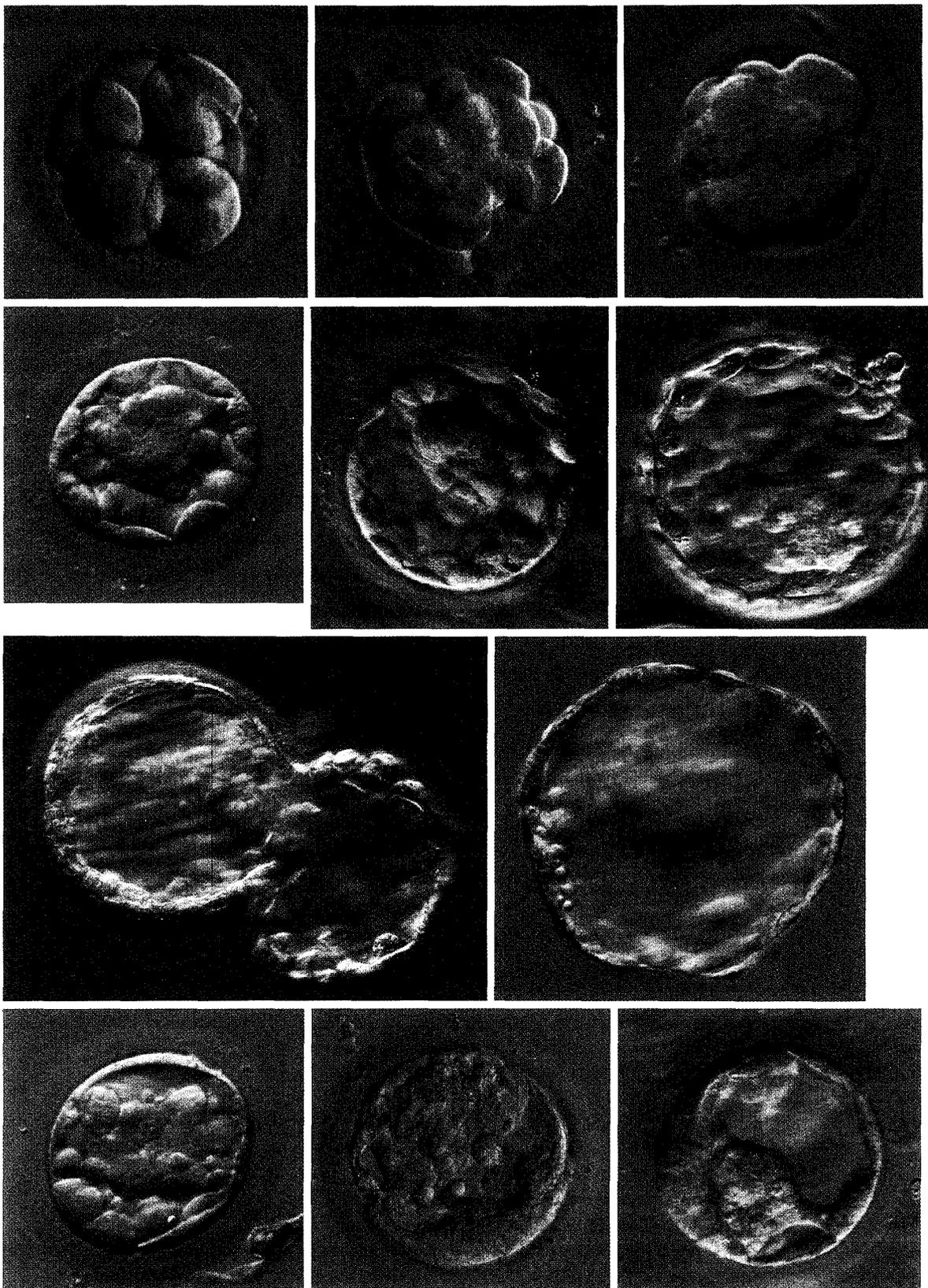


Photo. 1	Photo. 2	Photo. 3
Photo. 4	Photo. 5	Photo. 6
Photo. 7		Photo. 8
Photo. 9	Photo. 10	Photo. 11

