

ーテクニカルノートー

特集：PGT-A のラボワークのコツ

Laser & Pulling 法を用いた Trophectoderm (TE) Biopsy とその後の検体管理 Tips of trophectoderm biopsy procedure using the Laser & Pulling method and tubing for PGT

水田 真平

Shimpei Mizuta

リプロダクションクリニック大阪 〒530-0011 大阪市

Reproduction Clinic Osaka, Grand Front Osaka Tower A 15F, 4-20 Ofukacho, Kita-ku, Osaka 530-0011, Japan

要旨：着床前染色体スクリーニング (PGT-A) は ART におけるオプションの一つとなっており，国内でも臨床研究が開始され，今後より一層需要が高まる可能性がある．PGT-A に期待する目的は，胚移植あたりの妊娠率の向上と流産率の低下による，胚移植あたりの生児獲得率の向上だが，成績の向上を認めないという報告もあり，有用性は見解の一致を得ていないのが現状である．現在の PGT-A は，Trophectoderm (TE) Biopsy と NGS を用いた方法が主流であるが，有用性を認めないという報告のなかには技術的な問題を指摘するものもある．未だ一定の基準が定まっていない TE Biopsy 技術の一助となるよう，筆者らの施設で行っている Laser & Pulling 法を紹介したい．また，PGT-A を行う際の検体の安全な取り扱い方法や，保存および移送方法などについても参考にし，自施設に合う方法を見出すための一助としてほしい．

キーワード：PGT-A, TE Biopsy, Laser & Pulling 法

Abstract: Preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) is one of the options in ART worldwide, and clinical research has started in Japan. Therefore, there is a possibility that the demand for it will increase further in the future. It is anticipated that PGT-A will increase the pregnancy rate per embryo transfer and decrease the miscarriage rate, resulting in an improvement in the live birth rate per embryo transfer. However, some authors have reported observing no improvement in results, and there is no agreement on the usefulness of PGT-A. Currently, the common procedure for PGT-A is biopsy of trophectoderm (TE) and next-generation sequencing (NGS), but questioning its usefulness cite technical problems. We would like to introduce the Laser & Pulling method used at our clinic to assist the adoption of the TE Biopsy technique which is not yet standardized. In addition, we describe the safe handling, storage, and transfer methods of TE samples after biopsy, to help determine a method that best suits individual IVF centers.

Key words: PGT-A, TE Biopsy, Laser & Pulling

はじめに

1990年にX連鎖性遺伝性疾患に対して臨床実用が始まった受精卵遺伝子検査は，近年では着床前染色体スクリーニング (PGT-A) に応用され，ARTにおけるオプションの一つとなっている¹⁾．現在日本では，PGT-Aは日本産科婦人科学会により臨床研究として実施されている²⁾．PGT-Aは需要の増加とともに方法が改良され，当初はDay 3胚の1–2割球を採取し，FISHにて解析を行っていたが³⁾，近年では胚盤

(受付 2020年12月7日／受理 2020年12月26日)

別刷請求先：〒530-0011 大阪市北区大深町4番20号

グランフロント大阪タワー A 15階

リプロダクションクリニック大阪

e-mail: smizuta@reposaka.jp

胞のTrophectoderm (TE) を採取し、NGSで解析する方法が主流となっている⁴⁾。PGT-A導入の結果、流産率の減少や胚移植あたりの生児獲得率が向上するという報告も後押しして、需要はさらに伸びている^{5,6)}。しかしながら、TE Biopsyの技術が胚に与える負の影響に関して問題視されている報告も散見される⁷⁾。TE Biopsyは、レーザーやフリックを用いた方法が主流だが、ICSI以上に時間を要し、少なからず細胞を傷害することになる。技術の習得には修練が必要であり、その習熟度により胚への影響がでるであろうことを常に意識すべきである。これまでにBiopsyの方法に関して比較した報告は少なく、近年いくつかの方法が報告されているもの^{8,9)}、最も優れた手法についての統一した見解は得られていない。本稿では、胚発育への影響を低減するための工夫や、検査不能な胚を作らないため、再生検を必要としないために、「TE Biopsyから胚と検体の取り扱い」に関して、主に筆者の施設で行なっているLaser & Pulling法を中心に述べる。

