

経時的胚評価法GES(Graduated Embryo Score)を用いた胚評価に関する検討

誌名	Journal of mammalian ova research = 日本哺乳動物卵子学会誌
ISSN	13417738
著者名	相澤,嘉乃 千木野,みわ 佐藤,綾 岡本,真知 村瀬,真理子 榊原,秀也 石川,雅彦 吉田,浩 平原,史樹
発行元	日本哺乳動物卵子学会
巻/号	28巻2号
掲載ページ	p. 83-88
発行年月	2011年4月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



—原著—

経時的胚評価法 GES (Graduated Embryo Score) を 用いた胚評価に関する検討

—胚盤胞移植における検討—

Evaluation of Embryo Quality for Blastocyst Transfer with the Graduated Embryo Score (GES)

相澤 嘉乃^{1*}・千木野 みわ¹・佐藤 綾¹・岡本 真知¹・村瀬 真理子²・
榊原 秀也²・石川 雅彦¹・吉田 浩¹・平原 史樹²

Yoshino Aizawa^{1*}, Miwa Segino¹, Aya Sato¹, Machi Okamoto¹, Mariko Murase²,
Hideya Sakakibara¹, Masahiko Ishikawa¹, Hiroshi Yoshida¹, Fumiki Hirahara²

¹横浜市立大学附属市民総合医療センター婦人科 〒232-0024 横浜市

²横浜市立大学医学部産婦人科 〒236-0004 横浜市

¹Department of Gynecology, Yokohama City University Medical Center, 4-57 Urafune-cho, Minami-ku, Yokohama, Kanagawa 232-0024, Japan

²Department of Obstetrics and Gynecology, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama, Kanagawa 236-0004, Japan

要旨：経時的胚評価法：Graduated Embryo Score (GES) は、前核期の核小体の配列、媒精から25–27時間後の早期分割の有無およびフラグメンテーションの量、Day2またはDay3における細胞数と割球の均一性およびフラグメンテーションの量を経時的に評価する方法であり、8細胞までの良好胚の選択に有用である可能性が報告されているが、胚盤胞移植における有用性についての検討はない。そこで、従来法の Gardner 分類で胚盤胞を評価すると同時に、GES を用いて胚評価を行い GES が胚盤胞移植の臨床成績におよぼす影響を後方視的に解析した。本検討においては発育ステージのみに着目し、媒精後 118–120 時間後の Gardner 分類 4 以上を良好胚盤胞、3 以下を不良胚盤胞として検討を行い、内細胞塊、栄養外胚葉の評価は検討に含めなかった。Gardner 分類 4 以上の良好胚盤胞移植群のうち GES 高得点群の妊娠率 47.4% (9/19) は、GES 低得点群 16.7% (3/18) と比較し有意に高い結果となった ($P < 0.05$)。GES は、胚盤胞移植における胚評価法としても有用であり、今後良好単一胚盤胞移植にも寄与することができると考えられた。

キーワード：経時的胚評価法, 良好胚, 胚盤胞移植

Abstract: It has been reported that high quality embryos can be selected using the Graduated Embryo Score (GES) on day2 or day3. However it is still unknown whether GES is useful for the selection of day5–6 blastocyst stage embryos. Blastocyst stage embryos were evaluated with the conventional Gardner's classified system on day5 following evaluation with the modified GES system on day2–3, and were then transferred. The pregnancy rate (47.4%) was significantly higher for transferred blastocysts with high GES points (GES \geq 70) than the pregnancy rate (16.7%) of transferred blastocysts with low GES points (GES $<$ 70) which had been evaluated as high potential quality blastocysts by Gardner's classification. These results suggest that the GES system is useful for the selection of high potential blastocysts in blastocyst transfer cycles. Moreover, the GES may help to promote elective single blastocyst transfer.