Table 4 Comparisons of pregnancy rate with indications of BT

Indications	No. of			No. of pregnancy (%) ¹	Preg. rate/ BT
	pa-tient	cycle	BT cycle		
Tubal factor	45	60	52	86.7	11 21.2
Endometriosis	23	33	24	72.7 *	5 20.8
Uterine factor	27	31	27	87.1	10 37.0 *
Ovarian dysfunction	13	23	17	73.9 *	3 17.6
Male factor	51	65	59	90.8	11 18.6
Unknown	45	57	49	86.0	14 28.6
Total	204	269	228	84.8	54 23.7

* p < 0.05 (%)¹; BT/total attempted cycles

子宮外妊娠であった(1999年3月現在). 適応別で成績を比較すると(Table 4), 子宮因子の妊娠率が37.0%と最も高く(p<0.05), ついで原因不明であった. また妊娠率が低かったのは卵巣機能不全の症例(p<0.05)でBTキャンセル率も高く, 卵の質に問題のあることが示唆された. また男性不妊の症例では, 胚盤胞到達率が一番高かったにもかかわらず妊娠率が2番目に低いことから, 胚盤胞を移植しても妊娠しにくいことに関係する, 妻の側の診断不能な着床の問題も含まれる可能性が示唆された.

年齢別に胚盤胞発達率を新鮮胚(Table 5)と凍結胚(Table 6)で比較した. 新鮮胚では受精率は年齢間で差は認められなかったが, 胚盤胞発達率では40歳以上の症例で有意に低かった(p<0.05). 凍結胚でも解凍後の胚の生存率や胚盤胞発達率は40歳以上で有意に低かった(p<0.05). その結果, 40歳以上の症例では, 有意にBTキャンセル率は高

く, 平均BT数も少なく, 妊娠率も40歳未満のそれより低かった(p<0.05). これらの結果は予想されたことではあるが, あらためて40歳以上の症例では受精しても多くは異常卵であることが示唆された. 胚移植日と妊娠率を比較してみると, 5日目と6日目では差は認められなかったが, 7日目では症例が少ないものの, 妊娠例は1例で, その後流産に終わっている(Table 7). このことより良好胚は, 媒精後6日目までに胚盤胞に発達することが示唆された. 媒精3日目の胚分割状態とその後の胚盤胞発達をみると(ICSI 20症例, Table 8), 3日目で8分割以上の胚の胚盤胞発達率が高いものの, それ以下の胚でもその後25%が胚盤胞に発達していることから, 従来行っている胚の質の判定法は不十分であることも示唆された. 採卵数と妊娠率の関係を Table 9に示す. 採卵数を6個で分けた理由としては, 胚盤胞発達率は一般的に30~50%と考えられ, 少なくとも一つ以上の胚盤胞を得るためには受精卵が3個以上必要となる. 受精率がIVF, ICSIにおいては70%程度なので十分な胚盤胞数を得るためには, 採卵数6個以上が必要と考えたためである. 予想されたとおり, 5個以下の採卵数の症例では有意に妊娠率は低く, また通常IVF, ICSIのそれよりも低いことより, 反応不良例ではBT法も有効でないことが示唆された. 移植胚数と妊娠率の関係を Table 10に示す. 3個ETで妊娠率は最も高かった(p<0.05)が4個ETの症例と一緒にしても多胎妊娠率は5%と低かった. このことは今回の症例の多くが着床に問題があることをあらためて示唆した.

Photo. 1; Day 3 post insemination, morphologically good 8-cell embryo

Photo. 2; Day 3—4 post insemination, early morula stage embryo : beginning of compaction

Photo. 3; Day 4 post insemination, morula stage good embryo : each blastomeres were compacted

Photo. 4; Day 4—5 post insemination, early good blastocyst : beginning of the blastocoel formation (2)

Photo. 5; day 5 post insemination, full good blastocyst : the blastocoel complete fills the embryo (3AA)

Photo. 6; Day 5—6 post insemination, expanded good blastocyst : the blastocoel volume is now larger than that of the early embryo and zona is thinning (4AA)

Photo. 7; Day 6 post insemination, hatching good blastocyst ; the trophectoderm has started to herniate through the zona (5AA)

Photo. 8; Day 6—7 post insemination, hatched blastocyst : the blastocyst has completely escaped from the zona (6AA)

Photo. 9—11; Day 5 post insemination, morphologically poor blastocyst : ICM (inner cell mass) and trophectoderm have less numbers of cell and irregular shape (3BC)

