

— 総説 —

特集：PGT-A の是非

## PGT-A に潜む “pitfalls”

### The Pitfalls of PGT-A

辻 優大\*・竹村 昌彦

Yuta Tsuji\* and Masahiko Takemura

大阪急性期・総合医療センター 〒558-8558 大阪市

Osaka General Medical Center, 3-1-56 Bandaihigashi, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8558, Japan

**要旨：** 受精卵の染色体が異数性である場合、着床不全や流産といった妊孕能が低下する原因となる。そのため、胚移植する前に染色体の異数性について検査する着床前診断 (Preimplantation genetic testing for aneuploidy; PGT-A) が開発され、生殖補助医療の分野では急速な広がりを見せた。より妊孕能が高い受精卵を移植胚として選択できる PGT-A は、体外受精による妊娠成績を改善させるはずである。しかしながら、実際には未解決のままの技術的問題点が残っており、全ての症例に PGT-A を運用することに対して否定的な意見は少なくない。その要因として、正倍数性 (euploid) 細胞と異数性 (aneuploid) 細胞が混在するモザイク胚の存在が大きい。本稿では、PGT-A を行うために受精卵を構成する細胞の一部を採取する胚生検技術、および受精卵が有する aneuploid 細胞に対する自己修復機能の2点から、PGT-A に潜む “pitfall (落とし穴)” を覗いてみたい。

**キーワード：** PGT-A, 着床前診断, 染色体, 胚生検, 自己修復機能

**Abstract:** Aneuploidy of embryo chromosomes, being a factor in implantation failure and miscarriage, impairs the potential of pregnancy. Because of this, preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) was developed, PGT-A tests the aneuploidy of chromosomes prior to embryo transfer, and has rapidly become popular throughout the field of assisted reproductive technology. PGT-A, which can select fertilized embryos with higher fertility, is expected to improve the pregnancy outcomes of *in vitro* fertilization. However, some technical issues remain unresolved, and the performance of PGT-A for all patients is controversial. The presence of mosaic embryos is a major issue among these problems. In this paper, we look at the pitfalls of PGT-A from two perspectives: the embryonic biopsy technique, which collects some cells from the embryo in order to perform PGT-A, and the self-correcting function of aneuploid cells in the embryo.

**Key words:** Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A), Preimplantation diagnosis, Chromosome, Embryo biopsy, Self-correcting function

#### はじめに

体外受精により得られた受精卵の染色体異常を、胚移植に先立って検査する着床前診断 (Preimplantation genetic testing; PGT) は、Handyside らによる PCR 法を用いた性染

色体評価に関する報告<sup>1)</sup>以降、多くの国々で取り入れられてきた。PGT は対象となる異常性の検査から3種に分類されている。すなわち、特定の単一遺伝子の異常について検査する PGT-M (PGT for monogenetic)、染色体の構造異常について検査する PGT-SR (PGT for structural rearrangement)、そして染色体の数的異常を検査する PGT-A (PGT for aneuploidy) である<sup>2)</sup>。特に染色体において数的な異常である異数性 (aneuploidy) は、最も多く起こる異常であり、受精卵における初期発育段階での発生停止、胚移植後の着床不全、流産、ならびに先天性異常の主な原因となる<sup>3, 4)</sup>。また加齢にともない、aneuploid 胚の発生リスクは劇的に上昇することから<sup>5, 6)</sup>、PGT-A は高齢化が進む生殖補助医療分野において急

(受付 2020年8月20日 / 受理 2020年9月20日)

別刷請求先：〒558-8558 大阪府大阪市住吉区万代東3-1-56

大阪急性期・総合医療センター

\*To whom correspondence should be addressed.

e-mail: tsuji.yuta81@gmail.com

速な普及をみせた。一方、本邦では、2017年から2018年にかけて日本産科婦人科学会が主体となり、反復流産あるいは胚移植反復不成功症例の患者を対象としたPGT-Aの有用性と安全性に関する前方視的検討が行われてきた。その結果、採卵周期あたりの挙児率は改善されないが、胚移植当たりの挙児率が有意に改善したことを報告している<sup>7)</sup>。

