

## Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: a consecutive case series study

Maria Giulia Minasi<sup>1,\*</sup>, Alessandro Colasante<sup>1</sup>, Teresa Riccio<sup>1</sup>,  
Alessandra Ruberti<sup>1</sup>, Valentina Casciani<sup>1</sup>, Filomena Scarselli<sup>1</sup>,  
Francesca Spinella<sup>2</sup>, Francesco Fiorentino<sup>2</sup>, Maria Teresa Varricchio<sup>1</sup>,  
and Ermanno Greco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centre for Reproductive Medicine, European Hospital, Via Portuense 700, Rome 00149, Italy <sup>2</sup>Molecular Genetics Laboratory, "GENOMA", Via di Castel Giubileo 11, Rome 00138, Italy

\*Correspondence address. Centre for Reproductive Medicine, European Hospital, Via Portuense 700, Rome 00149, Italy.  
Tel: +39-06-65975659; Fax: +39-06-6534897; E-mail: mg.minasi@gmail.com

### 要約

#### 議題

ヒト胚盤胞の染色体の状態、標準的な形態学的評価とタイムラプスの間には相関関係があるのか。

#### 結果要約

胚盤胞は、異数体のものに比べて、質の高い ICM よ TE の割合が高く、グレード分類が高く、胚盤形成、拡張、孵化の開始までの時間が短いという相関関係がみられた。

#### 既成事実

胚の質は、着床や妊娠を成功させるための重要な予測因子であると考えられている。しかし、胚盤胞の段階での各形態学的パラメータの相対的な影響について知識を深める必要がある。最近では、タイムラプス技術の導入により、形態運動パラメータの評価もできるようになった。しかし、多くの研究が矛盾した結果を報告している。

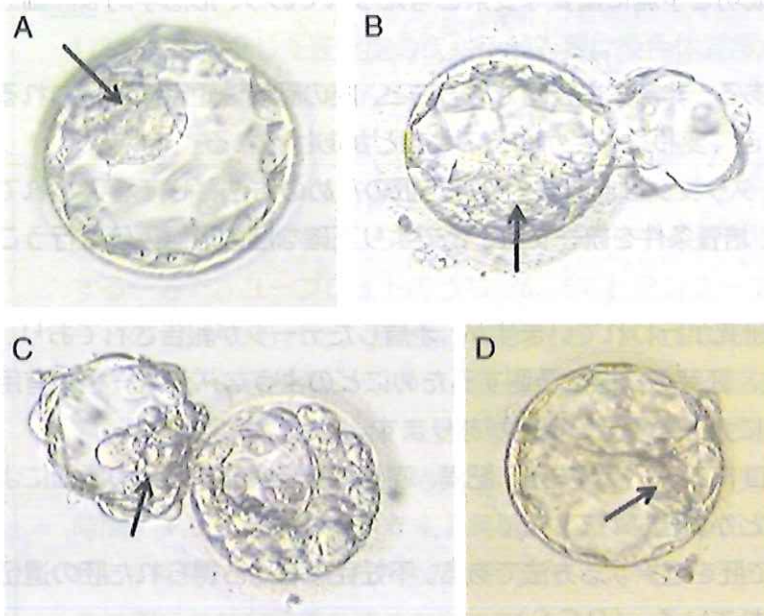
#### 研究デザイン

2012年9月から2014年4月までに実施された530回のPGSサイクルで得られた1730個の胚盤胞のうち、TEバイオプシーとアレイ比較ゲノムハイブリダイゼーションを受けた胚盤胞の形態を後ろ向きに解析した。合計928個の胚盤胞をタイムラプスインキュベーターで培養し、形態動態パラメータの解析を行った。

#### 参加者

女性の平均年齢は36.4±4.24歳で、454組のカップルがエントリーしました。384組が1回のPGS、64組が2回のPGS、6組が3回のPGSを実施した。標準的な形態学的評価では、ICMとTEのグレードと質が分析された。観察された形態学的パラメータは、第2極体

- ・ ICM および TE のグレード分類、胚盤胞のグレード分類にて評価した。



**Figure 1** Examples of human blastocyst morphology evaluation. **(A)** High-quality blastocyst: Type A ICM, Type A TE and degree of blastocoel expansion 4; **(B)** High-quality blastocyst: Type B ICM, Type A TE and degree of blastocoel expansion 5; **(C)** Low-quality blastocyst: Type C ICM, Type B TE and degree of blastocoel expansion 5; **(D)** Low-quality blastocyst: Type C ICM, Type C TE and degree of blastocoel expansion 4. The arrows indicate the ICM. Pictures are at magnification  $\times 400$ . ICM, inner cell mass; TE, trophoctoderm.