方法

1. 概要

ラボワークのコツとして強調したい点は下線を引いているので参考にしたい。原則的に、準備段階からTEをPCR tubeに移すTubingまでの作業は、未滅菌のもので良いので必ず手袋を着用のうえ実施する。これは、万が一にでも起こり得るヒトの皮膚細胞などがPCR tube内に混入する可能性を防ぐためのものである。胚および細胞を扱う全ての工程はクリーンベンチ内で行う。また「取り違い」にも留意する必要がある。施設ごとに状況は異なるが、胚をBiopsy用のdishに移動するところから、胚を凍結保存タンクに収納するまで、およびTEをPCR tubeに吐出して冷凍庫に保管するまでの全ての工程を2人のスタッフでダブルチェックを行いながら実施することが望ましい。これによるマンパワーの増加が必要になるが、Tubingまでの工程は極めて煩雑で、胚No.とTE No.を紐付けし、dishおよびPCR tubeのダブルチェックも必要となる。「患者間」の取り違いのみならず、「胚間」の取り違いへ細心の注意を払わなければならない。また、Tubingとその後の検査施設への検体移送については、日本産科婦人科学会の認定するPGT-A検査施設(2020年11月現在16社、受託を行わない施設も含む)ごとに推奨される方法が異なるため、その推奨方法に準ずる必要がある。Biopsyのタイミングは、拡張の度合いやTE細胞数によって各施設で判断基準を設ける。また、胚盤胞の移植や凍結可否の基準は施設によって異なるが、Biopsyの実施可否についても患者負担費用と成功率を考慮して、基準を各施設で設定する必要があり、患者と相談することも必要かもしれない。

当院のBiopsyからTubingまでの方法の流れを図1に記す。具体的には、透明帯の開口はDay3にレーザーを用いて行い、タイムラプスインキュベーターでDay6(状況に応じてDay7)まで培養する。TE数とHerniation範囲を観察しな

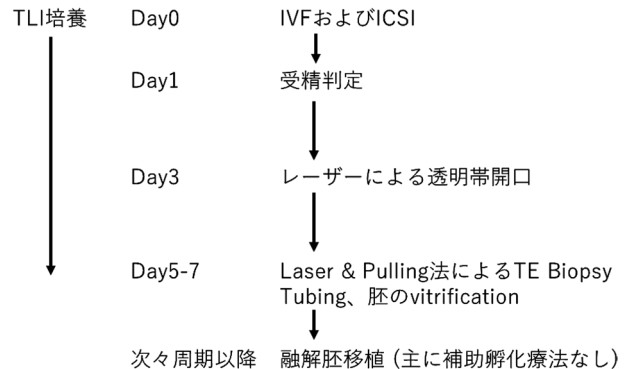


図1 筆者の施設におけるPGTのためのTE Biopsyフローチャート
TLI: タイムラプスインキュベーター, TE: trophectoderm.

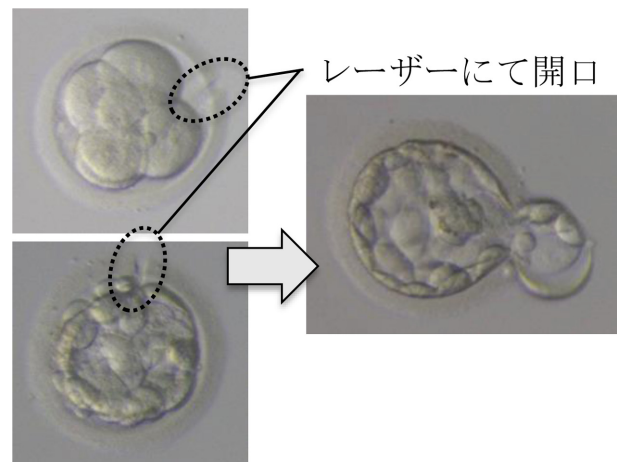


図2 左上: Day3に開口, 左下: Day5融解直後に開口(孔サイズは約10 μm), 右: Herniationの様子。

がら、Biopsy可能と判断した胚は、順次レーザー照射と引き伸ばしを交互に行うLaser & Pulling法を用いてBiopsyを行う。

2. 透明帯の開口 (Day 3)

