

## 自然排卵周期での凍結融解胚移植における 黄体期の治療別妊娠成績の検討

### Comparison of the Pregnancy Outcomes in Patients Receiving Hormone Replacement in the Luteal Phase after Transfer of Frozen-Thawed Embryos in the Natural Ovulatory Cycle

田中 里美<sup>1\*</sup>・後藤 栄<sup>1</sup>・橋本 洋美<sup>1</sup>・泉 陽子<sup>1</sup>  
松永 雅美<sup>1</sup>・苔口 昭次<sup>1</sup>・塩谷 雅英<sup>1</sup>

Satomi Tanaka<sup>1\*</sup>, Sakae Goto<sup>1</sup>, Hiromi Hashimoto<sup>1</sup>, Yoko Izumi<sup>1</sup>,  
Masami Matsunaga<sup>1</sup>, Shoji Kokeyuchi<sup>1</sup> and Masahide Shiotani<sup>1</sup>

<sup>1</sup>英ウイメンズクリニック 〒650-0021 神戸市

<sup>1</sup>Hanabusa Women's Clinic, Sannomiya Central Building 2nd Floor, 1-1-2 Sannomiya, Chuo-ku, Kobe city, Hyogo 650-0021, Japan

**要旨：**自然排卵周期を利用して凍結融解胚移植を行った223周期を対象とし、黄体期のホルモン療法の違いにより妊娠成績に差があるかどうかについて検討を行った。黄体期のホルモン療法として、hCGを投与した40周期をA群、hCG投与に加えプロゲステロン膣座薬を投与した83周期をB群、hCG投与とプロゲステロン膣座薬に加えエストラジオール貼布剤を使用した100周期をC群とした。移植あたりの臨床妊娠率及び着床率は、A群42.5%、28.0%、B群45.8%、30.3%、C群63.0%、44.3%であり、いずれもA群及びB群と比較してC群が有意に高率であった。以上より、自然排卵周期での凍結融解胚移植では黄体期にhCG投与に加えプロゲステロン膣座薬とエストラジオール貼付剤投与を行う事が妊娠率及び着床率を高めるために有用であることが示唆された。  
キーワード：凍結融解胚移植、自然排卵周期、プロゲステロン、エストラジオール

**Abstract:** The aim of this study was to determine whether there is a difference in pregnancy outcomes dependent on the kind of hormone replacement treatment in the luteal phase after transfer of frozen-thawed embryos in the natural ovulation cycle. Two hundred and twenty-three cycles were examined in this study. The cycles were divided into three groups. In group A (40 cycles), the luteal phase was supported by human chorionic gonadotropin (hCG). In group B (83 cycles), the luteal phase was supported by hCG and vaginal suppository of progesterone. In group C (100 cycles), the luteal phase was supported by hCG, vaginal progesterone and transdermal estradiol. The pregnancy rate and implantation rate in group C (63.0% and 44.3%) were significantly higher than those in group A (42.5% and 28.0%) and group B (45.8% and 30.3%). In conclusion, administration of vaginal progesterone and transdermal estradiol in addition to hCG in the luteal phase in the natural ovulation cycle is effective for improving pregnancy and implantation rates in patients undergoing transfer of frozen-thawed embryos.

**Key words:** Frozen-thawed embryo transfer, Natural ovulation cycle, Progesterone, Estradiol

(受付 2007年12月2日/受理 2008年2月28日)

別刷請求先：〒650-0021 神戸市中央区三宮町1丁目1-2

三宮セントラルビル2階

英ウイメンズクリニック

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: hb-labo@amber.plala.or.jp

#### はじめに

現在、生殖補助医療において、多数の受精卵が得られた際の余剰胚の有効利用や、卵巣過剰刺激症候群 (ovarian hyperstimulation syndrome : OHSS) の重症化の予防などを目的として胚凍結が広く行われている。凍結融解胚を用いた移植は、自然排卵周期に行う場合と、ホルモン調節周期で

行う場合とがある。このうち、自然排卵周期での凍結融解胚移植では、黄体期にホルモン療法を行わない場合もあるが、ホルモン療法を行う場合には、human chorionic gonadotropin (hCG) 投与<sup>1)</sup>や、プロゲステロンの補充<sup>2,3)</sup>など様々な方法が行われている。そこで、今回、自然排卵周期を利用した融解胚移植後の妊娠成績を上げるためには黄体期にどのようなホルモン療法が有効であるかについて、hCG、プロゲステロン腔座薬及びエストラジオール貼付剤を用いて検討を行った。