### モザイク胚と妊孕能

それでは、生殖補助医療においてPGT-Aは標準的に施行されるべき技術であろうか。日本を含む世界数か国の体外受精に関する統計データ(新鮮胚移植周期に限定)では、2014年以降に挙児に至る妊娠継続率が低下していることが報告されている<sup>8)</sup>。Gleocherらは、該当年に導入が進められた体外受精に関わる技術が、妊孕能の低下を誘引した可能性を指摘しており、その一つとしてPGT-Aの偽陽性率の高さを挙げている<sup>8)</sup>。すなわち、児への発生能を有する受精卵に対し、従来の形態学的評価では移植を行っていたにも関わらず、PGT-Aでaneuploidyあるいはモザイク(euploid細胞とaneuploid細胞の混在)の結果がでたために、移植胚の候補から除外してしまっている可能性が考えられる。事実、PGT-Aによりモザイクやaneuploidyと評価された胚を母体内へ移植したところ、正倍数性(euploid)胚に比べて妊娠成績は低くなり、流産率は高くなるが、正常に児が得られていることがこれまでに数多く報告されている<sup>9-12)</sup>。本稿では、PGT-Aの結果と胚移植後の妊孕能が一致しない原因として、(1) 胚生検における技術的限界と(2) aneuploid細胞に対する自己修復機能の2点について紹介したい。

### (1) 胚生検における技術的限界

PGTを行うためには、細胞が持つDNAを回収する必要がある。3つの異なる胚発育段階で行うことができる。すなわち、①1細胞期、②分割期、そして③胚盤胞期である(図1参照)。しかしながら、①で行う極体生検(図1-①)は、父型由来の遺伝情報や減数分裂以降に生じる染色体異常は不明であること<sup>12, 13)</sup>、ならびに受精後の胚発生予後が不明なことから必然的に生検を施行する個数が増えることもあり、胚への侵襲性を禁止する一部の地域を除き、現在ではほとんど行われていない。また、分割期胚で行う割球生検(図1-②)は、モザイクの割合が70%以上と高いこと、ならびに生検後の妊孕能低下が著しいことが明らかになっており<sup>14, 15)</sup>、妊孕能改善を目的とするPGT-Aには不適切といえよう。

上述してきたような問題点をクリアしているのが胚盤胞期であり、現在では胚性DNAを回収するための胚発育段階として、主流とされている。

### 胚盤胞期における胚性遺伝情報の収集方法と課題

胚盤胞でPGT-Aを行うメリットには、胚盤胞が多数の細胞から構成されていることだけではなく、単一胚移植に適していること<sup>16)</sup>やPGT-Aの結果が出た後に融解胚移植周期として万全の状態ですべての胚移植を行えること<sup>17)</sup>が挙げられる。一方で、体内とは異なる体外培養環境(温度、酸素濃度、培養用オイル、および胚操作など)は、受精卵を常にストレス状態に曝している状態である<sup>18)</sup>。体外培養によるストレスが及ぼす影響の一つに、エピジェネティック修飾の異常が含まれている。ウシ胚をモデルにした研究では、“胚性ゲノムの活性化”が起こる時期(ウシなら8細胞期、ヒトなら4細胞期)

