

Effective protection: the embryonic development and clinical outcomes of emergency vitrification of 1246 oocytes and Day 0–Day 5 embryos in a natural disaster

Wenyan Song ^{†,*} Fuli Zhang[†], Yuan Wang[†], Hao Shi , Ning Sun, Haixia Jin, Xiaopeng Wang, Yihong Guo , Linli Hu , Jun Zhai, Shanjun Dai, Yile Zhang, Yingchun Su , Guidong Yao , Senlin Shi, Shuang Wen, Ning Song, Zhaoting Wu, Lei Chen, Tingting Cheng, Beijia Kang, Jing Sun, Xianju Huang, Zhimin Sun, Luyao Cheng, Yuling Liang, and Yingpu Sun ^{*}

Reproductive Medical Center, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, China

効果的な保護対応

自然災害における1246個の卵子と0日目から5日目の胚の緊急凍結後の胚発生と臨床成績

China

ABSTRACT

Q: 緊急凍結は、自然災害やその他の事象により、正常な培養を妨げるような出来事の際、胚や卵子を保護することができるのか？

A: 災害時、卵子と0日目から5日目(D0-D5)の胚の緊急凍結は、安全で効果的な対応です。

STUDY DESIGN

中国の鄭州（ていしゅう）で記録的な豪雨が発生し、深刻な洪水、交通の混乱、停電が発生した。2021年7月20日17時30分から2021年7月21日17時30分まで、155人の患者の1246個の卵子とD0-D5胚が凍結保存された。ラボには非常用電源のみ設置されていた。

METHODS

2021年12月21日現在、124人の患者の1149個の緊急凍結卵子とD0-D5緊急凍結胚が凍結融解胚移植(FET)を受けた。in vitroでの胚培養の日数に応じて、卵子グループ、0日目～1日目(D0-D1)グループ、2日目-3日目(D2-D3)グループ、4日目-5日目(D4-D5)グループの4つのグループに分けられた。それぞれの対照群は、2018年1月から2021年10月までに体外受精/ICSIを受けたフレッシュサイクルの患者から選択された。その後の培養成績と妊娠成績を分析した。

RESULT

有意差が認められた

卵子の緊急凍結群と対照群の間で受精率 (81%対72%、 $P = 0.022$)

D0-D1群と対照群の間で一卵性双生児妊娠率 (10%対0%、 $P = 0.038$) および子宮外妊娠率 (5%対0%、 $P = 0.039$)

有意差が認められなかった ($p > 0.05$)

緊急凍結卵子/D0-D1胚/D2-D3胚と対照群との間の良好胚数、使用可能な胚盤胞数、臨床妊娠率、流産率、および出生率。
緊急凍結D4-D5群と対照群との間の臨床的妊娠率、流産率、出生率

WIDER IMPLICATIONS OF FINDINGS

本研究は、災害時における緊急凍結卵子、D0受精卵、D1-D5胚の大規模サンプルの胚発生、臨床成績、出生成績を分析した初めての研究である。その結果、緊急凍結は、卵子やD0-D5胚に適用された安全で効果的な保護手段であることが示された。ラボには、全負荷で6～8時間供給できる非常用無停電電源装置 (UPS) を装備する必要がある。



