

—テクニカルノート—

特集：PGT-Aのラボワークのコツ

PGT-Aにおけるラボワークのコツ —低侵襲性を維持しつつ正確にNGS解析を行うための工夫—

The tips of Lab work for PGT-A —Ingenuity to accurately analyze using NGS while maintaining minimally invasive biopsy—

中野 達也

Tatsuya Nakano

医療法人三慧会 IVFなんばクリニック 〒550-0015 大阪市
IVF Namba Clinic, 1-17-28 Minamihorie, Nishi-ku, Osaka 550-0015, Japan

要旨：PGT-Aにおいて、胚盤胞から細胞の一部を採取するバイオブシーの工程は必須となるが、胚からの細胞生検は少なからず侵襲性がある。そのため、胚盤胞の形態や採取細胞数によっては着床率の低下が懸念されるが、少数細胞ではDNA増幅不良やモザイク診断のリスクがある。そのため、バイオブシー後の胚盤胞が高い生存性を維持しつつ、安定した染色体解析結果となる手技を構築する必要がある。しかし、胚盤胞はそれぞれに特徴があり、1胚ごとに手技の工夫が必要な場合もある。そこで、各施設の培養士が様々な工夫を行い、バイオブシーを実施している。また、胚盤胞は収縮・拡張など常に動きがあるため、バイオブシー時は焦らず落ち着いて実施することが求められる。本稿ではPGT-Aにおけるラボワークの各工程における工夫について、当院の手技が採用となるまでの経緯および経験を踏まえて解説する。

キーワード：PGT-A, 低侵襲, 採取細胞数, 孵化状態, チュービング

Abstract: The trophoctoderm (TE) biopsy process of collecting some cells from a blastocyst is indispensable in preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A). However, TE biopsy is not a little invasive. Therefore, there is a concern that the implantation rate may decrease depending on the blastocyst morphological assessment and the number of TE biopsy cells, but there is also a risk of DNA amplification failure and mosaic diagnosis in a small number of cells. Accordingly, it is necessary to devise a method that produces stable chromosomal analysis results while maintaining high viability of blastocysts after TE biopsy. However, each blastocyst has its own characteristics, and it is necessary to make ingenuity for each embryo, and the embryologists at each clinic are making various efforts to carry out the TE biopsies. In addition, since blastocysts are constantly changing, e.g., contraction and expansion, it is necessary to calmly and patiently perform a TE biopsy. In this paper, we will explain the ingenuity in each process of lab work in PGT-A, based on our background and experience until the novel technique was adopted.

Key words: PGT-A, TE biopsy, Assisted hatching, Number of collected cells, Tubing

はじめに

(受付 2020年11月29日／受理 2020年12月26日)
別刷請求先：〒550-0015 大阪府大阪市西区南堀江1丁目17-28
医療法人三慧会 IVFなんばクリニック
e-mail: nakano@ivfnamba.com

近年、分子生物学的解析技術の発達により全染色体の数的な異常を網羅的に解析できるArray Comparative Genomic Hybridization (aCGH) やNext Generation Sequencing (NGS) などがPreimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A) に臨床応用されるようになった。これらの方法は

全ゲノム増幅 (WGA) を必要とし、多くの細胞数を用いることで診断精度が向上する。そのため、胚生検の時期も3日目の分割期胚から、より多くの細胞が得られる胚盤胞の栄養外胚葉 (TE) 生検が主流となった。これにより、分割期胚における割球間での染色体構成の違いによる誤診断はなくなったが、TEバイオプシーでは複数細胞を用いるためモザイクが診断されるようになった。また、PGT-Aにおいて、胚盤胞から細胞の一部を採取するバイオプシーの工程は欠かすことができない。しかし、胚からの細胞生検は少なからず侵襲性がある。そのため、胚盤胞の形態や採取細胞数によっては着床率の低下が懸念されるが、少数細胞ではDNA増幅不良やモザイク診断のリスクがある。さらに、バイオプシー工程と一括りとなっているが、細胞採取のためにアシステドハッチング (AHA) の実施、実際に細胞採取を行うバイオプシー、採取細胞をチューブに入れるチュービングなどと様々な工程がある。これらの工程では、AHAはいつ行うか、バイオプシー方法、採取細胞数はどれくらいがよいか、生検後の凍結時期などの疑問があり、各施設の培養士が色々な工夫をしている。本稿では、PGT-Aにおけるラボワークの各工程における工夫を当院の手技が採用となるまでの経緯および経験を踏まえて解説する。

受精方法

PGTでは透明帯に付着した精子がバイオプシーやチュービング時の細胞の操作にて混入するため、受精方法は顕微授精 (ICSI) が推奨されている。しかし、実際に混入した精子のDNAがNGSによって検出されるのは多く議論されている。精子のDNAはプロタミンによってクロマチン構造を維持しているため、高度に凝集し超音波破碎や酵素処理への耐性を示す。また、精子を用いた全ゲノム増幅の研究では、60個の精子からDNAを抽出しWGAを行っても、ほとんどDNAが検出できないことを示している¹⁾。さらに、NGSの解析結果においても一般体外受精でモザイク診断が多く検出されることもなく、ICSIと同等の成績が得られている²⁾。以上のことより、PGT実施における受精方法の選択は従来通りの精液所見や患者背景による決定で問題ないと考えられる。