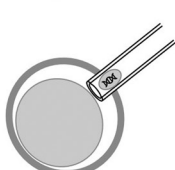
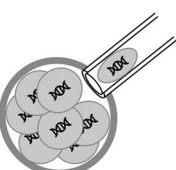
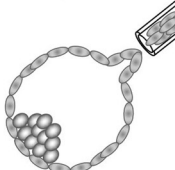
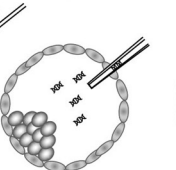
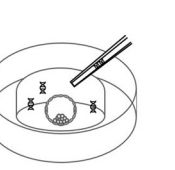
| 胚発育段階 | 受精前後                                                                                | 分割期胚                                                                                | 胚盤胞期                                                                                |                                                                                      |                                                                                       |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|       | ①                                                                                   | ②                                                                                   | ③                                                                                   | ④                                                                                    | ⑤                                                                                     |
| 方法    |  |  |  |  |  |
| 検体    | 第1/第2極体                                                                             | 割球                                                                                  | TE細胞                                                                                | 胞胚腔液                                                                                 | 培養液                                                                                   |
| 侵襲性   | 無                                                                                   | 大                                                                                   | 大                                                                                   | 小                                                                                    | 無                                                                                     |
| メリット  | ・ 新鮮胚移植が可能<br>(凍結リスクを減らせることが可能)                                                     |                                                                                     | ・ DNA量が豊富                                                                           | ・ 侵襲性が無い(低い)<br>・ ICMの解析も含む                                                          |                                                                                       |
| デメリット | ・ 発生予後が不明<br>・ 施行個数が多い<br>・ 父型DNAが不明                                                | ・ Mosaic率が高い<br>・ 侵襲性が高い                                                            | ・ ICMの状態が不明<br>・ 一部のみの解析                                                            | ・ DNAが解析に必要な量に不十分                                                                    | ・ 初期胚盤胞に不適<br>・ 母型因子の混入                                                               |

図1 PGT-Aに必要な胚性遺伝情報(DNA)の回収方法

各発育段階に応じて胚性DNAの回収を行う：①卵子あるいは受精後の1細胞期胚から第一および第二極体を回収する、②初期分割期胚から割球を1-2個回収する、③胚盤胞期胚から栄養外胚葉(TE)を回収する、④胞胚腔液から cell free DNA を回収する、⑤体外培養に使用した培養液から cell free DNA を回収する。

胞期)を体外培養環境下におくことで、体内培養した受精卵に比べてDNAメチル化状態が低く維持されていることを報告している<sup>19)</sup>。これらが児へどのような影響を及ぼすのかは未だ明らかではない。しかしながら、生殖補助医療に由来する児にエピジェネティック修飾の異常が要因の一つとして考えられている自閉症スペクトラム障害が多いことは、長期間に渡る培養が関与している可能性として否定することはできない<sup>20)</sup>。このように、技術には必ずといってよいほど、一長一短が備わっている。生殖補助医療のさらなる発展のためには、利点という一側面のみではなく、潜んでいる危険性についても把握しておく必要がある。本項では、胚盤胞期から胚性DNAを回収する方法として、栄養外胚葉(trophectoderm; TE)生検、ならびに胞胚腔液(blastocoele fluid; BF)の採取に関する利点と技術的限界を示す。

#### TE細胞を採取して行うPGT-A

TE生検(図1-③)は胚盤胞を構成する細胞の一部(5-10細胞)を採取するため、胚盤胞を構成する複数個の細胞から胚性DNAを採取できる点は、原則的に単一細胞から解析を行う他の生検(極体および割球)に比べて大きな利点といえる。また、割球生検に比べて胚に対する損傷割合が低く、生検後に認められる妊娠能の低下も低いことが示されている<sup>15)</sup>。しかしながら、TE生検による胚への侵襲性を恐れて採取する細胞数が少なくなると、偽陽性/偽陰性の結果を誘引する原因となり<sup>21)</sup>、細胞数を多く採取し過ぎると分割期胚と同様に妊娠能低下の要因<sup>22)</sup>となることから、ある程度の技術的練度は必要であろう。近年になり、Paulsonは適量のTE生検であったとしても、40歳未満の女性患者から得られた50%近くの胚において、妊娠能を損なっている可能性を指摘している<sup>23)</sup>。さらに、胚盤胞全体の遺伝情報を予測する上で、5-10個のTE細胞という数字は少なすぎることも指摘されている<sup>24)</sup>。実際、同一胚盤胞から複数回に渡るTE生検を行ったところ、得られたPGT-Aの結果に再現性が認められないことや、生検した結果が胎児を形成するICMの遺伝情報と一致していないことを指摘する報告も少なくない<sup>9, 25)</sup>。このように、TE生検から得られた結果は、局所的に集まっていた細胞から得られた遺伝情報である可能性を、完全に除外できないことを認識しておく必要がある。

