

# First PGT-A using human *in vivo* blastocysts recovered by uterine lavage: comparison with matched IVF embryo controls<sup>†</sup>

Santiago Munne<sup>1,2,3,\*</sup>, Steven T. Nakajima<sup>4</sup>, Sam Najmabadi<sup>5,6</sup>, Mark V. Sauer<sup>7</sup>, Marlane J. Angle<sup>8</sup>, José L. Rivas<sup>6</sup>, Laura V. Mendieta<sup>6</sup>, Thelma M. Macaso<sup>5</sup>, Sarthak Sawarkar<sup>1</sup>, Alexander Nadal<sup>9</sup>, Kajal Choudhary<sup>9</sup>, Camran Nezhat<sup>10</sup>, Sandra A. Carson<sup>3</sup>, and John E. Buster<sup>9,11</sup>

<sup>1</sup>CooperGenomics, 3 Regent St., Suite 301, Livingston, NJ 07039, USA <sup>2</sup>Overture Life, Avenida de Europa 4, Alcobendas, Madrid 28108, Spain <sup>3</sup>Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Yale University, 310 Cedars Street, RM 337, New Haven, CT 06510, USA <sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA <sup>5</sup>Center for Reproductive Health and Gynecology, 99 N. La Cienega Blvd., Suite 109, Beverly Hills, CA 90211, USA <sup>6</sup>Punta Mita Fertility Center/Center for Reproductive Health and Gynecology, Punta Mita Hospital, Ramal Carretera Federal 200 KM 19 No. 1, Punta Mita, Nayarit C.P. 63734, Mexico <sup>7</sup>Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Rutgers Robert Wood Johnson Medical School, Clinical Academic Building, 125 Paterson St., Room 2150, New Brunswick, NJ 08901, USA <sup>8</sup>Laurel Fertility Care, 1700 California St., San Francisco, CA 94109, USA <sup>9</sup>Previvo Genetics, Inc., 1599 Industrial Road, San Carlos, CA 94070, USA <sup>10</sup>Center for Special Minimally Invasive and Robotic Surgery, 900 Welch Road, #403, Palo Alto, CA 94304, USA <sup>11</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Warren Alpert Medical School of Brown University, 101 Dudley St., Providence, RI 02905, USA

\*Correspondence address. Department of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Sciences, Yale University, New Haven, CO 06510, USA. Tel: +1 (502-767-6924); Fax: 1-646-207-2897; E-mail: Santiago.munne@gmail.com

Submitted on December 19, 2018; resubmitted on September 7, 2019; editorial decision on October 9, 2019

## ◆ Abstract

**STUDY QUESTION:** 着床前異数性遺伝学的検査(PGT-A)を行うために、調整卵巣刺激(COS)およびIUIを行った後に、妊娠可能な女性から子宮洗浄によって体内で受精・発育した胚盤胞を回収し、PGT-A結果とGardner分類による形態学的評価を体外受精の胚盤胞と比較することは臨床的に可能であるか？

**SUMMARY ANSWER:** COSおよびIUIを行った134周期中56周期で体内から136個の胚が回収でき、その胚の正倍数性は体内受精と体外受精で同等であったが、形態は体内受精胚の方が良好であった。

**STUDY DESIGN, SIZE, DURATION:** 新規の子宮洗浄カテーテルおよび体液回収装置の安全性、有効性および実施可能性を評価するために、女性(n=81)を対象に単一施設前向き対照試験を実施した。すべての子宮洗浄は不妊治療専門病棟を有する民間施設で2017年8月から2018年6月にかけて実施された。被験者は臨床転帰と遅発性合併症をモニターするために、洗浄後30日間追跡された。20人の被験者では、対照群として同じ卵巣刺激プロトコールで1回の体外受精を実施し、体内受精と体外受精の胚盤胞の比較を行った。