Day3に、胚を培養していたタイムラプスdishを倒立顕微鏡下に置き、レーザー照射システム(Saturn 5 Active, Research Instruments, UK)を使用し、Biopsy mode, φ10 μmに設定し、囲卵腔が比較的広い箇所に、内側から外側に向かって3-4 shotsで開口する(図2)。その後、タイムラプスインキュベーターで培養し、細胞の数とHerniation範囲を経時的に観察するとBiopsy実施のタイミングを図りやすい。凍結胚盤胞に行う場合は、融解直後の収縮している時点でICMと離れた位置に同様の方法で開口する。

3. TE Biopsy (Day 5-7)

胚盤胞期の胚を観察し、開口部からHerniationしている胚から順次Biopsyを行う。図3のようにBiopsy用のdish(Nunc IVF dish 150265, thermo scientific)を作成する。1枚のdishで同時に胚を入れて行う個数は最大3個までとして、3個のBiopsy用HEPES含培養液(ORIGIO Handling, ORIGIO, Denmark)ドロップと、それぞれのピペット洗浄用の10% PVP (PVP Clinical Grade, ORIGIO) のドロップを作成し、オイル(Light Mineral Oil, Irvine Scientific, USA)を被せる。胚をそれぞれのNo.のBiopsy用ドロップに移す。この際の胚操作はφ200–250 μm程度の太めのピペットを使用して優しく慎重に行い、胚を収縮させてしまわないよう留意する。Biopsy用dishの底を傷付けるとTEが引っかかって付着することがあるので注意する。まず、ホールディングピペットと内径約25 μmのBiopsyピペット(MBB-FP-XS-30, ORIGIO)を10% PVP内に浸け、外側と内部にTEが貼りつきづらくする。BiopsyピペットはオイルとPVPを5回程度

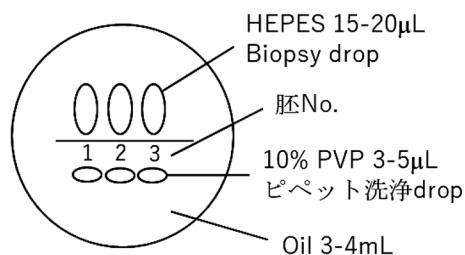


図3 Biopsy用dish

交互に吸引しておくとも吸引を緩慢にできるため操作しやすくなる。最後にPVPを多めに吸引し、吸引圧はゼロにしておき、ピペット内にできる限り培養液を吸わないように注意する。ピペット内に培養液が多く流入すると、吸引速度が早くなるなど調節が困難となる。

図4のように胚のHerniationしているTE先端部分にピントを合わせ、ホールディングピペットで胚を吸引固定する。この際、ICMの位置が分からなくなりにできるようにできる限り視認できる位置に合わせるのが望ましい。BiopsyピペットでTEをわずかに吸引し、左右に引き伸ばす。吸引は一気にではなく圧を徐々に強弱しながら行ない、吸引圧で胞腔に穴を開けてしまわないように注意する。吸引圧で穴が開くと、そこから胞腔液が吸引されてしまい、一気に胚盤胞が収縮して、Biopsyが困難になる。遺残割球やフラグメントは検査結果のエラーを招く恐れがあるため、混入しない様に留意し、吸引のみで簡単に剥がれるものはフラグメントの可能性が高いため検査に使用しないことを勧める。採取細胞数は5–8細胞を目標として採取するTEをある程度想定したうえで、レーザー single pulse, 500 ms (約φ9 μm)で、上端か下端の細胞の間隙を狙いレーザーを1発照射し、収縮させる。その後左右に強く引き伸ばし、可能な限り細胞の間隙を狙いさらにレーザーを1発照射し、この工程をTEが胚から剥がれるまで繰り返す。ある程度剥がれそうな状態になれば、レーザー照射ではなく、両側に引っ張ることでTEを引き剥がす。レーザー照射の際、TEを常に引っ張った状態を維持することが重要で、レーザーで切るというよりは「レーザーを当てた部分から引き剥がす」というイメージで行なう。TEはわずかに吸引する程度として、引っ