アシステドハッチング (AHA) の実施

胚の周囲には透明帯があり、TEの一部を透明帯より脱出させる必要がある。バイオプシーにおけるAHAの方法で主に用いられているのは、3日目もしくは5日目にてレーザーを使用した方法である。

1. 3日目の分割期胚

分割期胚にてAHAを実施する利点としては、囲卵腔が比較的広く操作も容易である。透明帯の開口サイズは10~20 μm 程度で、可能な範囲で囲卵腔の広い箇所に実施し胚へのダメージを避けるように行う (図1a)。しかしながら、あらかじめ3日目AHAをすることにより、5日目にてバイオ

プシーを行う際に内部細胞塊 (ICM) からの孵化や透明帯より完全脱出するリスクもある。このような状態になってしまうとバイオプシーの難易度が高くなり、孵化の状態のコントロールも難しいため、当院では次の胚盤胞でのAHAを実施している。また、近年ではこれらを回避するために、透明帯を2か所開口する方法も提案されている。その際に、透明帯の開口位置を対角線上ではなく、90度程度離すことでホールドでの固定が容易となる。

2. 5日目の胚盤胞

胚盤胞にてAHAを実施する利点は、開口位置をICMから遠ざけることができICMから孵化が避けられる。また、バイオプシー直前まで開口しないことで胚盤胞の形態評価も正確に実施できるため、バイオプシーの可否の判断が容易である。しかし、胚盤胞でのAHA実施には胞胚腔の収縮が必須なため、操作に時間を要し煩雑になり易くなるため注意が必要である。当院では胞胚腔の収縮にはシュクロース溶液 (0.1~0.3 mol/L) を用いており、ICMより最も遠い部分を20~30 μm 程度開口している (図1b)。開口サイズが小さい場合 (10 μm 程度) は孵化に時間を要し、当日中のバイオプシーが難しくなる。また、ICMが透明帯に引っ掛かってしまう可能性もあるため、胚移植時に追加でAHAを実施する必要もある。一方で大きい場合 (40 μm 以上) は胞胚腔の拡張にともない開口部もより広がってしまい、バイオプシー時に透明帯からでてしまう恐れがある。AHA後は2~3時間程度回復培養を行い、ヘルニア状の孵化が認められた胚からバイオプシーを実施する。

最近では、AHAを実施せずに拡張程度程度の胚盤胞の透明帯をレーザーで開口後すぐにバイオプシーする方法も提案されている。この方法は胞胚腔の収縮やAHA後の回復培養が不必要なため、バイオプシーの作業時間が短縮できる利点がある。しかし、レーザーの照射位置に近い細胞は膜にダメージが加わり、細胞吸引時に膜の破裂を引き起こす可能性がある。複数の細胞を採取しているためNGSによる解析は可能であるが、細胞膜の破裂が起こると一部の細胞を無駄にしてしまう。また、そのように損傷してしまった細胞の

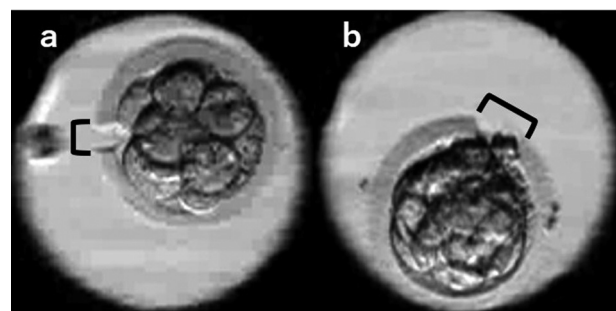


図1 レーザーによるAHA後の胚
a: 分割期胚へのAHA, b: 胚盤胞へのAHA.

膜は、細胞操作の際に使用するピペットやチューブに接着するリスクも高くなる。このようなことから、当院では必ずAHAを行い、ヘルニア状の孵化が認められた胚にバイオプシーを実施している。

バイオプシー前の準備

1. 顕微操作用ディッシュの作製

顕微操作には通常の胚培養液 (Hepes 不含) とバイオプシーピペット洗浄用に1% PVP/PBS (PVP) を用意する。胚培養液を用いる理由は凍結までの一時的にインキュベーターへ戻す際に、可能な限り胚の移動を避けるためである。ドロップ作製には直径60 mm程度の細胞培養用ディッシュの蓋やICSI用ディッシュを用いる。細胞培養用ディッシュの底を使用するとディッシュの表面コートにより採取した細胞が接着してしまうため注意が必要である。各ドロップは20 μ Lで作製し、ミネラルオイルで被覆する (図2)。

