

—総説—

特集：PGT-A の是非

着床前胚染色体異数性検査の有効性 —診断の解像度および感度，特異度が胚移植結果に及ぼす影響— Influence of the diagnostic resolution, sensitivity, and specificity of the preimplantation genetic test for aneuploidy on reproductive outcomes

青山 直樹*・加藤 恵一

Naoki Aoyama* and Keiichi Kato

加藤レディースクリニック 〒160-0023 新宿区

Kato Ladies Clinic, 7-20-3 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023, Japan

要旨：PGT-Aの臨床試験の結果においては有用性を示す報告が多い一方で，対照群との間に有意差が得られない報告も散見される．本邦でも日本産科婦人科学会主導臨床研究が開始され，当院では移植当たり80%の生児獲得率が得られた．PGT-Aに反対の研究者は，胚盤胞のモザイク率が高いことにより診断感度の低下を誘導するとしているが，著者らの胚盤胞モデルでは，診断感度が90%の場合生児獲得率は64%と算出され当院で得られた結果とは乖離しているため，著者らは実際の臨床現場では高感度，高解像度の診断が実施されていると考える．それにもかかわらず，移植当たりの成績が改善されない場合は生検による胚へのダメージが疑われる．PGT-Aは，移植当たりの成績向上，流産率低下のメリットばかりでなく，デメリットとして生検の影響および低特異度による累積生児獲得率低下が予想されるため，受診前に自己意思決定できるような情報提供を行うことが重要である．
キーワード：PGT-A，診断感度，特異度，胚盤胞生検，的中率

Abstract: The majority of articles assessing the strategy of performing a preimplantation genetic test for aneuploidy (PGT-A) together with morphological assessment of embryos have reported a higher clinical pregnancy or live birth rate per embryo. However, several studies have demonstrated a lack of efficacy in improving reproductive outcomes. Some researchers state that high rates of mosaicism decrease the diagnostic sensitivity of PGT-A and consequently diminish the reproductive outcome. However, we achieved live birth rates per transfer of 80% in a clinical study of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. From this result, we consider that PGT-A had a sensitivity of 97%, a result which was calculated using our hypothetical blastocyst model. Damage to the blastocyst caused by a trophectoderm (TE) biopsy may interfere with normal implantation, resulting in poor reproductive outcomes. Hence, skillful TE biopsy is important for successful PGT-A outcomes. We consider that PGT-A confers benefits such as improved clinical pregnancy and live birth rates per embryo transfer. However, underdeveloped biopsy techniques and low diagnostic specificity can reduce the chances of delivery. Finally, the decision-making process should involve couples who are considering the use of this technique.

Key words: Preimplantation genetic test for aneuploidy (PGT-A), Diagnostic sensitivity, Specificity, Blastocyst biopsy, Success rate

(受付 2020年8月31日／受理 2020年9月29日)

別刷請求先：〒160-0023 東京都新宿区西新宿7-20-3

ウエストゲート新宿ビル

加藤レディースクリニック

*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: n-aoyama@towako-kato.com

緒 言

ヒトを対象とした体外受精において初めて生児が得られた当時は，現在に比べれば効率が悪く，Lopataは移植当たりの妊娠率は10.7% (6/56)，生児獲得率は5.4% (3/56)と報告した¹⁾．1970年代には，流産絨毛染色体分析技術も既

に確立され、流産の主因が染色体異常であることが判明しており、当時のIVFの成功率の低さの一因として胚の染色体異常が既に指摘されていた。注目すべき点として、ヒトへのIVF臨床応用開始の10年も前にEdwardsは胚の染色体異常へのスクリーニング法に関する構想を始めていたということである²⁾。しかしながら、生検方法、分析技術が成熟するまでには時間がかかり、初めてのヒト胚を用いた着床前診断 (Preimplantation Genetic Diagnosis: PGD) がHandysideらにより実施されるまでにそれから20年を要した³⁾。世界初のPGDの手法としてはY染色体の有無を評価し、伴性劣性遺伝性疾患保因者夫婦に対し雌性胚を選別するだけであり、スクリーニングの目的ではなかったが、ヒトにおいて分割期の胚から1割球を生検しても生児が得られることを証明したことは画期的な研究成果であった。一方当時、染色体数の評価方法としては細胞遺伝学的な染色体検査のみであったが、初期胚において生検された細胞1-2個に対し染色体標本作製することは効率が悪く、まずは間期核の標本に対し1-2種類のDNAプローブにてコピー数を確認する手法により性判定を目的とした診断が実施された^{4,5)}。その後、すぐに一度目の技術革新が起こり、PGDは急速な進歩を遂げることになる。1993年にBAC (Bacterial Artificial Clone) プローブに直接蛍光標識をラベルする技術が完成し⁶⁾、多数の蛍光標識も商品化され、一度に5種類ほどの染色体コピー数を評価できるようになったことである⁷⁾。IVF成績向上、流産率低下を目的としたFISH (Fluorescence In Situ Hybridization) プローブを用いた複数の染色体数評価による胚選別方法 (Preimplantation Genetic Screening : PGS) は当時大きな期待が持たれた一方で、その後ランダム化比較試験 (RCT) を含め多くの臨床研究が実施された結果、臨床的有用性が認められず⁸⁻¹⁶⁾、ASRM¹⁷⁾、ESHRE¹⁸⁾からも本法の有効性にかかわるエビデンスがないというコメントが発表され、この第1世代のPGSは終焉を迎えた。このような結果となった理由としては、染色体の検索範囲が狭かったこと (多くても10種類程度しか解析できないこと)、診断の解像度が低かったこと (1本の染色体を1個のプローブのみで評価すること)、初期胚ではモザイク性が高いが、それを的確に診断できないことなどが挙げられた。

その後、すぐに第2世代PGSは着床前胚染色体異数性検査 (Preimplantation Genetic Test for Aneuploidy) として名称も変更し、二度目の技術革新となる網羅的遺伝子診断技術の発展とともに始動した。定量PCR法^{19, 20)} (quantitative polymerase chain reaction)、BAC^{21, 22)}、染色体^{23, 24)} およびSNP (Single Nucleotide Polymorphism)^{25, 26)} アレイを用いたCGH法 (array comparative genomic hybridization)、次世代シーケンサー法^{27, 28)} (Next generation sequencing) のバリデーション結果は全て感度、特異度ともに95%を超える好成績を示したことから、少数の細胞からのCCS (Comprehensive Chromosomal Screening) 技術が臨床応用に対応できる程度に成熟したことを裏付けた。第1世代では、5-10程度のBACクローンのコピー数変化を観察するの

みであり、これまで実現できなかった網羅的診断が可能となり、2010年頃から臨床試験も盛んに実施されるようになった。論文の結果を参照しただけでも汲み取れるが、決して平坦な道のりではなかったようである。臨床データが蓄積されるに従い診断に用いる試料 (極体、割球、栄養外胚葉Trophectoderm: TE) と、プラットフォームのマッチングおよびそれが診断の正確性に与える影響が少しずつ明らかになっていった。第一世代PGSでは分割期の割球1個に対しFISHで解析したが、CCSでは全ゲノム増幅が必要であり、その鋳型となるDNA試料は1細胞では不十分であり、成績を安定させるためには5-10細胞が必要であることが判明し、単一割球よりも次第にTE生検が主流となっていった。また、極体では4.5²⁹⁾-8.2%³⁰⁾においてDNA増幅不良が認められたこと、さらに雄性因子だけでなく受精以降に発生するモザイクなども評価できないため極体を用いた手法としては衰退した。その他として凍結技術の普及も検査方法に大きく影響を与えた。着床前診断において2010年当初は新鮮胚移植が多く行われ、短時間で診断結果の得られるqPCR、aCGH (24 Sure) などが用いられたが、ESHRE PGD Consortiumがまとめる胚生検ガイドライン³¹⁾にも凍結技術の有用性が加えられたことで急速診断を行う意味がなくなってきたこと、さらにqPCR、aCGHは解像度が低くモザイクが判定できないことも加わり衰退していった。最終的に現在では、胚盤胞期にTE生検実施後すぐに凍結保存し、SNPアレイまたはNGSを用いて解析を実施するプロトコルが一般的となった。RCTを含めた比較試験が行われ^{29, 32-41)}、有効性が示されている一方で、条件によっては必ずしも有効性が示されない報告⁴²⁻⁴⁶⁾もあり、これが一番の問題点と考えている。これら臨床試験の結果から、有効性を結論付けるメタ分析2報^{47, 48)}、システマティックレビュー1報⁴⁹⁾とは対照的に否定的な結論を導いたシステマティックレビュー1報⁵⁰⁾もあり結論が一致していない (表1, 2)。現在でもPGT-Aの臨床的有効性に関しては研究者によって賛否が分かれた状態であり、主な論点は胚のモザイク性が診断に与える影響でありモザイクの発生率はどの程度なのか?さらには現在の診断技術でモザイク胚の生物学的なポテンシャルを見極める診断精度は得られるのか?が争点となっており、賛成派、反対派の研究者の間で意見が二分されたままである⁵¹⁾。