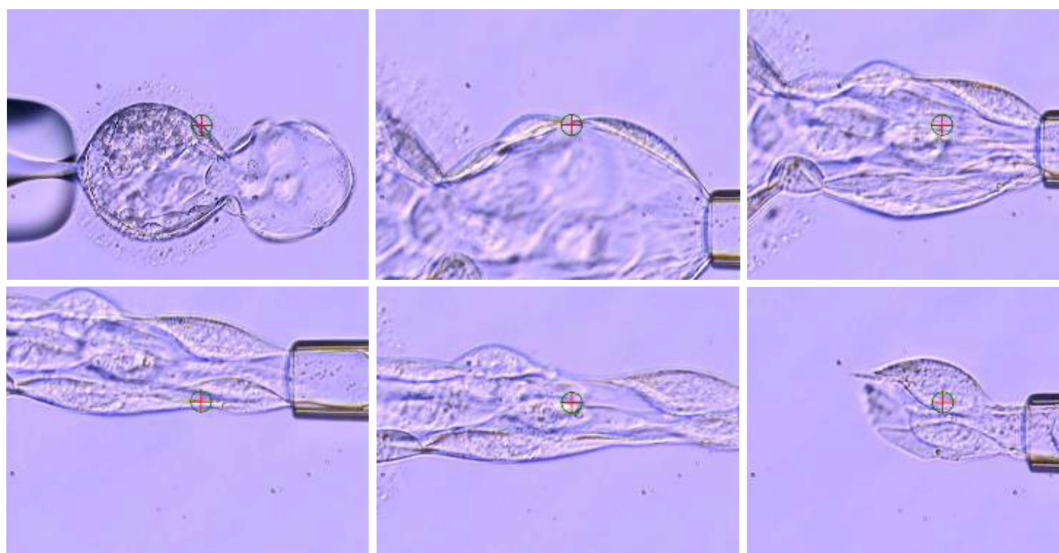


図4 Laser & Pulling法によるBiopsy. Gardner分類Grade3–4に相当。開口部よりHerniationしており、Biopsyを行ないやすい胚盤胞。左右のピペットで細胞を引き伸ばしながら細胞の間隙にレーザー照射してTEを剥がす。強い吸引圧をかけてTEを引き伸ばそうとせず、ピペットを左右に離して細胞を引き剥がす方が良い。

張った際にBiopsyピペットからTEが抜けそうになった場合に、再度左にBiopsyピペットを押し当てTEとの隙間をなくして軽く吸引し、再度右に引っ張る。常にTEとBiopsyピペットの内側に隙間ができていない「栓」がされている状態であると常に引っ張った状態を維持できる、これがPulling法の肝になる部分である(図5)。ピペット内側と吸引している細胞の間に隙間ができると培養液が流入し、吸引速度が極端に早くなり調節が困難となるため、できる限り培養液を吸わないように注意する。TE分離後は、速やかに胚を培養液に戻す。TEはBiopsyピペットの先端に貼りつくことが

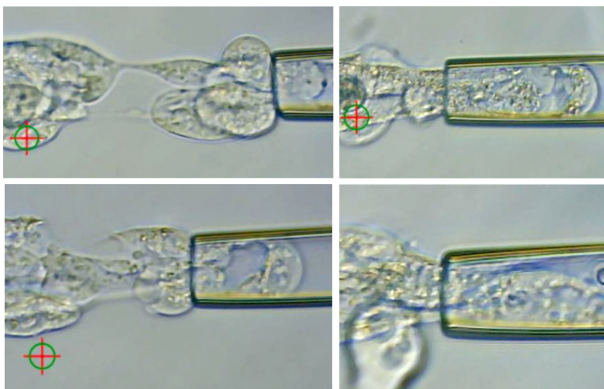


図5 左：Biopsyピペット内壁と吸引しているTE間に隙間がなく「栓」がされておりPullingが行える良い状態。右：内壁とTE間に隙間がある状態。Pullingがしっかりと行えず、ピペットのみが左右に動く不良な状態。Pulling法は強く引っ張ることでTEを薄くさせ、細胞間隙にレーザー照射しやすい状態にすることで剥がしやすくなる。