Key words: Graduated Embryo Score (GES), Good quality embryo, Blastocyst transfer

(受付 2010年10月18日 / 受理 2011年1月18日)

別刷請求先：〒232-0024 神奈川県横浜市南区浦舟町4-57 横浜市立大学附属市民総合医療センター婦人科

*To whom correspondence should be addressed. e-mail: yaizawa@yokohama-cu.ac.jp

はじめに

体外受精・胚移植において最も良好な胚を選択的に移植することは、妊娠に至る重要な鍵となる。一般に胚の評価は、Day2またはDay3（採卵日をDay0とした時の培養日数）での割球数とVeeck分類¹⁾による細胞の均一性およびフラグメンテーションから良好胚を選別し胚移植が行われている。しかし、Day5まで培養すると形態良好胚が胚盤胞へ発生しない場合や形態不良胚が胚盤胞へと発生する場合を少なからず経験する。胚の選択は非侵襲的かつ短時間で行わなければならない、非侵襲的な胚評価法として形態学的評価が簡便であり広く用いられている。現在までに、前核期の核小体の配列評価²⁻⁴⁾や、早期分割による評価^{5,6)}、初期胚における割球の均一性やフラグメンテーションによる評価^{1,7)}、桑実胚での評価⁸⁾、胚盤胞の胚盤胞腔の広がりおよび内細胞塊と栄養外胚葉の細胞数⁹⁾等の各発生段階における顕微鏡下での形態学的な評価方法が報告されている。

Fischらは前核期からDay3までの胚を経時的に点数化し（経時的胚評価法GES）、評価することによって胚盤胞到達率が高い胚を選択でき、Day3の胚移植において妊娠率の高い胚が選択できることを報告した^{10,11)}。さらに、Day2またはDay3において、GESの一部を改変した方法（経時的胚評価法）で選択した良好胚は、割球数とフラグメンテーションにより評価する従来法で選択した良好胚と比べて、胚盤胞到達率が高くなることから、経時的胚評価法を用いることでDay2またはDay3の胚移植において妊娠する可能性が高い良好胚を選別できることが報告されている^{12,13)}。

そこで、今回我々は、この評価法を用いて胚盤胞移植を行った周期について後方視的に解析し、GESの胚盤胞移植における有用性について検討を行った。

対象と方法

1. 対象および採卵

2006年5月から2009年10月までに当院にて胚盤胞移植を目的として採卵を施行した103周期を対象とした。本検討ではDay2またはDay3にて全胚凍結を行った周期は検討から除外し、採卵・受精確認後にすべての胚を胚盤胞まで培養した周期を対象とした。卵巣刺激はロング法、ショート法、アンタゴニスト法、クロミッド法など年齢、これまでの治療歴、FSH基礎値等の卵巣機能評価に基づき選択した。経腔超音波下の卵胞計測によるモニタリングにより採卵日を設定し、採卵の36時間前にhCG 5,000 IUまたは10,000 IUを投与した。採卵は静脈麻酔のもと、経腔超音波ガイド下で行った。

2. 胚の培養と胚移植

採取された卵子はFertilizatoin medium (Cook, Australia)にて3-5時間の前培養を行った。精子は二層法で遠心分離の後、Fertilizatoin medium (Cook)を用いてswim upを行い、良好な精子を回収し体外受精または顕微授精に用いた。受

精確認は媒精から16-18時間後に行い、受精確認後の胚は20 μ lの培養液ドロップで単独培養を行った。2006年5月から2008年7月の間、Day1からDay3までCleavage medium (Cook)及びBlastAssist System1 (Origio, Denmark)の2種類の培養液を用いて各周期の胚を半数ずつ並行して培養を行った。2008年8月以降はBlastAssist System1 (Origio)をSingle Step Medium (Irvine Scientific, USA)に変更して培養を行った。得られた胚はDay3で培養液の交換を行いDay5まで培養し胚盤胞移植を行った。Day3以降の培養には2006年5月から2008年7月の間は、Blastocyst Medium (Cook)及びBlastAssist System2 (Origio)の2種類の培養液を用いてDay3までと同様に並行して培養を行った。2008年8月から2009年9月の期間はBlastAssist System2 (Origio)をSingle Step Medium (Irvine)に変更して培養を行った。Day5に胚盤胞が得られなかった周期はDay6まで追加培養を行い、胚盤胞移植を行った。胚盤胞の評価は媒精から118-120時間後にGardner分類¹¹⁾で行った。胚は37°C、6% CO₂、5% O₂、89% N₂の条件下で培養を行った。移植後は原則としてhCG 3000 IU筋注3回と、プロゲステロン坐剤200 mg/dayによる黄体補充を行い、妊娠判定後の超音波検査において胎嚢が確認された周期を臨床的妊娠周期とした。