本邦におけるPGT-A臨床研究はようやく日本産科婦人科学会特別臨床研究パイロット試験 (UMIN000026104) が終了し⁵²⁾、第II相臨床試験が始まったばかりである。パイロット試験における当院単独の成績ではすべての患者合計33人 (平均38.7歳) のうち、正倍数性胚が得られた20人における移植当たりの妊娠率は85% (17/20)、生児獲得率が80% (16/20) であり (第37回日本受精着床学会学術講演会:2020年発表、加藤恵一)、さらにそれに続く2回目の臨床試験でも同様の成績が得られているため、当院としては現状ではPGT-Aの有効性をポジティブに捉えている。一方で、著者らは診断プラットフォームに対する詳細なバリデーション

表1 PGT-Aにより有効性が得られた報告

著者	研究デザイン	生検胚	診断デバイス	患者背景	母体年齢	主な評価項目	PGS群結果	対照群 (Non-PGS) 結果	統計学的有意差 <i>P</i> 値
Sher 2009	PCS	分割期割球	mCGH	AMA/RIF/ RPL	PGS 37.6; 対照群 (凍結) 36.1; (新鮮) 36.4	妊娠率	64%	凍結群 37% 新鮮胚 41%	<0.05
						流産率	4%	凍結群 8% 新鮮胚 12%	<0.03
						生産率	60%	凍結群 33% 新鮮胚 36%	<0.05
Schoolcraft 2010	PCS	胚盤胞	mCGH	IVF 不成功	PGS 37.7; 対照群 37.1	妊娠継続率 着床率 (IR)	68.9% 72.2%	44.8% 46.5%	<0.01 <0.01
Forman 2012	RCS	胚盤胞	qPCR		PGS 37.3; 対照群 34.2	継続率 (>12wk) 流産率	55.0% 10.5%	41.8% 24.8%	<0.01 <0.01
Yang 2012	RCT	胚盤胞	aCGH	1回目IVF 周期	PGS 31.2; 対照群 31.5	妊娠率	70.9%	45.8%	<0.05
						継続率 (>20wk)	69.1%	41.7%	<0.01
Keltz 2013	RCC	分割期割球	aCGH	AMA/RIF/ RPL	PGS 37.3; 対照群 35.4	妊娠率	52.6%	19.2%	<0.01
						臨床妊娠率	69.2%	43.9%	<0.01
						妊娠継続率	61.5%	32.5%	<0.01
						多胎率 流産率	8.3% 11.1%	34.4% 26.0%	<0.01 <0.01
Scott 2013	RCT	胚盤胞	qPCR	卵巣予備能正 常/1周期以上 の治療不成功	PGS 32.2; 対照群 32.4	妊娠率	66.4%	47.9%	<0.05
						生産率	84.7%	67.5%	<0.05
Greco 2014	PCS	胚盤胞	aCGH	RIF	PGS/RIF 32.8; PGS/非RIF 31.7; 対照群/RIF 31.5	妊娠率 (IR)	RIF: 68.3% 非RIF: 70.5%	22.0%	<0.01
						臨床妊娠率	RIF: 68% 非RIF: 70.5%	21.2%	<0.01
Lee 2015	RCS	胚盤胞	aCGH	AMA	PGS 41.2; 対照群 41.3	妊娠率 (IR)	PGS/凍結群: 50.9%	凍結群 25.4% 新鮮群 23.8%	<0.01
						生児獲得率 (移植当たり)	45.5%	凍結群 19.0% 新鮮群 15.8%	<0.01
						流産率	11.1%	38.1%	-
						生児獲得率 (全患 者当り: 移植でき ない患者を含む)	14.1%	17.3%	-
Feichtinger 2015	RCS	極体	aCGH	RIF/AMA	PGS 39.5; 対照群 38.4	生産率 (移植当たり)	26.4%	14.9%	<0.05
						生産率 (移植患者当たり)	35.7%	22.7%	<0.05
						生児獲得率 (全患 者当り: 移植でき ない患者を含む)	22.5%	21.7%	-
Lukaszuk 2015	PCS	分割期割球	NGS		PGS 34.0; 対照群 34.4	臨床妊娠率 流産率	84.4% 2.8%	41.5% 4.6%	<0.01 -
Gorodeckaja 2019	CR	胚盤胞	NGS		詳細不明	妊娠率 (IR)	80.0% 詳細不明	35.0%	

aCGH: array comparative genomic hybridization; aOR: adjusted odds ratio; AMA: advanced maternal age; DET: double-embryo transfer; IR: implantation rate; mCGH: metaphase comparative genomic hybridization; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; PCS: prospective cohort study; PR: pregnancy rate; RCC: retrospective case-control; RCS: retrospective cohort study; RCT: randomized controlled trial; RIF: repeated implantation failure; RPL: recurrent pregnancy loss; SET: single-embryo transfer.

データを持ちあわせていないために最終的な結論はできないが、本稿ではPGT-Aの有効性に大きな影響を与える因子として、I現状での診断プラットフォームの感度および特異度、II診断の解像度とモザイクの検出能力、およびIII有効性

を示す報告と示さない報告の違いは何か？この3因子に焦点をあてPGT-Aによる臨床成績向上の可能性を解説したい。

表2 PGT-Aによる有効性が場合により示すことのできなかった報告

著者	研究デザイン	生検胚	診断デバイス	患者背景	母体年齢	主な評価項目	PGS群結果	対照群(Non-PGS)結果	統計学的有意差P値
Forman 2013	RCT	胚盤胞	qPCR	卵巣予備能正常/1周期以上の治療不成功	PGS 35.1; 対照群 34.5	妊娠率 継続率 (>24wk) 多胎率	69.0% 60.7% 0.0%	81.0% 65.1% 53.4%	- - 多胎率のみ改善できた
Kang 2016	RCS	胚盤胞	aCGH	PGS IVF 受診歴平均 1.81回 流産平均回数 0.95; 対照群 IVF 0.71回 流産 0.28回	≤ 37 > 37 ≤ 37 > 37 ≤ 37 > 37	妊娠率 妊娠率 流産率 流産率 生児獲得率 生児獲得率	SET 54.8% DET 62.0% SET 62.2% DET 86.7% SET 4.8% DET 0.0% SET 4.4% DET 6.7% SET 50.0% DET 62.0% SET 57.8% DET 80.0%	SET 52.8% DET 64.7% SET 37.0% DET 51.3% SET 5.6% DET 4.8% SET 18.5% DET 8.5% SET 47.0% DET 59.9% SET 18.5% DET 42.9%	- - <0.05 <0.01 - - - - - - - <0.01 <0.01
Kushnir 2016	RCS (全米の集計データ)				< 35 35-37 > 37 全年齢 < 35 35-37 > 37 全年齢	流産率 生児獲得率/周期	12.9% 10.7% 16.8% 13.7% 33.7% 32.2% 17.7% 25.2%	10.5% 14.0% 26.0% 13.9% 39.8% 29.5% 12.7% 28.8%	- - <0.0001 - <0.0001 <0.05 <0.0001 <0.0001
Chang 2016	RCS (全米の集計データ)				< 35 35-37 > 37 < 35 35-37 > 37 < 35 35-37 > 37	臨床妊娠率 生児獲得 流産率	51.5% 50.3% 40.6% 43.5% 44.0% 33.3% 12.9% 10.7% 16.8%	60.2% 54.1% 42.5% 52.8% 45.4% 30.4% 10.5% 14.4% 26.0%	*aOR 0.82 1.01 1.18 0.82 1.13 1.43 1.09 0.62 0.55
*aOR: PGS周期の対照群に対する adjusted odds ratio									
Munne 2019	RCT	胚盤胞	NGS		< 35 35-40 < 35 35-40	継続妊娠率 流産率	49.3% 50.8% 11.2% 8.2%	53.0% 37.2% 8.3% 11.0%	0.5757 0.0349 - -

aCGH: array comparative genomic hybridization; aOR: adjusted odds ratio; AMA: advanced maternal age; DET: double-embryo transfer; IR: implantation rate; mCGH: metaphase comparative genomic hybridization; qPCR: quantitative polymerase chain reaction; PCS: prospective cohort study; PR: pregnancy rate; RCC: retrospective case-control; RCS: retrospective cohort study; RCT: randomized controlled trial; RIF: repeated implantation failure; RPL: recurrent pregnancy loss; SET: single-embryo transfer.

