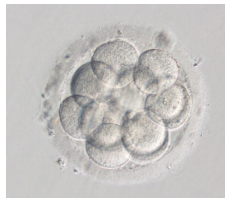




G1-7



MO(13cell↑)

D3でベスト1を1個凍結の指示・・・

どっちの胚を凍結しよう??

Increased blastomere number in cleavage-stage embryos is associated with higher aneuploidy

Lindsay L. Kroener, M.D.,^{a,b} Gayane Ambartsumyan, M.D., Ph.D.,^{a,b} Margareta D. Pisarska, M.D.,^{a,b} Christine Britton-Jones, Ph.D., H.C.L.D.,^c Mark Surrey, M.D.,^c and David Hill, Ph.D., H.C.L.D.^c

^a Division of Reproductive Endocrinology and Infertility, Department of Obstetrics and Gynecology, University of California, Los Angeles; ^b Division of Reproductive Endocrinology and Infertility, Department of Obstetrics and Gynecology, Cedars Sinai Medical Center, Los Angeles; and ^c Southern California Reproductive Center, Beverly Hills, California

分割期における割球数の増加は高い異数性率と関連する

(Objective) 割球数と異数性の関係を評価する。

(Design) コホート研究

(Setting) 体外受精専門のクリニック

(Patient) 胚の包括的な染色体スクリーニングを併用した体外受精(IVF)を受けた2,594名の患者

(Intervention) 合計1,915個の胚が3日目に生検され、マイクロアレイを用いた比較ゲノムハイブリダイゼーションによる包括的な染色体スクリーニングが行われた。

(Main Outcome Measure(主な評価項目)) 3日目の割球数、異数性率、胚盤胞期への進行との関係

(Result) 3日目の割球数が10個以上の場合、異数性率が有意に上昇することが分かった。急速に発達した胚は、染色体の状態にかかわらず、胚盤胞になる可能性が有意に高かった。患者ひとりあたりの胚数が13個以上であれば、母体年齢に関係なく、異数性率の低下と関連していた。

(Conclusion) 分割期の割球数が6-9個の胚は、10個以上の胚よりも移植を優先的に考えるべきである。3日目での割球数の指標は胚盤胞までの培養と組み合わせて使用することで、特に定数以上の胚がある場合に優性胚の選択を改善できる。これらの選択基準が臨床結果を改善するかどうかはさらなる研究が必要である。

INTRODUCTION

体外受精における大きな課題は正倍数体である可能性が最も高い胚を選ぶことであり、有用で安価でかつ非侵襲的な胚を選択する基準を見つけることである。

胚の選択に最も一般的に使用される方法は、形態学的基準(フラグメントの量や細胞の均一性など)と胚盤胞期までの培養である。胚の形態と異数性・臨床転帰が関連することが分かっており、胚盤胞期までの培養および胚盤胞移植が分割期移植と比較して出生率がわずかだが有意に増加することが判明している。

受精後25-27時間の間に第一分割が起こった胚は胚盤胞への到達率が高く、着床率と妊娠率の向上に関連する。また、3日目胚の割球数増加は胚盤胞到達率の向上、出生率と関連する。

3日目胚の割球数と異数性率との関係を評価し、3日目胚の割球数と染色体の状態がその後の胚盤胞への発生をどのように予測するか、また、これらの要因を用いて正倍数体の胚の選択方法の改善ができるか調査した。

MATERIALS AND METHODS

259名1915個の胚

GnRHアゴニストまたはアンタゴニストのプロトコールで、排卵は採卵の34-36時間前にhCGで誘発した。

胚は3日目に割球数と形態学的グレードを評価した。

3日目の胚の評価はhCG投与から107-108時間後に行った。

胚のグレードを決定する主な要因は、フラグメントの割合と割球の均一性である。

培養3日目に、非接触型赤外線レーザー[Zilos-tk](Hamilton Thorne Biosciences社製)を用いて胚生検を行い、1割球を取り出して解析した。

3日目の割球数が6個未満であった胚は、生検を行わず研究から除外した。

その後、3日目の胚生検で正常胚と判定された胚のみ移植した。

RESULTS

対象：1,915個 / 259人

患者年齢：21～47歳（平均年齢 37.5歳）

3日目の染色体の状態と割球数による胚の分布

TABLE 1

Embryo distribution by chromosomal status and day 3 cell number.