2. マニピュレーターの準備

当院では細胞を吸引する際に細胞膜の破裂を避けるため、少し太めの内径35 μ mのバイオプシーピペットを採用している。以前、バイオプシーピペットの検討で内径20~25 μ mのピペットで吸引した際に、TEのグレードが低く、細胞数も少ない胚盤胞では細胞膜の破裂を数回経験したため細い内径のものは避けている。マニピュレーターへのセッティングは基本的に顕微授精と同様であるが、バイオプシーピペットはホールディングピペットに対して平行、かつステージに対して水平になるように注意する。また、吸引操作にはホールドは空圧インジェクター、バイオプシーは呼吸により行っている。そのため、バイオプシーピペットの装着部には空圧式インジェクターに用いるユニバーサルホルダーと空圧用チューブを使用し、その先を胚操作に用いるマウスピースを接続している (図3)。呼吸で吸引操作を行うことで左右ともにジョイスティック操作が可能のため、胚を動かしやすく適切な箇所レーザー照射ができ、さらに急な胚の形態変化にも対応しやすい。また、バイオプシーピペットは胚操作に用いるピペットより細いため、少し強めの吸引圧を意識すると扱いやすい。使用する前にバイオプシーピペットは細胞の接着を防ぐため、PVPでピペット内壁をコートする。また、ピペットがオイル内を通過するときに、毛細管現象により最初にオイルがピペット内に入ってしまうと内壁にオイルが付着することがある。そのために、ピペット投入時は少し陽圧の状態にしながPVPドロップへ投入し、その後PVPの間にオイルを挟んで吸引圧を調整する。また、充填したPVPをそのままバイオプシー用ドロップに持ち込んでしまうと、PVPの混入により胚盤胞が収縮してしまうことがある。そこで、オイルの充填もしくは培養液に置換し、ピペットの外壁も洗浄用培養液ドロップを通すようにしている。

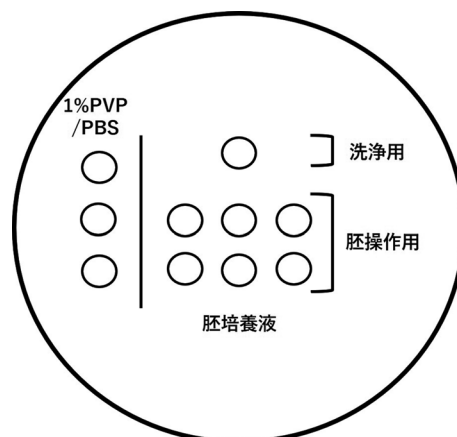


図2 顕微操作用ディッシュの作製

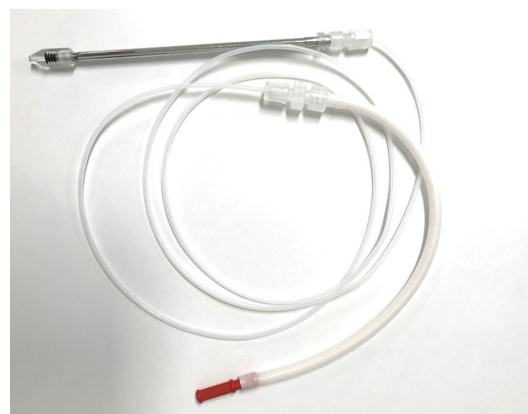


図3 当院で用いているピペットホルダーとマウスピース

3. バイオプシーの実施基準

胚盤胞のグレードとしてはGardner分類で3BC以上を実施可能な基準とし、ICMがグレードCの場合はバイオプシーを基本的には実施していない。また、TEがグレードCでも非常に細胞が少なく、採取細胞数によっては大半のTEが失われる可能性がある場合も実施していない。当院では、胚盤胞バイオプシーを実施するために適切な胚の状態と細胞数を検討した³⁾。その結果、BL1, 2では採取細胞数が非常に少なく、胚全体の細胞数に対して採取細胞数の割合も高くなり、凍結融解後の拡張性も低下したことを示している。以上のことから、BL1, 2の場合はそのまま培養を継続し、BL3以上でバイオプシーすることを推奨している。また、バイオプシー時期の目安としては図4bのようにヘルニア状態になっている胚盤胞を最もよい時期とし、タイムラプスシステムを用いて2時間ごとに確認し適切な時期でバイオプシーを実施している。

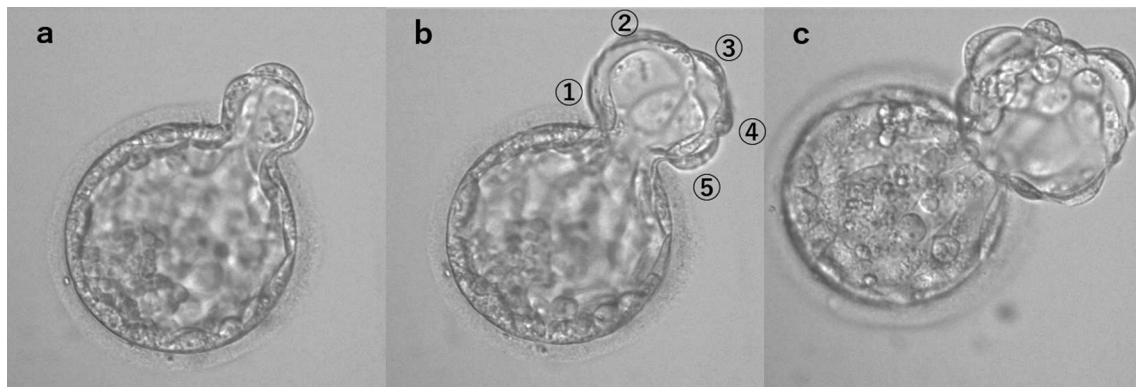


図4 胚盤胞の孵化状態の目安
孵化細胞がaは3-5細胞, bは6-9細胞, cは10細胞以上.