1. 現状での診断プラットフォームの 感度および特異度

診断の感度、特異度はPGT-Aの成績に直接影響を与える重要な因子である。一方で、モザイク胚の発生頻度も正診率に影響を与えるが、もしも100%の診断感度、特異度が得られたとしても、胚のモザイク性は独立して偽陰性、偽陽性を発生し妊娠率の低下、流産率上昇の原因となるため別に考

察する必要がある、本章では診断プラットフォームの感度および特異度のみに焦点をあてて解説する。

① PGT-A賛成派が想定する近年のプラットフォームの高感度および高特異度

近年のバリデーションの報告では、FiorentinoらはTE生検で得られた試料をSurePlexを用いて全ゲノム増幅後にaCGH (24sure V3 microarrays (Illumina, Inc., San Diego,

CA, USA))とNGS (VeriSeq PGS workflow (Illumina, Inc.))のプラットフォームで比較したところ、NGSでのパフォーマンスは感度100.0%、特異度99.98%であり^{28, 53)}、さらにKungらも同様にSurePlexを用いて全ゲノム増幅後にNGS (Low genome coverage : 0.01x)でのパフォーマンスは感度100%、特異度100%としている⁵⁴⁾。さらに、NIPT (母体血を用いた出生前遺伝学的検査)の分野において低coverage NGSプラットフォーム (coverage 0.08-0.3x)を用いた報告でも、染色体当たり感度99.4%、特異度99.9%が得られており⁵⁵⁻⁵⁸⁾、これらの結果を参照する限りでは近年のNGSにおけるプラットフォームにおいては高感度、高特異度の診断が期待できる

② PGT-A 反対派が想定する診断の低感度および低特異度

Gleicherらは自験例においてPGT-Aにおいて陽性となった胚11個に対し、他施設又はプラットフォームを変更して再解析を行った。同じ陽性結果が得られたのは僅か18.2% (2/11)であり、一方で36.4% (4/11)が正倍数性を示した。さらにPGT-A診断にてモノソミーを示した胚8個を移植したところ、正常核型の妊娠が5例得られたことを報告した⁵⁹⁾。また、Paulsonは、独自の胚モデルを用いて妊娠率66.7%であった場合の診断の予想感度は90%、特異度は80%と算出し、現在のPGT-Aの手法では高感度、低特異度の傾向がありデメリットが大きいことを報告した⁶⁰⁾。

③ 診断プラットフォームの感度および特異度はどの程度得られると解釈できるのか？

PGT-Aの感度、特異度には報告により大きな差があるのが現状であり、著者らは直接バリデーション試験を実施していないのでどの報告が正しいかは判断ができないが、実感として、近年では高い感度、特異度がコマーシャルベースで提供されていると考えている。日本産科婦人科学会特別臨床研究パイロット試験における当院で得られた移植当たり85%の妊娠率を達成するには95%以上の感度が必要と考えているからである (第III章参照)。Gleicherらの報告の解釈としてはモザイクの影響も考えられるが、一つ目の指摘として、試料に単一割球が用いられていたことが挙げられる。論文中では詳細は不明だが、分割期胚の割球1個の診断では割球のモザイク性や、細胞周期が全ゲノム増幅に大きく影響を与える一方で、近年での5-10個程度のTE細胞の試料では均一な結果が得られると考えている。二つ目に全ゲノム増幅の方法として、現在ではLinker Adapter法を基にしたPicoPlex/SurePlex (Illumina, Inc.)が主流となっているが、Gleicherらの報告ではそれよりも古い増幅法でのMultiple Displacement Amplification法をもとにしたRepli-Gを用いていることが推測される。MDA法は、増幅後のDNA回収量が多い割には遺伝子領域により増幅しにくい領域、増幅しやすい領域のばらつきが大きく、その結果、低感度、低特異度を誘導したものと考えている。

II. 診断精度とモザイクの検出能力

理想的な増幅方法および診断プラットフォームを応用しても、胚のモザイク性が高ければ偽陰性、偽陽性が多発しPGT-Aの臨床効果を低下させるため、現状での論点の中心はモザイク胚を検出できるかどうか？に集まってきている。

① 胚盤胞におけるモザイク発生率の分布

胚盤胞がどのくらいの頻度でモザイク性の染色体異常に罹患しているかに関する報告は、2-10%レベル⁶¹⁻⁶⁴⁾、20%レベル^{25, 65, 66)}、30%レベル^{67, 68)}、40%レベル^{69, 70)}、とされていくバリエーションが大きい。この差は、NGS, SNPアレイ, FISHなどによる診断プラットフォームの解像度にも依存しており、一概にどの報告が真実を示しているのかという結論を導くことはできないと考える。つまり、20%程度の低頻度モザイクを検出できるような解像度のプラットフォームを用いれば結果としてモザイクの検出率は高くなるが、50%レベルのモザイクしか検出できない解像度であれば胚盤胞あたりのモザイク検出率は低くなるということである。NGSを用いた一般的なプロトコールでは、ヒト全ゲノム30塩基対のうち選ばれた100万-400万塩基対領域のコピー数の増減を評価しており、カバー率として0.03-0.1%程度あれば栄養外胚葉に潜在する20%レベルのモザイクが検出できるようである⁶⁵⁾。一方で、現状において移植あたりの成績が向上しないのであれば診断解像度を10倍、100倍に上げ、1000万-1億レベルでの塩基対を読み取れば、10%以下の低頻度のモザイクの検出が可能となり、さらに正診率も10倍、100倍向上するのか？という問いに対する答えはNoである。高解像度の診断は、染色体異常の検出に対しては高感度である一方で、TEの診断においてモザイク結果を示す胚のなかでの生物学的ポテンシャルは区別できない。PGT-Aにおいて、モザイク結果の胚を全て移植対象から除外すれば見かけ上移植あたりの妊娠率、生児獲得率は向上する。しかしながら、モザイク胚のなかには生児となる可能性のある胚が一定数見込まれ、つまりそれらを全て排除するということは本来生まれてくる運命を持った胚の出生の機会を奪うことになり、それにより診断の底特異度化を誘発する。診断の精度は感度と特異度のバランスが重要であり、特にPGT-Aの場合は、着床前の胚がもつ独特のモザイク性により、高感度、高特異度の両立が難しく、今後の課題といえる。また、コストに見合った結果が得られるか？という点も重要な因子であり、解像度を10倍、100倍に上げれば診断コストも10倍、100倍となる。現状では、胚盤胞1個の診断コストは5-10万円のようなものであるが、これ以上の高額な診断を患者は望んではいない。このような状況から、カバー率0.03-0.1%程度のNGSもしくは6万領域程度のSNPアレイなどのプラットフォームがPGT-Aの診断解像度として妥当であると考えられる。

②モザイクの分類と胚移植後の成績に与える影響

近年の胚盤胞のモザイク性に関する報告では、TEとICMを分離して解析しており、Popovicらは廃棄胚盤胞をTE3か所、ICM1か所でNGSを用いて解析し、モザイクの発生率は44%、ICMとTEの一致率は62.1%しかなかったとしている⁷⁰⁾。著者らが注目していることは、TE生検の分析結果の正診率（胚盤胞のモザイク性からどの程度正診率が低下するか？）と、モザイク胚の生物学的なポテンシャルである（表3:Popovicらの表を改変:モザイクタイプを5分類した）。PGT-Aの結果において、異数性、もしくはモザイクの診断が出た場合に全て移植対象から除外すれば、少なくともモザイクタイプIV、Vは判別が可能であり、生児となる可能性が殆どないモザイクタイプIIに関しては、10–16.7%の確率でPGT-Aにおいて偽陰性を示す可能性があるものの、胚盤胞

全体からみれば発生率は11.8–20.8%であるため影響は大きくはないかもしれない。また、モザイクタイプIIIはタイプIIと同様に偽陰性となるが、発生率自体が低いことが予想される。モザイクタイプIは、最も分布が多いモザイクであり20.6–25%程の分布が見込まれ、38.1–54.2%の確率でPGT-Aにおいて正倍数性を示す一方で、ICMは正常であり、生物学的なポテンシャルが比較的高いことが見込まれ、生児獲得の可能性も十分にあると考えられる。正倍数性胚が全て生児にはならないかもしれないこと、特にモザイクタイプIの生物学的ポテンシャルがどの程度なのかは想像の領域を脱することができないが、モザイク胚は30–40%程度存在するかもしれないが、全てが診断不能という訳ではないと考えている。