- ・ 解析した形態動態パラメータは、第2極体の押し出し (tPB2)、前核の出現および消失、2~8細胞分裂の開始 (t2、t3、t4、t5、t6、t7、t8、t9+)、2~3細胞期 (cc2) から3~4細胞期 (s2) までの時間、モルラ形成 (tM)、胚盤胞形成開始 (tSB)、完全胚盤胞期 (tB)、胚盤胞拡大 (tEB)、胚盤胞孵化 (tHB) である。
- ・ すべての生検は胚盤胞期に行われた。
- ・ 新鮮胚移植は PGS の結果が判明後に行った。
- ・ 凍結融解胚移植は、ホルモン補充周期または自然周期にて行われた。
- ・ 移植は超音波ガイド下で行った。
- ・ 移植対象は2倍体の胚盤胞のみ。
- ・ 子宮内膜の厚さが7mm未満の場合、移植を行わなかった。

・分析

連続データは平均値と標準偏差で、カテゴリ変数は絶対値とパーセントの頻度で示した。複数の混合ロジスティックモデルを用いて評価し、オッズ比と 95%信頼区間を報告した。

・すべての解析にて p 値<0.05 を統計的に有意とした。

結果

**Table 1 Biological and clinical outcomes of 530 PGS with aCGH cycles performed from September 2012 to April 2014.**

PGS + aCGH	September 2012 to April 2014
Number of cycles	530
Mean female age (years, ±SD)	36.8 ± 4.24
Mean male age (years, ±SD)	39.4 ± 5.37
Number of Retrieved oocytes	5811
Mature oocytes (%)	4463 (76.8%)
Injected oocytes	4463
Fertilized oocytes (%)	3495 (78.3%)
Day 3 embryos obtained (%)	3463 (99.1%)
Day 3 good/excellent quality embryos (%)	3011 (86.9%)
Blastocysts obtained (%)	1812 (52.3%)
Blastocyst analyzed for PGS (%)	1748 (96.5%)
Blastocysts with genetic result (%)	1730 (98.5%)
Blastocysts no result (%)	18 (1.0%)
Aneuploid blastocysts (%)	1127 (65.1%)
Euploid blastocysts (%)	603 (34.9%)
Transferred blastocysts	
Total	435
In fresh ET	164
In frozen-thawed ET	271
ETs	
Total	407
Fresh	155
Frozen-thawed	252

hCG-positive test (%)	
Total	228 (56.0%)
In fresh ET	80 (51.6%)
In frozen-thawed ET	148 (58.7%)
Biochemical pregnancies (%)	
Total	45 (19.7%)
In fresh ET	21 (26.3%)
In frozen-thawed ET	24 (16.2%)
Clinical pregnancies (CPR%)	
Total	180 (44.2%)
In fresh ET	56 (36.1%)
In frozen-thawed ET	124 (49.2%)
Fetal hearts (IR%)	
Total	184 (42.3%)
In fresh ET	56 (34.1%)
In frozen-thawed ET	128 (47.2%)
Ectopic pregnancies	
Total	3
In fresh ET	3
In frozen-thawed ET	0
Miscarriages (%)	
Total	31 (17.2%)
In fresh ET	11 (19.6%)
In frozen-thawed ET	20 (16.1%)
Deliveries (LBR%)	
Total	149 (36.6%)
In fresh ET	45 (29.0%)
In frozen-thawed ET	104 (41.3%)

aCGH, array comparative genomic hybridization; ET, embryo transfer; CPR, clinical pregnancy rate; IR, implantation rate; LBR, live birth rate.

