

## The effect of storage time after vitrification on pregnancy and neonatal outcomes among 24 698 patients following the first embryo transfer cycles

Jianghui Li<sup>1</sup>, Mingru Yin<sup>1</sup>, Bian Wang<sup>1</sup>, Jiyang Lin, Qiuju Chen, Ningling Wang, Qifeng Lyu, Yun Wang, Yanping Kuang<sup>\*</sup>, and Qianqian Zhu<sup>\*</sup>

Department of Assisted Reproduction, Shanghai Ninth People's Hospital affiliated to JiaoTong University School of Medicine, Shanghai, China

### 凍結後の保存期間が妊娠・出産に及ぼす影響について 初回の初期胚移植を行った患者24,698人の胚移植サイクル

研究課題：ガラス化凍結後の保存期間が、胚の生存率、妊娠転帰、新生児転帰赤あああ に与える影響を評価する。

要約：凍結保存期間の長さは、生化学妊娠率、臨床妊娠率、出生率などの妊娠成績に悪影響を及ぼしたが、新生児には影響しなかった。

背景：近年、ガラス化凍結法はART治療の基本的な手段となっているが、保存期間が胚や臨床結果に及ぼす影響を検討した研究は少ない。

期間 / 対象：2011年1月から2017年12月までの期間に24,698人の初回の凍結融解胚移植のうち初期胚における移植を受けた患者を対象に、レトロスペクティブな研究を行った。  
対象基準を満たした患者を、保存期間に応じて4グループ分けた。

Group 1： 3ヶ月未満

Group 2： 3ヶ月から6ヶ月未満

Group 3： 6ヶ月から12ヶ月未満

Group 4： 12ヶ月から24ヶ月

多変量ロジスティックと線形回帰を行い、重要な交絡因子を調整して、臨床転帰に対する保存期間の独立した影響を評価した

#### 主な結果

潜在的な交絡因子を調整した後、生化学妊娠率、臨床妊娠率、出生率は保存期間が長くなるにつれて有意に減少したが流産、子宮外妊娠及び新生児転帰（早産、低出生体重、高出生体重、巨大児、先天性欠損症）は保存期間との間には統計的な有意差は認められなかった。

はじめに

凍結保存技術の急速な発展に伴い、ガラス化凍結は近年のART治療の基本的な手段である。

この技術を使用することで、累積出生率が向上した。

緩慢凍結とは対照的に、超急速ガラス化凍結保存は細胞と細胞外環境を氷を作らないでガラス状に固めることができる。

生存率が高く、より良い臨床結果を得ることができる。

その結果、凍結保存された胚の数と保存期間は徐々に増加している。

しかし、より高濃度の凍結保護剤にさらされることによる、潜在的な毒性の影響が懸念される。

胚や臨床結果に影響を与えない最長期間は不明である。胚の生存率や妊娠成績に保存期間が与える影響を調べた研究はほとんどない。

この研究では、保存期間が胚の生存率、妊娠結果、および新生児の転帰に与える影響を調べた。

## 対象

2011年から2017年までの間、体外受精サイクル全胚凍結の患者を対象とした。

今回のレトロスペクティブコホート研究では、凍結融解による初回初期胚移植（FET）を受けた24,698人の女性を対象とした。

本研究では、各女性を1回のみ対象とし、過去に新鮮または凍結胚移植を受けたことのある患者は除外した。

分割期胚と胚盤胞の混合移植を行った患者またPGDを受けた患者も除外した。

## 方法

3日目の胚、グレードIおよびIIの良好胚を凍結保存した。

胚は液体窒素タンクの液相中で $-196^{\circ}\text{C}$ の一定温度で保存し、週に2回、手動で補充した。試験期間中、同じ凍結・融解方法を用いた。