www.ettoday.net
鄭州暴雨380死是「天災+人禍」！...
3418 x 2262 jpeg 1338 KB



www.bbc.com
「息もできなかった」 中国・河南...
640 x 360 jpeg 52 KB



www.cnn.co.jp
豪雨の影響で壊れた橋＝21日、河...
768 x 432 jpeg 146 KB



www.upmedia.mg
中國公布鄭州洪災調查報告 河南官...
1000 x 666 jpeg 83 KB



www.nownews.com
中國鄭州暴雨成災 水入地鐵12死5...
1200 x 810 jpeg 142 KB



www.nownews.com
鄭州洪災 港媒：一把手未連任省委...
1200 x 898 png 1736 KB



www.edigest.hk
河南暴雨 | 鄭州292人遇難47失蹤...
1000 x 600 jpeg 96 KB



www.cup.com.hk
為何中國城市多洪災？ - *CUP媒體
1600 x 1027 jpeg 192 KB



www.storm.mg
陳昭南專欄：河南鄭州洪水氾濫，...
800 x 528 jpeg 65 KB



ec.ltn.com.tw
鄭州洪災重創共軍攻台計劃！傳對...
800 x 533 jpeg 62 KB



news.ltn.com.tw
鄭州暴雨災害究責 鄭州市委書記徐...
800 x 582 jpeg 87 KB



www.ettoday.net
鄭州洪災56死！女駕駛經過地下道...
1700 x 1275 jpeg 667 KB



Introduction

近年、地球の気候は大きく変化し、自然災害が頻発している。IVFラボの停電につながる洪水、地震、およびその他の災害は、いつでもどこでも発生する可能性がある。

壊滅的な災害が発生した場合、緊急凍結は、ヒトの胚、卵子、精子を保護するための緊急管理対策の1つです。しかし、災害における緊急凍結に関する報告は少ない。特に卵子の緊急凍結に関するデータはレアです。そのために、緊急凍結のプロセス、およびその臨床的有効性と安全性はよく把握されていない。

緊急凍結をした卵子とD0-D5の胚が実際にどの程度うまく機能しているかを把握することはラボの災害時対応の鍵となる。

この記事では、2021年7月20日に中国の鄭州で記録的な暴風雨によって引き起こされた長期の停電の壊滅的な状況下での緊急凍結と融解後の臨床データを遡及的に分析している。これらのデータには、患者155人の1246個の卵子とD0～D5の胚が含まれ、最終的に合計124人の患者が分析された。本研究では、災害時での卵子およびD0-D5胚の緊急凍結がその後の結果に及ぼす影響について調査し、実際に発生した緊急時のデータから、体外受精の災害管理戦略を立案することを目的としている。

対象

2021年7月20日の記録的な暴風雨により当センターで7月15日から7月21日までIVF / ICSIを受け、緊急凍結を受けた155人

7月20日20:00から7月21日01:30までの間に129人の患者が緊急胚凍結を受け、7月21日06:00から13:00までの間に26人の患者が緊急卵子回収と凍結を受けた。

すべての患者は21歳から47歳で、平均年齢は32.15歳。

155例（緊急凍結実施）-28例（緊急凍結胚以外をET）-3例（通常凍結分も同時ET）=124例を対象

in vitroでの胚培養の日数に応じて
卵子グループ(23例、卵子242個)

D0-D1群(45例、受精卵(fertilized oocytes) 189個、受精卵(zygotes) 282個、

D2-D3群(33例、受精後48時間までの胚98個、受精後72時間まで胚153個)

D4-D5群(23例、桑実胚168個、胚盤胞17個)