**PARTICIPANTS/MATERIALS, SETTINGS, METHODS:** ゴナトロピンで卵巣刺激を行い、排卵誘発は少なくとも2個の主席卵胞が18mm以上の時に行われた。その後IUIを行い、子宮洗浄はIUIの4-6日後に行われた。対照IVF群の20人の女性は、洗浄周期の後に体外受精も行った。回収された胚は栄養外胚葉(TE)の生検を受け、ガラス固化され、液体窒素で保存された。生検は次世代シーケンス技術を用いて解析した。洗浄後はGnRHアンタゴニストを注射して月経を誘発した。

**MAIN RESULTS AND THE ROLE OF CHANCE:** 81人の女性に合計134回の子宮洗浄が行われ、そのうち56周期(42%)で136個の胚が回収された。凍結保存時、胚盤胞は96個(70%)であった。胚盤胞の質は良好で、74%(70/95)がGardner分類のグレード3BB以上であり、体外受精胚よりも有意に形態が良好であった。本研究は、胚の遺伝的特徴を明らかにするために、卵巣刺激後に体内で受精・発育した胚盤胞を回収した最初の研究であり、回収された胚盤胞の染色体正倍数性率は、体外受精胚と同等であった。

**LIMITATIONS, REASON FOR CAUTION:** 卵巣刺激後に子宮洗浄を行い、分析のために胚盤胞を回収することの可能性を評価するという最初の目的は達成された。しかしながら、子宮洗浄システムには受精したすべての胚を子宮内洗浄で取り出せるわけではないという効率の面での課題が残されており、臨床において期待されるレベルにまではまだ完全に到達していなかった。体内受精胚と体外受精胚の染色体異常の頻度は同程度であるという結果であったが、この研究は小規模であった。しかしながら、より大規模な過去の研究結果においても、体内受精胚の遺伝学的結果は体外受精胚の範囲内であるとわかっている。

**WIDER IMPLICATIONS OF THE FINDINGS:** 子宮洗浄法は、体外受精を望まない、あるいは必要としない妊娠可能な女性やPGT、胚の妊孕性温存、レズビアンカップルの相互体外受精を望む女性から胚を回収するための非外科的で低侵襲な方法となりうる。研究および臨床の観点から、この技術は、体内受精胚を、将来および現在の生殖補助医療の究極の基準として用いるための新しいプラットフォームを提供する。

## ◆ Introduction

受精卵の染色体異常は、母体の年齢が高くなるにつれて増加し、着床不全の主な原因となることが知られている。しかしながら染色体異常の要因は年齢だけではなく、体外受精の実施自体が異数性やモザイクを誘発する可能性があることが示されている。

残念ながら、現時点では体外受精以外に PGT のために胚盤胞を得る方法はなく、今回のように体外受精を行わずに子宮洗浄によって胚盤胞を得る方法は、遺伝学的検査を実施するために体内で受精した胚盤胞を回収するための新しい選択肢となりうる。

今回の研究では、COS と IUI の後に、体外受精を行うことなく、特殊な子宮カテーテルと洗浄システムを用いて体内で受精した胚盤胞を複数個回収することが可能であることを初めて実証した。また回収した体内受精の胚盤胞と体外受精の胚盤胞の形態学的比較解析についても初めて報告する。

## ◆ Materials and Methods

**Recruitment and ethical approval:** 2017 年 8 月から 2018 年 6 月までの研究期間中に、メキシコのプンタ・ミタ病院にて 81 人の女性に合計 134 回の子宮洗浄が行われた。卵子提供者は、卵巣が 2 つあり、生殖能力に影響を及ぼすような既知の健康問題がないことが条件であった。各被験者は子宮卵管造影検査によって正常な子宮腔と両側卵管開存が確認され、BMI 40kg/m<sup>2</sup> 以上や卵巣嚢腫摘出術の既往、経口避妊薬等の禁忌がある被験者は除外された。精子提供者についても健康状態が良好で、精液凍結保存前後の精液パラメータは正常であった。また 20 人の被験者では、対照群として同じ卵巣刺激プロトコールで体外受精を 1 回実施し、体内受精と体外受精の胚盤胞の比較を行った。