#### 胞胚腔液から行うPGT-A

胚盤胞を構成するTE細胞の一部を採取する侵襲的(invasive; i) PGT-Aに対して、細胞を回収することなく胞胚腔液から胚性遺伝情報(cell-free(cf)DNA)を穿刺回収する低侵襲的(mild-invasive; mi) PGT-Aは、2013年にPaliniらにより提唱された(図1-④)<sup>26)</sup>。miPGT-Aは、TE生検と異なり一部の細胞に由来するDNAではなく、胚盤胞全体の胚性DNAを反映している可能性が高いことから、近年注目されている技術である。しかしながら、細胞からDNAを直接回収するTE生検に比べて、胞胚腔液に含まれるcfDNA量は少なく、PGT-A解析が可能な十分量のcfDNAが回収できる

割合は比較的低率(60-80%程度)であることが報告されている<sup>27, 28)</sup>。Magliらは、TE生検でaneuploidと診断された胚盤胞に由来する胞胚腔液では、euploidyと診断された胚盤胞に由来する胞胚腔液に比べて、全ゲノム増幅(whole genome amplification; WGA)を行うために必要な十分量のDNAを回収できた割合が、有意に高いことを報告している(81% vs. 45%;  $P < 0.001$ )<sup>29)</sup>。詳しくは後述するが、後者ではaneuploid細胞に対する自己修復機能としてのapoptosisが積極的に関与している可能性が考えられる<sup>30)</sup>[本稿(2)-③参照]。さらに、cfDNAを十分量回収できなかった胚盤胞では、cfDNAを十分量回収できた胚盤胞に比べて、妊娠能が高いことも報告している<sup>29)</sup>。すなわち、WGAができればaneuploid胚、WGAができればeuploid胚である可能性が高いということを意味している。また、cfDNA量の測定であれば、PGT-Aの全行程を行う必要はないことから、費用面を抑えることも可能である。しかしながら、胞胚腔液から行うmiPGT-Aの精度は未だ低く、また初期胚盤胞のように胞胚腔液が少量の場合に不適な方法であることから、胞胚腔液によるmiPGT-Aを単独で臨床応用する場合には、さらなる解析方法の改善は必須であろう。

他のPGT-Aとして、受精卵の体外培養に使用した培養液からcfDNAを回収する非侵襲的(non-invasive; ni) PGT-Aがある(図1-⑤)。しかしながら、TE生検との一致率が30.4%と低いことに加え、母型由来DNAと胚性DNAのコンタミネーションが示唆されている<sup>31, 32)</sup>。そのため臨床応用されるには、母型DNAと胚性DNAの見極めができることが不可欠であろう。

#### (2) aneuploid細胞に対する自己修復機能

ヒト胚におけるaneuploidyの多くは、卵子形成過程における減数分裂時のエラーに由来することが知られている。すなわち、第一減数分裂前期での停止(胎生7カ月~性成熟)が長期間に渡ること、減数分裂再開後の染色体分配到異常をきたし、年齢依存的に異数性染色体が増加する要因となる<sup>33)</sup>。そのため、減数分裂に起因する染色体数異常では、受精後の胚全体の細胞がaneuploidな状態にあることが予測され、一部の染色体異常を除き、正常な妊娠能が期待できる可能性は低い<sup>34)</sup>。一方、モザイク胚の大半は受精後の細胞分裂過程で形成される(染色体不分離、分裂後期遅滞、核内倍化など)<sup>35)</sup>。しかしながら、冒頭でも述べたようにaneuploid胚あるいはmosaic胚から健常児が得られることは既報から明らかである。その理由として、①異数性細胞に対する自己救済措置、②ICM系列へのeuploid細胞の優先的分配、③aneuploid細胞における細胞増殖の抑制、といった自己修復機能が仮説として提唱されている<sup>36, 37)</sup>。以下に各仮説の概要と、既報から分析される各仮説に対する信憑性についてまとめる。