対照群

2018年1月から2021年10月までにIVF / ICSIを受けたフレッシュサイクルの患者

年齢、受精方法、胚発生の日数、および移植された胚の数とグレードに応じて緊急凍結グループの患者と一致させた。

患者は適格な患者から無作為に選択され、4:1の比率で緊急凍結グループと厳密に一致させた。

停電当日のタイムライン

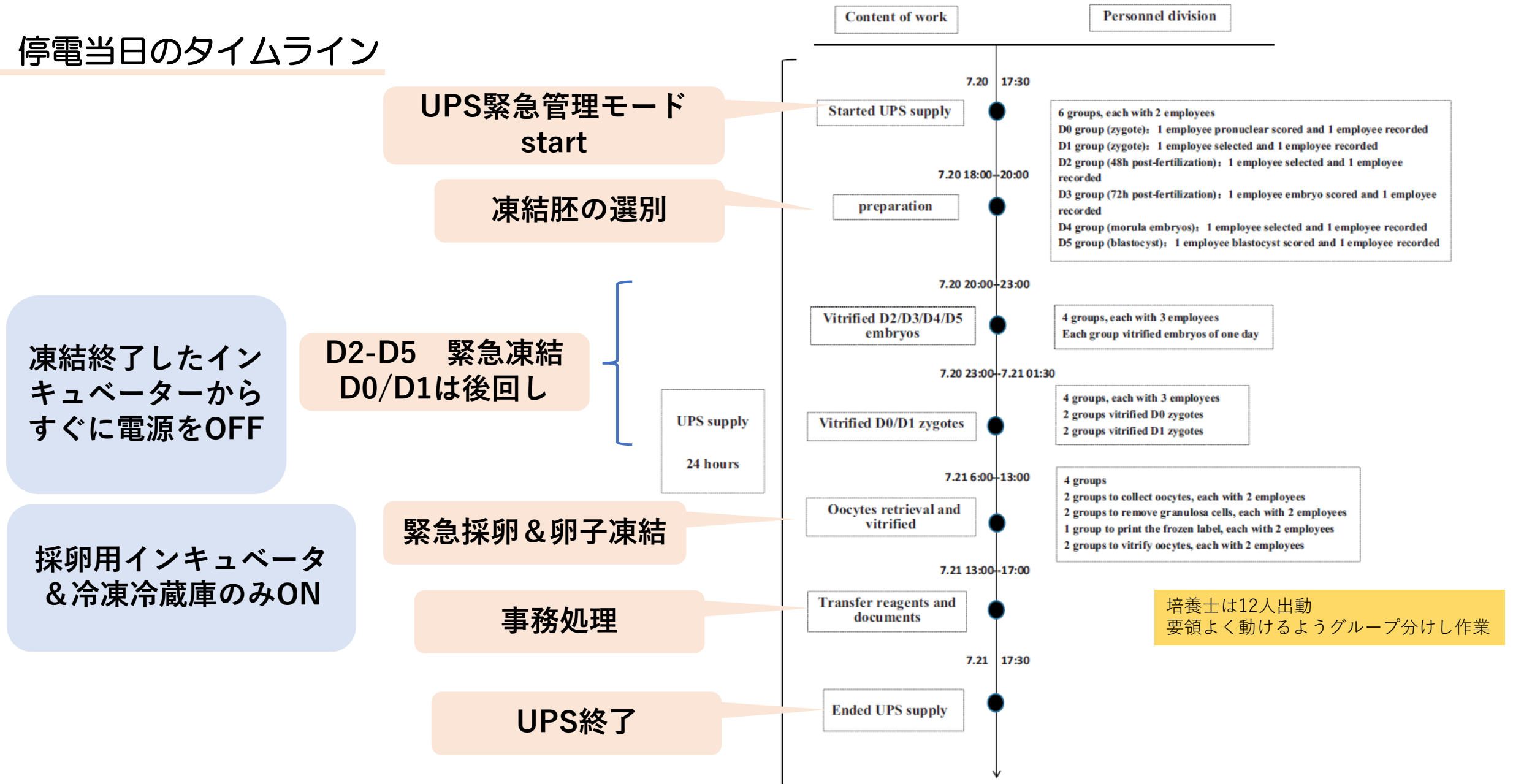


Figure 2. Timeline of emergency vitrification procedure for oocytes and D0-D5 embryos. UPS: uninterrupted power supply; D0: Day 0; D1: Day 1; D2: Day 2; D3: Day 3; D4: Day 4; D5: Day 5.

停電当日のUPS緊急管理方法

2010年に設置されたラボのUPSの容量は、機器の電氣的パラメータに基づいており、6～8時間の全負荷電源供給である

2021年7月20日17時30分、UPS緊急管理モードが開始された。

UPSの容量を節約するために、必要な機器（顕微鏡8台とインキュベータ42台）のみをオンにしたまま、他の機器の電源を切断した。その後、インキュベータ内のすべての胚が凍結されると、インキュベータはすぐにOFFにし、UPSの電力供給時間が大幅に延長された。これらの予防措置により、6～8時間フル電力を供給するように設計されたUPSは約24時間十分な電力供給を維持し、ラボでは胚と卵子の凍結、卵子の回収と緊急凍結をすべて完了することができた。