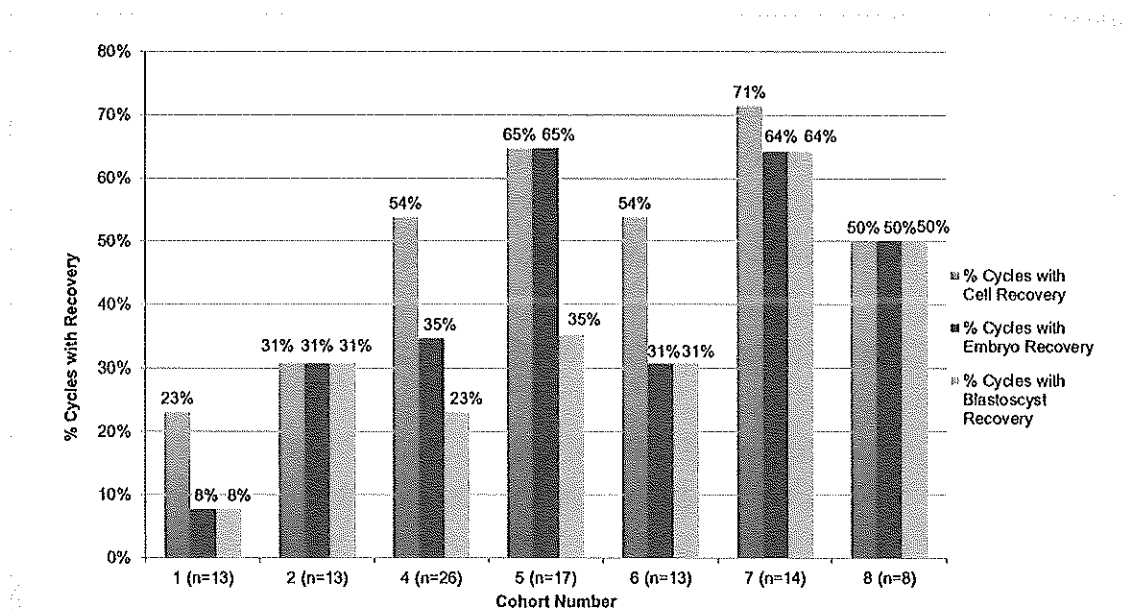
**COS protocol:** COS に先立って経口避妊薬を投与し、ゴナドトロピンを開始する 4 日前からは中止した。ゴナドトロピンの初回投与量として遺伝子組換え FSH(rFSH)100IU/日とヒト閉経期ゴナドトロピン(hMGs)75IU/日を 3 日間投与した。ゴナドトロピンの投与量は、直径 18mm 以上の卵胞が 2 つ以上できるように調整した。排卵誘発薬として被験者の最初の cohorts (n=13, 10.4%) では 5000IU の hCG を、その後の被験者(n=121, 90.2%) には酢酸リュプロリド 4mg と 2500IU の hCG を投与した。被験者は 36 時間後に IUI を受け、着床期間と一致するように、IUI の 4~6 日後に子宮洗浄を 1 回予定した。

**Uterine lavage, blastocyst biopsy and genetic analysis:** 子宮洗浄システムは、回収ボトルを備えた洗浄カテーテルと、再使用可能な洗浄コントローラーで構成され、洗浄液を子宮腔に注入した後、胚を回収ポートに回収する仕組みとなっている。洗浄によって回収された胚は栄養外胚葉(TE)の生検を受け、ガラス固化され、液体窒素で保存された。胚生検は次世代シーケンス技術を用いて解析され、正常胚は正倍数体に、染色体異常が全細胞に存在する胚は異数体に分類された。モザイク率 20%未満または 80%以上は鑑別不可能とみなされ、20%未満は正倍数体、80%以上は異数体と分類された。異常細胞が 20-40%のモザイク胚を低頻度モザイク胚、40-80%以上のモザイク胚を高頻度モザイク胚と