表3 胚盤胞のモザイク性が診断に与える影響

		廃棄胚の分析: 34個 (PGT-A (-))			廃棄胚の分析: 24個 (PGT-A 施行後廃棄)			胚盤胞の 生物学的 ポテンシャル	偽陰性 発生リスク	偽陽性 発生リスク
ICM/TE の評価		胚の評価 /胚盤胞個数 (%)	TE1-TE3の評価 /分析回数		胚の評価 /胚盤胞個数 (%)	TE1-TE4の評価 (PGT-A 結果含) /分析回数				
	正倍数性 /正倍数性	正倍数性 14 (41.2)	正倍数性	90.5% (38/42)	正倍数性	-		高	理論上は 発生しない	累積生児 獲得率低下 させる主因
			異数性	0% (0/42)						
			モザイク	0% (0/42)						
			N/I	9.5% (4/42)						
	異数性 /異数性 (非モザイク)	異数性 5 (14.7)	正倍数性	0% (0/15)	異数性	正倍数性	0% (0/32)	低 単一トリソ ミーは流産/ 患児出産に 帰結する場 合がある	診断を高感 度化するこ とにより最 少化できる	理論上は 発生しない
			異数性	86.7% (13/15)	8 (33.3)	異数性	96.9% (31/32)			
			モザイク	0% (0/15)		モザイク	0% (0/32)			
			N/I	13.3% (2/15)		N/I	3.1% (1/32)			
	I 正倍数性 /モザイク	モザイク I 7 (20.6)	正倍数性	38.1% (8/21)	モザイク I 6 (25.0)	正倍数性	54.2% (13/24)	中 生児となる可 能性がある が、正倍数性 胚よりは劣る	診断を高感 度化しても 偽陰性を 発生させる	生児獲得率 を低下させ る可能性有
			異数性	4.8% (1/21)		異数性	0% (0/24)			
			モザイク	52.4% (11/21)		モザイク	33.3% (8/24)			
			N/I	4.8% (1/21)		N/I	12.5% (3/24)			
	II モザイク /モザイク	モザイク II 4 (11.8)	正倍数性	16.7% (2/12)	モザイク II 5 (20.8)	正倍数性	10.0% (2/20)	低 生児となる可 能性は殆ど ない	高解像度、 高感度化に より最少化 できる	偽陽性が 増加しても 成績には 影響しない
			異数性	8.3% (1/12)		異数性	10.0% (2/20)			
			モザイク	66.7% (8/12)		モザイク	70.0% (14/20)			
			N/I	8.3% (1/12)		N/I	10.0% (2/20)			
	III モザイク /正倍数性	モザイク III 1 (2.9)	正倍数性	100% (3/3)	モザイク III 0 (0)	-		低 生児となる可 能性は殆ど ない	偽陰性は不 可避だが、も とも発生率 が低いので 影響は少な いと考える	偽陽性が 増加しても 成績には 影響しない
			異数性	0% (0/3)						
			モザイク	0% (0/3)						
			N/I	0% (0/3)						
	IV 異数性 /モザイク	モザイク IV 1 (2.9)	正倍数性	0% (0/3)	モザイク IV 5 (20.8)	正倍数性	0% (0/20)	低 生児となる 可能性は 殆どない	高解像度、 高感度化に より最少化 できる	理論上は 発生しない
			異数性	33.3% (1/3)		異数性	60.0% (12/20)			
			モザイク	66.6% (2/3)		モザイク	30.0% (6/20)			
			N/I	0% (0/3)		N/I	10.0% (2/20)			
	V 異数性 /異数性 (異なる異数性)	モザイク V 2 (5.9)	正倍数性	0% (0/6)	モザイク V 0 (0)	-		低 生児となる 可能性は 殆どない	診断を高感 度化するこ とにより最 少化できる	理論上は 発生しない
			異数性	100% (6/6)						
			モザイク	0% (0/6)						
			N/I	0% (0/6)						

Popovic ら 2018, Hum Reprod. Table I ~ IV を改変. N/I : not informative.

III. 有効性を示す報告と示さない報告の違いは何か？

①陰性的中率と移植当たりの成績

PGT-Aの有効性評価は、移植当たりの妊娠率、生児獲得率、流産率などで評価されることが多い。移植当たりの生児獲得率は、出生児数を胚移植数すなわち真の陰性胚数および偽陰性胚数の合計で除した値であるが、偽陰性胚数が増加すれば分母が増大することにより生児獲得率の値は減少することになり、すなわち診断感度の影響を強く受ける。偽陰性と真の陰性の比率は陰性的中率で評価され、グループの罹患率により影響が変化する(図1)⁷¹⁾。例えば、胚盤胞の染色体異常罹患率が35%(若齢患者を想定)、45%(35-37歳)、および75%(高齢患者)のグループがあった場合において、感度97%、特異度80%の診断を実施した場合の陰性的中率は98.0、97.0、および89.9%と算出され、若齢患者では高齢患者よりも移植当たりの成績においては、陰性的中率が高く有利であることが推測できる(図1)。一方で、MurphyらはPGT-Aの移植当たりの生児獲得率に関して、高齢患者では62.1%、若齢患者では45%程度(詳細不明)と報告している⁷²⁾。この結果の解釈としては、若齢患者において移植当たり生児獲得率が低下しており、その原因は診断感度以外の要因により低下したと考える方が妥当であると考えている。その解釈としては、検体は一律の感度のもとで診断が行われると考えられ、若齢群のみ偽陰性が多発したとは考えにくいことが挙げられる。このような場合における生児獲得率低下の原因は、生検手技などの人為的因子の影響が疑われる。それでは若齢患者の方がPGT-Aのメリットが大きいのか？ということに関しては、陽性的中率は若齢患者の方が低いために(図1)、偽陽性として廃棄される正常胚が多くなるというリスクが予想され、どちらの患者群においてもメリットとデメリットが発生する。

②生検の重要性：生検が移植当たりの生児獲得率に与える影響

前述のように、移植可能胚数は真の陰性胚数と偽陰性胚数の合計からなるが、真の陰性胚には正倍数性を示すにもかかわらず、生児とならない(妊娠(-)または流産)胚が含まれ、さらに本来であれば生児となっていた運命をもつ高い生物学的ポテンシャルをもった胚が生検の影響によりダメージを受け生児に到達できなかった胚も含まれる(図2)。例えば胚盤胞100個のうち罹患率が75%であるその母集団に対し、感度97%、特異度80%の診断を行った場合、真の陰性20個と偽陰性2個が移植可能胚となる。正倍数性を示したにもかかわらず低ポテンシャル、もしくは生検によるダメージで低ポテンシャルとなった胚数の合計(α)が4個であれば、移植当たりの生児獲得率は81.8%と算出される(表4)。日本産科婦人科学会主導のパイロット試験において、当院では移植当たりの生児獲得率が80%であったことから、 α は100個中4個程度であり、生検による胚へのダメージは最小限に抑えられていたと推測している。一方で、 α が10個の場合予想される生児獲得率は54.5%となるため、移植当たりの生児獲得率が50%レベルの報告では生検が胚に与える影響が大きかったのかもしれないと考えている。

③感度および特異度の推測

現状では感度と特異度のバリデーション結果においてPGT-A賛成派と反対派の間での結果やその解釈に相違があり、さらにモザイクによる正診率低下を含めた感度および特異度の実質上の数値は推測の域を脱することができない。Paulsonは独自の胚モデルを用いて感度90%、特異度80%であれば理論上の移植当たりの妊娠率66.7%が得られるとしている⁶⁰⁾。当院のモデルにおいて移植当たりの生児獲得率81.8%と算出された同じ条件下において感度のみを90%