自然周期またはホルモン療法周期で1つまたは2つの胚を移植し、妊娠8週までプロゲステロンの補充を行った。

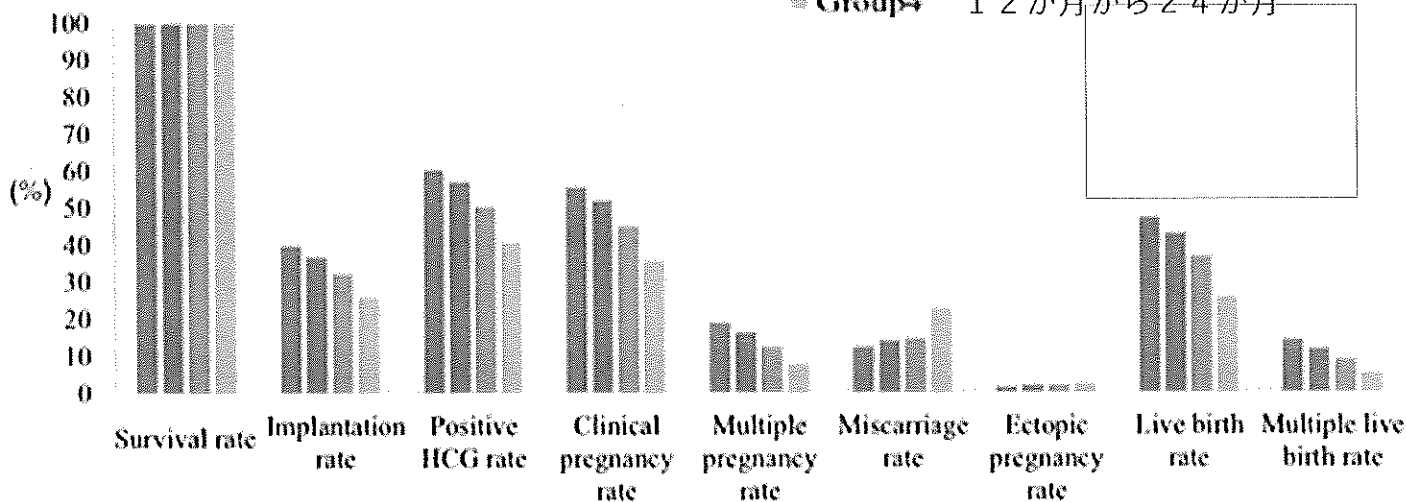
すべての患者に対して胚移植の14日後に血清 $\beta$ HCG値を測定した。

結果が陽性であった場合には、胚移植後GS確認のために約35日目に経膈超音波検査をした。

患者は、移植された胚の保存期間に応じて4つのカテゴリーに分けた。

# 結果

- Group1 3ヶ月未満
- Group2 3ヶ月から6か月未満
- Group3 6か月から12か月未満
- Group4 12か月から24か月



## Pregnancy outcomes following frozen embryo transfer with different storage times.

4つの保管期間グループにおけるFET周期ごとの妊娠結果を示している。群間の生存率に有意差はなかった。

グループ1と4で比較したところ、着床率、HCG陽性率、臨床妊娠率、多胎妊娠率、出生率、多胎出生率は保存期間が長くなるにつれて減少した。流産率、子宮外妊娠率は、保存期間が長くなるにつれて増加したが、統計的有意性は、流産率にのみ認められた。(妊娠転帰の多変量ロジスティック解析、潜在的な交絡因子を調整した後のものである。)