した。異常細胞の割合に関わらず、3本以上の染色体を含むモザイク胚は、複合モザイク胚として、3本以上の染色体を持ち、異数性を有する胚は複合異常胚に分類された。

## ◆ Result

**Embryo recovery and safety results:** 81人の女性に合計134回の子宮洗浄が行われ、そのうち56周期(42%)で136個の胚が回収され、そのうち胚盤胞は46周期(34%)で回収された。Figure3に示すように研究コホート別の胚回収率にばらつきがみられたが、初期ほど効率が低く、技術とシステムの最適化により効率は向上し、最後の2つでは1周期あたり50~60%の胚回収率を維持した。



**Figure 3 Results of embryo recovery after uterine lavage in women.** The cellular recovery of oocytes and embryos (cells/cycle, blue graph), embryos (blastocysts and cleavage stage) (embryos/cycle, red graph) and blastocysts (blastocyst/cycle, green graph) by study cohort. Note: Cohort 3 was excluded from analysis as cycles were unstimulated.

子宮洗浄をIUI後平均120時間(96-144時間)に行い、合計136個の胚が回収された。最初の胚回収の時点で胚盤胞は53%(72/136)であったが、凍結保存の時点では70%(96/136)であった。またTable IIに示すように胚(93%、52/56)、特に胚盤胞(93%、43/46)は洗浄がIUI後115~129時間に実施された場合に高い割合で発生した。

**Table II Time interval between IUI and uterine lavage.**

	85-99 hours	100-114 hours	115-129 hours	130-145 hours
Distribution of the 134 lavages by time interval	2	7	121	4
Number of lavages with embryo recovery	0	1	52	3
Number of lavages with blastocyst recovery	0	1	43	2

**IVF control cycles:** 子宮洗浄で胚盤胞を回収した女性 20 人を対象に、同様の COS プロトコルを用いて体外受精も行った。通常の体外受精(ふりかけ法)のみで顕微授精は行われなかった。体外受精により合計 163 個の胚盤胞が PGT-A 分析に用いられた。

**Aneuploidy testing:** Table VI に示すように正倍数性率が体内受精の胚盤胞で 54%、体外受精の胚盤胞では 51%、異数性率は体内受精の胚盤胞で 20%、体外受精の胚盤胞では 17% と有意差はなかった。しかし低頻度のモザイク率は体内受精の胚盤胞で 9%、体外受精の胚盤胞では 13% と体外受精で有意に高い結果となった。

**Table VI Genetic analysis of *in vivo* and IVF (control group) blastocysts.**

	<i>In vivo</i> blastocysts		IVF blastocysts	P-value
	Data from all lavage cycles	Excluding lavage women with no IVF cycles		
N (total cycles)	134	50	20	-
N (cycles with embryo recovery)	56	28	20	-
N (women)	81	20	20	-
N (embryos collected and analyzed)	93	65	163	
Euploid	50 (54%)	35 (54%)	83 (51%)	
Low-grade mosaic ( $\leq 40\%$ )	8 (9%)	6 (9%)	22 (13%)	NS, $P > 0.05$
High-grade or complex mosaic ( $> 40\%$ )	10 (11%)	3 (5%)	14 (9%)	
Aneuploid	18 (19%)	13 (20%)	28 (17%)	
Complex abnormal, triploid	7 (8%)	8 (12%)	16 (10%)	

P = p-value comparing genetic results of *in vivo* and IVF blastocysts. No significant differences were found among the values of *in vivo* and IVF blastocysts. All statistical tests were performed using chi-square analysis. If a re-biopsy was performed on *in vivo* blastocysts, only the result of the second biopsy was utilized. (No re-biopsies were performed on the *in vitro* blastocysts.)

**Embryo morphology:** 回収した体内受精の胚盤胞 96 個のうち、内細胞塊(ICM)を可視化できなかった 1 個を除く 95 個が Gardner 分類で評価され、Table VII に示すように 73.7% がグレード 3BB 以上の形態良好群に、残り 26.3% が形態不良群に割り付けられた。体内受精と体外受精の胚盤胞の形態を比較した結果、Table VII・VIII に示すように体外受精の胚盤胞で有意に不良形態率が高かった。

**Table VII *In vivo* versus IVF blastocyst morphology comparisons for all women.**

	IVL-PMH (n)	IVL-IHE (n)	IVF	P1*	P2'
Good morphology blastocysts (n)	70 (73.7%)	72 (75.8%)	77 (43.3%)		
Poor morphology blastocysts (n)	25 (26.3%)	23 (24.2%)	101 (56.7%)	$p < 0.05$	$p < 0.05$
Total	95**	95**	178		

Comparison of good morphology and poor morphology of the *in vivo* lavage (IVL) and IVF blastocysts using the entire IVL blastocyst population.