緊急卵子凍結

【緊急時卵子回収】

hCG注入から35時間から36時間後に緊急(UPS)電源による卵子回収が行われ、ヒアルロニダーゼでCOCが除去された直後に卵子を凍結

【通常】

hCG注射の36～37時間後に、卵子回収が行われ、COCを*in vitro*で1時間培養しヒアルロニダーゼで剥離しさらに1時間培養した後、凍結

→緊急凍結時間は、ルーチンよりも3～4時間早く行われた。

緊急卵子・胚凍結方法

【緊急時卵子・胚凍結】

非常時のガラス化凍結では、マイクロドロップ法(凍結液量約150 μ l)を採用し、デバイスに3個までのせた（消耗品や試薬の十分な確保のため）

【通常】

4ウェルプレートを使用し(凍結液量は約300 μ l)、デバイスに最大2個まで

胚と胚盤胞の評価

分割期胚：Peter分類 (D3胚で6-8cell以上

Grade I：均等な割球と<10%のFragment

Grade II：わずかに不均等な割球と<10~20%のFragment)

良好胚

胚盤胞期胚：Gardner分類 >BCで使用可能胚

卵子・胚の融解と培養

融解後、生存卵子はすべて体外で約4~5時間培養

MII卵子をICSIに用い、16~18時間後に受精を観察

D0/D1期に受精しているとみなされた2PB卵子を融解後、前核を観察し、6~8時間後に再び受精を観察

D2胚は融解後、スコアリングのために1日間培養

D3胚は融解し、2時間培養

D4胚は融解後スコアリングのために1日間培養

移植

D3胚： 1~2個

胚盤胞：3BC以上1個

Outcomes

生存率、受精率、正常受精率、分割率、良好胚数、使用可能胚盤胞数、使用可能胚率、化学的妊娠率、臨床妊娠率、着床率、流産率、出生率

副次的アウトカムは、単胎妊娠、多胎妊娠、一卵性双生児妊娠率、子宮外妊娠率、在胎週数、出生体重

統計分析

すべてのデータは、SPSS version 26.0 for Windows(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)で解析

緊急凍結群とペアの対照群を比較

群間差は、t検定、または変数の非正規性によるマン・ホイットニーU検定の使用と比較された。

カテゴリ変数は、ピアソン×2検定によって比較。フィッシャー法は、カイ二乗検定の条件が満たされない場合に使用。

両側のP値<0.05は統計的に有意であると判定。

Result

緊急凍結卵子の融解、その後の胚発生と転帰

- 緊急凍結卵子群と対照群間に不妊因子の統計学的有意差あり ($P < 0.001$)
 - ①卵管因子は緊急卵子凍結群で44%を占め、対照群の9%よりも高い。
 - ②対照群の男性因子は48%で、緊急凍結卵子群の13%よりも高い。
- 緊急凍結卵子群の生存率は95%であった。
- 緊急凍結卵子群と対照群との間、受精率に有意差が認められた (81%対72%、 $P = 0.022$)
- 緊急凍結卵子群と対照群との間には、正常受精率(78%対70%)、分割率(97%対99%)良好胚数(3.17 ± 3.00 対 3.84 ± 3.01)、使用可能胚盤胞数(1.22 ± 1.78 対 1.21 ± 2.03)、利用胚率(61%対56%)に有意差($P > 0.05$)なし。
- 臨床妊娠率(56%対57%)、着床率(40%対39%)、流産率(30%対15%)、および出生率(39%対49%)に有意差なし(表1)。

緊急凍結D0-D1胚の融解、その後の胚発生と転帰

- 緊急凍結D0-D1群の生存率は98%であった。
- 緊急凍結D0-D1群と対照群の間には、一卵性双胎妊娠率(10% vs. 0%、 $P = 0.038$) 子宮外妊娠率(5% vs. 0%、 $P = 0.039$)において有意差が認められた。
- 良好胚数(5.04 ± 3.66 vs. 4.56 ± 2.87)、使用可能盤胞数(2.16 ± 2.26 vs. 1.55 ± 2.08)、利用胚率(60% vs. 59%)、臨床妊娠率(55% vs. 55%)、着床率(46% vs. 44%)、流産率(5% vs. 11%)、生児出生率(53% vs. 50%)において、有意差なし($P > 0.05$) (表1)