表1 採取細胞数が胚盤胞の生存性および妊孕性に与える影響

	移植時 母体年齢	移植 周期数	融解後の 生存率	着床率	流産率	移植時 BL4BB以上
3-5細胞	36.1	7	100.0% (7/7)	28.6% (2/7)	0.0% (0/2)	85.7% (6/7)
6-9細胞	36.3	27	96.3% (26/27)	69.2% (18/26)	0.0% (0/18)	65.4% (17/26)
10細胞以上	37.7	6	100.0% (6/6)	83.3% (5/6)	0.0% (0/5)	100.0% (6/6)
再バイオブシー	35.5	4	100.0% (4/4)	75.0% (3/4)	0.0% (0/3)	75.0% (3/4)

4. 採取細胞数の目安

実際にどの程度の胚盤胞から細胞を採取するかは非常に悩ましいところである。当院では採取細胞数別の胚の生存性について検討し、10細胞以上の採取細胞数であっても凍結融解後の胚盤胞の生存および妊孕性に問題はないことを示している(表1)。また、採取細胞数の参考のために図5には採取した細胞の明視野とヘキストによる核染色像を示している。さらに、10細胞程度を目安として図4bのような状態を参考としている。このように、脱出している細胞の外周が5細胞程度確認できるため手前と奥にも同程度の細胞数があると予想され、合計で10細胞程度採取できると考える。

バイオブシーの実施

1. ヘルニア状になった胚盤胞(図6)

ヘルニア状に孵化している部分を3時方向にホルードで固定するが、孵化部分はバイオブシーピペットと平行にピン트가合うように正確に固定する。固定時に開口部のピン트가合っていないと、適切な位置へのレーザー照射ができなくなり不必要な照射が増えてしまう。続いて、バイオブシーピペットをTEに近づけて細胞が中に入らない程度に軽く吸引する。この際に強く吸引してしまうとヘルニア部分が収縮してしまい、レーザー照射の位置が分かりにくくなってしまいますので注意が必要である。図6bの状態にし、透明帯開口部の対角線上(サークル内)の各細胞間にレーザー照射を行う。照射回数はそのときの細胞数や透明帯開口部大き

さにもよるが3~5回程度に抑えることが望ましいため、AHAの大きさなどには注意が必要である。その後、TEをバイオブシーピペットにて軽く吸引するが、その際に細胞間接着が剥がれていくのを確認しながら行う。しっかりと細胞間にレーザーが照射できていれば、1回目の吸引で細胞の採取が可能である。もし、繋がっている部分が残ってしまった場合はその箇所だけにレーザー照射し、再度バイオブシーピペットでゆっくり吸引する。それでも繋がっている部分が残る場合は、胚をホルードから外してホルディングピペットの側面と摺り合わせようにして切断する(図6e)。この方法はほとんどの胚盤胞で使用可能であるが、完全孵化後胚盤胞(BL6)の場合はホルディングピペットでの固定には注意が必要なため別途記載する。

1胚のバイオブシーが終了後に両ピペットを交換することが望ましい。しかしながら、前述の方法であればPVPにてコートしたピペットの内外への細胞の付着はほとんどないため、洗浄用PVP内ですべての培養液などを捨ててリセットすることで次の胚も行うことが可能である。もし、バイオブシーピペットに少量でも細胞が付着して取れない場合は、ピペットの交換を推奨する。

当院では1胚のバイオブシーからチュービングまでの作業時間は3~5分とし、一回での最大胚数を3個までとしている。作業時間の目安としては10分以内に胚をインキュベーターまで戻せる程度で設定している。