\*P1 = p-value comparing the grades of the IVL blastocysts (as graded by Punta Mita Hospital: PMH) to the IVF blastocysts. P2 = P value comparing the grades of the IVL blastocysts (as graded by the in house embryologist: IHE) to the IVF blastocysts. All statistical tests performed using chi-square analysis.

\*\*Total value excluded the non-graded blastocyst (n = 1)

**Table VIII. In vivo versus IVF morphology comparison in the same woman.**

	IVL-PMH (n)	IVL-IHE (n)	IVF	P1*	P2*
Good morphology blastocysts (n)	45 (68.1%)	47 (71.2%)	77 (43.3%)		
Poor morphology blastocysts (n)	21 (31.9%)	19 (28.8%)	101 (56.7%)	<i>P</i> < 0.05	<i>P</i> < 0.05
Total	66	66	178		

Comparison of good morphology and poor morphology IVL and IVF blastocysts using IVL blastocyst data from women who also underwent a lavage cycle.

\*P1 = *P* value comparing the grades of the IVL blastocysts, as graded by PMH, to the IVF blastocysts. P2 = *P* value comparing the grades of the IVL blastocysts, as graded by the in-house embryologist, to the IVF blastocysts

## ◆ Discussion

今回の研究によって卵巣刺激後に子宮洗浄を行い、分析のために体外受精を行わずに胚盤胞を回収することの可能性を評価するという最初の目的は達成され、子宮洗浄法が体外受精を望まない、あるいは必要としない妊娠可能な女性やPGT、胚の妊孕性温存、レズビアンカップルの相互体外受精を望む女性から胚を回収するための非外科的で低侵襲な方法となりうると考えられた。しかしながら、子宮洗浄システムには受精したすべての胚を子宮内洗浄で取り出せるわけではないという効率の面での課題が残されており、実際今回の研究では41.8%(56/134)の周期でしか胚が回収できていない。体外受精と子宮洗浄の両方を行った20人の女性においても、卵巣刺激の方法は同様であったにもかかわらず、28回の子宮洗浄で65個の胚盤胞が得られたのに対し、20回の体外受精では163個もの胚盤胞が得られ、子宮洗浄による胚の回収は体外受精に比べて効率が悪いことがわかる。

また体内受精胚と体外受精胚の染色体異常の頻度は同程度であるという結果であったが、今回の研究では体外受精と体内受精、双方で胚を検査できたのは20人と、サンプルサイズが小さいのも今後の改善の余地がある点だと思われ、より大規模なデータが必要である。

## ◆ Conclusion

子宮洗浄法を用いるには、卵管が開存し、卵巣予備能が正常で、男性因子がないことが必要で、遺伝性疾患による妊娠や出産リスクのある患者にとって有用であり、母体の高齢や複数回の流産が生殖不全の主な原因であるような場合にも使用できる。

子宮洗浄法は体外受精に代わる非外科的で低侵襲の方法となる可能性を秘めているが、現時点では胚の回収効率の悪さに課題がある。しかしながら洗浄カテーテルやコントローラの改良に加えて、卵巣刺激プロトコールの修正や子宮洗浄に最適な内分泌環境に関してさらなる研究を重ねることで、胚回収効率の向上につながると考えられる。

子宮洗浄法は医療提供者に、ますます多様化する患者集団に対応するための新たな生殖補助医療の選択肢を提供し、研究の観点からは、現在および将来の生殖補助医療を評価するための究極の対照として、体内受精胚の使用の可能性について考えさせる。また体内受精胚と体外受精胚の違いを明らかにすることで、ヒトの発生学に新たな科学的洞察を与えると考えられる。