緊急凍結D2-D3胚の融解、その後の胚発生と転帰

緊急凍結D2-D3群の生存率は98%であった。

緊急凍結D2-D3群と対照群との間には、良好胚数(4.85 ± 5.36 対 5.04 ± 4.64)、使用可能胚盤胞数(2.82 ± 3.23 対 2.58 ± 3.32)、利用可能胚率(54%対54%)、臨床妊娠率(40%対50%)、着床率(39%対42%)、流産率(17%対20%)、出生率(33%対40%)について有意差($P > 0.05$)は観察されなかった。

緊急凍結D4-D5胚の融解、その後の胚発生と転帰

緊急凍結D4-D5群の生存率は100%であった。

緊急凍結D4-D5群と対照群との間には、使用可能胚盤胞数に有意差($P > 0.05$)は認められなかった(4.78 ± 3.63 vs 4.39 ± 3.88)。

D5の4人の患者で合計17個の胚盤胞が融解された。4人の患者全員がETなしでPGD / PGSを受けた。

緊急凍結D4-D5群と対照群との間には、臨床妊娠率(40%対55%)、着床率(40%対55%)、流産率(0%対18%)、出生率(40%対45%)においても有意差は認められなかった

Table 1. Embryonic development and clinical outcomes of thawed oocyte, D0-D1, D2-D3, and D4-D5 embryos.