Table 5 Results of BT according to patients' age

Age	No. of							
	patient	cycle	egg	embryo	blastocyst	BT cycle	mean embryo	pregnancy
—29	22	33	603(18.3) ¹	370(61.4) ²	145(39.2) ³	30(90.9) ⁴	3.0	9(30.0) ⁵
30—34	50	66	917(13.9)	627(68.4)	229(36.5)	61(92.4)	3.1	20(32.8)
35—39	53	61	689(11.3)	488(70.8)	159(32.6)	50(82.0)	2.9	10(20.0)
40—	31	31	213(6.9)*	136(63.8)	29(21.3)*	21(67.7)*	2.4*	1(4.8)*
Total	156	191	2,422(12.7)	1,621(66.9)	562(34.7)	162(84.8)	2.9	40(24.7)

¹: Mean No. of eggs ²: Mean fertilization rate(%) ³: Blastocyst development rate(%)

⁴: % of BT cycles/total cycles ⁵: Pregnancy rate/BT(%) * : p < 0.05

Table 6 Results of thawed embryo BT according to patients' age

Age	No. of		No. of embryos		No. of			
	patient	cycle	thawed	survived	blastocyst	BT cycle	mean embryo	pregnancy
—29	5	7	35(4.9) ¹	26(74.3) ²	12(46.2) ³	6(85.7) ⁴	2.6	2(33.3) ⁵
30—34	32	39	215(5.5)	149(69.3)	68(45.6)	35(89.7)	2.5	8(22.9)
35—39	21	25	135(5.4)	98(72.6)	41(41.8)	20(80.0)	2.7	4(20.0)
40—	6	7	24(3.3)*	14(58.3)*	5(35.7)*	5(71.4)	2.0*	0(0)
Total	64	78	409(5.2)	287(70.2)	126(43.9)	66(84.6)	2.5	14(21.2)

¹: Mean No. of thawed embryos ²: Mean fertilization rate(%) ³: Blastocyst development rate(%)

⁴: % of BT cycles/total FET(%) ⁵: Pregnancy rate/BT(%) * : p < 0.05

Table 7 Comparisons of pregnancy rate on the day of BT

Day of BT	No. of		Mean No. of blastocyst transferred	No. of pregnancy
	cycle	blastocyst		
Day 5	191(71.0) ¹	519	2.9	46(24.1) ²
Day 6	26(9.7)	76	2.3	7(26.9)
Day 7	11(4.1)	21	2.0	1(9.1)*
Cancelled cycle	41(15.2)			
Total	269(100)	616	2.7	54(23.7)

¹: % of total BT cycles ²: Pregnancy rate * p < 0.01

Table 8 Prediction of blastocyst development at day 3 embryos' stage

Day 3 stage	No. of		Developmental rate *
	embryo	blastocyst	
> 8 cell	68	27	39.7
6—7 cell	31	11	35.5
< 5 cell	41	7	17.1
Total	140	45	32.1

* : % of blastocyst development from day 3 embryos

Table 9 Pregnancy rate according to No. of eggs retrieved

No. of eggs retrieved	No. of		
	total cycle	BT cycle	Pregnancy
≥ 6 cell embryos	146	133(91.1) ^{1*}	37(27.8) ^{2*}
≤ 5 cell embryos	45	29(64.4)	3(10.3)
Total	191	162(84.8)	40(24.7)

¹: % of BT ²: % of pregnancy/BT cycle * : p < 0.05

Table 10 Comparisons of pregnancy rate with No. of blastocyst transferred

No. of blastocyst transferred	No. of ¹		No. of multiple pregnancy
	BT cycle	pregnancy(%)	
1	29	5(17.2)	0
2	43	9(20.9)	0
3	96	26(27.1)*	1(Triplets)
4	60	14(23.3)	1(Twins)
Total	228	54(23.7)	2