よくあるが、ピペットホルダーの締め付けネジのあたりを指先で軽く叩くか、それでも取れない場合は爪で強めに弾けば取ることができる。培養液とオイルの境界面を使用して無理に剥がそうとするとオイルに付着して回収困難となるためおすすめしない。胚凍結はTEのTubingが終了した時点で速やかに行い、回復培養は行わなくて良い。基本的に胚移植の際は補助孵化療法を行わないで良い。

ICMからHerniationしている胚の場合は、Biopsyの直前に開口する方法でBiopsyを実施する(図6)。ICM周辺からHerniationしている胚盤胞においては、Herniationした部位にレーザーを用いてBiopsyすることで、ICMを傷害してしまう危険性があるため別の部位から行う。Herniation部を90°回転させ、出力を極力弱めたレーザーを用いて、胚を収縮させないようにおよそ25 μm程度の幅で透明帯を開口する。開口部よりBiopsyピペットを囲卵腔内に侵入させ、徐々にTEを吸引し、右方向への引き伸ばしを繰り返し行い、TEの一部を透明帯の外へ引き出す。その後、前述の方法と同様の手順でBiopsyを行う。なお、本法は透明帯に2箇所穴が開いている状態となるため、凍結融解胚移植に用いる際は、アシステッドハッチングにより完全に脱出させるか、極めて大きな開口を行った方が良いかもしれない。

完全脱出胚盤胞か、非常に大幅にHerniationしているPulling法だと透明帯から完全に脱出してしまう恐れがある胚盤胞には、Laser & Flicking法を使用する。完全脱出胚盤胞や大きくHerniationしている胚盤胞は、胚を強くホールドできないためLaser & Pulling法ではTE剥離が困難である。軽くホールディングピペットで吸引して固定している状態で、切断したい部位までBiopsyピペットで徐々に吸引を行い、切断したい部位の上端と下端にレーザーを1発ずつ照射

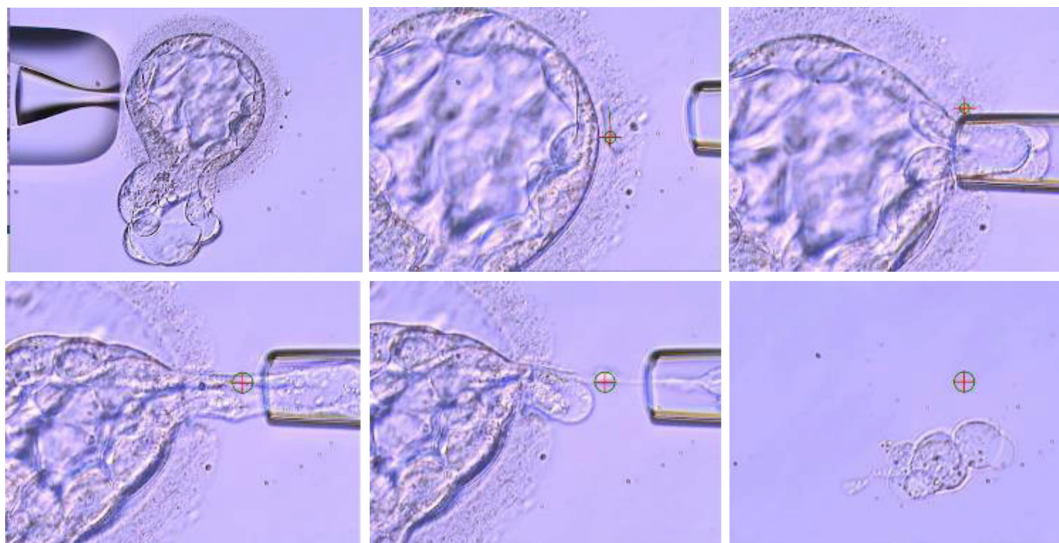


図6 ICM周辺からHerniationしている胚盤胞。90°回転させ、出力を弱めたレーザーによって胚を収縮させずに透明帯を開口する。ピペットを囲卵腔内に侵入させ、吸引と引き伸ばしを繰り返し、TEの一部を透明帯外へ引き出し、Laser & Pulling法でBiopsyを行う。

