

Grade and looseness of the inner cell mass may lead to the development of monozygotic diamniotic twins

Junko Otsuki, Ph.D., Toshiro Iwasaki, D.V.M., Ph.D., Yuya Katada, B.S., Haruka Sato, M.S., Kohyu Furuhashi, B.S., Yuta Tsuji, Ph.D., Yukiko Matsumoto, M.D., and Masahide Shiotani, M.D., Ph.D.

Hanabusa Women's Clinic, Kobe, Japan

Fertility and Sterility® Vol. 106, No. 3, September 1, 2016 0015-0282/\$36.00
Copyright ©2016 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.05.007>

ICMのグレードとゆるみが一絨毛二羊膜性双生児発生率に関与する？

Abstract

【目的】一絨毛二羊膜性双胎(M-D)の発生における内部細胞塊(ICM)のグレードとその形態的構成との関係を検討すること。

【デザイン】後方視的な胚のコホート研究。

【セッティング】民間の体外受精クリニック。

【患者】8,435例の凍結融解単胚盤胞移植、ホルモン補充療法を評価した。このコホートには71個の胚盤胞とそのICMをタイムラプス写真で観察した。

【主な評価項目】ICM内のゆるみをタイムラプス撮影により観察し評価した。また、緩みのプロセスに関与する細胞数も評価した。これらのパラメータは、一卵性双生児のタイプと相関していた。

【結果】ICMのグレードが高い(A)胚盤胞を移植した場合のM-D双胎率は0.38%(3/796)であったが、グレードが低い(B、C)胚盤胞を移植した場合は1.38%(34/2,463)と有意に高い値を示した。71個の凍結融解胚盤胞を移植し、タイムラプス撮影を行ったところ、二絨毛膜二羊膜双胎(DD)が2件、一絨毛膜二羊膜双胎が1件あった。MD1例の胚を注意深く観察したところ、少なくとも8個の細胞が脱コンパクションされ、ICMが緩んだ外観になっていることが判明した。他の胚盤胞のICMにはこのような脱コンパクションは認められなかった。

【結論】M-D双胎の発生は、脱コンパクションされたICMを含む胚盤胞を除外することにより回避できる可能性がある。

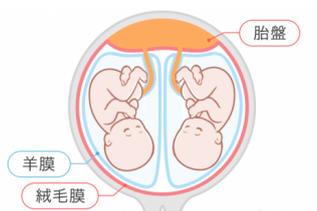
Introduction

生殖補助医療において、自然発生率と比較して有意に高い確率で一卵性双生児が発生することはこれまで言われてきた。一卵性双生児には、一絨毛二羊膜性双生児(M-D)、一絨毛一羊膜性双生児(M-M)、二絨毛二羊膜性双生児(D-D)の3つのタイプがある。M-Dは胎盤を共有しているため、双胎間輸血のリスクがあり、成長不良や胎児死亡の原因となる。

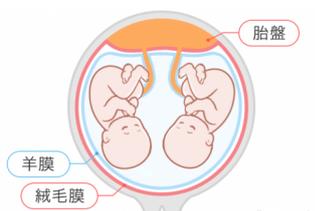
一卵性双生児を誘発するいくつかの要因が提起されているが、ICSI、孵化補助(AHA)、胚盤胞期までの延長培養など、いくつかのARTの方法については矛盾した報告がなされている。近年、培養液の改良により一卵性双生児率が低下しているという暗黙の了解があるのかもしれないが、一卵性双生児率は自然妊娠での発生率である約0.4%まで低下していない。

本研究では、拡大・膨張胚盤胞のICMのグレードに着目し、新たな側面から考えられる危険因子を検討した。ICMの分裂しやすさは、ICM細胞のグレードとゆるさに関係すると考えた。このような要因によって、2つの別々のICMが形成され、その結果、M-D双胎が生じる可能性があるかと仮定しM-D双胎に注目した。タイムラプス撮影により、そのような要因を解析することができた。

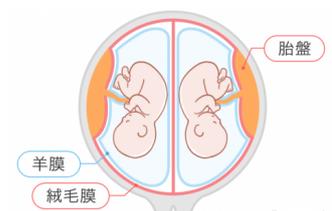
一絨毛二羊膜性双生児(M-D)



一絨毛一羊膜性双生児(M-M)