¹: Pregnancy rate/BT cycles(%) * : p < 0.05

考 察

胚盤胞移植という以前より行われている方法が

一般化しなかった最大の理由は、次に挙げるような点である。まず一つ目は培養条件に関してであり、従来の IVF に使用されている培養液は、いわゆる balanced salt solution にエネルギー源として糖分を使用するといった単純な組成であり、Hams' F-10, HTF や MEM 液は体細胞を培養するために開発されたもので、必ずしも生殖細胞の培養に適しているとはいえなかった。そのため採卵後2~3日目で胚移植を行うのは子宮は体外で培養するよりは、至適な培養器ではないかという背景があった。また胚盤胞まで培養するためには煩雑な手順を必要とする共培養法などを使用しなければならなかった。しかし多種動物及びヒトの卵管内液や子宮内腔液を研究した結果、初期胚と桑実胚以後の成育に必要なエネルギーが違うことが分かり¹⁶⁾¹⁷⁾、胚盤胞まで培養するには単一の培養方法では難しいことが明らかになった。そのため、Gardner et al. は初期胚培養液 (Day 0~3) の glucose 量を低くし Taurine などの可欠アミノ酸と EDTA を加え (S-1液)、胚盤胞まで培養する後期胚培養液には glucose 量を増加し、必須アミノ酸を加え、EDTA は除去して (S-2液) 胚盤胞培養を試み、共培養法と同じ高率の胚盤胞発達率及び妊娠率を得、その後同様の結果が他の施設からも報告されている¹⁸⁾¹⁹⁾。今回、我々の研究結果も同様であり、sequential medium 使用による BT の有効性は認められた。もう一つの点は子宮内腔環境に関してである。Gardner et al. によると⁷⁾ 卵管内に胚がある時期の子宮腔内はやや酸性に傾いており決して胚発育に適した状態ではなく、その上胚盤胞になっていない段階での胚には、 $\text{pH} < 7.0$ の状態での代謝調節を行う機能が著しく低下していることが知られており、胚を compaction 前の段階で子宮に戻すことはかなりなストレスとなることが予測される点である。これらのことから臨床的に受け入れられるレベルの2種類の培養液を組み合わせた培養システムが確立されつつある現在、胚盤胞移植も一つの ART 手法と考えられる時代となった。

しかし BT の適応についてはいまだ確定していない。従来法と比べて胚当りの着床率は高くなる

ものの、胚盤胞まで発育する率が限られるため、受精卵数当りの着床率では従来法のそれと大きな差は認められていない²⁰⁾。初期胚 (前核, 2分割) の段階で scoring を行い、良質の胚移植を行うと患者当りの妊娠率は BT のそれと差がないという報告もあり²¹⁾、多くの報告は対象を反復 ART 不成功例の治療や、多胎妊娠防止、胚の質の判定⁶⁾などに限られている。従来法の ET は、ヒトでは 2PN ~ 8分割の胚を子宮内腔に戻しても胚は発育し、着床に至るという前提で行われている。ヒトの子宮は他動物と違い、着床前胚にとっては優れた培養器であると考えられている²³⁾。しかし子宮内環境 (培養条件) が悪ければ当然発育のブロックがかかることが考えられるし、また胚そのものの質が悪ければ胚盤胞まで発育しない。従来法では不成功の理由がどちらなのか明らかにできないが、BT 法ではより多くの情報を得ることができる。すなわち、胚盤胞まで発育し、BT 後患者当り 26.5% 妊娠したという結果は、従来法での反復 ART 不成功例ではそれだけの割合で、子宮内で胚が発育していなかったことを示唆し、また 15.3% の BT キャンセルがあったことは、それだけ胚の質に問題があったことを示唆している。その意味からも今回の結果で子宮因子の症例において有意に妊娠率が高かったことは (Table 4)、胚の成育に適していない子宮環境に採卵後2~3日目で戻すより、胚盤胞まで体外で培養し着床直前の状態で戻すほうがよいと考えられた。胚の質についても一般に Day2 で 4 分割、Day3 で 8 分割であれば良好胚と考えられてきたが、今回の結果で胚の形態のみで質を判定することが困難であることも明らかになり (Table 8)、BT 法で初めて反復 ART 不成功の原因が明らかとなることが多い。しかし胚盤胞を移植しても着床しない例では、子宮の receptivity が問題となる。男性不妊の症例では BT キャンセル率が最も低かった (最も胚盤胞発達率が高い) にもかかわらず、妊娠率が2番目に低かったことは、不妊の原因が男性側にのみにあると診断されている夫婦のなかには、かなりの率で妻の側にも診断不能な子宮の receptivity という問題も含まれる可能性が示唆された。