Characteristic	Oocyte group (N = 23)	Oocyte control group (N = 92)	P value	D0-D1 group (N = 45)	D0-D1 control group (N = 177)	P value	D2-D3 group (N = 33)	D2-D3 control group (N = 132)	P value	D4-D5 group (N = 23)	D4-D5 control group (N = 92)	P value
No. of oocytes retrieved	11.0 (9.0-13.0)	12.0 (7.3-15.0)	0.406	13.0 (8.5-17.5)	11.0 (8.0-15.0)	0.145	14.0 (6.0-19.0)	11.0 (7.0-16.0)	0.462	16.0 (14.0-21.0)	15.0 (8.0-20.0)	0.211
Resuscitation rate (no./total no. (%))	23/242 (95)	—	—	459/471 (98)	—	—	247/251 (98)	—	—	185/185 (100)	—	—
Oocyte utilization rate (no./total no. (%))	183/230 (80)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. of MII oocytes	9.0 (4.0-11.0)	9.5 (5.3-13.0)	0.190	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Fertilization rate (no./total no. (%))	138/171 (81)	638/883 (72)	0.022	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Normal fertilization rate (no./total no. (%))	133/171 (78)	622/883 (70)	0.051	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Normal fertilization cleavage rate (no./total no. (%))	129/133 (97)	614/622 (99)	0.290	—	—	—	—	—	—	—	—	—
No. of high-quality embryos	3.17 ± 3.00	3.84 ± 3.01	0.346	5.04 ± 3.66	4.56 ± 2.87	0.346	4.85 ± 5.36	5.04 ± 4.64	0.839	—	—	—
No. of usable blastocysts	1.22 ± 1.78	1.21 ± 2.03	0.981	2.16 ± 2.26	1.55 ± 2.08	0.090	2.82 ± 3.23	2.58 ± 3.32	0.706	4.78 ± 3.63	4.39 ± 3.88	0.662
Embryo utilization rate	82/134 (61)	341/614 (56)	0.231	167/280 (60)	625/1056 (59)	0.890	133/247 (54)	572/1065 (54)	0.969	—	—	—
No. of ET cycles [†]	18/23 (78)	72/92 (78)	1.000	38/45 (84)	152/177 (86)	0.807	15/33 (46)	60/132 (46)	1.000	5/23 (22)	20/92 (22)	1.000
Average number of embryos transferred	1.94 ± 0.24	1.94 ± 0.23	1.000	1.79 ± 0.41	1.79 ± 0.41	1.000	1.53 ± 0.52	1.53 ± 0.50	1.000	1.00	1.00	—
Biochemical pregnancy per woman	11/18 (61)	42/72 (58)	0.830	24/38 (63)	86/152 (57)	0.463	6/15 (40)	31/60 (52)	0.419	2/5 (40)	11/20 (55)	0.645
Clinical pregnancy per woman	10/18 (56)	41/72 (57)	0.915	21/38 (55)	84/152 (55)	1.000	6/15 (40)	30/60 (50)	0.488	2/5 (40)	11/20 (55)	0.645
Clinical pregnancy per woman ≥35 years old	2/3 (67)	6/12 (50)	1.000	1/5 (20)	3/20 (15)	1.000	0/3 (0)	2/12 (17)	1.000	0/0 (0)	8/12 (67)	—
Clinical pregnancy per woman <35 years old	8/15 (53)	35/60 (58)	0.726	20/33 (61)	81/132 (61)	0.936	6/12 (50)	28/48 (58)	0.602	2/5 (40)	3/8 (38)	1.000
Singleton pregnancy	6/10 (60)	29/41 (71)	0.783	14/21 (67)	51/84 (61)	0.615	3/6 (50)	22/30 (73)	0.343	2/2 (100)	11/11 (100)	—
Twin pregnancy	4/10 (40)	12/41 (29)	0.783	7/21 (33)	29/84 (35)	0.918	3/6 (50)	8/30 (27)	0.343	—	—	—
Monozygotic twin pregnancy	0/10 (0)	1/41 (2)	1.000	2/21 (10)	0/84 (0)	0.038	1/6 (17)	0/30 (0)	0.167	—	—	—
Ectopic pregnancy	—	—	—	2/38 (5)	0/152 (0)	0.039	0/15 (0)	1/60 (2)	1.000	—	—	—
Implantation per embryo	14/35 (40)	54/140 (39)	0.877	31/68 (46)	120/272 (44)	0.827	9/23 (39)	39/92 (42)	0.777	2/5 (40)	11/20 (55)	0.645
Miscarriage rate (no./total no. (%))	3/10 (30)	6/41 (15)	0.496	1/21 (5)	9/84 (11)	0.678	1/6 (17)	6/30 (20)	1.000	0/2 (0)	2/11 (18)	1.000
Live birth rate	7/18 (39)	35/72 (49)	0.460	20/38 (53)	76/152 (50)	0.772	5/15 (33)	24/60 (40)	0.635	2/5 (40)	9/20 (45)	1.000
Total number of births	11	44	—	25	99	—	7	30	—	2	9	—
Gestational age (weeks)	38.4 (37.0-38.9)	38.6 (37.3-39.4)	0.710	38.6 (37.9-39.7)	38.7 (37.3-39.6)	0.588	38.7 (37.9-39.1)	37.7 (37.0-39.3)	0.418	38.5 (37.9-)	39.7 (38.2-40.2)	1.000
Birth weight (g)	2700.0 (2370.0-3900.0)	3050.0 (2612.5-3475.0)	0.354	3051.2 ± 721.7	2953.9 ± 562.1	0.468	2975.7 ± 492.7	2971.7 ± 738.9	0.991	3150.0 (2700.0-)	3620.0 (3000.0-3950.0)	0.238

Day 0-Day 1: D0-D1; Day 2-Day 3: D2-D3; Day 4-Day 5: D4-D5; N: number; ET: embryo transfer.

[†] Five patients of the oocyte group who did not undergo embryo transfer (two of them were no embryo obtained, two of them were Preimplantation Genetic Diagnosis/Preimplantation Genetic Screening, and 1 of them was freeze-all cycle). Seven patients of the D0-D1 group who did not undergo embryo transfer (two of them were no embryo obtained, four of them were Preimplantation Genetic Diagnosis/Preimplantation Genetic Screening and one of them was freeze-all cycle). Twelve patients of the D2-D3 group who did not undergo embryo transfer (two of them were no embryo obtained, seven of them were Preimplantation Genetic Diagnosis/Preimplantation Genetic Screening and three of them were freeze-all cycle). Six cases of the D2-D3 group were transferred with non-emergency vitrification embryos, and their pregnancy outcomes of the transfers were not included. Twelve patients of the D4-D5 group who did not undergo embryo transfer (two of them were no embryo obtained, nine of them were Preimplantation Genetic Diagnosis/Preimplantation Genetic Screening and one of them was freeze-all cycle). Six cases of the D4-D5 group were transferred with non-emergency vitrification embryos, and their pregnancy outcomes of the transfers were not included.