二絨毛二羊膜性双生児(D-D)



Material&Method

- ・2011年1月から2014年12月までに、単一の不妊治療クリニックにおいて、臨床妊娠(GS)に至ったホルモン療法(HRT)、単一融解胚移植を後方視的に評価した。
- ・2013年6月から2014年12月までの、タイムラプス顕微鏡(Embryo Scope)による胚盤胞のICM観察についても、後方視的に解析した。
- ・卵子が4個以上得られた30歳から40歳の患者に限定してタイムラプス撮影を行った。ICMの緩みはグループ化した細胞を含んでいたICMに、その後緩く配列した細胞が5個以上存在することと定義された。
- ・胚盤胞のグレードはGardner分類を用い、培養士1名に限定し評価した。
- ・ほとんどの胚盤胞(90%以上)にAHAが行われた。M-D双胎化率に関しては、AHAを行った胚(1.06%、35/3,311)と行わなかった胚(0.75%、1/134)に有意差はなかった。
- ・統計解析には χ^2 検定を用いた。

Result

- ・凍結融解した胚盤胞は合計8,435個。
- ・3,445人(40.8%)の臨床妊娠。
- ・これらの臨床妊娠のうち一卵性双生児は 80例(2.32%)であった。M-D、M-M、D-D双胎は、それぞれ36(1.04%)、3(0.09%)、39(1.13%)であった。
- ・一卵性三つ子も2例(0.06%)で確認された。
- ・D-D双胎における性別不一致は、凍結融解単胚盤胞移植のHRT周期における単一胚移植と自然妊娠の組み合わせであると仮定し、2例のD-D双胎で確認された。
- ・二児のFHB率は、M-D双胎の方がD-D双胎より有意に高かった($P<.001$)。
- ・二児出生率もD-D双胎に比べM-D双胎で有意に高かった($P=.0017$)。

TABLE 1

Outcome	No.	%	P value	Female/female	Male/male	Female/male	Unknown	Aborted
Transferred embryos	8,435							
Chemical pregnancy	4,945	58.6 (4,945/8,435)						
Clinical pregnancy	3,445	40.8 (3,445/8,435)						
FHB (+)	3,050	36.2 (3,050/8,435)						
D-D clinical pregnancy	39	1.13 (39/3,445)						
D-D double FHBs	18	46.2 (18/39)	a					
D-D single FHB	16	41.0 (16/39)						
D-D double live births	17	43.6 (17/39)	c	11	4	2		
D-D single live birth	13	33.3 (13/39)		9	3		1	
M-D clinical pregnancy	36	1.04 (36/3,445)						
M-D double FHBs	33	91.7 (33/36)	b					
M-D single FHB	0	0 (0/36)						
M-D double live births	26	72.2 (26/36)	d	9	16		1	1
M-D single live birth	2	5.6 (2/36)					2	
M-M clinical pregnancy	3	0.09 (3/3,445)						
M-M double FHBs	1	33.3 (1/3)						
M-M single FHB	2	66.7 (2/3)						
M-M double live births	0	0 (0/3)						
M-M single live birth	2	66.7 (2/3)		1	1			
Monochorionic triplet	2	0.06 (2/3,445)						
M-T double FHBs ^e	1	50.0 (1/2)						
M-T double live births	1	50.0 (1/2)			1			
Total of twin and triplet	80	2.32 (80/3,445)						

Note: D-D = dichorionic diamniotic; FHB = fetal heart beat; IUFD = intrauterine fetal death; M-D = monochorionic diamniotic; M-M = monochorionic monoamniotic; M-T = monochorionic triplet.
^{a,b} $P<.001$.
^{c,d} $P=.0017$.
^e One of three fetuses resulted in IUFD.

Otsuki. Monochorionic diamniotic twinning. Fertil Steril 2016.

TABLE 2

Blastocyst grade and monozygotic diamniotic twinning incidence after transfers of single frozen-thawed blastocysts in women given hormone therapy.