3. 経時的胚評価法による良好胚の選別

表1に本検討で用いた評価方法を示した。胚の評価にはFischら^{1,2)}が報告したGESの一部を改変したスコアリングを用いた。受精時の核小体の配列、早期分割、フラグメンテーション、Day2またはDay3のVeeck分類⁸⁾について経時的に4回の評価を行った。具体的な評価方法を以下に示す。

評価1：媒精から16-18時間後に二前核を形成した胚の核小体の配列を観察した。Scottら⁴⁾が報告したZ-scoreを用いて核小体の配列を分類し核小体の並列しているZ1の胚に点数を加算した。

評価2：媒精から25-27時間後に早期分割の観察を行った。胚が均一に分割している胚に点数を加算した。

評価3：早期分割において分割している胚については同時にフラグメンテーションの割合0%、5-20%未満、20%以上により点数を加算した。評価2において不均一に分割している胚については、早期分割の点数は加算せず、フラグメンテーションの点数のみを加算した。

評価4：Day2（媒精から40-43時間後）またはDay3（媒精から64-67時間後）に割球数とVeeck分類により胚を評価した。評価2の早期分割の観察で分割が見られなかった胚の中で、Day2またはDay3時に点数の加算される良好胚に発生した胚は、評価3のフラグメンテーションの点数をさかのぼって加算した。

以上4つの評価を総合して100点を満点とし、Fischら^{1,2)}と同様に70点以上をGESの高得点胚として検討を行った。

表1 経時的胚評価法による良好胚の選別 (GES)

評価	媒精後の経過時間 (h)	評価方法	点数
1	16-18 (Day1)	核小体が並列している	20
2	25-27 (Day1)	胚が均一に分割している	30
3	25-27 (Day1)	フラグメンテーション 0%	30
		< 20%	25
		≥ 20%	0
4	40-43 (Day2)	細胞数とグレード (Veck a)	
		4G1, 4G2	20
		4G3, 5G1, 6G1	10
	64-67 (Day3)	7G1, 8G1, 8G2, 8G3, 9G1	20
		7G2, 7G3, 9G2, 9G3, 10G1, 11G1, Compacting	10
合計			100

^a VeckのGrade1=割球が均一でフラグメンテーションを認めない, Grade2=割球が均一でフラグメンテーションをわずかに認める, Grade3=割球が不均一, Grade4=割球が均一または不均一でかなりフラグメンテーションを認める, Grade5=割球が不均一でフラグメンテーションが著しい, 4G1=4Cell Grade1.

4. 胚盤胞の評価

媒精から118-120時間後にGardner分類¹¹⁾にしたがって胚を評価した。

さらにGardnerら¹¹⁾はスコア3以上の胚盤胞については内細胞塊と栄養外胚葉の細胞の形態についてA-Cの3段階で評価しているが, 本検討では胚盤胞の発育ステージのみに着目し媒精後118-120時間後にGardner分類4以上(拡張期以降)を良好胚盤胞, Gardner分類3以下(完全胚盤胞以前)を不良胚盤胞として後方視的に検討を行い, 内細胞塊, 栄養外胚葉の評価は検討に含めなかった。また, 媒精後118-120時間後に胚盤胞が得られずDay6にて胚盤胞に到達した胚は不良胚盤胞として評価を行った。

5. 統計学的解析

データはすべて平均値±標準誤差(mean±SE)で示し, 統計学的有意差の検定にはスチューデントのt検定およびカイ二乗検定を用いた。また, 一部のデータでFisherの直接確率計算法を用いて有意差の検定を行った。各項目について危険率5%未満をもって有意差ありとした。

結果

103周期の採卵により, 採卵数は6.2±1.0個, そのうち4.4±0.3個(75.3%)が媒精後に二前核を形成した。このうち89周期で胚盤胞移植を行った。Day5で胚盤胞移植を行った周期は77周期, Day5で胚盤胞が得られずDay6にて胚盤胞が得られて移植した周期は12周期であった。また, 採卵した103周期のうち14周期(13.6%)においてDay6まで胚を培養するも胚盤胞が得られず移植中止となった。胚盤胞移植は2個以内とし, 胚盤胞移植を行った89周期の平均胚移植数は1.5±0.3個であった。2個胚盤胞移植を行った44周期中, 良好胚盤胞と不良胚盤胞の組み合わせは9周期であった。2個胚盤胞移植周期では良好胚盤胞を1個でも含む場合