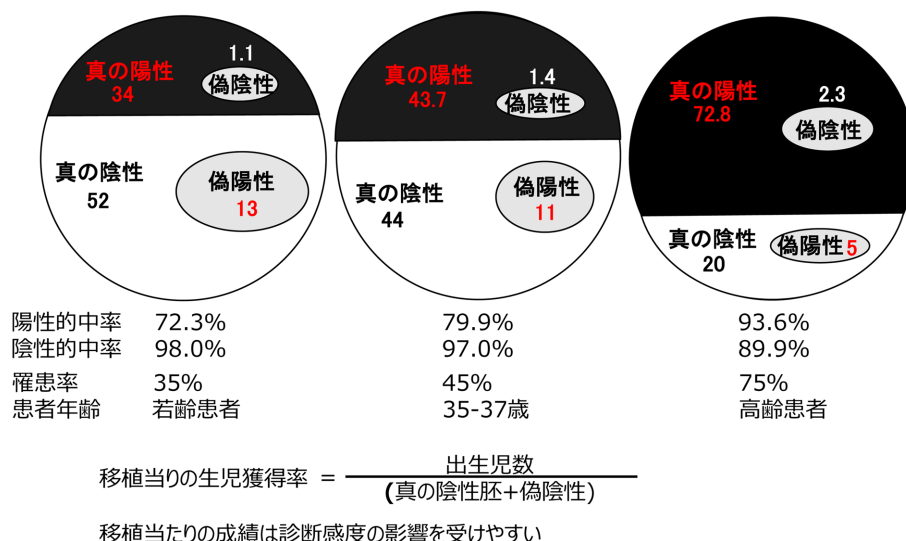


図1 胚盤胞罹患率の違いにより生じる的中率の変化：高感度97%/低特異度80%の診断の場合

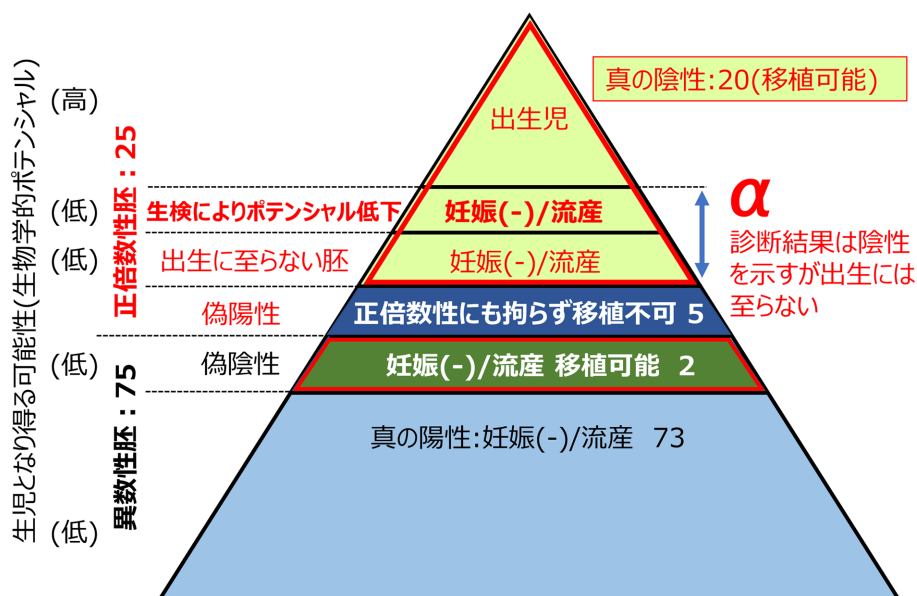


図2 高齢患者胚盤胞モデル(罹患率75%)における生検が胚に及ぼす影響の予測：感度97%/特異度80%の診断

表4 胚への生検のダメージが移植当たりの生児獲得率に及ぼす影響

高齢患者胚盤胞モデル：感度97% / 特異度80%の診断								
真の陰性	20	20	20	20	20	20	20	20
偽陰性	2	2	2	2	2	2	2	2
移植可能胚	22	22	22	22	22	22	22	22
α：生児になれなかった胚数	2	4	6	8	10	12	14	16
出生児数	20	18	16	14	12	10	8	6
移植当たりの生児獲得率	90.9%	81.8%	72.7%	63.6%	54.5%	45.5%	36.4%	27.3%
高齢患者胚盤胞モデル：感度90% / 特異度80%の診断								
真の陰性	20	20	20	20	20	20	20	20
偽陰性	8	8	8	8	8	8	8	8
移植可能胚	28	28	28	28	28	28	28	28
α：生児になれなかった胚数	2	4	6	8	10	12	14	16
出生児数	20	18	16	14	12	10	8	6
移植当たりの生児獲得率	71.4%	64.3%	57.1%	50.0%	42.9%	35.7%	28.6%	21.4%

α：正倍数性を示すが生児にならない生物学的にポテンシャルの低い胚数と生児となる運命をもっていたにも拘らず妊娠(-)/流産となった胚数の合計 (図2参照)。

に低下させた場合、予想される生児獲得率は64.3%と算出され (表4)、実際に得られた当院での生児獲得率80.0%とは乖離があるため、著者らは高感度の診断が実施されていると判断している。

今後の課題

①ランダム化比較試験 (RCT) の必要性

PGT-Aに対し反対の立場である研究者は、世界的にもなし崩しに行われているPGT-Aの現状に対しRCTの必要性を主張している⁷³⁾。胚盤胞のモザイク性の問題が障壁とな

り、正確な診断バリデーションを行うのが困難である一方で、臨床試験による評価が必須であることは理解できるが、実際にRCTを実施する場合には多くの問題点が予想され、診断の費用 (患者自己負担、学術団体、実施施設、企業等の選択肢がある)、遺伝カウンセリングに必要な人材 (後方視的な症例対照試験と比較し大きな負担が予想される)、治験参加者人数確保のために発生する問題点 (一施設で対応できる患者数には限度があるため多施設研究が予想されるが、施設間での技術差が問題となる) 等への対応が求められる。実際にMunneらはRCTを実施した結果、若齢患者群での妊

娠継続率はPGT-A実施群で49.3%, 対照群で53%と報告し、有意な差が得られていない。34施設が参加した研究のようであるが、実際にはモザイクを含めた異数性の発生率は、ラボごとに大きく異なり、継続妊娠率も30–60%と施設により大きな差があると報告した⁴⁴⁾。診断施設は同一であるため、診断感度の差はないと考えられ、これだけの大きなレンジでの継続妊娠率の変動の主因は生検の影響によるものと推察している。また一方で、IVF全般の技術を含めた違いもあるのかもしれない。PGT-Aに必要な技術として凍結融解胚盤胞の単一胚移植の結果を図3に示した(日本生殖医学会ART登録データブック<http://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/> 2017より抜粋)。当院と全国施設のデータを比較したが、当院のデータでは、胚盤胞当たりの生児の生産性は他の施設と41歳までは10%以上の高い傾向がみられている。図2が示すところの胚盤胞100個あたりの出生児数が減少すれば、生児獲得率も同時に減少すると考えられる。

②診断感度および特異度のバリデーションの必要性

著者らは、自施設でのパイロット試験の結果から診断感度は高いことを予想している。PGT-A反対の立場の研究者の主張する低感度を示すデータは古い手法が用いられ、現在の5–10細胞のTE塊を試料としたLinker Adapter法による全ゲノム増幅した産物をNGSやSNPアレイのプラットフォームで解析する手法を用いれば高感度と高再現性の診断が実現できると予想している。また、胚のモザイク性は診断感度を低下させる主因であるとされていて、胚盤胞において30–40%の存在が予想される。一方で、Popovicらの報告では5タイプ存在するモザイクのうち全てのタイプが診断不可能ではなく、ICM正常かつTEがモザイクを示す胚盤胞の場合は診断が難しいが、ICMが異数性またはモザイク

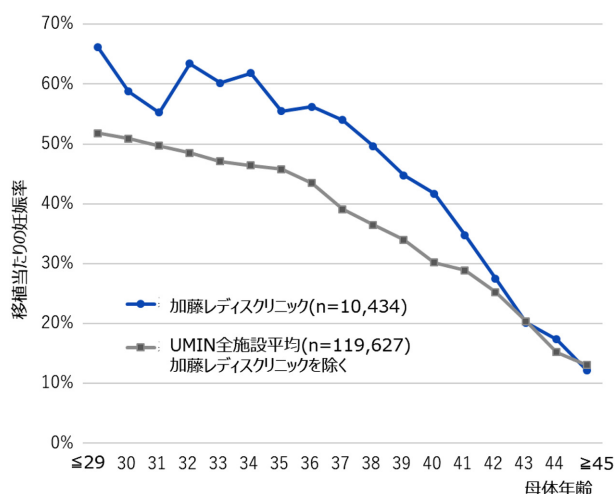


図3 凍結融解胚盤胞単一胚移植の妊娠率
加藤レディスクリニックと全国平均(当院を除く)の比較。
日本生殖医学会データブック2017より。
<http://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/>

を示す場合は、PGT-Aの結果が異数性もしくはモザイクを移植候補から除外することでほぼ選別が可能のようである⁷⁰⁾。胚のモザイク性が感度を低下させていると仮定すれば、最終的な感度が90%レベルと仮定した場合に移植当たりの妊娠率を80%レベルで達成することは理論上できないと考えている。一方で、当院での臨床試験の結果を含めLukaszuk³³⁾やGorodeckaja³²⁾らも同様の高い妊娠率を報告しているため、最終的な診断感度は高く、モザイクの影響は大きくはないと考えている。しかしながら、今後もPopovicらの方法を参考にモザイク性や感度および特異度のバリデーション評価が必要である。