## ①異数性 (trisomy/monosomy) 細胞に対する自己救済措置

〔概要〕細胞分裂時に trisomy (三倍体) あるいは monosomy (半数体) な状態にある aneuploid 細胞が、自発的に細胞分裂時の染色体分配エラーを起こすことで、正常倍数性の染色体へ自己調整する異数性救済機能。

〔分析〕SNP array で 3,400 個の胚盤胞を解析した結果、片親性ダイソミー (UPD; uniparental disomy) の検出率が 0.06% と低いことが報告されており、少なくとも胚発生を通して運用されている染色体自己修復機能の主軸である可能性は低い<sup>38)</sup>。一方、Yoshida らはインプリンティング疾患の女性 (UPD 群) と一般女性群における X 染色体の不活化解析を行い、不活化のパターン (父型/母型の X 染色体が不活化されている割合) を解析した結果、UPD 群では不活化の割合に偏りが認められたことを明らかにしている。すなわち、X 染色体が不活化される胚盤胞期より前の段階で、異数性救済措置が取られていることを示した<sup>39)</sup>。これらの報告から、aneuploid 細胞に対して、受精卵の発生段階に応じた自己修復機能がそれぞれ働いている可能性が考えられた。

## ② ICM への euploid 細胞の優先的分配

〔概要〕euploid 細胞と aneuploid 細胞が混在するモザイク胚では、ICM 系列へ優先的に euploid 細胞を分化させ、aneuploid 細胞を TE 細胞へ分化誘導することで、受精卵の児への発育を促す機能。

〔分析〕モザイク胚を胚移植した後に臨床妊娠が成立した 23 名の患者に対し、出生前診断として絨毛検査あるいは羊水検査を行ったが、胎盤に aneuploid 細胞が限局的に配分されていないことが報告されている<sup>40)</sup>。すなわち、既報からは euploid 細胞を ICM 系列へ優先的に配分する自己修復機能に関しては否定的である。しかしながら、Bolton らは人為的に aneuploid 細胞と euploid 細胞を混合させたキメラ胚を作成したマウスモデルにおいて、ICM では aneuploid 細胞に対して apoptosis (細胞死) が積極的に誘起されていることを明らかにした<sup>30)</sup>。さらに同氏らは、TE では aneuploid に対する apoptosis は認められないが、細胞数の増加も認められなかったことを報告している。すなわち、ICM と TE では別々の自己修復機能が、それぞれ aneuploid 細胞の増殖に対して抑制的に働きかけている可能性が考えられた。

## ③ aneuploid 細胞に対する細胞増殖の抑制

〔概要〕受精後に細胞分裂する際に、aneuploid 細胞には apoptosis などによる細胞の分裂・増殖に対する能動的排除が誘起され、結果的に euploid 細胞の分裂・増殖が促進される機能。

〔分析〕②で述べたように、マウスを用いた検討から ICM に由来する aneuploid 細胞では apoptosis により積極的に排除され、TE では apoptosis とは別の増殖抑制が誘起されることで、モザイク胚からでも正常な胎盤と胎子が得られたことが報告されている<sup>30)</sup>。また、ヒト胚においても同様に、apoptosis が検出される割合が、euploid、モザイク、

aneuploid の間で大きく異なっており、aneuploid 胚では多くの細胞で apoptosis が誘起されていることが確認されている<sup>12)</sup>。この仮説は、胞腔液に存在する cfDNA 量に関する研究からも裏付けられている<sup>29)</sup>。すなわち、aneuploid 細胞では apoptosis が積極的に誘起されることで、胞腔液中に cfDNA 量が豊富な状態にあるのに対して、euploid 細胞では apoptosis が抑制的であるために、WGA が可能な程度の cfDNA 量が採集できない要因として考えられている<sup>29)</sup>。