## 対象と方法

### 1) 対象

2004年4月から2006年3月に自然排卵周期で凍結融解胚移植を行った223周期を対象とし前方向的に検討を行った。2004年4月から2005年7月(第1期)はA群、B群およびC群の3群に分けて検討を行った。融解胚移植を行う予定の症例をA群→B群→C群→A群→B群→C群→A群の順に繰り返し振り分けた。この期間において臨床妊娠率はA群42.5% (17/40)、B群50% (20/40)、C群68% (34/50)であり、A群がC群と比較して有意(カイ二乗検定 $P=0.015$ )に低率であったためA群の研究は打ち切った。2005年8月から2006年3月(第2期)は、B群とC群の2群に分けて検討を行った。融解胚移植を行う予定の症例をB群→C群→B群→C群の順に繰り返し振り分けた。本研究のデザインから、A群と他の二群を単純に比較検定することは難しく第1期と第2期に分けてそれぞれ検討するのが望ましいが、検討周期数が少なくなり有意差検定が困難となるため、本研究では、第1期および第2期において各群で移植方法、卵巣刺激法に偏りが無いことを確認した上で全期間での検討とした。各群に振り分けられたが融解後に胚の変性により移植できなかった周期、および患者都合などにより排卵後8日目の血中エストラジオール値及びプロゲステロン値を測定できなかった周期は検討から除外した。

超音波検査において主席卵胞が消失した日を排卵日とした。

hCG (HCG フジセイヤク<sup>®</sup>, 富士製薬工業, 日本) を排卵後2, 5, 8日目に3,000単位ずつ筋肉注射した40周期をA群、hCG投与に加えプロゲステロン腔座薬400 mg (院内作製) を排卵後2日目から連日投与した83周期をB群、hCG投与とプロゲステロン腔座薬に加えエストラジオール貼付剤(エストラダーム<sup>®</sup>, キッセイ薬品工業, 日本)(エストラジオール0.72 mg/1枚)を排卵後5日目から3枚ずつ1日おきに貼付した100周期をC群とした。貼付薬と腔座薬は妊娠判定日である排卵後15日目まで投与を継続し、妊娠の成立した周期においては、プロゲステロン腔座薬は妊娠8週まで投与し、エストラジオール貼付剤は妊娠7週まで貼付を行った。

### 2) 方法

#### ①採卵・受精・胚培養

卵巣刺激法は、原則としてlong protocol, short protocol

又はantagonist法を用い、静脈麻酔下で経腔超音波ガイド下に採卵を行った。精液調整は、密度勾配法及びswim up法で行い運動良好精子を回収した。回収卵子は3~5時間前培養した後、媒精は調整精子10万/mlの濃度にて行った。また、卵細胞内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)はマイクロマニピュレーター(OLYMPUS ON2-99D-3)を装着した倒立顕微鏡(OLYMPUS IX-70)下に施行した。媒精またはICSI施行18~20時間後に受精確認を行った。胚培養は、採卵から受精確認まではUniversal IVF Mediumにて、受精確認後はBlastAssist<sup>®</sup> System Medium 1にて、後期培養はBlastAssist<sup>®</sup> System Medium 2(以上すべてMediCult a/s, Jyllinge, Denmark)にて培養した。培養条件は5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>, 37°C, 湿度100%で行った。

#### ②胚凍結・融解

胚の凍結は、vitrification kit vitrification media (北里バイオファルマ, 日本)を用いて行った。胚を平衡化液にて平衡させたのち、ガラス化液に投入し、少量のガラス化液と共にクライオトップ(北里バイオファルマ, 日本)上にのせ、液体窒素中に投入した。

胚の融解は、vitrification kit thawing media (北里バイオファルマ, 日本)を用いて行った。37°Cの融解液にクライオトップの先端を浸漬し、次に希釈液、洗浄液の順に胚を投入し処理した。融解後の胚はBlastAssist<sup>®</sup> System Medium 2を用いて培養し、移植に用いた。

#### ③胚移植

胚移植は、初期胚移植、胚盤胞移植、または二段階胚移植を施行した。外陰部および腔内を生理的食塩水で洗浄し、ファイコン移植カテーテル(富士システムズ, 日本)などのソフトカテーテルを用い、超音波下にて施行した。ファイコン移植カテーテルが挿入困難である場合は、フレスポイト移植カテーテル(北里サプライ, 日本)などのスタイルット付きカテーテルを使用した。