は良好胚盤胞移植群として統計処理を行った。胚盤胞を移植した89周期のうち19周期(21.3%)で臨床的妊娠が成立した。そのうち流産は5周期(26.3%), 多胎妊娠は6周期(31.6%), 着床率は17.3%(23/133)であった。多胎妊娠6周期の内訳は一絨毛膜二羊膜性双胎2周期, 二絨毛膜二羊膜性双胎4周期であった。

次に, Gardner分類の良好胚盤胞移植群, 不良胚盤胞移植群それぞれにおける年齢, 既往採卵回数, 採卵数, 受精卵数(二前核), 移植胚数を比較したが, それぞれに有意差は見られなかった。妊娠率はGardner良好胚盤胞移植群で32.4%(12/37), Gardner不良胚盤胞移植群で13.5%(7/52)と, Gardner良好胚盤胞移植群で有意に高かった($P<0.05$)。着床率はGardner良好胚盤胞移植群24.2%(15/62), Gardner不良胚盤胞移植群11.3%(8/71)であり, 有意にGardner良好胚盤胞移植群で高い結果が得られた($P<0.05$)。流産率および多胎率は両群間に差は見られなかった。

また, Day2またはDay3におけるGESが良好であったか否かでさらにGardner良好かつGES高得点胚盤胞移植群(Group 1), Gardner良好かつGES低得点胚盤胞移植群(Group 2), Gardner不良かつGES高得点胚盤胞移植群(Group 3), Gardner不良かつGES低得点胚盤胞移植群(Group 4)の4群に分類した。Group 1およびGroup 2の年齢, 既往採卵回数, 卵子数, 受精卵数(二前核), および移植胚数にそれぞれ差は見られなかった(表2)。妊娠率はGroup 1で47.4%(9/19), Group 2で16.7%(3/18)であり, Group 1はGroup 2と比較して有意に高い妊娠率が得られた($P<0.05$)。着床率はGroup 1で37.5%(12/32), Group 2で10.0%(3/30)あり, Group 1の着床率はGroup 2と比較し有意に高い結果となった($P<0.05$)。Group 1とGroup 2の間で流産率に差は見られなかった。Group 3とGroup 4を比較すると, 妊娠率はそれぞれ21.7%(5/23), 6.9%(2/29)および着床率はそれぞれ17.6%(6/34), 5.4%(2/37)であった(表3)。

表2 Gardner良好/不良胚盤胞移植群におけるGES高得点/低得点群の患者背景

	Gardner良好胚盤胞移植群			Gardner不良胚盤胞移植群			全体 (n=89)
	GES 70 点以上 (Group 1) (n=19)	GES 70 点未満 (Group 2) (n=18)	全体 (n=37)	GES 70 点以上 (Group 3) (n=23)	GES 70 点未満 (Group 4) (n=29)	全体 (n=52)	
年齢	37.1 ± 0.8	37.9 ± 0.6	37.5 ± 0.5	37.4 ± 0.6	37.7 ± 0.6	37.7 ± 0.4	37.8 ± 0.3
既往採卵回数	2.4 ± 0.4	2.4 ± 0.5	2.4 ± 0.3	2.8 ± 0.6	2.5 ± 0.4	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.2
卵子数	8.7 ± 1.3	6.9 ± 1.0	7.8 ± 1.2	5.4 ± 1.2	5.4 ± 0.6	5.4 ± 1.3	6.2 ± 1.0
受精卵数 (二前核)	7.1 ± 1.0	5.4 ± 0.7	6.1 ± 0.7	4.2 ± 0.5	3.9 ± 0.5	4.1 ± 0.8	4.4 ± 0.3
移植胚数	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.5 ± 0.3

表3 Gardner良好/不良胚盤胞移植群におけるGES高得点/低得点群の妊娠率, 着床率, 流産率, 多胎率の比較検討 (全胚盤胞移植周期)