近年の live-cell imaging によるマウスモデルの検討では、初期分割段階で染色体異常がある受精卵でも、胚盤胞まで到達した受精卵からは産子が得られることを報告しており、受精卵が自己修復機能を備えていることは間違いないであろう<sup>41)</sup>。しかしながら、全ての aneuploid 細胞が完全に正常な euploid 細胞に置換されるわけではなく、多くの胚では aneuploidy あるいはモザイク状態で発育を停止してしまう<sup>42)</sup>。さらに、自己修復機能にも上限 (あるいは規律) があることは、モザイク胚の妊孕能が euploid 胚に比べて低くなることから明らかである<sup>11)</sup>。今後、さらなるメカニズムの解明、そしてより効率的に自己修復機能を促進させる方法の発見・開発が期待される。

## 結語

児を得ることを目的とした生殖補助医療において、PGT-A はとても魅力的な技術である。一方で、aneuploidy あるいはモザイクと診断された受精卵から健常児が得られたという報告は、まさに現状の PGT-A における技術的境界を意味している。しかしながら、PGT-A の技術的練度および解析精度のみが、PGT-A の技術境界を招いている原因ではない。卵子/受精卵が持つ、aneuploid 細胞に対する驚嘆すべき自己修復機能が、PGT-A の異数性検出力に誤差を生じさせている要因の一つであろう。これらを踏まえ、誰を PGT-A の対象にして、どの方法で PGT-A を行い、そして PGT-A の結果にどこまで従って胚移植するのか、慎重に議論を重ねていく必要がある。PGT-A はまだ発展途上の技術であり、今後のさらなる改善が期待される。

## 文献

- 1) Handyside, A.H., Pattinson, J.K., Penketh, R.J., Delhanty, J.D., Winston, R.M. and Tuddenham, E.G. (1989): Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*, 1, 347-349.
- 2) Zegers-Hochschild, F., Adamson, G.D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I.D., Simpson, J.L. and van der Poel, S. (2017): The international glossary on infertility and fertility care. *Hum. Reprod.*, 32, 1786-1801.
- 3) Hassold, T. and Hunt, P. (2001): To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat. Rev. Genet.*, 2, 280-291.
- 4) Maurer, M., Ebner, T., Puchner, M., Mayer, R.B.,