### 3) 検討項目

3群の妊娠率、着床率、流産率を検討した。また、3群における排卵後8日目の血中エストラジオール値及びプロゲステロン値を検討した。さらに排卵後8日目の血中エストラジオール値を50 pg/mlごと、プロゲステロン値を5 ng/mlごとにグループ分けして、そのグループの妊娠率との相関を検討した。

子宮内に胎嚢が確認できた周期を臨床妊娠とし、子宮内に確認できた胎嚢数を移植胚数で割ったものを着床率とした。

有意差検定はカイ二乗検定およびt検定を用い、 $P<0.05$ を有意差ありとした。

## 結果

患者の平均年齢±SDは、A群33.8±2.3歳、B群34.6±4.9歳、C群34.5±4.2歳、平均既往ART回数±SDはA群2.4±2.9回、B群2.2±2.4回、C群2.1±2.5、平均基礎FSH値±

表1 患者背景<sup>※</sup>

	A群	B群	C群
年齢(歳)	33.8 ± 2.3	34.6 ± 4.9	34.5 ± 4.2
既往ART回数	2.4 ± 2.9	2.2 ± 2.4	2.1 ± 2.5
基礎FSH値(IU/L)	6.6 ± 1.3	6.5 ± 2.0	6.4 ± 2.7
移植胚数	1.9 ± 0.7	1.8 ± 0.7	1.9 ± 0.7

すべてM ± SD. ※3群間で有意差認めず.

表2 妊娠成績

	A群	B群	C群
移植あたり臨床妊娠率	42.5% (17/40) <sup>a</sup>	45.8% (38/83) <sup>b</sup>	63.0% (63/100) <sup>c</sup>
移植胚あたり着床率	28.0% (21/75) <sup>d</sup>	30.3% (43/142) <sup>e</sup>	44.3% (85/192) <sup>f</sup>
妊娠あたり流産率	17.6% (3/17)	9.3% (4/43)	7.9% (5/63)

ac, bc, df: P < 0.05; ef: P < 0.01; ab, de: 有意差なし.

SDはA群6.6 ± 1.3 mIU/ml, B群6.5 ± 2.0 mIU/ml, C群6.4 ± 2.7 mIU/ml, 平均移植胚数 ± SDは, A群1.9 ± 0.7個, B群1.8 ± 0.7個, C群1.9 ± 0.7個であり, 3群間に有意な差は認められなかった(表1).

卵巣刺激法において, 3群間で有意な差は認められなかった. また, 全胚凍結後融解移植した周期と余剰胚凍結後融解移植した周期はそれぞれ, A群23周期, 17周期, B群45周期, 38周期, C群66周期, 34周期であり3群間に有意な差は認められなかった.

移植方法別周期数およびその割合は, A群は初期胚移植7周期(17.5%), 胚盤胞移植15周期(37.5%), 二段階胚移植18周期(45.0%), B群は初期胚移植17周期(20.5%), 胚盤胞移植35周期(42.2%), 二段階胚移植31周期(37.3%), C群は初期胚移植17周期(17.0%), 胚盤胞移植38周期(38.0%), 二段階胚移植45周期(45.0%)であった. 各群における3種類の移植方法の割合を, A群B群間, A群C群間, B群C群間でそれぞれカイ二乗検定を用いて有意差検定を行ったところ, 移植方法において3群間で有意な差は認められなかった.

移植周期あたりの臨床妊娠率は, A群42.5% (17/40), B群45.8% (38/83), C群63.0% (63/100)であり, A群及びB群と比較してC群が有意に高率であった. 移植胚あたりの着床率は, A群28.0% (21/75), B群30.3% (43/142), C群44.3% (85/192)であり, A群及びB群と比較してC群が有意に高率であった. 妊娠周期あたりの流産率は, A群17.6% (3/17), B群9.3% (4/43), C群7.9% (5/63)であり, 3群間に有意な差は認められなかったが, B群及びC群と比較してA群で高い傾向であった(表2).

排卵後8日目の血中エストラジオールの平均値は, A群332.6 pg/ml及びB群293.3 pg/mlと比較して, C群539.9 pg/mlが有意に高値であった(図1). また, 排卵後8日目の血中プロゲステロンの平均値は, A群21.2 ng/mlと比較してB群

29.8 ng/ml及びC群29.5 ng/mlが有意に高値であった(図2).