・表 1

融解された 274 個の胚盤胞のうち、271 個 (98.9%) が生存した。

229 個の患者で hCG 陽性となり、45 名で化学流産、3 名に子宮外妊娠、180 名で臨床的妊娠であった。

凍結胚移植は新鮮胚移植に比べて、妊娠率、着床率、生児率が高く、化学流産率、流産率は低かった。

表 2

胚の倍数体状態と、3日目の開裂期に行われた標準的な形態評価、または胚盤胞が形成され生検された日のいずれにも相関関係は認められなかった。

グレード A の ICM および TE を持つ胚盤胞では、よりグレードの低い胚盤胞よりユープロイドである確率が高かった。

同様にグレード 5 ~ 6 の胚盤胞では低グレードの胚盤胞よりユープロイドである確率が高かった。

**Table 2** Correlation between the human Day 3 embryo morphological evaluation, day of the TE biopsy, ploidy status of the blastocysts, ICM morphology, TE morphology, degree of expansion (EXP) of the blastocysts and their ploidy status.

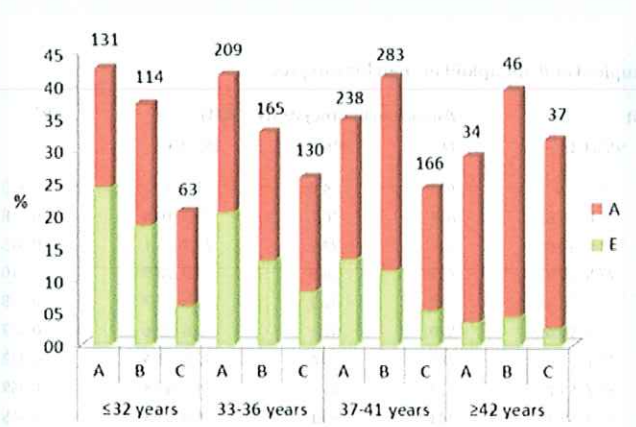
	Euploid blastocysts (N = 603)	Aneuploid blastocysts (N = 1127)	OR	95% CI	P <sup>c</sup>	OR adj <sup>b</sup>	95% CI	P <sup>d</sup>
Day 3 Grade A embryos	474 (78.6%)	863 (76.6%)	1 <sup>a</sup>					
Day 3 Grade B embryos	114 (18.9%)	244 (21.7%)	1.2	0.9–1.5	0.207	1.2	0.9–1.5	0.224
Day 3 Grade C embryos	15 (2.5%)	20 (1.8%)	0.8	0.4–1.6	0.456	0.7	0.3–1.4	0.339
Day 4 biopsy	9 (1.5%)	10 (0.9%)	0.4	0.1–1.3	0.124	0.4	0.1–1.3	0.130
Day 5 biopsy	402 (66.7%)	731 (64.9%)	0.6	0.3–1.1	0.092	0.6	0.3–1.2	0.165
Day 6 biopsy	178 (29.5%)	343 (30.4%)	0.6	0.3–1.2	0.144	0.7	0.3–1.3	0.229
Day 7 biopsy	14 (2.3%)	43 (3.8%)	1 <sup>a</sup>					
Grade A ICM	270 (47.2%)	342 (32.8%)	1 <sup>a</sup>					
Grade B ICM	204 (35.7%)	404 (38.7%)	1.6	1.3–2.1	<0.001	1.5	1.2–2.0	0.001
Grade C ICM	98 (17.1%)	298 (28.5%)	2.5	1.8–3.3	<0.001	2.3	1.7–3.2	<0.001
Not evaluable ICM quality	31	83						
Grade A TE	266 (46.5%)	325 (31.1%)	1 <sup>a</sup>					
Grade B TE	154 (26.9%)	321 (30.7%)	1.8	1.3–2.3	<0.001	1.7	1.3–2.2	<0.001
Grade C TE	152 (26.6%)	398 (38.1%)	2.2	1.7–2.9	<0.001	2.1	1.6–2.7	<0.001
Not evaluable TE quality	31	83						
EXP 1–2	31 (5.1%)	83 (7.4%)	1 <sup>a</sup>					
EXP 3–4	83 (13.8%)	228 (20.2%)	1.0	0.6–1.7	0.894	1.0	0.6–1.6	0.879
EXP 5–6	489 (81.1%)	816 (72.4%)	0.6	0.4–0.9	0.026	0.6	0.4–0.9	0.021
Female age			1.1	1.1–1.2	<0.001			

<sup>a</sup>Reference class.