卵子提供によるレシピエントの妊娠率がドナーのそれより高いことは良く知られている²²⁾。すなわち、内因性の卵巣機能では子宮の着床準備 (receptivity) が不十分である症例が存在する可能性も推測される¹¹⁾。今回の凍結 BT はその意味で、全例 E2 と P 投与による子宮内膜作成後に行った。その結果、BT 当り 21.2% とわが国の平均凍結胚移植妊娠率より高率であったことは、我々の推測が正しいことが証明された。一般に反応不良例や高齢者の妊娠率が低く、その原因が卵の質にあることはすでに明らかとなっているが、今回の結果でも証明された。胚盤胞発達率が 30~40% などで採卵数が 5 個以上と未満の症例と比較すると、有意に採卵数 5 個以上の症例で妊娠率が高かった。BT キャンセル率はそれぞれ 9.9%, 35.6% で、胚盤胞発達率は差がなかったものの BT 数が反応不良例で少ないため、妊娠率が低いという従来法と同様の結果であった (Table 9)。これらの結果より、反応不良例では、BT 法も有効でないと考えられた。

年齢別では 40 歳以上の胚盤胞発達率や妊娠率が有意に低く (Table 5, 6)、これらの症例でも BT 法は無効と考えられた。しかし BT 法の結果で、これらの患者が、患者自身の胚の質に問題があり、それが不妊の原因であることを指摘され、妊娠を諦めることを納得できるようにもなるので、最後の方法としてこれらの高齢者に対しても BT 法は試みる意義はあると考えられる。

ET 数と妊娠率及び多胎妊娠率について考察してみると、ET 数が 1 個より 3 個までは数が増えるに従って妊娠率は有意に上昇したが、4 個では差がなかった (Table 10)。2 個移植で多胎妊娠 0, 3, 4 個で多胎妊娠率 5% という結果は、今回の症例のように反復 ART 不成功例では、3 個まで BT しても多胎妊娠率は低いことを示唆している。Gardner et al.⁷⁾ のように多胎妊娠防止のために BT を行う場合と対象が全く違い、反復 ART 不成功例では着床障害が多く存在することが示唆された。

良好胚は採卵後 5 日目で胚盤胞にまで発育するが、5 日目では compaction で 6 日目で胚盤胞になる胚も少なくない。Table 10 に示したように、3

日目で 8 分割未満でも 25% の胚が胚盤胞まで発達することは、従来法での胚の質の判定法では不十分ということが示唆された。BT 日の違いによる妊娠率の差は 5 日目と 6 日目で認められなかった。しかし 7 日目で胚盤胞に発育する胚もあるが、数は少なく、1 例の妊娠も流産に終わったことより (Table 7)、7 日目で BT するか否かについては議論の余地が残る⁸⁾。

以上のように BT 法の利点は 1. 子宮内膜との同期化 (Synchronization)⁸⁾ 2. 胚の質の判定⁸⁾ 3. 多胎妊娠の防止⁷⁾ 4. ラボの Quality control²³⁾ である。BT 法が従来法より妊娠率において優れているか否かについては、今後の研究を待たねばならないが、対象を 40 歳未満の反復 ART 不成功例に限ると、妊娠率は 26.2% であり、一般に ART 4 回目以後の妊娠率が下がることを²⁰⁾ 考慮すれば満足すべき結果と考える。したがって、このような症例では従来法を続けるよりも BT 法が優れていると考えられた。また同じ protocol で 3 施設の成績に差がなかったことは、BT 法が有効な治療法であることを示唆している。我々は現在 S-1, S-2 より新しい培養液、G1.2, G2.2 (Scandinavian IVF Science AB) を使用して BT を行っており、成績の向上をみている。BT 法の問題点としては 1. 手技が煩雑になる。2. ET 日があらかじめ決まらない。3. 胚盤胞まで成育するか否か毎日考えるために生じる患者の精神的ストレスの増加。4. 胚盤胞にならなければすべての治療の終わりを意味するのか? などが考えられる。これらの問題の多くは患者の精神的ストレスに関与するため、専門のカウンセラーの存在が重要になってくる。その意味でも BT 法を実施する施設は、専門のチームを作り、厳しい Quality control の下で培養できるエンブリオロジストや、専門カウンセラーが必要である。従来のように産婦人科医療の一部という考え方は、BT 法による ART の成果は期待できない。

文 献

1. 平成 9 年度 診療・研究に関する倫理委員会報告. 平成 8 年度分の体外受精・胚移植等の臨床実施成績および平成 10 年 3 月における登録施設名. 日産婦誌 1998; 50: 267-277
2. Iritani A. Current status of biotechnological stud-