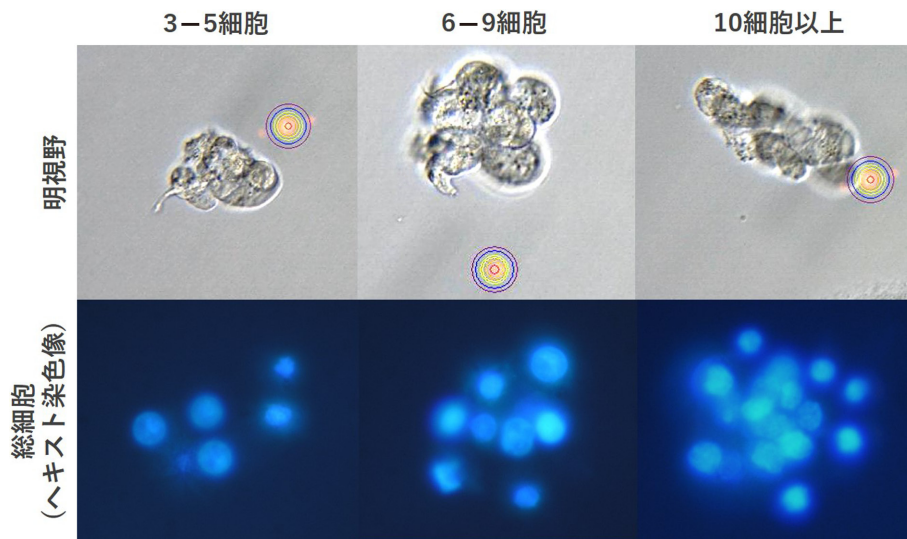


図5 採取細胞別の細胞の状態と総細胞数
採取した細胞の核を蛍光染色して細胞数を確認した。

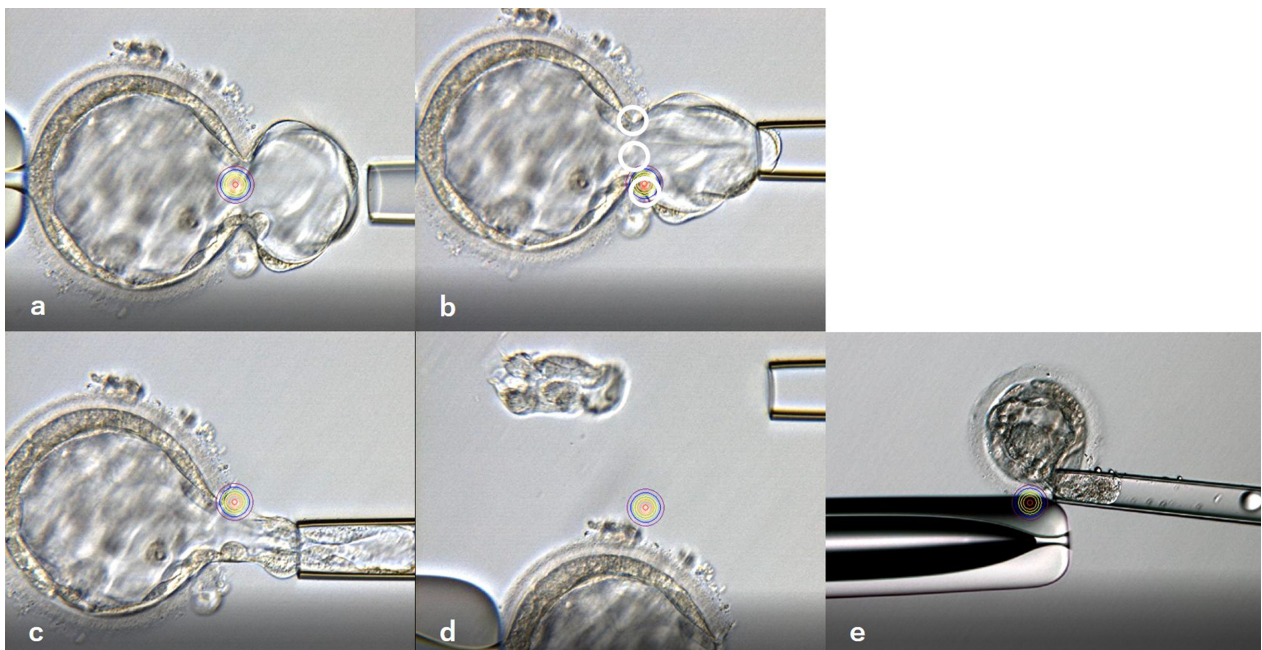


図6 ヘルニア状になった胚盤胞のバイオプシー

a : 孵化部分を3時方向に固定, b : 細胞間の接着部(サークル内)にレーザー照射, c : 吸引しながら細胞を剥離, d : 陽圧にして細胞を排出, e : 部分的に細胞が繋がっていて残った場合はピペット同士を擦り合わせて切断。

2. 完全孵化後胚盤胞 (BL6) (図7)

分割期胚でAHAを実施すると発生速度の速い良好胚はBL6になってしまうことがある。完全孵化後は直接ICM側のTEを固定することになるため、強く吸引してしまうと細胞がホルード内に入ってしまうリスクがある。また、ヘルニア状になっていないためレーザー照射回数も増えてしまう。

そのため、TEをバイオプシーピペットでゆっくり吸引して胚を軽く収縮させながら、必要な細胞をピペット内に入れ細胞間がちょうど先端になるような位置で止める。図7cのようにバイオプシーピペットでTEをヘルニア様にし、その部分にレーザー照射を数回行う。その後、前述通り吸引しながら細胞間接着を剥がしていく。もし、ホルードによる固定

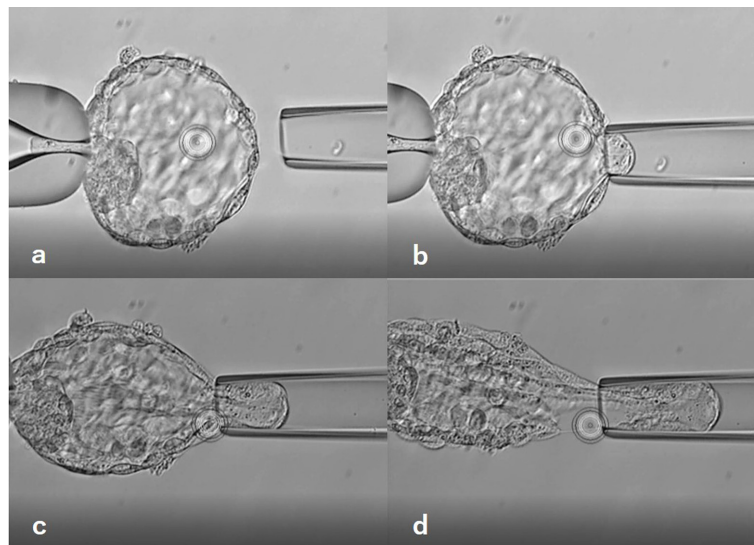


図7 BL6のバイオブシー
 a : ICM側を固定, b : 必要な細胞をピペット内にゆっくり吸引, c : 細胞間の接着部分をピペットの先端付近に保ちレーザー照射, d : 吸引しながら細胞を剥離.