	Group 2	P <sub>1</sub> -value	Group 3	P <sub>2</sub> -value	Group 4	P <sub>3</sub> -value
<b>Positive HCG rate</b>						
Unadjusted OR(95%CI)	0.87 (0.83, 0.92)	<0.001	0.67 (0.62, 0.72)	<0.001	0.45 (0.38, 0.54)	<0.001
Adjusted OR(95%CI) <sup>a</sup>	0.92 (0.87, 0.97)	0.004	0.83 (0.76, 0.90)	<0.001	0.68 (0.56, 0.81)	<0.001
<b>Clinical pregnancy rate</b>						
Unadjusted OR(95%CI)	0.86 (0.82, 0.91)	<0.001	0.65 (0.60, 0.71)	<0.001	0.44 (0.37, 0.53)	<0.001
Adjusted OR(95%CI) <sup>a</sup>	0.91 (0.86, 0.96)	0.001	0.80 (0.73, 0.87)	<0.001	0.65 (0.54, 0.79)	<0.001
<b>Multiple pregnancy rate</b>						
Unadjusted OR(95%CI)	0.84 (0.78, 0.90)	<0.001	0.61 (0.55, 0.69)	<0.001	0.36 (0.27, 0.49)	<0.001
Adjusted OR(95%CI) <sup>a</sup>	0.89 (0.83, 0.96)	0.004	0.82 (0.72, 0.92)	0.001	0.63 (0.46, 0.87)	0.005
<b>Miscarriage rate</b>						
Unadjusted OR(95%CI)	0.89 (0.82, 0.96)	0.005	0.75 (0.66, 0.85)	<0.001	0.54 (0.39, 0.76)	<0.001
Adjusted OR(95%CI) <sup>a</sup>	1.05 (0.94, 1.18)	0.412	0.96 (0.80, 1.14)	0.622	1.32 (0.92, 1.89)	0.127
<b>Ectopic pregnancy rate</b>						
Unadjusted OR(95%CI)	1.26 (0.95, 1.66)	0.108	1.30 (0.86, 1.96)	0.212	1.54 (0.62, 3.83)	0.350
Adjusted OR(95%CI) <sup>a</sup>	1.14 (0.86, 1.52)	0.361	1.18 (0.77, 1.82)	0.440	1.59 (0.63, 4.03)	0.330
<b>Live birth rate</b>						
Unadjusted OR(95%CI)	0.84 (0.79, 0.89)	<0.001	0.65 (0.60, 0.71)	<0.001	0.39 (0.32, 0.47)	<0.001
Adjusted OR(95%CI) <sup>a</sup>	0.89 (0.85, 0.95)	<0.001	0.83 (0.76, 0.91)	<0.001	0.59 (0.48, 0.72)	<0.001
<b>Multiple live birth rate</b>						
Unadjusted OR(95%CI)	0.81 (0.74, 0.87)	<0.001	0.58 (0.51, 0.66)	<0.001	0.33 (0.23, 0.48)	<0.001
Adjusted OR(95%CI) <sup>a</sup>	0.87 (0.80, 0.94)	0.001	0.79 (0.68, 0.91)	0.001	0.60 (0.41, 0.88)	0.008

ガラス化凍結胚の保存期間の違いによる妊娠転帰のオッズ比グループ1を基準に他のグループを比較し有意差を求めた。

新生児の転帰(早産,低出生体重,高出生体重,巨大児,先天性欠損症)に関しては、群間差は認められなかった。  
 多くの交絡因子があるが多変量線形回帰でも、妊娠年齢と出生体重は保存期間と有意な関係がないことが示された。

高齢患者の割合が増加していることを考慮し  
 36歳未満の患者と36歳以上のサブセットで解析したが、全集団での解析と一致した。

**Table III Neonatal outcomes of singletons born after frozen embryo transfer, stratified by the storage times of vitrified embryos.**

	Group 1 (n = 3377)	Group 2 (n = 2705)	P <sub>1</sub> -value	Group 3 (n = 814)	P <sub>2</sub> -value	Group 4 (n = 110)	P <sub>3</sub> -value
Newborn gender, n (%)			0.606		0.504		0.968
Female	1603 (47.47)	1302 (48.13)		397 (48.77)		52 (47.27)	
Male	1774 (52.53)	1403 (51.87)		417 (51.23)		58 (52.73)	
Gestational age, mean ± SD	38.54 ± 1.52	38.53 ± 1.71	0.922	38.43 ± 1.56	0.059	38.38 ± 1.78	0.289
Preterm (<37weeks), n (%)	231(6.84)	186(6.88)	0.956	49(6.02)	0.400	11(10.00)	0.199
Birth weight, mean ± SD	3342.22 ± 479.54	3348.47 ± 513.97	0.625	3339.96 ± 488.33	0.904	3295.73 ± 513.82	0.318
Low birth weight (<2500g), n (%)	120 (3.55)	120 (4.44)	0.079	30 (3.69)	0.856	4 (3.64)	0.963
High birth weight (>4000g), n (%)	206 (6.10)	184 (6.80)	0.267	51 (6.27)	0.860	6 (5.45)	0.780
Macrosomia (>4500g), n (%)	30 (0.89)	23 (0.85)	0.874	3 (0.37)	0.183	1 (0.91)	0.982
Birth defects, n (%)	36 (1.07)	29 (1.07)	0.982	8 (0.98)	0.834	1 (0.91)	0.874