- ies in mammalian reproduction. *Fertil Steril* 1988 ; 50 : 543—547
3. *Bolton VN, Hawes SM, Taylor CT, Parson JH*. Development of spare human preimplantation embryos in vitro : an analysis of the correlations among gross morphology, cleavage rates, and development to the blastocyst. *J In Vitro Fertil Embryo Transfer. Biology of Reproduction* 1989 ; 6 : 30—35
 4. *Menezo YJR, Guerin JF, Czyba JC*. Improvement of human early embryo and development in vitro by coculture on monolayers of Vero cell. 1990 ; 42 : 301—306
 5. *Bongso A, Ng SC, Fong CY, Ratman S*. Cocultures : a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. *Fertil Steril* 1991 ; 56 : 179—190
 6. *Olivennes F, Hazout A, Lelaidier C, Freitas S, Fanchin R, de Ziegler D, Frydman S*. Four indications for embryo transfer at the blastocyst stage. *Hum Reprod* 1994 ; 9 : 2367—2373
 7. *Gardner KD, Phil D, Vella P, Lane M, Wagley L, Schlenker T, Schoolcraft WB*. Culture and transfer of human blastocysts increases implantation rates and reduce the need for multiple embryo transfer. *Fertil Steril* 1998 ; 69 : 84—88
 8. *Jones GM, Trouson A, Lolatgis N, Wood C*. Factors affecting the success of human blastocyst development and pregnancy following in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril* 1998 ; 70 : 1022—1029
 9. 高橋克彦, 竹中真奈美, 石塚文平. 反復して着床に至らない症例に対する Assisted hatching の治療効果. *日産婦誌* 1994 ; 46 : 1009—1012
 10. 高橋克彦, 塚本早苗, 向田哲規. ART 反復着床不成功例の対策 I 黄体期エストロゲン(E)補充療法 第14回日本受精着床学会演題 86, 1996
 11. 高橋克彦, 竹中真奈美, 塚本早苗, 石塚雄作. IVF 反復施行不成功例への対策. *Pharma Medica* 1994 ; 12 : 41—45
 12. 高橋克彦, 塚本早苗, 向田哲規. ART 反復着床不成功例への対策 II 子宮鏡検査の着床への影響. 第14回日本受精着床学会演題 87, 1996
 13. *Strohmer H, Obruca A, Radner KM, Feichtinger W*. Relationship of the individual uterine size and the endometrial thickness in stimulated cycle. *Fertil Steril* 1994 ; 61 : 972—975
 14. 高橋克彦, 竹中真奈美, 高橋健太郎. 男性不妊症に対する卵卵腔内精子注入法の臨床成績. *日産婦誌* 1994 ; 46 : 21—26
 15. 高橋克彦, 竹中真奈美. 顕微授精による妊娠 : 出生児62例の検討. *日産婦誌* 1995 ; 47 : 565—568
 16. *Biggers JD, Gardner DK, Leese HJ*. Control of carbohydrate metabolism in preimplantation mammalian embryos. In : Rosenblum IY, Heyner S eds. *Growth factors in mammalian development*. USA : CRC Press, Boca Raton, 1989 ; 19—32
 17. *Gardner DK, Lane M, Calderon I, Leeton J*. Environment of the preimplantation human embryo in vivo : metabolic analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cell. *Fertil Steril* 1996 ; 65 : 349—353
 18. *Behr B, Pool TB, Milki AA, Moore D, Gebhardt J, Dasing D*. Preliminary clinical experience with human blastocyst development in vitro without co-culture. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 454—457
 19. *Edwards RG, Beard HK*. Blastocyst transfer : pitfalls and benefits. *Hum Reprod* 1999 ; 14 : 1—6
 20. *Scott LA, Smith S*. The successful use of pronuclear embryo transfers the day before oocyte retrieval. *Hum Reprod* 1998 ; 13 : 1003—1013
 21. *Bavister BD, Boatman DE*. The neglected human blastocyst revisited. *Hum Reprod* 1997 ; 12 : 1607—1610
 22. *Paulson RJ, Sauer MV, Lobo RA*. Embryo implantation after human in vitro fertilization : importance of endometrial receptivity. *Fertil Steril* 1990 ; 53 : 870—874
 23. *Lopata A*. The neglected human blastocyst. *J Assisted Reprod Genet* 1992 ; 9 : 508—512
 24. *Meldrum DR, Silverberg KM, Bustillo M, Stokes L*. Success rate with repeated cycles of in vitro fertilization-embryo transfer. *Fertil Steril* 1998 ; 69 : 1005—1009
(No. 8056 平11・4・28受付, 平11・9・6採用)