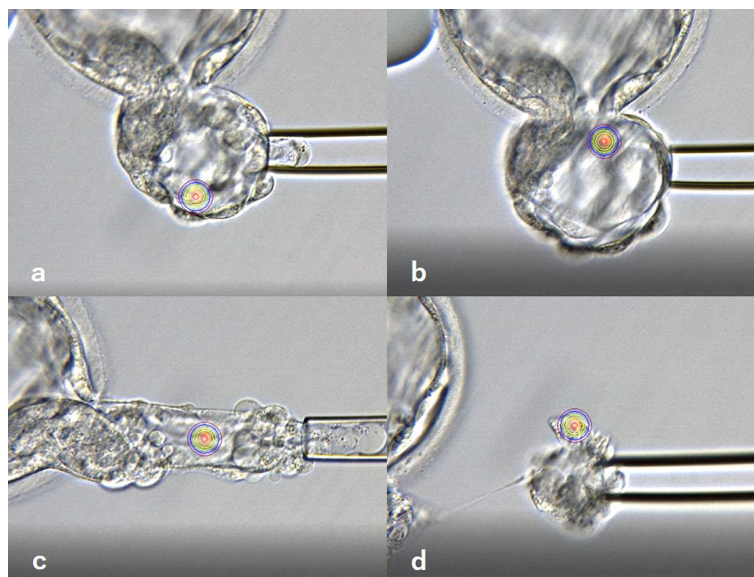


図8 ICM側が孵化した胚盤胞のバイオブシー
 a:ICMをホルド側で固定, b:ICMを避けながら, 細胞間の接着部(サークル内)にレーザー照射, c, d : 吸引しながら細胞を剥離.

が上手くいかない場合は、固定せずにバイオブシーピペットでTEを必要量吸引し、レーザー照射を行う。その後、ホールディングピペットの側面と擦り合わせるようにして切断する方法もある。ただし、透明帯がないため擦り合わせる位置によっては胚を圧迫し、変性させてしまうため注意が必要である。最後に、透明帯が残っている場合は開口部をレー

ザーで広げ、バイオブシーピペットを用いて透明帯内へ胚盤胞を戻すことで凍結融解が実施しやすくなる。

3. ICM側が孵化した胚盤胞 (図8)

分割期胚や凍結胚盤胞でAHAを実施すると、ICMの位置が正確にはわからずICM側から孵化してしまうことがある。

その場合はICMの位置を考慮し、適切な方法でバイオブシーを実施する必要がある。図8aのようにICMがヘルニア部分の片側によっている場合は、ICMがホールド側になるように固定し前述と同様に実施することが可能である。その際に孵化TEの細胞数を外周10細胞程度と多めにするとよい。

もし、ICMが中央に位置し避けるのが難しい場合は、BL6にしてバイオブシーを実施しているため、前述のBL6と同様の実施方法である。ただし、BL6になるまで待つと業務時間内に収まらない場合は、半分程度のTEができていればバイオブシーピペットを用いて引き出すこともよい。

採取した細胞のチュービング

1. 細胞洗浄用ディッシュの作製 (図9)

細胞洗浄用ディッシュはバイオブシー胚数に応じて60

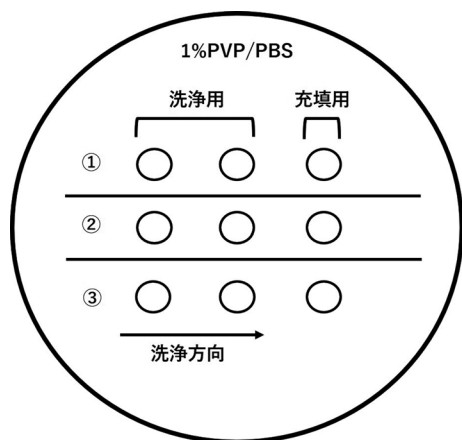


図9 細胞洗浄用ディッシュの作製

mmもしくは30 mmディッシュの蓋を用いて作製する。この場合も顕微操作用ディッシュと同様に細胞培養用ディッシュの底を使用すると、ディッシュの表面コートにより採取した細胞が接着してしまうため注意が必要である。作製するドロップは胚1個につき10 μ LのPVPを3個用意し、2個は洗浄用、1個はピペットの洗浄およびPVP充填用である。また、あらかじめPCRチューブにもドロップを作製するが、図10aのようにチューブ側面に作製すると細胞にピントが合わせやすくなる。ドロップの量は検査会社のWGA条件により異なるため、各プロトコルに沿って実施する。

2. 細胞のチュービング (図10)

細胞操作用のピペットには内径150 μ mのストリッパチップを採用している。まず、使用する前にストリッパチップは細胞の接着を防ぐため、PVPでピペット内壁をコートする。次に採取した細胞を顕微操作用ディッシュから細胞洗浄用ディッシュのPVPドロップへ移す。続いて、ストリッパチップ内の培養液およびPVPをすべて抜き、新しいPVPを充填する。採取細胞を1個目のPVPドロップから次のPVPドロップへ移し、2~3回ピペッティングにて細胞を洗浄する。再度、ストリッパチップ内のPVPを新しいものに置換し、細胞を吸引し可能な限りチップの先端で保持する。実体顕微鏡下にPVPの入ったチューブを置き、ストリッパチップをゆっくりとドロップまで近づける(図10b)。この際はできるだけ全体を捉えられる倍率で行う。チップがドロップの近くまできたところで、倍率をあげてドロップとチップのピントをしっかりと合わせ細胞を移す(図10c)。ドロップ内に細胞の排出が確認できたら(図10d)、素早くチップを抜き余分なPVPの混入は避ける。最後にストリッパチップ内に細胞が残っていないか確認し、卓上遠心機でチューブを遠心しドロップを底に落として、-20°Cで凍結保存す