P<sub>1</sub>: Group 2 vs. Group 1, P<sub>2</sub>: Group 3 vs. Group 1, P<sub>3</sub>: Group 4 vs. Group 1.

## 考察

臨床転帰に及ぼす保存期間の長さは本研究により  
 HCG陽性率、臨床妊娠率、出生率などの妊娠転帰にマイナスの影響を与えるが、新生児転帰は保管期間に影響されなかった。

ガラス化凍結保存の普及に伴い、長期保存の安全性が懸念されている。  
 いくつかの動物実験が実施されている。

マウス胚では生存率は低下し、染色体異常は保存期間の延長に伴って増加することが示された。しかしながら、他の動物試験では、胚の生存率、妊娠率および出生率に有意な影響を及ぼさないことが報告されている

保存期間がARTの成績に及ぼす影響を評価したヒト集団研究が報告されているが、その結果は矛盾している。Testartらによる先行研究(1987年)ではヒト胚の生存率および妊娠率は、数ヶ月の保存後に低下することが判明した。一方、Riggsらが1986年から2007年にかけて行ったレトロスペクティブ研究では、生存率、着床率、妊娠率に影響はなかったと結論づけている。  
 上記のすべての研究で使用された凍結方法は、緩慢凍結であった。私たちの知る限り、ガラス化凍結後の保存期間の影響を調査した研究は2つしかありません。

(Wirleitner 2013;上野ら, 2018)。

両研究ともで ガラス化凍結胚盤胞の凍結保存期間は、妊娠および新生児の転帰と有意な関係がないことを報告している。ただし、この研究では、卵管因子不妊症と診断され、以前に移植サイクルに失敗した35～39歳の患者に限定していたり、サンプル数が小さいこともあり、この主題に関する大規模な研究を提案している。

本研究は、ガラス化凍結初期胚の保管時間による影響を解析するために行われた大規模な研究であり得られた知見はこの分野の現在の研究を充実させる可能性がある。

保存期間の長さとは妊娠転帰の悪化との関係の根底にあるメカニズムは不明である。

フリーラジカルや凍結保護剤に関連する毒性作用が、DNAの断片化を増加させる可能性がある。

ガラス化は細胞と細胞外環境を凝固させ、フラクチャー（破碎）の原因となる熱機械的ストレスを低下させます

凍結生物学ではガラス化転移温度 (Tg) 未満の大きな分子の機動性が制限されるが小さな分子の局所的な動きは、Tg の近くまたはそれ以下でも可動する可能性がある (Wowk、2010)。 Tg 未満の分子運動は緩和を引き起こす可能性がありこれはガラス状態で保存された生体物質の分解リスクに関連している。

## 結論

凍結融解胚移植は新鮮胚移植に比べて出生体重の中央値が有意に高いことが報告されている。

しかし私達の研究では保存期間が長くなっても新生児転帰には影響しないことが示された。

新生児の健康という点では本研究は長期凍結保存胚の安全性を証明するものである。

24カ月の保存期間に限定されるものの、保存期間の延長に伴い臨床妊娠率、出生率が低下する傾向を反映した結果であると考えられる。この結果は臨床医が生殖医療を行う前に、保存期間の影響を考慮する必要があることを示唆している。