排卵後8日目の血中プロゲステロン値が10 ng/ml以下であった周期数はA群2周期(5.0%), B群0周期, C群1周期(1.0%)であり, このうち妊娠が成立した周期は2周期(A群1周期, C群1周期)であった. また, 排卵後8日目の血中エストラジオール値が100 pg/ml以下であった周期数はA群2周期(5.0%), B群1周期(1.2%), C群0周期であり, このうち妊娠が成立した周期はA群の2周期であった.

排卵後8日目のエストラジオール値50 pg/mlごとの妊娠率との相関係数は0.47(図3), プロゲステロン値5 ng/mlごとの妊娠率との相関係数は0.33(図4)であり, どちらも有意性は認められなかったが, エストラジオール値がプロゲステロン値よりも妊娠率との相関関係が強かった.

## 考 察

本研究では, 自然排卵周期での凍結融解胚移植では, 黄体期にhCG投与とプロゲステロンの補充に加えエストラジオール貼付剤を併用することによって妊娠率及び着床率が高率になることが示された. 流産率は黄体期の治療の違いによる差は認められなかった. 卵巣刺激周期において黄体期にエストロゲンを補充することで妊娠率が高くなるという報告<sup>4, 5)</sup>はあるが, 自然排卵周期における融解胚移植プロトコールで, 排卵後のエストロゲン製剤使用の有用性を示したのは, 我々が調べた限りにおいて本研究が初めてである.

自然排卵周期での凍結融解胚移植では, 黄体期の治療としてhCGの投与を行っている報告<sup>1)</sup>や, プロゲステロンの補充を行っている報告<sup>2, 3)</sup>がある一方, ホルモン治療を行わずに胚移植を施行している報告<sup>6, 7)</sup>もある. 当院において, 自然排卵周期で黄体期のホルモン補充を全く行わずに移植を行った周期では, ホルモン補充を行った周期と比較し妊娠率が低かったため(未発表), 今回の研究ではホルモン補