	Gardner良好胚盤胞移植群			Gardner不良胚盤胞移植群			全体 (n=89)
	GES 70 点以上 (Group 1) (n=19)	GES 70 点未満 (Group 2) (n=18)	全体 (n=37)	GES 70 点以上 (Group 3) (n=23)	GES 70 点未満 (Group 4) (n=29)	全体 (n=52)	
妊娠率 (%)	47.4% (9/19) ^e	16.7% (3/18) ^f	32.4% (12/37) ^a	21.7% (5/23)	6.9% (2/29)	13.5% (7/52) ^b	21.3% (19/89)
着床率 (%)	37.5% (12/32) ^g	10.0% (3/30) ^h	24.2% (15/62) ^c	17.6% (6/34)	5.4% (2/37)	11.3% (8/71) ^d	17.3% (23/133)
流産率 (%)	22.2% (2/9)	33.3% (1/3)	25.0% (3/12)	40.0% (2/5)	0.0% (0/2)	28.6% (2/7)	26.3% (5/19)
多胎率 (%)	44.4% (4/9)	0.0% (0/3)	33.3% (4/12)	40.0% (2/5)	0.0% (0/2)	28.6% (2/7)	31.6% (6/19)
一絨毛膜二羊膜性双胎 (%)	11.1% (1/9)	0.0% (0/3)	8.3% (1/12)	20.0% (1/5)	0.0% (0/2)	14.3% (1/7)	10.5% (2/19)
二絨毛膜二羊膜性双胎 (%)	33.3% (3/9)	0.0% (0/3)	25.0% (3/12)	20.0% (1/5)	0.0% (0/2)	14.3% (1/7)	21.1% (4/19)

ab, cd, ef, gh $P < 0.05$.

表4 Gardner良好/不良胚盤胞移植群におけるGES高得点/低得点群の妊娠率, 着床率, 流産率, 多胎率の比較検討 (Day5胚盤胞移植周期)

	Gardner良好胚盤胞移植群			Gardner不良胚盤胞移植群			全体 (n=77)
	GES 70 点以上 (Group 1) (n=19)	GES 70 点未満 (Group 2) (n=18)	全体 (n=37)	GES 70 点以上 (Group 3) (n=19)	GES 70 点未満 (Group 4) (n=21)	全体 (n=40)	
妊娠率 (%)	47.4% (9/19) ^e	16.7% (3/18) ^f	32.4% (12/37) ^a	21.1% (4/19)	4.8% (1/21)	12.5% (5/40) ^b	21.3% (17/77)
着床率 (%)	37.5% (12/32) ^g	10.0% (3/30) ^h	24.2% (15/62) ^c	17.2% (5/29)	3.6% (1/28)	10.5% (6/57) ^d	17.6% (21/119)
流産率 (%)	22.2% (2/9)	33.3% (1/3)	25.0% (3/12)	25.0% (1/4)	0.0% (0/1)	20.0% (1/5)	23.5% (4/17)
多胎率 (%)	44.4% (4/9)	0.0% (0/3)	33.3% (4/12)	25.0% (1/4)	0.0% (0/1)	20.0% (1/5)	29.4% (5/17)
一絨毛膜二羊膜性双胎 (%)	11.1% (1/9)	0.0% (0/3)	8.3% (1/12)	0.0% (0/4)	0.0% (0/1)	0.0% (0/5)	5.9% (1/17)
二絨毛膜二羊膜性双胎 (%)	33.3% (3/9)	0.0% (0/3)	25.0% (3/12)	25.0% (1/4)	0.0% (0/1)	20.0% (1/5)	23.5% (4/17)

ab, cd, ef, gh $P < 0.05$.