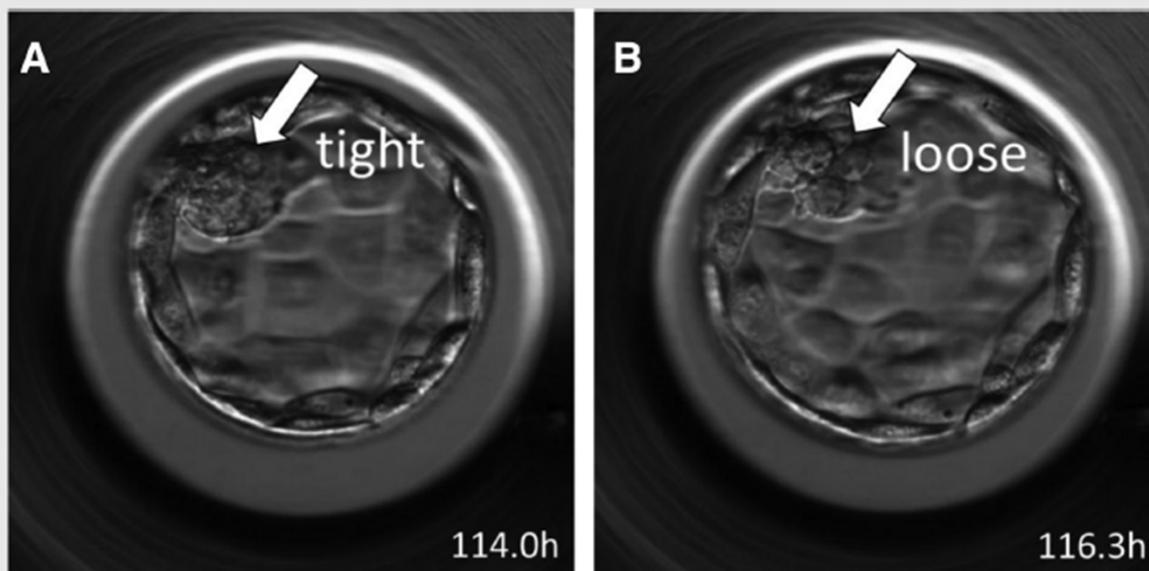
Grade	No. of clinical pregnancy	No. of M-D twinning	%	P value
High quality blastocyst (≥3BB)	1,958	17	0.87	
Low quality blastocyst (<3BB)	1,349	20	1.48	
ICM grade A (AA, AB, AC)	796	3	0.38	^a
ICM grade B and C	2,463	34	1.38	^b
Total	3,307	37	1.12	

Note: ICM = inner cell mass; M-D = monozygotic diamniotic.

^{a,b} P = .033.

Otsuki. Monozygotic diamniotic twinning. Fertil Steril 2016.

- ・グレード別M-D双胎率を分析した。
- ・高グレード胚盤胞(≥3BB)のM-D双胎率は0.87%(17/1,958)であったが、低グレード胚盤胞(<3BB)を移植した場合は1.48%(20/1,349)となった(P=.11)。
- ・高グレードのICM(グレードA)を含む胚盤胞を移植した場合のM-D双胎率は0.38%(3/796)であったが、低グレードのICM(グレードBおよびC)を含む胚盤胞は1.38%(34/2,463)となった(P=.033)。

FIGURE 1

Careful observation of the blastocyst that resulted in the birth of a monozygotic diamniotic twin revealed that eight cells in its inner cell mass (ICM) became decompact and the cell mass developed a looser appearance. The timing of these changes was as follows: (A) Tight junctions formed in the ICM at 114.0 hours after insemination. (B) These junctions in the ICM loosened at 116.3 hours after insemination.

Otsuki. Monozygotic diamniotic twinning. Fertil Steril 2016.

- ・凍結融解した胚盤胞(71個)をタイムラプス顕微鏡で観察後移植した。
- ・hCG、GS、FHB陽性率はそれぞれ74.2%(52/71)、63.4%(45/71)、57.7%(41/71)であった。
- ・FHB陽性の41周期のうち、36例が出産、4例が流産、1例不明となった。
- ・M-Dの胚盤胞のICMには、少なくとも8個の脱力細胞が発生していた。
- ・他の66個の胚盤胞のICMではこのような脱細胞は観察されなかった。残りの4個の胚盤胞では、ICMが不鮮明で、ICM内の細胞の緩みは検出されなかった。