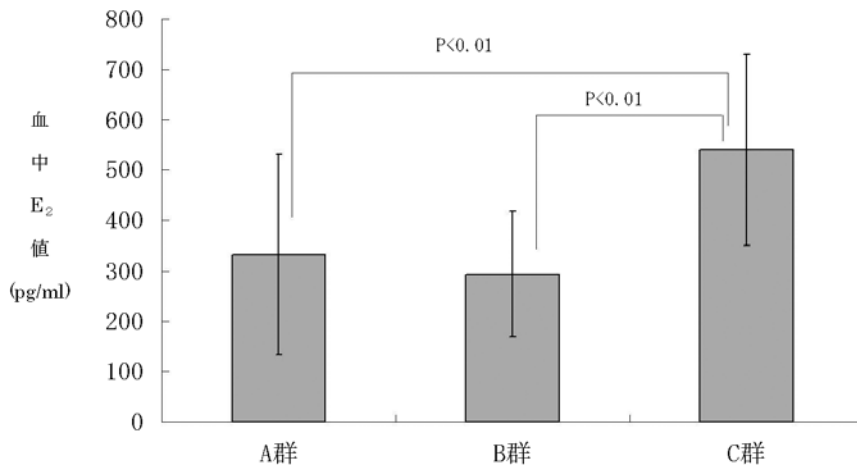


図1 排卵後8日目の平均血中エストラジオール値  
A群及びB群と比較してC群が有意に高値であった。

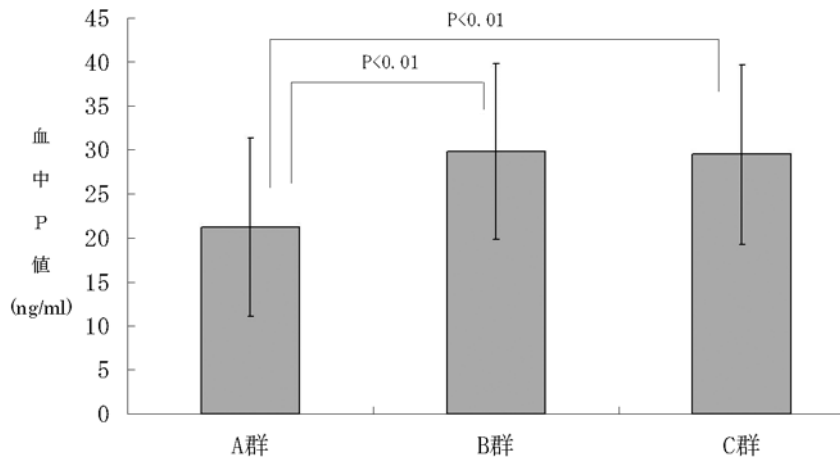


図2 排卵後8日目の平均血中プロゲステロン値  
A群と比較してB群及びC群が有意に高値であった。

充を行わない治療周期との比較検討は施行しなかった。

本研究では、hCGのみ投与群 (A群) と比較し、hCG 及びプロゲステロン投与群 (B群) では血中プロゲステロン値が有意に高値であったが、2群間で妊娠率、着床率ともに有意な差はなかった。また、B群とC群 (hCGとプロゲステロン座薬とエストラジオール貼付使用) ではプロゲステロン値は差を認めなかったが妊娠率、着床率はC群で有意に高率であった。さらに、プロゲステロン値と妊娠率は相関関係が弱いという結果が得られた。今回の検討ではプロゲステロン値が黄体機能不全の指標とされる 10 ng/ml以下であった周期数は3周期のみで、うち2周期が妊娠成立しており、妊娠に必要なプロゲステロン値の下限値は示すことはできなかった。以上より、少なくとも排卵後8日目のプロゲステロン値は妊娠率に大きな影響を与えていないことが示唆され

た。

一方、排卵後8日目の血中エストラジオール値の検討では、エストラジオール貼付剤を併用した群 (C群) は併用しなかった群 (B群) と比較し有意に高値であり、妊娠率、着床率ともに有意に高率であった。さらに、妊娠率はプロゲステロン濃度よりもエストロゲン濃度との相関が強いことが示された。Drakakisら<sup>4)</sup>およびLukaszukら<sup>5)</sup>は、卵巣刺激周期において、黄体期のホルモン補充としてプロゲステロンのみ用いた周期と比較し、プロゲステロンとエストロゲンを併用した周期の方が妊娠率が高率であったと報告している。採卵後の黄体期にはエストラジオール値が低下することから、かれらはエストロゲンを補充することにより黄体期のエストロゲン低下を補うことができたため妊娠率が向上したと考察している。本研究は自然周期であり、排卵後