- Shebl, O., Oppelt, P. and Duba, H.C. (2015): Chromosomal Aneuploidies and Early Embryonic Developmental Arrest. *Int. J. Fertil. Steril.*, 9, 346–353.
- 5) Fransasiak, J.M., Forman, E.J., Hong, K.H., Werner, M.D., Upham, K.M., Treff, N.R. and Scott, R.T. Jr. (2014): The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil. Steril.*, 101, 656–663.
  - 6) Munné, S., Chen, S., Colls, P., Garrisi, J., Zheng, X., Cekleniak, N., Lenzi, M., Hughes, P., Fischer, J., Garrisi, M., Tomkin, G. and Cohen, J. (2007): Maternal age, morphology, development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-stage embryos. *Reprod. Biomed. Online*, 14, 628–634.
  - 7) 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.
  - 8) Gleicher, N., Kushnir, V.A. and Barad, D.H. (2019): Worldwide decline of IVF birth rates and its probable causes. *Hum. Reprod. Open*, 2019, hoz017.
  - 9) Gleicher, N., Vidali, A., Braverman, J., Kushnir, V.A., Barad, D.H., Hudson, C., Wu, Y.G., Wang, Q., Zhang, L. and Albertini, D.F. (2016): Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos; International PGS Consortium Study Group. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 14, 54.
  - 10) 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.
  - 11) Munné, 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
  - 12) Victor, A.R., Tyndall, J.C., Brake, J., Lepkowsky, L.T., Murphy, A.E., Griffin, D.K., McCoy, R.C., Barnes, F.L., Zouves, C.G. and Viotti, M. (2019): One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in healthy pregnancies. *Fertil. Steril.*, 111, 280–293.
  - 13) Montag, M., Koster, M., Strowitzki, T. and Toth, B. (2013): Polar body biopsy. *Fertil. Steril.*, 100: 603–607
  - 14) 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.
  - 15) 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.
  - 16) Johnston, J., Gusmano, M.K. and Patrizio, P. (2014): Preterm births, multiples, and fertility treatment: recommendations for changes to policy and clinical practices. *Fertil. Steril.*, 102, 36–39.
  - 17) Wei, D., Liu, J.Y., Sun, Y., Shi, Y., Zhang, B., Liu, J.Q., Tan, J., Liang, X., Cao, Y., Wang, Z., Qin, Y., Zhao, H., Zhou, Y., Ren, H., Hao, G., Ling, X., Zhao, J., Zhang, Y., Qi, X., Zhang, L., Deng, X., Chen, X., Zhu, Y., Wang, X., Tian, L.F., Lv, Q., Ma, X., Zhang, H., Legro, R.S. and Chen, Z.J. (2019): Frozen versus fresh single blastocyst transfer in ovulatory women: multicentre, randomized trial. *Lancet*, 30; 393, 1310–1318.
  - 18) Wale, P.L. and Gardner, D.K. (2016): The effects of chemical and physical factors on mammalian embryo culture and their importance for the practice of assisted human reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 22, 2–22.
  - 19) Salilew-Wondim, D., Saeed-Zidane, M., Hoelker, M., Gebremedhn, S., Poirier, M., Pandey, H.O., Tholen, E., Neuheff, C., Held, E., Besenfelder, U., Havlicek, V., Rings, F., Fournier, E., Gagné, D., Sirard, M.A., Robert, C., Gad, A., Schellander, K. and Tesfaye, D. (2018): Genome-wide DNA methylation patterns of bovine blastocysts derived from in vivo embryos subjected to in vitro culture before, during or after embryonic genome activation. *BMC Genomics*, 19, 424.
  - 20) Liu, L., Gao, J., He, X., Cai, Y., Wang, L. and Fan, X. (2017): Association between assisted reproductive technology and the risk of autism spectrum disorders in the offspring: a meta-analysis. *Sci. Rep.*, 7, 46207.
  - 21) Vera-Rodriguez, M. and Rubio, C. (2017): Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos'. *Fertil. Steril.*, 107, 1107–1112
  - 22) Zhang, S., Luo, K., Cheng, D., Tan, Y., Lu, C., He, H., Gu, Y., Lu, G., Gong, F. and Lin, G. (2016): Number of biopsied trophectoderm cells is likely to affect the implantation potential of blastocysts with poor trophectoderm quality. *Fertil. Steril.*, 105, 1222–1227.
  - 23) Paulson, R.J. (2019): Outcome of in vitro fertilization cycles with preimplantation genetic testing for aneuploidies: let's be honest with one another. *Fertil. Steril.*, 112, 1013–1014.
  - 24) Gleicher, N., Metzger, J., Croft, G., Kushnir, V.A., Albertini, D.F. and Barad, D.H. (2017): A single trophectoderm biopsy at blastocyst stage is mathematically unable to determine embryo ploidy accurately enough for clinical use. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 15, 33
  - 25) Navratil, R., Horak, J., Hornak, M., Kubicek, D.,