③生検が胚に与えるダメージを最少限にする手技の確立

実際のところ、生検操作が胚盤胞に与えるダメージに関してはほとんど説明されていない。ScottらはTE生検後に診断を行わず胚移植を実施し、生検群と非生検群との間において妊娠継続率に差はないと報告したが、非生検群を100%とした場合の比の差は5%程度みられたようである⁷⁴⁾。さらに、この報告では35歳以下の患者を対象とし、day5の胚盤胞移植のみ用いたが、高齢患者やday6胚盤胞のポテンシャルは不明であり、流産率に関する記載もない。前述のように、著者らは診断感度は現状においてはほぼ完成し既に高感度の診断がコマーシャルベースで提供されていると解釈しているため、例えば妊娠率が50%程度しか得られなかった場合の成績悪化の主因は生検手技にあると考えている。TE生検方法は開孔および人為的孵化処理による生検方法^{39, 75)}と、非孵化処理での直接吸引方法⁶²⁾に分けられるが、どちらの方法が有効性が高いかという比較試験は行われておらず、黄金律とされる手法は確立されていない。著者らはTEをヘルニエーション処理することにより生検操作を円滑に実施できると考えているが、ラボにより最適化した生検方法を確立することが重要であると考えている⁷⁶⁾。

④培養液・胚盤胞内腔液を用いた遺伝子診断

近年、培養液や胚盤胞内腔液を用いた無侵襲、もしくは低侵襲の診断方法が検討されている。一方で欧州では否定的に捉えており、ESHRE PGT-A委員会の作成したガイドラインでは臨床レベルに用いるには改善の余地があると結論付けており⁷⁷⁾、その根拠としてPGT-AのパイオニアであるCapalboらはTE結果との一致率が低く、内腔液で72.6% (250/347)、培養液では10.3% (39/378) において結果が得られなかったとしており⁷⁸⁾、さらにRubioらも同様の否定的な報告をしている⁷⁹⁾。一方で、中国では肯定的な研究者により研究が進められており、Xieらは感度100% (33/33)、特異度80% (12/15)と報告しているが、デメリットとして判定不能率が8.3% (4/48)とTE生検によるPGT-Aよりもかなり高いことを報告し⁸⁰⁾、またJiaoらも同様の成績を示している⁸¹⁾。診断結果にノイズが多いことが多く、これらの改善にはフラグメントの除去、培養時間、培養液のドロップ量に検討が必要かもしれないことが指摘されており、現状

では高い生検技術が確立されれば侵襲的検査の方が効率的かもしれない。

結 論

PGT-Aの有効性に関しては未だ一致した見解が得られていない。高いエビデンスを得るにはRCTなどの臨床試験が望ましいが、資金やマンパワーの問題もあり実現することは難しいのが現状である。PGT-Aの効率を低下させる要因は、①胚のモザイク性が診断感度を低下させること、②プラットフォーム自体の感度および特異度の低下、③生検が胚に与える物理的影響、と考える。PGT-A反対の立場の研究者が主張するところの胚盤胞のモザイク性が高いことが診断感度を低下させている点に関しては、著者らは主因ではないと考えている。現在のPGT-Aのプラットフォームでは高感度の診断が期待され、実際に当院での日本産科婦人科学会主導臨床研究の結果だけでなく、幾つかの施設においても移植当たりの妊娠率において80%以上の成績が報告されている。著者らは、感度が90%以下であった場合、移植当たり80%以上の生児獲得率を得るのは不可能であると算出した。さらに妊娠率が60%以下を示す報告では、生検が胚に与える影響により妊娠率を低下させていると考えている。特異度に関しては80%程度とする報告もあるが、今後、廃棄胚の再解析による検討が必要である。PGT-Aはメリットだけでなく、デメリットも予想される。移植当たりの妊娠率向上や流産率の低下が期待できる一方で、特異度の低下や生検技術の未熟さにより、生児として生まれる運命をもっている胚を失うことになりかねない場合があることを患者が十分に理解したうえで、本手法を選択できるように情報提供することが重要である。

文 献

- 1) Lopata, A. (1980): Successes and failures in human in vitro fertilization. *Nature*, 288, 642–643.
- 2) Johnson, M.H. (2011): Robert Edwards: the path to IVF. *Reprod. biomed. online*, 23, 245–262.
- 3) Handyside, A.H., Kontogianni, E.H., Hardy, K. and Winston, R.M. (1990): Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*, 344, 768–770.
- 4) Delhanty, J.D., Griffin, D.K., Handyside, A.H., Harper, J., Atkinson, G.H., Pieters, M.H. and Winston, R.M. (1993): Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation, (FISH). *Hum. Mol. Genet.*, 2, 1183–1185.
- 5) Munne, S., Weier, H.U., Stein, J., Grifo, J. and Cohen, J. (1993): A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 10, 82–90.
- 6) Wiegant, J., Wiesmeijer, C.C., Hoovers, J.M., Schuurin, E., d'Azzo, A., Vrolijk, J., Tanke, H. J. and Raap, A.K. (1993): Multiple and sensitive fluorescence in situ hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet. Cell Genet.*, 63, 73–76.
- 7) Munne, S., Lee, A., Rosenwaks, Z., Grifo, J. and Cohen, J. (1993): Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.*, 8, 2185–2191.
- 8) Staessen, C., Verpoest, W., Donoso, P., Haentjens, P., Van der Elst, J., Liebaers, I. and Devroey, P. (2008): Preimplantation genetic screening does not improve delivery rate in women under the age of 36 following single-embryo transfer. *Hum. Reprod.*, 23, 2818–2825.
- 9) Twisk, M., Mastenbroek, S., Hoek, A., Heineman, M.J., van der Veen, F., Bossuyt, P.M., Repping, S. and Korevaar, J.C. (2008): No beneficial effect of preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age with a high risk for embryonic aneuploidy. *Hum. Reprod.*, 23, 2813–2817.
- 10) Mersereau, J.E., Pergament, E., Zhang, X. and Milad, M.P. (2008): Preimplantation genetic screening to improve in vitro fertilization pregnancy rates: a prospective randomized controlled trial. *Fertil. Steril.*, 90, 1287–1289.
- 11) Mastenbroek, S., Twisk, M., van Echten-Arends, J., Sikkema-Raddatz, B., Korevaar, J.C., Verhoeve, H.R., Vogel, N.E., Arts, E.G., de Vries, J.W., Bossuyt, P.M., Buys, C.H., Heineman, M.J., Repping, S. and van der Veen, F. (2007): In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N. Engl. J. Med.*, 357, 9–17.
- 12) Staessen, C., Platteau, P., Van Assche, E., Michiels, A., Tournaye, H., Camus, M., Devroey, P., Liebaers, I. and Van Steirteghem, A. (2004): Comparison of blastocyst transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Hum. Reprod.*, 19, 2849–2858.
- 13) Blockeel, C., Schutyser, V., De Vos, A., Verpoest, W., De Vos, M., Staessen, C., Haentjens, P., Van der Elst, J. and Devroey, P. (2008): Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod. Biomed. Online*, 17, 848–854.
- 14) Meyer, L.R., Klipstein, S., Hazlett, W.D., Nasta, T., Mangan, P. and Karande, V.C. (2009): A prospective randomized controlled trial of preimplantation genetic screening in the "good prognosis" patient. *Fertil. Steril.*, 91, 1731–1738.
- 15) Schoolcraft, W.B., Katz-Jaffe, M.G., Stevens, J., Rawlins, M. and Munne, S. (2009): Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil. Steril.*, 92, 157–162.
- 16) Hardarson, T., Hanson, C., Lundin, K., Hillensjo, T., Nilsson, L., Stevic, J., Reismer, E., Borg, K., Wikland, M. and Bergh, C. (2008): Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum. Reprod.*, 23, 2806–2812.