さらにDay6移植を行った12周期を除外し, Day5胚盤胞移植周期のみにおいて同様の検討を行った. Day5胚盤胞移植周期は, すべてGardner不良胚盤胞移植群(Group3およびGroup4)に含まれていた. Gardner分類の良好胚盤胞移植群, 不良胚盤胞移植群それぞれにおける年齢, 既往採卵回数, 採卵数, 受精卵数(二前核), 移植胚数を比較し, それぞれに有意な差は見られなかった. 妊娠率はGardner良好胚盤胞移植群で32.4% (12/37), Gardner不良胚盤胞移植群で12.5% (5/40)と, Gardner良好胚盤胞移植群で有意に

高かった($P < 0.05$). 着床率はGardner良好胚盤胞移植群24.2% (15/62), Gardner不良胚盤胞移植群10.5% (6/57)であり, 有意にGardner良好胚盤胞移植群で高い結果が得られた($P < 0.05$). 流産率および多胎率は両群間に差は見られなかった. Group3とGroup4の比較を行うと, 妊娠率はそれぞれ21.1% (4/19), 4.8% (1/21)および着床率はそれぞれ17.2% (5/29), 3.6% (1/28)であった(表4).

考 察

Gardner分類では発育ステージと、内細胞塊および栄養外胚葉の形態の2つ側面からの評価が行われているが、今回我々は、そのうちの発育ステージに着目して評価を行った。これまでの報告^{11, 14)}と同様に、本検討においても媒精後118–120時間後の時点でGardner分類4以上の良好胚盤胞移植群において、Gardner分類3以下の不良胚盤胞移植群と比較し妊娠率が有意に高い結果となった ($P < 0.05$)。

本検討のGardner良好胚盤胞移植群においてDay2またはDay3でGES高得点胚 (GES 70点以上) 移植した群 (Group 1) は、GES低得点胚 (GES 70点未満) を移植した群 (Group 2) と比較し有意に妊娠率および着床率が高い結果となった。さらに、Group 1において胚盤胞を2個移植した13周期のうち二絨毛膜二羊膜性双胎が3周期 (23.1%) と高率であった。本検討では全て胚盤胞での移植を行っており、単一胚盤胞からのDDTwinの発生は、受精後1–3日の発生過程で胚が分離しそれぞれが着床した場合に起こると多く報告されていることから、2個移植でのDDTwin例は2個の胚盤胞がそれぞれ着床したものと考えた。ゆえに、GESで胚を評価することによって良好胚盤胞を選択し、単一胚盤胞移植を行うことにより多胎妊娠が減少する可能性が考えられた。

2008年4月より日本産科婦人科学会の生殖補助医療における多胎妊娠防止に関する見解が改訂され、原則として単一胚移植とされた。そのため、良好胚を選択することは以前よりもさらに重要視されている。また、単一胚盤胞移植により、妊娠率を下げることなく多胎率を減少させ、十分な成績が得られることも報告されている^{15, 16)}。しかし、体外で胚培養を行う期間を延長し胚盤胞移植を行うことにより、一絨毛膜二羊膜性双胎の頻度が上昇することやゲノムインプリンティング異常との関連も指摘されており^{17, 18)}、必ずしも胚盤胞移植が初期胚移植と比較して有利であると言い切ることはできない。そのため、当院では初期胚移植を第一選択肢とし、複数回の初期胚移植における非成功症例に対して胚盤胞移植を行っている。

GESにおいては、早期分割を評価する際に割球数にはこだわらず均一性とフラグメンテーションに重点をおいて検討したが、3cell以上に分割している胚もいくつか観察された。現在までに早期において分割している胚は、分割していない胚と比較し初期胚において形態良好胚となる割合が多く、胚盤胞への高い到達率、高い妊娠率および着床率が得られると報告されている¹⁹⁾。しかし、早期分割時の割球数において2cellと3cell以上を比較した結果は報告されていない。今後早期分割時における割球数も検討していくことが必要と考えられた。

胚盤胞移植の際にGardner分類単独で評価を行うよりもDay2またはDay3までの経時的な評価法であるGESを組み合わせるにより良好胚盤胞が複数個得られる周期など移植胚の選択が難しい周期においてより妊娠に結びつく胚を的確に選択できる可能性が示唆された。GESは胚盤胞移