- Balcova, M., Tauwinklova, G., Travník, P. and Vesela, K. (2020): Concordance of various chromosomal errors among different parts of the embryo and the value of re-biopsy in embryos with segmental aneuploidies. *Mol. Hum. Reprod.*, 26, 269–276.
- 26) Palini, S., Galluzzi, L., De Stefani, S., Bianchi, M., Wells, D., Magnani, M. and Bulletti, C. (2013): Genomic DNA in human blastocoele fluid. *Reprod. Biomed. Online*, 26, 603–610
- 27) Magli, M.C., Pomante, A., Cafueri, G., Valerio, M., Crippa, A., Ferraretti, A.P. and Gianaroli, V. (2016): Preimplantation genetic testing: polar bodies, blastomeres, trophoctoderm cells, or blastocoele fluid? *Fertil. Steril.*, 105, 676–683.
- 28) Tobler, K.J., Zhao, Y., Ross, R., Benner, A.T., Xu, X., Du, L., Broman, K., Thrift, K., Brezina, P.R. and Kearns, W.G. (2015): Blastocoele fluid from differentiated blastocysts harbors embryonic genomic material capable of a whole-genome deoxyribonucleic acid amplification and comprehensive chromosome microarray analysis. *Fertil. Steril.*, 104, 418–425.
- 29) Magli, M.C., Albanese, C., Crippa, A., Tabanelli, C., Ferraretti, A.P. and Gianaroli, L. (2019): Deoxyribonucleic acid detection in blastocoele fluid: a new predictor of embryo ploidy and viable pregnancy. *Fertil. Steril.*, 111, 77–85.
- 30) Bolton, H., Graham, S.J., Van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Fernandez Gallardo, E., Voet, T. and Zernicka-Goetz, M. (2016): Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nat. Commun.*, 7, 11165.
- 31) Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., Jimenez-Almazan, J., Martinez, S., Navarro, R., Peinado, V., Mercader, A., Meseguer, M., Blesa, D., Moreno, I., Valbuena, D., Rubio, C. and Simon, C. (2018): Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development. *Hum. Reprod.*, 33, 745–756.
- 32) Brouillet, S., Martinez, G., Coutton, C. and Hamamah, S. (2020): Is cell-free DNA in spent embryo culture medium an alternative to embryo biopsy for preimplantation genetic testing? A systematic review. *Reprod. Biomed. Online*, 40, 779–796.
- 33) Nagaoka, S.I., Hassold, T.J. and Hunt, P.A. (2012): Human aneuploidy: mechanisms and new insights into an age-old problem. *Nat. Rev. Genet.*, 13, 493–504.
- 34) Adashi, E.Y. and McCoy, R.C. (2017): Technology versus biology: the limits of preimplantation genetic screening: better methods to detect the origin of aneuploidy in pre-implantation embryos could improve the success rate of artificial reproduction. *EMBO Rep.*, 18, 670–672.
- 35) Stloulakis, V. and Bertero, M.C. (2019): Molecular aspects of aneuploidy in preimplantation human embryos: A mini-review. *Ann. Res. Hosp.*, 3, 8
- 36) Capalbo, A. and Rienzi, L. (2017): Mosaicism between trophoctoderm and inner cell mass. *Fertil. Steril.*, 107, 1098–1106.
- 37) McCoy, R.C. (2017): Mosaicism in preimplantation human embryos: when chromosomal abnormalities are the norm. *Trends Genet.*, 33, 448–463.
- 38) Gueye, N.A., Devkota, B., Taylor, D., Pfundt, R., Scott, R.T. Jr, and Treff, N.R. (2014): Uniparental disomy in the human blastocyst is exceedingly rare. *Fertil. Steril.*, 101, 232–236.
- 39) Yoshida, T., Miyado, M., Mikami, M., Suzuki, E., Kinjo, K., Matsubara, K., Ogata, T., Akutsu, H., Kagami, M. and Fukami, M. (2019): Aneuploid rescue precedes X-chromosome inactivation and increases the incidence of its skewness by reducing the size of the embryonic progenitor cell pool. *Hum. Reprod.*, 34, 1762–1769
- 40) Spinella, F., Fiorentino, F., Biricik, A., Bono, S., Ruberti, A., Cotroneo, E., Baldi, M., Cursio, E., Minasi, M.G. and Greco, E. (2018): Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of in vitro fertilization treatments. *Fertil. Steril.*, 109, 77–83.
- 41) Mashiko, D., Ikeda, Z., Yao, T., Tokoro, M., Fukunaga, N., Asada, Y. and Yamagata, K. (2020): Chromosome segregation error during early cleavage in mouse pre-implantation embryo does not necessarily cause developmental failure after blastocyst stage. *Sci. Rep.*, 10, 854.
- 42) Victor, A.R., Griffin, D.K., Brake, A.J., Tyndall, J.C., Murphy, A.E., Lepkowsky, L.T., Lal, A., Zouves, C.G., Barnes, F.L., McCoy, R.C. and Viotti, M. (2019): Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophoctoderm biopsy and blastocyst. *Hum. Reprod.*, 34, 181–192.