Characteristic	n (%)		
No. of patients	259		
Mean age (y)	37.5		
Total no. of embryos	1,915		
Overall aneuploidy rate, %	62		
Embryos per patient (n), mean	7		
Cells on day 3			
6-9	1,619 (84.5)		
>9	296 (15.5)		
Distribution by age group	<36 y	36-40 y	>40 y
6-9	586	563	471
Aneuploid	270 (46.1)	344 (61.1)	379 (80.5)
Euploid	316 (53.9)	219 (38.9)	92 (19.5)
>9	110	107	79
Aneuploid	59 (53.6)	74 (69.2)	67 (84.8)
Euploid	51 (46.4)	33 (30.8)	12 (15.2)

Note: Results presented as n (%) unless indicated otherwise.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.

異数体の割合：全体の62%が異数体

3日目の割球数の分類：

6～9cellの胚が84%、10cell以上の胚が15%

6～9cell胚、10cell以上胚ともに、年齢が高い群ほど異数性率も高くなった。

妊娠率

3日目に胚生検を行った胚の単一胚移植による妊娠率は40.4%

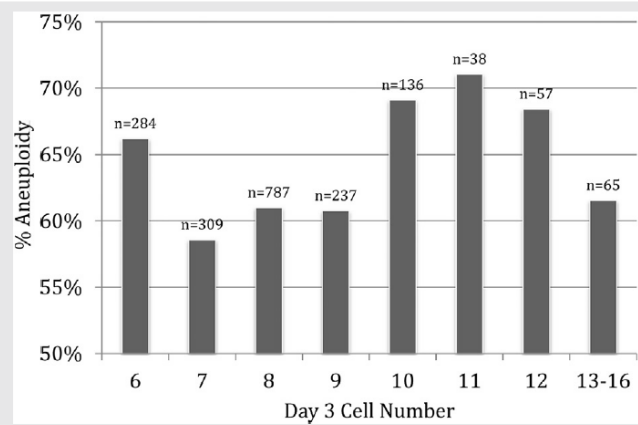
年齢別妊娠率は

- ・ 35歳未満 54%
- ・ 35～37歳 54%
- ・ 38～40歳 40%
- ・ 41～42歳 29%
- ・ 42歳以上 27%

年齢が若いほど妊娠率が高い。

3日目の胚の割球数と異数性率

FIGURE 1



Day 3 cell number and aneuploidy rate.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.

Fig. 1 3日目の割球数と異数性率

3日目胚の割球数の増加に伴い染色体異常の増加がみられた。

限界値分析と多変量解析により、9cellが異数体が増加する境界であり、割球数が9個より多い場合、異数性率が有意に増加することが判明した。(P= 0.0294)

3日目に10cell以上の場合、胚の異数性率が有意に増加した。

ひとり当たりの胚数と異数性率

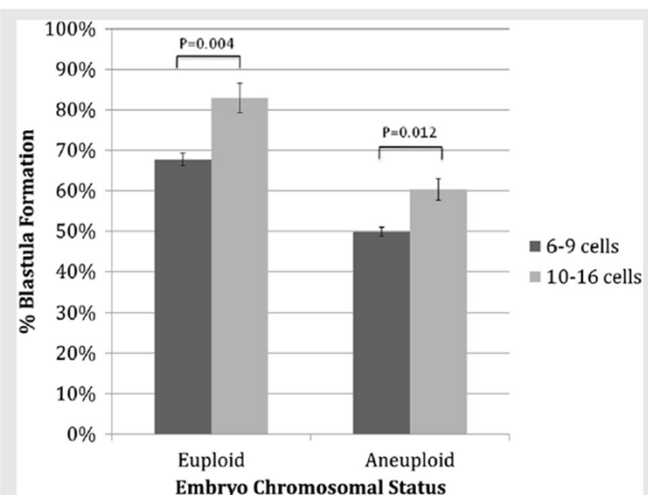
患者あたりの胚数の増加は、異数性率の低下と関連しており、母体の年齢に関係なく、患者ひとり当たりの胚数が13個以上だと異数体の発生率が最も低かった。しかし実際には13個以上胚が得られた患者は少なかった。

胚数が6個以上の患者は6個未満の患者に比べて異数性率が低い傾向にあったが、有意な差はなかった。胚数が6個以上の患者を35歳未満、35～39歳、40歳以上の3つの年齢層に分けて分析すると、35歳未満の群においてのみ、胚数の増加と異数性率の低下に関連が見られたが、それ以上の年齢層では見られなかった。

得られた胚が6個以上だと異数性率が低く、13個以上のとき最も低い傾向にあった。35歳未満の群で、得られた胚数の増加と異数性率の低下に関連があった。

胚盤胞形成率と異数性率

FIGURE 2



Rate of blastula formation according to day 3 cell number and chromosomal status.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.