<sup>b</sup>OR adj: odds ratio adjusted by female age.

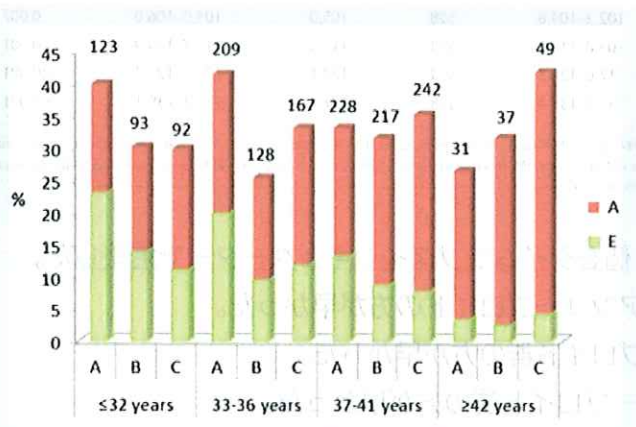
<sup>c</sup>P value was calculated by univariable mixed logistic model.

<sup>d</sup>P value was calculated by mixed logistic model adjusting by female age.

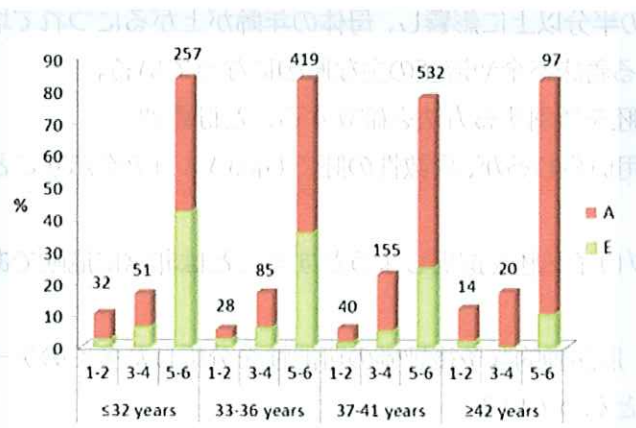


**Figure 2** Distribution of euploid (E) and aneuploid (A) human blastocysts according to the ICM morphology in four classes of female ages (≤32, 33–36, 37–41, ≥42 years). The N values are at top of bars.

女性の平均年齢はユープロイド群でアンユープロイド群より低く、アンユープロイドになる確率は1年ごとに10%増加した。



**Figure 3** Distribution of euploid (E) and aneuploid (A) human blastocysts according to the TE morphology in four classes of female ages (≤32, 33–36, 37–41, ≥42 years). The N values are at top of bars.



**Figure 4** Distribution of euploid (E) and aneuploid (A) human blastocysts according to the degree of expansion in four classes of female ages (≤32, 33–36, 37–41, ≥42 years). The N values are at top of bars.