Discussion

【グレードとMD双胎率】

本研究では、高グレードに分類されるICMを含む胚盤胞はMD双胎率が低いことが判明した。

【ICMの緩み】

データは、“ICMの緩み”がICMの分裂を誘発する危険因子の一つであり、それがM-D双胎を引き起こす可能性があることを示している。一般的に、高グレードのICMはより大きく、より緊密化しているため、タイムラプスのデータはICMグレードのデータと一致する。M-D双胎の発生率は、タイムラプス観察で確認されたように、緩んだICMを含む胚の移植を避けることによって減少させることができる。

M-M、M-D、D-Dはそれぞれ原因が異なる可能性があり、要因や危険因子を個別に調査する必要がある。データでは、一卵性M-D双生児は一卵性D-D双生児に比べ、胎児数の減少がなく出生率が高いことが示された。これは、ICMが分裂する割合が多いためと考えられる。

【結論】

ICMの緩みが見られる胚盤胞の移植を避けることでM-D双胎化の発生を抑制できる可能性がある。このような形態学的変化はタイムラプス観察で容易に確認できるため、この仮説を支持するためには、さらなる前向きな研究が必要である。

(参考)当院での一卵性双胎

SBT 40歳以下 凍結融解胚移植 HRC
2013.10~2021.11

GS	55.63%(938/1686)
双胎	1.92%(18/938)
DD	1.28%(12/938)
MD	0.32%(3/938)

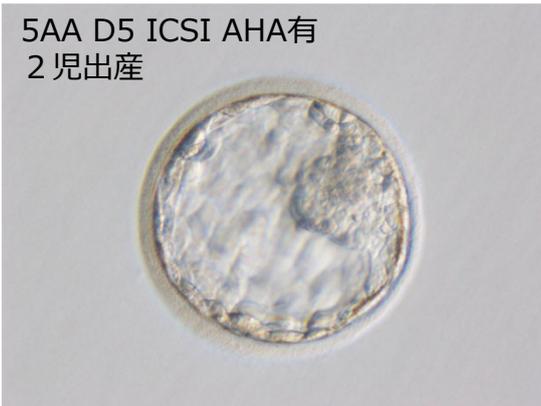
双胎タイプ不明3名

出産まだ5名 出生率には含まず

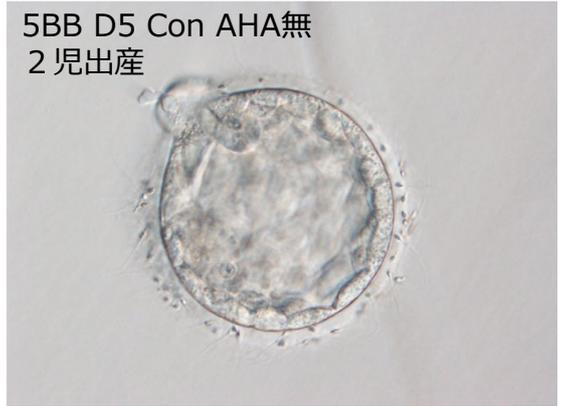
DD	12
DD FHB×2	100.00%(12/12)
DD 出生×2	33.33%(3/9)
MD	3
MD FHB×2	100.00%(3/3)
MD 出生×2	100.00%(3/3)

MDとなった胚

5AA D5 ICSI AHA有
2児出産



5BB D5 Con AHA無
2児出産



4BA D5 ICSI AHA有
2児出産



その他の要因

◎AHA

日本産婦人科学会データをロジスティック回帰分析により分析するとAHAが一卵性双胎のリスク因子として挙げられた(Y Ikemoto et al.,2018)。

一卵性双生児はAHAとは関係がない(Wu D et al.,2014)。

Zona free とAHA非施行を比較して一卵性双胎率に有意差は認められなかった(Frankfurter D. et al., 2004)。

◎培養時間

メタ解析より、胚盤胞移植は初期胚移植と比較して双胎のリスクが上がる(Kathrine Vauvert R Hviid et al.,2018)。

患者の年齢、治療が行われた期間、6~8細胞胚の数と割合、余剰胚の利用可能性を考慮すると、胚盤胞移植と初期胚移植の間で双胎率に差はなくなった。(Jason M et al., 2015)。

◎凍結融解胚移植

メタ解析より、凍結融解胚移植と一卵性双胎の関連は示されなかった (Busnelli A,et al. 2019) 。

◎グレード

一卵性双胎発生率はICMのグレードが低く、TEのグレードが高いことと関連していた。26,254例中402例 (Wenhao Shi, et al. 2021)