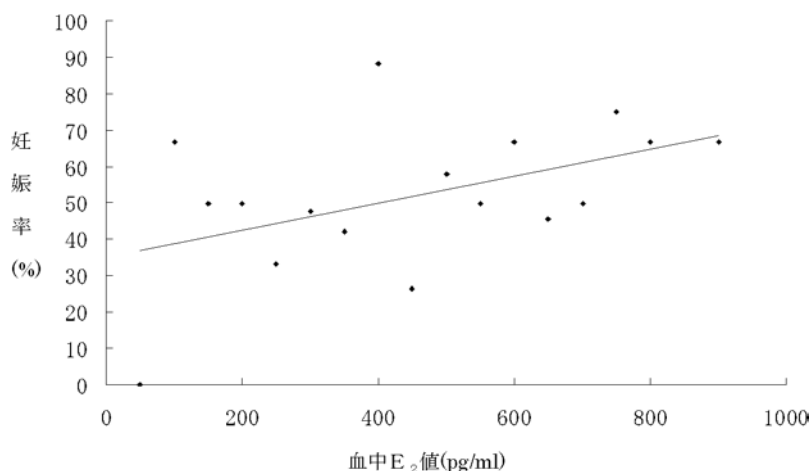


図3 排卵後8日目の血中エストラジオール値と妊娠率の散布図  
相関係数=0.47

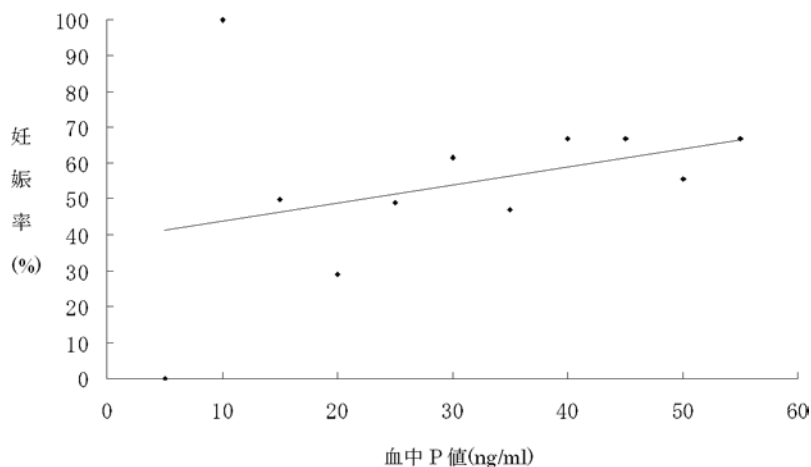


図4 排卵後8日目の血中プロゲステロン値と妊娠率の散布図  
相関係数=0.33

8日目の血中エストラジオール値が100 pg/ml以下であった周期数は223周期中3周期のみであり、エストラジオール値が異常低値であった症例は少数であったため卵巣刺激周期と同様の機序によってエストロゲン併用が有効であったかどうかは明らかではない。Goldsteinらはエストラジオール濃度が低い場合にプロゲステロン濃度が高値であっても妊娠率は低くなると報告している<sup>8)</sup>。また、エストロゲンが子宮内膜のプロゲステロンレセプターを増加させることが報告されており<sup>9,10)</sup>、黄体期中期におけるエストロゲン濃度が着床に重要であることが示されている。今回の検討において、エストラジオール貼付剤を併用した群(C群)が高い妊娠率および着床率であった要因として、エストロゲンが直接着床期子宮内膜に与える影響以外に、高いエストロゲン

濃度により子宮内膜のプロゲステロンレセプターが他群より多く発現したことにより、プロゲステロンに対する反応性が高くなり、着床に有利に働いたのではないかと推察している。

今回の検討で、自然排卵周期での凍結融解胚移植では、黄体期にhCGおよびプロゲステロン腔座薬及びエストラジオール貼付剤を併用し、血中エストラジオール値を高く保つことが、妊娠率および着床率を高めるために有用であることが示唆された。

## 文 献

- 1) Yu Ng, E.H., Yeung, W.S., Yee Lan Lau, E., So, W.W. and Ho, P.C. (2000): High serum oestradiol concentrations

- in fresh IVF cycles do not impair implantation and pregnancy rates in subsequent frozen-thawed embryo transfer cycles. *Hum. Reprod.*, 15, 250–255.
- 2) Tiitinen, A., Halttunen, M., Harkki, P., Vuoristo, P. and Hyden-Granskog, C. (2001): Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum. Reprod.*, 16, 1140–1144.
  - 3) Loh, S.K. and Leong, N.K. (1999): Factors affecting success in an embryo cryopreservation programme. *Ann. Acad. Med. Singapore*, 28, 260–265.
  - 4) Drakakis, P., Loutradis, D., Vomvolaki, E., Stefanidis, K., Kiapekou, E., Anagnostou, E., Anastasiadou, K., Milingos, S. and Antsaklis, A. (2007): Luteal estrogen supplementation in stimulated cycles may improve the pregnancy rate in patients undergoing in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection-embryo transfer. *Gynecol. Endocrinol.*, 23, 645–652.
  - 5) Lukaszuk, K., Liss, J., Lukaszuk, M. and Maj, B. (2005): Optimization of estradiol supplementation during the luteal phase improves the pregnancy rate in women undergoing in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil. Steril.*, 83, 1372–1376.
  - 6) Sathanandan, M., Macnamee, M.C., Rainsbury, P., Wick, K., Brinsden, P. and Edwards, R. (1991): Replacement of frozen-thawed embryos in artificial and natural cycles: a prospective semi-randomized study. *Hum. Reprod.*, 6, 685–687.
  - 7) Gelbaya, T.A., Nardo, L.G., Hunter, H.R., Fitzgerald, C.T., Horne, G., Pease, E.E., Brison, D.R. and Lieberman, B.A. (2006): Cryopreserved-thawed embryo transfer in natural or down-regulated hormonally controlled cycles: a retrospective study. *Fertil. Steril.*, 85, 603–609.
  - 8) Goldstein, D., Zuckerman, H., Harpaz, S., Barkai, J., Geva, A., Gordon, S., Shalev, E. and Schwartz, M. (1982): Correlation between estradiol and progesterone in cycles with luteal phase deficiency. *Fertil. Steril.*, 37, 348–354.
  - 9) Fritz, M.A., Westfahl, P.K. and Graham, R.L. (1987): The effect of luteal phase estrogen antagonism on endometrial development and luteal function in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65, 1006–1013.
  - 10) Kurita, T., Lee, K., Saunders, P.T., Cooke, P.S., Taylor, J.A., Lubahn, D.B., Zhao, C., Mäkelä, S., Gustafsson, J.A., Dahiya, R. and Cunha, G.R. (2001): Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol. Reprod.*, 64, 272–283.