Fig. 2 3日目の割球数と染色体の状態に応じた胚盤胞形成率

3日目に6～9cellであった胚と10～16cellであった胚とで胚盤胞形成率を比較した。

発生速度が速い10～16cellの胚は、2倍体か異数体かに関わらず、胚盤胞形成率が有意に高かった。

胚盤胞に到達した胚のうち、6～9cell胚の異数性率は54%、10～16cell胚は62%で、6～9cell胚の方が異数性率が低い傾向にあった。(P= 0.096)

胚盤胞形成率が高いのは10～16cellの胚。しかし、異数性率が低い傾向にあったのは6～9cell由来のものだった。

DISCUSSION

胚盤胞の形成には、第一分割のタイミングが早いことと3日目で割球数が多いことが関係している。初期に急速に発育した胚は、その後も急速に発育を続けて胚盤胞を形成する可能性が高い。また、染色体の状態にかかわらず、3日目に10cell以上の胚は胚盤胞になる可能性が高いことが分かった。

移植する胚盤胞を選択する際には胚盤胞の形態と合わせて分割期の評価を考慮する必要があり、これは特に単一胚移植において有用であると考えられる。なぜなら、急速に発育した胚から発生した胚盤胞は、6~9cellの胚から発生した胚盤胞よりも異数体である可能性が高いからである。

【今後の課題】

今回の研究では、移植した胚は全て2倍体であったため、これらの選択基準による臨床的結果は評価できなかった。これらの知見を検証するには、遺伝子スクリーニングを行わない、5日目の単一胚移植における、分割期での評価と妊娠率の研究を調べた前向き研究が必要である。

【結語】

異数体の予測因子が胚数であるのは興味深いことであった。患者ひとり当たりの胚数が多ければ、異数性率は低くなった。特に35歳未満の女性では、この周期で得られた胚が6個未満の場合、異数体の割合が増加した。これらの結果は、特に、卵巣の反応が悪いことが少ないはずの若年層の反応不良者において、反応不良が異数性率増加の予測因子である可能性を示唆している。

従来、3日目胚は分割速度が速い胚ほど、より良い胚であるとされてきた。しかし、10cell以上の胚は6~9cellの胚に比べて異数性の可能性が高くなる。したがって6~9cell胚を選択することは、分割速度が速い胚よりも有利であると考えられる。3日目胚の割球数による評価は、形態学および胚盤胞までの培養と併せて、特に着床前遺伝子スクリーニングが容易に利用できない、または実施されない場合に、移植時の正常胚の選択を改善するのに役立つ可能性がある。

◆参考資料 当院で2018.1.1~2020.12.31にSETを実施した患者278名

39歳以下		HCG+(%)	GS+(%)	不明	流産(%)
6-9cell	143	48(33.6)	38(26.6)	1	10(27.0)
10cell↑	36	15(41.7)	14(38.9)	0	6(42.9)

40-44歳		HCG+(%)	GS+(%)	不明	流産(%)
6-9cell	78	21(26.9)	15(19.2)	1	11(78.6)
10cell↑	21	3(14.3)	1(4.8)	0	1(100.0)

統計解析

解析には多変量解析を用いた。

3日目の細胞数と異数性率の関係を評価した。

患者の年齢、**peternal age**、患者ひとり当たりの胚の数、形態学的グレード、習慣性流産の診断、同一患者から得られた胚の非独立性がコントロールされた。

すべての比較において統計的優位性はP値<0.05とした。

その後、境界値分析(Z-score)を行い、異数性と各優位な連続変数との関係を示す最適なカットオフ値を決定した。

RESULTS

259人の患者から得られた1,915個の胚を調査した。

患者の年齢は21~47歳(平均年齢は37.5歳)である。

全体の異数性は62%で、大部分(73%)の胚がAまたはBグレードであった。

3日目の割球数で分類したところ、6~9割球の胚が84%、9割球以上の胚が15%となった。

さらに年齢別に分類したところ、35歳未満の胚が586個、36~40歳の胚が563個、40歳以上が471個となった(Table 1)。

この期間の3日目にバイオプシーを行った胚の単一胚移植による臨床妊娠率は40.4%であった。

妊娠率を年齢で分類したところ、35歳未満で54%、35~37歳で54%、38~40歳で40%、41~42歳で29%、42歳以上では27%であった。

TABLE 1

Embryo distribution by chromosomal status and day 3 cell number.