- 17) Practice Committee of Society for Assisted Reproductive, T. and Practice Committee of American Society for Reproductive, M. (2008): Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertil. Steril.*, 90, S136–143.
- 18) Harper, J., Coonen, E., De Rycke, M., Fiorentino, F., Geraedts, J., Goossens, V., Harton, G., Moutou, C., Pehlivan Budak, T., Renwick, P., Sengupta, S., Traeger-Synodinos, J. and Vesela, K. (2010): What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium Steering Committee. *Hum. Reprod.*, 25, 821–823.
- 19) Zimmerman, R.S., Jalas, C., Tao, X., Fedick, A.M., Kim, J.G., Pepe, R.J., Northrop, L.E., Scott, R. T., Jr., and Treff, N. R. (2016): Development and validation of concurrent preimplantation genetic diagnosis for single gene disorders and comprehensive chromosomal aneuploidy screening without whole genome amplification. *Fertil. Steril.*, 105, 286–294.
- 20) Treff, N.R., Tao, X., Ferry, K.M., Su, J., Taylor, D. and Scott, R.T.Jr. (2012): Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil. Steril.*, 97, 819–824.
- 21) Mertzaniidou, A., Wilton, L., Cheng, J., Spits, C., Vanneste, E., Moreau, Y., Vermeesch, J.R. and Sermon, K. (2013): Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum. Reprod.*, 28, 256–264.
- 22) Gutierrez-Mateo, C., Colls, P., Sanchez-Garcia, J., Escudero, T., Prates, R., Ketterson, K., Wells, D. and Munne, S. (2011): Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil. Steril.*, 95, 953–958.
- 23) Wells, D., Escudero, T., Levy, B., Hirschhorn, K., Delhanty, J.D. and Munne, S. (2002): First clinical application of comparative genomic hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil. Steril.*, 78, 543–549.
- 24) Wells, D. and Delhanty, J.D. (2000): Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol. Hum. Reprod.*, 6, 1055–1062.
- 25) Northrop, L.E., Treff, N.R., Levy, B. and Scott, R.T.Jr. (2010): SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol. Hum. Reprod.*, 16, 590–600.
- 26) Treff, N.R., Su, J., Tao, X., Levy, B. and Scott, R.T.Jr. (2010): Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil. Steril.*, 94, 2017–2021.
- 27) Wells, D., Kaur, K., Grifo, J., Glassner, M., Taylor, J.C., Fragouli, E. and Munne, S. (2014): Clinical utilisation of a rapid low-pass whole genome sequencing technique for the diagnosis of aneuploidy in human embryos prior to implantation. *J. Med. Genet.*, 51, 553–562.
- 28) Fiorentino, F., Biricik, A., Bono, S., Spizzichino, L., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F. and Michel, C.E. (2014): Development and validation of a next-generation sequencing-based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. *Fertil. Steril.*, 101, 1375–1382.
- 29) Feichtinger, M., Stopp, T., Gobl, C., Feichtinger, E., Vaccari, E., Madel, U., Laccone, F., Stroh-Weigert, M., Hengstschlager, M., Feichtinger, W. and Neesen, J. (2015): Increasing live birth rate by preimplantation genetic screening of pooled polar bodies using array comparative genomic hybridization. *PloS One*, 10, e0128317.
- 30) Verpoest, W., Staessen, C., Bossuyt, P.M., Goossens, V., Altarescu, G., Bonduelle, M., Devesa, M., Eldar-Geva, T., Gianaroli, L., Griesinger, G., Kakourou, G., Kokkali, G., Liebenthron, J., Magli, M.C., Parriego, M., Schmutzler, A.G., Tobler, M., van der Ven, K., Geraedts, J. and Sermon, K. (2018): Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial. *Hum. Reprod.*, 33, 1767–1776.
- 31) Harton, G.L., Magli, M.C., Lundin, K., Montag, M., Lemmen, J., Harper, J.C., European Society for Human, R. and Embryology, P. G. D. C. E. S. I. G. (2011): ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum. Reprod.*, 26, 41–46.
- 32) Gorodeckaja, J., Neumann, S., McCollin, A., Ottolini, C.S., Wang, J., Ahuja, K., Handyside, A. and Summers, M. (2019): High implantation and clinical pregnancy rates with single vitrified-warmed blastocyst transfer and optional aneuploidy testing for all patients. *Hum. Fertil (Camb.)*, 1–12.
- 33) Lukaszuk, K., Puksza, S., Wells, D., Cybulska, C., Liss, J., Plociennik, L., Kuczynski, W. and Zabielska, J. (2015): Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertil. Steril.*, 103, 1031–1036.
- 34) Lee, H.L., McCulloh, D.H., Hodes-Wertz, B., Adler, A., McCaffrey, C. and Grifo, J.A. (2015): In vitro fertilization with preimplantation genetic screening improves implantation and live birth in women age 40 through 43. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 32, 435–444.
- 35) Greco, E., Bono, S., Ruberti, A., Lobascio, A.M., Greco, P., Biricik, A., Spizzichino, L., Greco, A., Tesarik, J., Minasi, M. G. and Fiorentino, F. (2014): Comparative genomic hybridization selection of blastocysts for repeated implantation failure treatment: a pilot study. *Biomed Res. Int.*, 2014, 457913.

- 36) Keltz, M.D., Vega, M., Sirota, I., Lederman, M., Moshier, E.L., Gonzales, E. and Stein, D. (2013): Preimplantation genetic screening (PGS) with Comparative genomic hybridization (CGH) following day 3 single cell blastomere biopsy markedly improves IVF outcomes while lowering multiple pregnancies and miscarriages. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 30, 1333–1339.
- 37) Scott, R.T. Jr., Upham, K.M., Forman, E.J., Hong, K. H., Scott, K.L., Taylor, D., Tao, X. and Treff, N. R. (2013): Blastocyst biopsy with comprehensive chromosome screening and fresh embryo transfer significantly increases in vitro fertilization implantation and delivery rates: a randomized controlled trial. *Fertil. Steril.*, 100, 697–703.
- 38) Forman, E.J., Tao, X., Ferry, K.M., Taylor, D., Treff, N.R. and Scott, R.T.Jr. (2012): Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Hum. Reprod.*, 27, 1217–1222.
- 39) Schoolcraft, W.B., Fragouli, E., Stevens, J., Munne, S., Katz-Jaffe, M.G. and Wells, D. (2010): Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil. Steril.*, 94, 1700–1706.
- 40) Sher, G., Keskinetepe, L., Keskinetepe, M., Maassarani, G., Tortoriello, D. and Brody, S. (2009): Genetic analysis of human embryos by metaphase comparative genomic hybridization (mCGH) improves efficiency of IVF by increasing embryo implantation rate and reducing multiple pregnancies and spontaneous miscarriages. *Fertil. Steril.*, 92, 1886–1894.
- 41) Yang, Z., Liu, J., Collins, G.S., Salem, S.A., Liu, X., Lyle, S.S., Peck, A.C., Sills, E.S. and Salem, R.D. (2012): Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol. Cytogenet.*, 5, 24.
- 42) Forman, E.J., Hong, K.H., Ferry, K.M., Tao, X., Taylor, D., Levy, B., Treff, N.R. and Scott, R. T., Jr. (2013): In vitro fertilization with single euploid blastocyst transfer: a randomized controlled trial. *Fertil. Steril.*, 100, 100–107 e101.
- 43) Kang, H.J., Melnick, A.P., Stewart, J.D., Xu, K. and Rosenwaks, Z. (2016): Preimplantation genetic screening: who benefits? *Fertil. Steril.*, 106, 597–602.
- 44) Munne, S., Kaplan, B., Frattarelli, J.L., Child, T., Nakhuda, G., Shamma, F.N., Silverberg, K., Kalista, T., Handyside, A.H., Katz-Jaffe, M., Wells, D., Gordon, T., Stock-Myer, S., Willman, S. and Group, S. S. (2019): Preimplantation genetic testing for aneuploidy versus morphology as selection criteria for single frozen-thawed embryo transfer in good-prognosis patients: a multicenter randomized clinical trial. *Fertil. Steril.*, 112, 1071–1079 e1077.
- 45) Kushnir, V.A., Darmon, S.K., Albertini, D.F., Barad, D.H. and Gleicher, N. (2016): Effectiveness of in vitro fertilization with preimplantation genetic screening: a reanalysis of United States assisted reproductive technology data 2011–2012. *Fertil. Steril.*, 106, 75–79.
- 46) Chang, J., Boulet, S.L., Jeng, G., Flowers, L. and Kissin, D.M. (2016): Outcomes of in vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis: an analysis of the United States Assisted Reproductive Technology Surveillance Data, 2011–2012. *Fertil. Steril.*, 105, 394–400.
- 47) Chen, M., Wei, S., Hu, J. and Quan, S. (2015): Can Comprehensive Chromosome Screening Technology Improve IVF/ICSI Outcomes? A Meta-Analysis. *PloS One*, 10, e0140779.
- 48) Dahdouh, E. M., Balayla, J. and Garcia-Velasco, J. A. (2015): Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertil. Steril.*, 104, 1503–1512.
- 49) Lee, E., Illingworth, P., Wilton, L. and Chambers, G.M. (2015): The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. *Hum. Reprod.*, 30, 473–483.
- 50) Gleicher, N., Kushnir, V.A. and Barad, D.H. (2014): Preimplantation genetic screening (PGS) still in search of a clinical application: a systematic review. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, : RB&E, 12, 22.
- 51) Rosenwaks, Z., Handyside, A.H., Fiorentino, F., Gleicher, N., Paulson, R.J., Schattman, G.L., Scott, R.T.Jr., Summers, M.C., Treff, N.R. and Xu, K. (2018): The pros and cons of preimplantation genetic testing for aneuploidy: clinical and laboratory perspectives. *Fertil. Steril.*, 110, 353–361.
- 52) Sato, T., Sugiura-Ogasawara, M., Ozawa, F., Yamamoto, T., Kato, T., Kurahashi, H., Kuroda, T., Aoyama, N., Kato, K., Kobayashi, R., Fukuda, A., Utsunomiya, T., Kuwahara, A., Saito, H., Takeshita, T. and Irahara, M. (2019): Preimplantation genetic testing for aneuploidy: a comparison of live birth rates in patients with recurrent pregnancy loss due to embryonic aneuploidy or recurrent implantation failure. *Hum. Reprod.*, 34, 2340–2348.
- 53) Fiorentino, F., Bono, S., Biricik, A., Nuccitelli, A., Cotroneo, E., Cottone, G., Kokocinski, F., Michel, C. E., Minasi, M. G. and Greco, E. (2014): Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. *Hum. Reprod.*, 29, 2802–2813.
- 54) Kung, A., Munne, S., Bankowski, B., Coates, A. and Wells, D. (2015): Validation of next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos. *Reprod. Biomed. online*, 31, 760–769.
- 55) Pos, O., Budis, J., Kubiritova, Z., Kucharik, M., Duris, F., Radvanszky, J. and Szemes, T. (2019): Identification of structural variation from NGS-based non-invasive prenatal testing. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 4403.
- 56) Mackie, F.L., Hemming, K., Allen, S., Morris, R.K. and Kilby, M.D. (2017): The accuracy of cell-free fetal DNA-based non-invasive prenatal testing in singleton