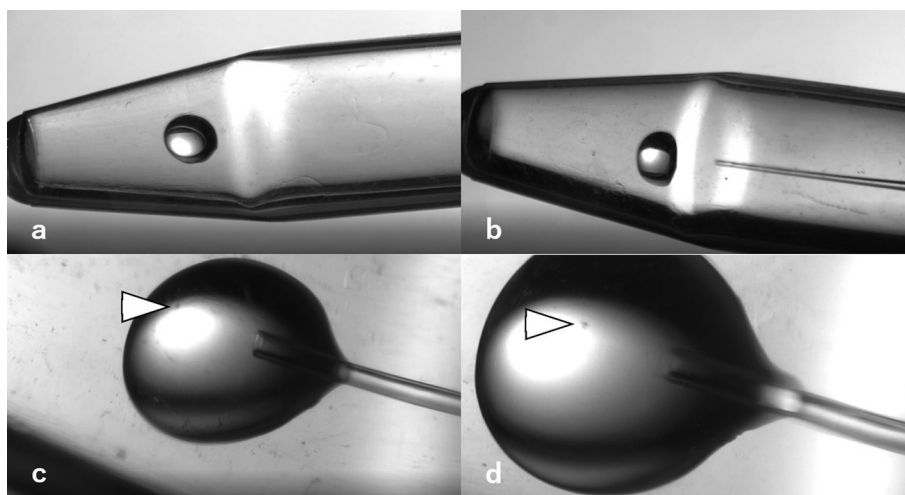


図10 採取細胞のチュービング
矢じり：バイオブシーしたTE.

る。これらの流れを一工程として、1細胞ごとに細胞洗浄用ドロップ作製とストリッパーチップ交換を行う。しっかりと細胞のチュービングが確認できたら胚凍結を行う。

バイオブシー後の胚凍結

バイオブシー後の胚凍結は検体と胚の番号を間違えないように細心の注意を払い、平衡化処理は個別で行うことが望ましい。凍結の時期はバイオブシーの開口部が閉じていれば問題ないため、必ずしも胚の拡張を確認する必要はない。また、体積増加した胞腔胚は不十分な平衡化による融解後の変性を引き起こす可能性⁴⁻⁶⁾もあるため、できる限り速やかに凍結した方がよい。

トラブルシューティング

ここでは上記での細かい注意点をトラブルシューティングとして解説する。

1. バイオブシーピペットの外部・内部に採取した細胞が接着した

ピペットの外部に接着した場合は、バイオブシーした胚盤胞からできる限り遠ざけ、ピペットホルダーをタッピングして取る。ドロップの境界で細胞を取ろうとすると、培養液とオイルの間に引っ付いてしまい取れなくなる恐れがあるので注意する。ピペットの内部に接着していることが確認できる位置に細胞がある場合は、PVPのドロップへ移動し十分な充填を行う。その後、軽くピペットホルダーをタッピングしながら、吸引・排出を実施し取るようにする。しかし、吸引・排出時にオイルや空気層が細胞を跨ぐとピペットに完全に接着し取れなくなるので注意する。また、細胞が見えない位置で接着して排出できない、もしくは吸引・排出しても取れない場合は、再度拡張するまで胚を回復培養し再バイオブシーを実施する。

2. DNAの増幅不良となった

バイオブシー時の一部細胞の膜変性や輸送時の温度変化などによるDNAの損傷などの理由により、5～10%程度はWGAによるDNA増幅が認められない場合がある⁷⁻⁹⁾。当院ではDNA増幅の認められなかった胚は再バイオブシーを行い再解析でき、診断不能率を減らせることを示している⁴⁾。さらに、数例ではあるが染色体正常胚も得られ、融解後も生

存しており妊娠し出産まで至っている(表1)。このことから、一度DNAの増幅が認められない場合でも再バイオブシーを行うことにより、移植可能胚を増やせるため有用であると考えている。

3. NGSの波形が乱れているもしくはモザイク胚が多い

モザイクが1か所のみであれば十分胚移植を検討してもよいが、優先順位は最下位にすることを推奨する。しかし、複数か所でモザイクやNGSの波形データが全体的に乱れている場合は、誤診断の可能性も考えられるため再バイオブシーを検討するのもよい。多くの場合は染色体異常であるが、これらの胚の中には染色体正常が含まれていることもある。そのため、当院では患者へ説明・同意のうえで、再バイオブシー可能胚は実施している。

また、このような波形の乱れやモザイクが散見される場合は、バイオブシーの手技に問題があることも考えられる。Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS)^{10, 11)}とCongress on Controversies in Preconception, Preimplantation, and Prenatal Genetic Diagnosis (CoGEN)¹²⁾のガイドラインでも、正確な診断にはTEを5～10個程度採取することを推奨し、レーザーを使用する場合は細胞間の接着部分を最少回数で行うこととしている。さらに、ART施設におけるモザイク発生頻度は5～10%とし、もしこれを超える場合は、卵巣刺激法、胚培養や生検方法などを見直す必要があるともしている。採取細胞数はDNA増幅不良やモザイク発生率に関連があり(表2)、当院では胚盤胞全体の数的異常をTEで正確に診断するには10細胞程度は必要と考えている。また、少数細胞で不正確な解析により再解析となると再バイオブシー・凍結が必要なため、一度のバイオブシーで十分な細胞量を獲得することが正確な解析には必須である。