Characteristic	n (%)		
No. of patients	259		
Mean age (y)	37.5		
Total no. of embryos	1,915		
Overall aneuploidy rate, %	62		
Embryos per patient (n), mean	7		
Cells on day 3			
6-9	1,619 (84.5)		
>9	296 (15.5)		
Distribution by age group	<36 y	36-40 y	>40 y
6-9	586	563	471
Aneuploid	270 (46.1)	344 (61.1)	379 (80.5)
Euploid	316 (53.9)	219 (38.9)	92 (19.5)
>9	110	107	79
Aneuploid	59 (53.6)	74 (69.2)	67 (84.8)
Euploid	51 (46.4)	33 (30.8)	12 (15.2)

Note: Results presented as n (%) unless indicated otherwise.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.

Table 1

染色体の状態と3日目の割球数による胚の分布

RESULTS

TABLE 1

Embryo distribution by chromosomal status and day 3 cell number.

Characteristic	n (%)		
No. of patients	259		
Mean age (y)	37.5		
Total no. of embryos	1,915		
Overall aneuploidy rate, %	62		
Embryos per patient (n), mean	7		
Cells on day 3			
6-9	1,619 (84.5)		
>9	296 (15.5)		
Distribution by age group	<36 y	36-40 y	>40 y
6-9	586	563	471
Aneuploid	270 (46.1)	344 (61.1)	379 (80.5)
Euploid	316 (53.9)	219 (38.9)	92 (19.5)
>9	110	107	79
Aneuploid	59 (53.6)	74 (69.2)	67 (84.8)
Euploid	51 (46.4)	33 (30.8)	12 (15.2)

Note: Results presented as n (%) unless indicated otherwise.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.