- pregnancies: a systematic review and bivariate meta-analysis. *BJOG*, 124, 32–46.
- 57) Lau, T.K., Cheung, S.W., Lo, P.S., Pursley, A.N., Chan, M.K., Jiang, F., Zhang, H., Wang, W., Jong, L.F., Yuen, O.K., Chan, H.Y., Chan, W.S., and Choy, K.W. (2014): Non-invasive prenatal testing for fetal chromosomal abnormalities by low-coverage whole-genome sequencing of maternal plasma DNA: review of 1982 consecutive cases in a single center. *Ultrasound Obstet. Gynecol.*, 43, 254–264.
- 58) Chen, S., Lau, T.K., Zhang, C., Xu, C., Xu, Z., Hu, P., Xu, J., Huang, H., Pan, L., Jiang, F., Chen, F., Pan, X., Xie, W., Liu, P., Li, X., Zhang, L., Li, S., Li, Y., Xu, X., Wang, W., Wang, J., Jiang, H. and Zhang, X. (2013): A method for noninvasive detection of fetal large deletions/duplications by low coverage massively parallel sequencing. *Prenat. Diagn.*, 33, 584–590.
- 59) Gleicher, N., Vidali, A., Braverman, J., Kushnir, V.A., Barad, D.H., Hudson, C., Wu, Y.G., Wang, Q., Zhang, L., Albertini, D.F. and International, P. G. S. C. S. G. (2016): Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos, *Reprod. Biol. Endocrinol.*, : RB&E, 14, 54.
- 60) Paulson, R.J. (2017): Preimplantation genetic screening: what is the clinical efficiency? *Fertil. Steril.*, 108, 228–230.
- 61) Greco, E., Minasi, M.G. and Fiorentino, F. (2015): Healthy Babies after Intrauterine Transfer of Mosaic Aneuploid Blastocysts. *N. Engl. J. Med.*, 373, 2089–2090.
- 62) Capalbo, A., Rienzi, L., Cimadomo, D., Maggiulli, R., Elliott, T., Wright, G., Nagy, Z. P., and Ubaldi, F.M. (2014): Correlation between standard blastocyst morphology, euploidy and implantation: an observational study in two centers involving 956 screened blastocysts. *Hum. Reprod.*, 29, 1173–1181.
- 63) Johnson, D.S., Cinnioglu, C., Ross, R., Filby, A., Gemelos, G., Hill, M., Ryan, A., Smotrich, D., Rabinowitz, M. and Murray, M.J. (2010): Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol. Hum. reprod.*, 16, 944–949.
- 64) Fragouli, E., Lenzi, M., Ross, R., Katz-Jaffe, M., Schoolcraft, W.B. and Wells, D. (2008): Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum. Reprod.*, 23, 2596–2608.
- 65) Munne, S., Blazek, J., Large, M., Martinez-Ortiz, P.A., Nisson, H., Liu, E., Tarozzi, N., Borini, A., Becker, A., Zhang, J., Maxwell, S., Grifo, J., Babariya, D., Wells, D. and Fragouli, E. (2017): Detailed investigation into the cytogenetic constitution and pregnancy outcome of replacing mosaic blastocysts detected with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil. Steril.*, 108, 62–71 e68.
- 66) Capalbo, A., Wright, G., Elliott, T., Ubaldi, F.M., Rienzi, L. and Nagy, Z.P. (2013): FISH reanalysis of inner cell mass and trophectoderm samples of previously array-CGH screened blastocysts shows high accuracy of diagnosis and no major diagnostic impact of mosaicism at the blastocyst stage. *Hum. Reprod.*, 28, 2298–2307.
- 67) Munne, S., Grifo, J. and Wells, D. (2016): Mosaicism: "survival of the fittest" versus "no embryo left behind" *Fertil. Steril.*, 105, 1146–1149.
- 68) Fragouli, E., Alfarawati, S., Daphnis, D.D., Goodall, N.N., Mania, A., Griffiths, T., Gordon, A. and Wells, D. (2011): Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum. Reprod.*, 26, 480–490.
- 69) Baart, E.B., Martini, E., van den Berg, I., Macklon, N.S., Galjaard, R.J., Fauser, B.C., and Van Opstal, D. (2006): Preimplantation genetic screening reveals a high incidence of aneuploidy and mosaicism in embryos from young women undergoing IVF. *Hum. Reprod.*, 21, 223–233.
- 70) Popovic, M., Dheedene, A., Christodoulou, C., Taelman, J., Dhaenens, L., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Van den Abbeel, E., De Sutter, P., Menten, B. and Heindryckx, B. (2018): Chromosomal mosaicism in human blastocysts: the ultimate challenge of preimplantation genetic testing? *Hum. Reprod.*, 33, 1342–1354.
- 71) Grimes, D.A. and Schulz, K.F. (2002): Uses and abuses of screening tests. *Lancet*, 359, 881–884.
- 72) Murphy, L.A., Seidler, E.A., Vaughan, D.A., Resekova, N., Penzias, A.S., Toth, T.L., Thornton, K.L. and Sakkas, D. (2019): To test or not to test? A framework for counselling patients on preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *Hum. Reprod.*, 34, 268–275.
- 73) Orvieto, R. (2016): Preimplantation genetic screening-the required RCT that has not yet been carried out. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, : RB&E, 14, 35.
- 74) Scott, R.T.Jr., Upham, K.M., Forman, E.J., Zhao, T. and Treff, N.R. (2013): Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil. Steril.*, 100, 624–630.
- 75) McArthur, S.J., Leigh, D., Marshall, J.T., de Boer, K.A. and Jansen, R.P. (2005): Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil. Steril.*, 84, 1628-1636.
- 76) Aoyama, N. and Kato, K. (2020): Trophectoderm biopsy for preimplantation genetic test and technical tips: A review, *Reprod. Med. Biol.*, 19, 222–231.
- 77) Consortium, E.P., Group, S.I.-E.B.W., Kokkali, G., Coticchio, G., Bronet, F., Celebi, C., Cimadomo, D., Goossens, V., Liss, J., Nunes, S., Sfountouris, I., Vermeulen, N., Zakharova, E. and De Rycke, M. (2020): ESHRE PGT Consortium and SIG Embryology good practice recommendations for polar body and embryo biopsy for PGT. *Hum. Reprod. Open*, 2020, hoaa020.
- 78) Capalbo, A., Romanelli, V., Patassini, C., Poli, M.,

- Girardi, L., Giancani, A., Stoppa, M., Cimadomo, D., Ubaldi, F. M. and Rienzi, L. (2018): Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil. Steril.*, 110, 870–879 e875.
- 79) Rubio, C., Rienzi, L., Navarro-Sanchez, L., Cimadomo, D., Garcia-Pascual, C.M., Albricci, L., Soscia, D., Valbuena, D., Capalbo, A., Ubaldi, F. and Simon, C. (2019): Embryonic cell-free DNA versus trophectoderm biopsy for aneuploidy testing: concordance rate and clinical implications. *Fertil. Steril.*, 112, 510–519.
- 80) Huang, L., Bogale, B., Tang, Y., Lu, S., Xie, X. S. and Racowsky, C. (2019): Noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy in spent medium may be more reliable than trophectoderm biopsy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 116, 14105–14112.
- 81) Jiao, J., Shi, B., Sagnelli, M., Yang, D., Yao, Y., Li, W., Shao, L., Lu, S., Li, D. and Wang, X. (2019): Minimally invasive preimplantation genetic testing using blastocyst culture medium. *Hum. Reprod.*, 34, 1369–1379.