最後に

臨床現場ではバイオブシー可能胚盤胞は全工程を適切に行い、検査会社へ移送し解析を行わなければならない。しかし、顕微授精時の卵子以上に胚盤胞はそれぞれに特徴があり、1胚ごとに手技の工夫が必要な場合もある。そのため、様々な場合のトラブルシューティングを考えておく必要がある。また、胚の拡張やヘルニア状態は時間経過で大きく変化をするため、ラボ業務に制約がかかることもある。また、

表2 採取細胞数がWGAおよびNGSの結果に与える影響

	胚数	採卵時 母体年齢	生検時 BL4BB以上	DNAの 増幅不良率	再生検時の 胚変性率	正常率	モザイク率
3-5細胞	63	36.8	33.3% ^a	12.7% ^a	1.6%	28.6% ^a	11.1% ^a
6-9細胞	160	36.5	56.3% ^b	5.0% ^b	0.6%	53.8% ^b	3.1% ^b
10細胞以上	54	37.3	59.6% ^b	1.9% ^b	0.0%	59.3% ^b	6.3%

採取細胞数別に異符号間で有意差あり ($P < 0.05$)。

胚と検体の個別管理・識別を正確に実施できていないと、すべての工程が台無しとなる。そこで、現状のラボに合わせた胚盤胞の観察やバイオプシーのタイミングを検討することで、無理のないラボワークにすることが重要である。

本稿では胚盤胞バイオプシー実施の要点について概説した。しかし、最も大切なのはどのような状況においても対応できるように、様々なバイオプシーやチュービングの方法を身につけ、トラブルが発生した際は焦らず落ち着いて実施することである。

文 献

- De Munck, N., El Khatib, I., Abdala, A., El-Damen, A., Bayram, A., Arnanz, A., Melado, L., Lawrenz, B. and Fatemi, H.M. (2020): Intracytoplasmic sperm injection is not superior to conventional IVF in couples with non-male factor infertility and preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A). *Hum. Reprod.*, 29, 317–327.
- Palmerola, K.L., Vitez, S.F., Amrane, S., Fischer, C.P. and Forman, E.J. (2019): Minimizing mosaicism: assessing the impact of fertilization method on rate of mosaicism after next-generation sequencing (NGS) preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A). *J. Assist. Reprod. Genet.*, 36, 153–157.
- 中野達也・赤松芳恵・佐藤 学・橋本 周・姫野隆雄・大西洋子・井上朋子・伊藤啓二郎・中岡義晴・森本義晴 (2013) : 着床前診断を目的とした成長段階別の胚盤胞栄養膜細胞採取についての検討. *受精着床誌*, 30, 29–32.
- Darwish, E. and Magdi, Y. (2016): Artificial shrinkage of blastocoel using a laser pulse prior to vitrification improves clinical outcome. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 33, 467–471.
- Kovačić, B., Taborin, M. and Vlaisavljević, V. (2017): Artificial blastocoel collapse of human blastocysts before vitrification and its effect on re-expansion after warming - a prospective observational study using time-lapse microscopy. *Reprod. Biomed. Online*, 36, 121–129.
- Chen H.H., Huang C.C., Cheng E.H., Lee, T.H., Chien, L.F. and Lee, M.S. (2017): Optimal timing of blastocyst vitrification after trophectoderm biopsy for preimplantation genetic screening. *PLoS One*, 12, e0185747.
- 中野達也・中岡義晴・松本由香・庵前美智子・佐藤 学・橋本 周・森本義晴 (2017) : 当院における均衡型相互転座症例を対象としたarray comparative genomic hybridizationを用いた着床前診断の現状. *受精着床誌*, 34, 147–151.
- Alfarawati, S., Fragouli, E., Colls, P. and Wells, D. (2011): First births after preimplantation genetic diagnosis of structural chromosome abnormalities using comparative genomic hybridization and microarray analysis. *Hum. Reprod.*, 26, 1560–1574.
- William, B., 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.
- Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (2016): PGDIS position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage. *PGDIS Newsletter*, 19.
- Cram, D.S., Leigh, D., Handyside, A., Rechitsky, L., Xu, K., Harton, G., Grifo, J., Rubio, C., Fragouli, E., Kahraman, S., Forman, E., Katz-Jaffe, M., Tempest, H., Thornhill, A., Strom, C., Escudero, T., Qiao, J., Munne, S., Simpson, J.L. and Kuliev, A. (2019): PGDIS position statement on the transfer of mosaic embryos 2019. *Reprod. Biomed. Online*, 39, e1–4.
- Controversies in Preconception, Preimplantation and Prenatal Genetic Diagnosis (CoGEN) (2016): Position statement on chromosomal mosaicism detected in preimplantation blastocyst biopsies. *IVF Worldwide. Virtual Academy of Genetics*. Available at: <https://ivf-worldwide.com/cogen/oep/publications/cogen-position-statement-on-chromosomal-mosaicism-detected-in-preimplantation-blastocyst-biopsies.html>. Accessed February 26, 2017.