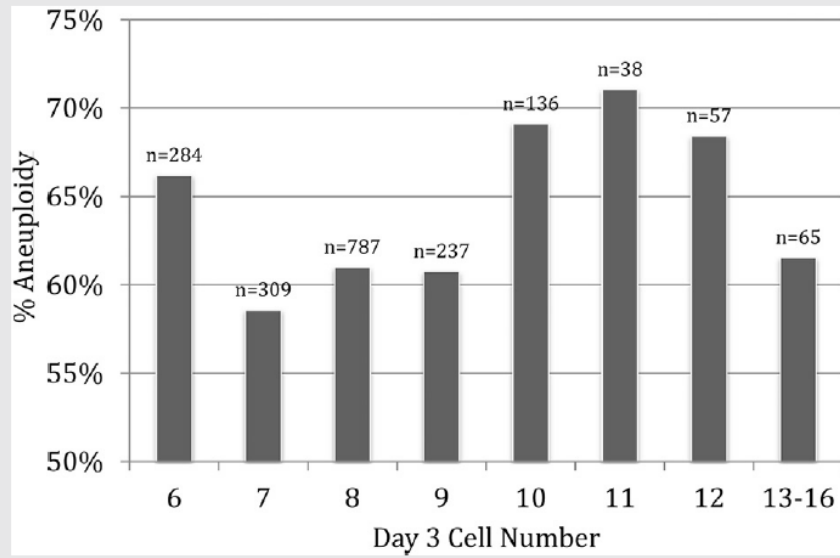
Table 1 染色体の状態と3日目の割球数による胚の分布

異数性胚率は62%で、その大部分(73%)がAまたはBグレードだった。

3日目にバイオプシーを行った胚の単一胚移植による妊娠率は40.4%
年齢で分類した妊娠率

- ・ 35歳未満 54%
- ・ 35~37歳 54%
- ・ 38~40歳 40%
- ・ 41~42歳 29%
- ・ 42歳以上 27%

FIGURE 1

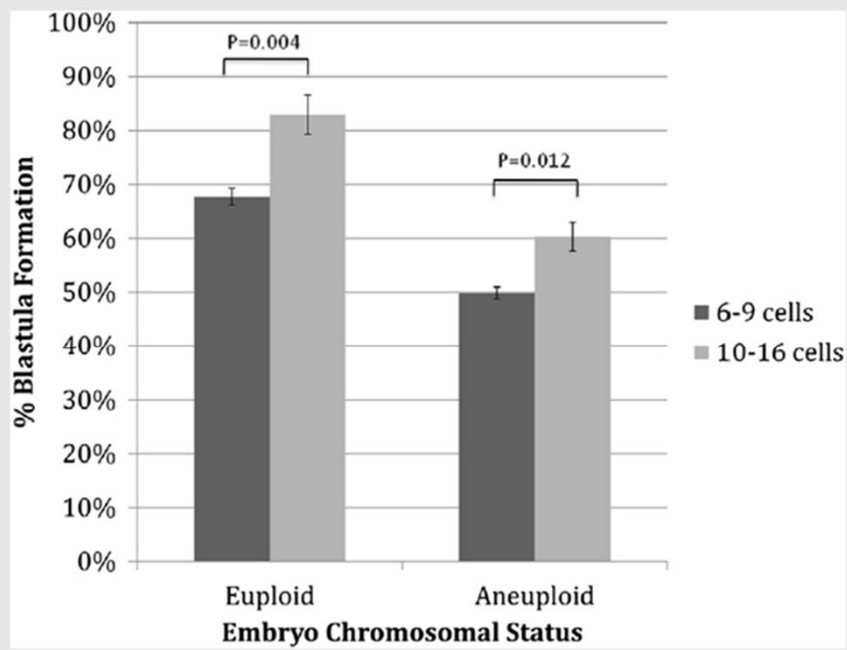


Day 3 cell number and aneuploidy rate.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.



FIGURE 2



Rate of blastula formation according to day 3 cell number and chromosomal status.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.

Embryo distribution by chromosomal status and day 3 cell number.

Characteristic	n (%)		
No. of patients	259		
Mean age (y)	37.5		
Total no. of embryos	1,915		
Overall aneuploidy rate, %	62		
Embryos per patient (n), mean	7		
Cells on day 3			
6-9	1,619 (84.5)		
>9	296 (15.5)		
Distribution by age group	<36 y	36-40 y	>40 y
6-9	586	563	471
Aneuploid	270 (46.1)	344 (61.1)	379 (80.5)
			92 (19.5)
			79
			67 (84.8)
			12 (15.2)

FIGURE 1

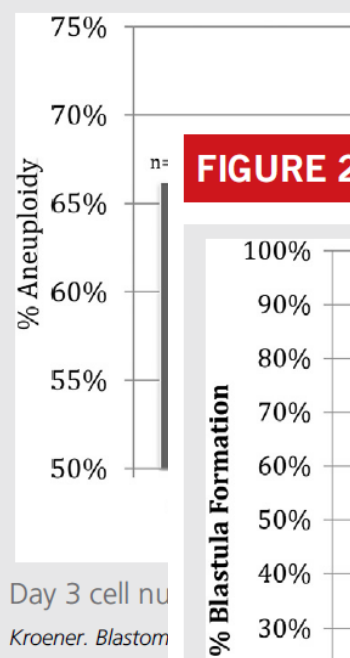
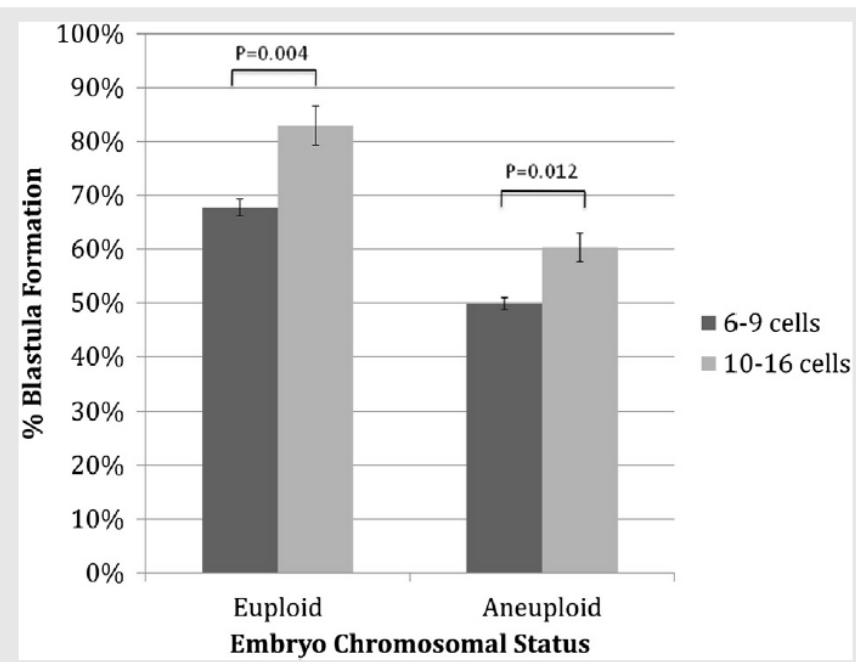


FIGURE 2



Rate of blastula formation according to day 3 cell number and chromosomal status.

Kroener. Blastomere number and aneuploidy rate. Fertil Steril 2015.