植においても有効な胚評価法であり経時的に胚を評価することで、今後単一胚盤胞移植を行う際にも十分に応用することができると考えられた。

文 献

- 1) Veeck, L. (1991): Cleaved human concepti. In Atlas of the human Oocyte and Early conceptus (Lynn Brown C, ed), pp163–230, Williams and Wilkins, Baltimore.
- 2) Scott, L.A. and Smith, S. (1998): The successful use of pronuclear embryo transfers the day following oocyte retrieval. *Hum. Reprod.*, 13, 1003–1013.
- 3) Scott, L., Finn, A., O'Leary, T., McLellan, S. and Hill, J. (2006): Morphologic parameters of early cleavage-stage embryos that correlate with fetal development and delivery: prospective and applied data for increased pregnancy rates. *Hum. Reprod.*, 22, 230–240.
- 4) Tesarik, J. and Greco, E. (1999): The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. *Hum. Reprod.*, 14, 1318–1323.
- 5) Fu, J., Wang, X.J., Wang, Y.W., Sun, J., Gemzell-Danielsson, K. and Sun, X.X. (2009): The influence of early cleavage on embryo developmental potential and IVF/ICSI outcome. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 26, 437–441.
- 6) Salumets, A., Hydén-Granskog, C., Mäkinen, S., Suikkari, A.M., Tiitinen, A. and Tuuri, T. (2003): Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Hum. Reprod.*, 18, 821–825.
- 7) Bolton, V.N., Hawes, S.M., Taylor, C.T. and Parsons, J.H. (1989): 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. Fert. Embryo. Transf.*, 6, 30–35.
- 8) Feil, D., Henshaw, R.C. and Lane, M. (2008): Day 4 embryo selection is equal to Day 5 using a new embryo scoring system validated in single embryo transfers. *Hum. Reprod.*, 23, 1505–1510.
- 9) Gardner, D.K., Lane, M., Stevens, J., Schlenker, T. and Schoolcraft, W.B. (2000): Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. *Fertil. Steril.*, 73, 1155–1158.
- 10) Fisch, J.D., Rodriguez, H., Ross, R., Overby, G. and Sher, G. (2001): The Graduated Embryo Score (GES) predicts blastocyst formation and pregnancy rate from cleavage-stage embryos. *Hum. Reprod.*, 16, 1970–1975.
- 11) Fisch, J.D., Sher, G., Adamowicz, M. and Keskinetepe, L. (2003): The graduated embryo score predicts the outcome of assisted reproductive technologies better than a single day 3 evaluation and achieves results associated with blastocyst transfer from day 3 embryo transfer. *Fertil. Steril.*, 80, 1352–1358.
- 12) 千木野みわ (2007) : Graduated Embryo Score (GES)

- を用いた経時的評価による良好胚の選別. J. Mamm. Ova Res., 24: 67–68.
- 13) 石田恵理・千木野みわ・相澤嘉乃・鈴木靖子・佐藤 綾・岡本真知・高島邦僚・吉田 浩・村瀬真理子・榊原秀也・平原史樹・石川雅彦 (2009) : 選択的単一胚移植を行なうための経時的胚評価法 Graduated Embryo Score (GES). 日本受精着床学会雑誌, 26 (1): 155–160.
 - 14) Balaban, B., Yakin, K. and Urman, B. (2006): Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. Fertil. Steril., 85, 559–563.
 - 15) Mullin, C.M., Fino, M.E., Talebian, S., Krey, L.C., Licciardi, F., and Grifo, J.A. (2009): Comparison of pregnancy outcomes in elective single blastocyst transfer versus double blastocyst transfer stratified by age. Fertil. Steril., 93, 1837–1843.
 - 16) Yanaihara, A., Yorimitsu, T., Motoyama, H., Ohara, M. and Kawamura, T. (2008): Clinical outcome of frozen blastocyst transfer; single vs. double transfer. J. Assist. Reprod. Genet., 7, 531–534.
 - 17) Milki, A.A., Jun, S.H., Hinckley, M.D., Behr, B., Giudice, L.C. and Westphal, L.M. (2003): Incidence of monozygotic twinning with blastocyst transfer compared to cleavage-stage transfer. Fertil. Steril., 79, 503–506.
 - 18) Aston, K.L., Peterson, C.M. and Carrell, D.T. (2008): Monozygotic twinning associated with assisted reproductive technologies: a review. Reproduction, 136, 377–386.
 - 19) Van Montfoort, A.P., Dumoulin, J.C., Kester, A.D. and Evers, J.L. (2004): Early cleavage is a valuable addition to existing embryo selection parameters: a study using single embryo transfers. Hum. Reprod., 19, 2103–2108.