—: not applicable.

Discussion

本研究では、2021年7月20日に中国・鄭州市で発生した集中豪雨による長期停電の災害状態下で、緊急凍結後の患者155人の卵子1246個とD0-D5胚の臨床データを遡及的に解析している。

その結果、緊急凍結融解後の胚発生や臨床成績への影響は認められず、災害時の卵子やD0-D5胚に対して、緊急凍結が安全で効果的な対応であることが示唆された。

また、**ラボでは、6～8時間電力を供給できるUPSを設置することも必要な条件です。**

成熟卵子の凍結は良好な臨床妊娠結果を達成していますが未熟卵子の凍結、融解の過程における変化はまだ完全には解明されていない。特に、災害時における卵子の緊急凍結については報告されていない。

今回、融解後のインキュベーション時間が、緊急凍結卵子の成績を改善するための重要な要素であると仮定した。

緊急時、卵子は通常よりhCG注射後1－2時間前倒しで採取され、採取直後に緊急凍結された（通常は卵子回収の2時間後）。

そのため、緊急凍結卵子は融解後通常より長くインキュベート（4-5時間〈通常時は2～3時間〉）し

卵子の細胞質の成熟を待った後ICSIした。

その結果、良好胚と使用可能胚盤胞数、利用可能胚率、臨床妊娠率、着床率、流産率、出生率に統計的な差($P > 0.05$)はなく、卵子の質が維持できたと考えられる。

受精率(81%対72%、 $P = 0.022$)においては、緊急凍結卵子群と対照群との間に有意差が認められた。

その理由は、緊急凍結卵子群の患者全員が融解後に顕微授精を受けたのに対し、対照群で受精方法がICSIの患者はそのほとんどが男性不妊症によるもので、低品質の精子が対象群の受精率を低下させたと考えられる。

しかし、受精後の胚発生能力には差がなかった。

通常、前核期の凍結保存時間は受精後20時間であり、融解後の生存率は分割期胚や、胚盤胞より低下すると報告されている。停電時、D0受精卵は受精後約11時間であり、一部はまだ前核が形成されてなかった。また、D1受精卵は2cellへの分割途中の過程であった。そのため、D0、D1受精卵はD2からD5の胚を凍結した後に凍結し、時間稼ぎを試み、その結果D0はより多く核を形成し、D1受精卵は完全なる2cellへと導いてから緊急凍結ができた。（紡錘体が分裂段階にあると凍結損傷を引き起こす可能性が高い）その結果、D0-D1受精卵の生存率は98%であった。対象群と比較してすべての項目に統計的な差はなかった。

D0-D1群の一卵性双胎が高くなったのは、緊急凍結・融解後の胚はAHAを実施したこと
また、子宮外妊娠率の増加は、その子宮外妊娠した二人の患者には卵管因子（内一人は子宮外妊娠歴あり）
があったことが考えられる。

緊急凍結卵子とD0-D5緊急凍結胚の融解後の発生およびの臨床妊娠率と出生率は、新鮮周期と比較して統計的有意差がないことが示された。

以上より、災害時における卵子とD0-D5胚の緊急凍結が安全で効果的な対策であることが示された。
よって、ART施設は、卵子とD0-D5胚のための合理的かつ効果的な緊急管理計画を策定すべきであることが示唆されている。
また、ラボでは、全負荷で6～8時間の電力を供給できるUPSを構成することも必要な条件です。最後に、胚培養土は、
緊急卵子凍結とD0-D1受精後卵を実施する際に、凍結タイミング、融解時間、インキュベーション時間などの重要な
技術的ポイントを考慮する必要がある。