・表 3

**Table III** Morphokinetic parameters analyzed in euploid and aneuploid human blastocysts.

Kinetic parameter	Euploid blastocysts (N = 294)			Aneuploid blastocysts (N = 634)			P <sup>a</sup>
	N	Mean	95% CI	N	Mean	95% CI	
tPB2	294	3.9	3.7–4.0	634	4.0	3.8–4.1	0.390
tPNa	294	10.2	9.8–10.6	634	10.1	9.8–10.4	0.468
tPNf	294	24.4	24.0–24.8	634	24.8	24.4–25.1	0.095
t2	276	28.0	27.5–28.5	602	28.4	28.0–28.9	0.110
t3	99	37.4	36.3–38.4	250	37.2	36.5–37.9	0.798
t4	270	40.0	39.3–40.6	570	41.1	40.6–41.6	0.002
t5	134	50.4	49.1–51.8	282	50.6	49.6–51.6	0.823
t6	170	53.9	52.7–55.2	323	55.2	54.2–56.3	0.069
t7	141	57.8	56.3–59.3	243	58.1	56.8–59.3	0.765
t8	257	61.9	61.5–63.2	556	62.0	61.0–63.0	0.853
9+	232	76.1	74.6–77.6	519	76.8	75.6–78.0	0.369
cc2	90	10.5	9.8–11.2	224	10.4	9.9–10.9	0.787
s2	86	2.6	1.7–3.5	214	4.2	3.6–4.8	0.004
tM	273	94.4	93.0–95.7	607	95.3	94.1–96.4	0.177
tSB	266	103.4	102.2–104.6	598	105.0	104.0–106.0	0.007
tB	263	110.2	108.8–111.5	593	112.8	111.7–113.9	<0.001
tEB	222	118.7	117.0–120.5	493	122.1	120.7–123.4	<0.001
tHB	174	133.2	131.2–135.2	328	137.4	135.7–139.1	<0.001

tPB2, second polar body extrusion; tPNa, appearance of two pronuclei; tPNf, pronuclear fading; t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, time to 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9+ or more cells divisions, respectively; cc2, time between 2- and 3-cell stages; s2, time between 3- and 4-cell stages; tM, morulae formation; tSB, starting blastulation; tB, full blastocyst stage; tEB, blastocyst expansion; tHB, blastocysts hatching. The marginal means reported are expressed in hours.  
<sup>a</sup>P-value was calculated by linear mixed model.

生検した 1730 個の胚盤胞のうち、928 個をタイムラプスインキュベーターで培養した。  
 4 細胞への分裂はユープロイドの方がアンユプロイドの方が早かった。  
 3 細胞期から 4 細胞期への分裂もユープロイド群の方が早かった。  
 胚盤胞に到達し、孵化し始めるのもユープロイド群の方が早かった。

## 考察

- ・卵子や胚の異数性は、産生された胚の半分以上に影響し、母体の年齢が上がるにつれて増加する。このことは、体外受精における着床不全や流産の主な原因になっている。
- 着床の可能性を損なう事なく異数性胚を識別する方法を確立することは重要
- ・形態学的評価は移植する胚の選択に用いられるが、異数性の胚でも高いスコアを示すことがある。
- ・そのため、形態学的評価のみでユープロイド胚を選択しようとすることは非常に危険である。
- ・近年、タイムラプス技術が導入され、形態動的な予後評価の可能性を分析した多くのデータが報告されているが、矛盾した結果となっている。
- ・前核の破綻は生着しなかったグループと比較して生着したグループで遅くなることが分かった。
- ・現時点では、普遍的に適用できるアルゴリズムは存在していないが、タイムラプス技術は

作業を効率化する可能性があるが、臨床結果が改善したという報告はない。

- ・近年、染色体分析のための様々な技術が開発されている。中でも、全ゲノムスクリーニングを伴う胚盤胞期で実施される PGS は、高い着床能を維持し、妊娠までの時間を短縮しながら、胚の倍数性の正確な評価を提供することができる、ユニークな手順であると考えられている。

- ・この技術により、単一胚移植を行うことができるため、累積成功率を維持しながら多胎妊娠率を下げることができる。

- ・生検後にすべての胚を凍結保存し、遺伝的な結果が出るのを待つフリーズオール戦略は、子宮内膜とよりよく同調することができ、流産のリスクを回避することができます。

- ・移植を自然周期で行うことができ、卵巣過剰刺激症候群のリスクを防ぐことができる。

- ・今回の研究により、PGS やタイムラプス技術そのものにより、胚や卵子の品質を改善するものではなく、体外受精の結果を改善させるものではないことが示された。

- ・PGS の臨床的、経済的な有効性に関しては議論の余地があり、異なる患者特性や臨床現場を考慮した前向き研究が必要と考えられる。