(切れ込みを入れるイメージ)する。この際、吸引が困難な場合は1箇所レーザーを照射して収縮させてから吸引を再開すると吸引しやすい場合がある。また、細胞数が非常に多いなどの場合は、上端と下端に加えて中央部も合わせた3箇所レーザーを照射するとFlickingでの切れ残りが起こりにくい。胚をホールディングピペットから外して、切断したいTEの面をホールディングピペットの角とBiopsyピペットで挟み込み、Biopsyピペットをホールディングピペットに軽く押し当てながら、真下に弾く(Flicking)ようにBiopsyピペットを動かす。Flicking時は、ホールディングピペットとBiopsyピペットのピントがずれないように注意する。また、吸引圧が強過ぎて細胞を吸い込まないように吸引圧をゼロに近い状態にしておく。

4. Tubing

Tubingの工程は、ヒトの皮膚細胞を始めとする術者のDNAがPCR tube内に混入する可能性が最も高いため、必ず手袋を着用の上実施する。TE洗浄用dish (Falcon 353002, CORNING, USA)を作成する(図7)。dishはTubingの際にオイルの混入を防ぐためにオイルを被せないため、乾かないように直前に分注し、クリーンベンチ内のス

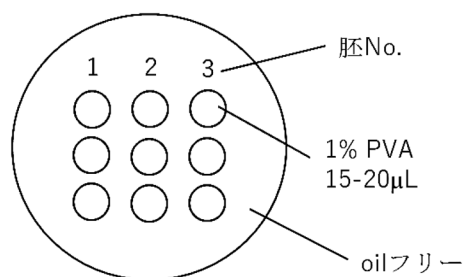


図7 TE洗浄用dish

テージウォーマーもオフにしておく。PCR tubeのフタと側面に検体No.を記載し、個別包装のEppendorf Tips (0030010019, Eppendorf, Germany)を用いて、2.5 mLのカルシウムイオンフリーPBS(検査会社指定のものが良い)をtubeの底に入れる。TEをφ120-140 µm程度の先端をフラットにしたピペット(ガラスでもシリコンでも良い)を用いて、1サンプルごとに3箇所の1% PVA (KG-PVA01, KITAZATO, Japan)中でピペッティング洗浄し、顕微鏡下でPCR tubeのPBS中に入れる(図8)。dishの底を傷付けるとTEが引っかかって付着することがあるので注意する。PCR tubeに入れる方法は、PCR tubeをdish蓋部の縁の部分に傾けて置く方法、底部の縁の部分に傾けて置く方法、真横に倒して置く方法などがあるが、筆者は通常の胚操作と同等の角度となる蓋を利用して傾ける方法を採用している。どの方法でも術者が操作しやすく細胞が視認できやすい方法を試して選択すれば良い。その後、確実に吐出できたことを確認するため再度1% PVAの中に残りの液を吐出する。PCR tube内でTEの吐出が視認できない場合もあるが、筆者らの経験ではこの工程でTEの再確認をすればDNA増幅されないことは極めて稀である。また、吐出されたように見えてもそれがTEではない場合もあり得るので、この再確認は非常に重要である。もしピペット内にTEが付着して吸引吐出を繰り返しても剥がれないことが視認できた場合は、PCR tube内でピペット先端を折り、ピペットの中にTEが入っている状態で通常通り移送する。蓋を閉めながら蓋の一部でテコの原理で折ると、折れた破片が飛んでしまうリスクも少なくできる。検査会社にはピペットの混入を伝えておく必要がある。蓋が開かない程度にパラフィルムを巻き(必要かどうか検査会社に要確認)、フラッシュ遠心でPCR tube底に落とし、-20°Cで保管する。TEの入ったPBSは少しの動作で側面に飛ぶことがあるので、遠心は必ず冷凍庫に保管する直前の最後の工程として行う。

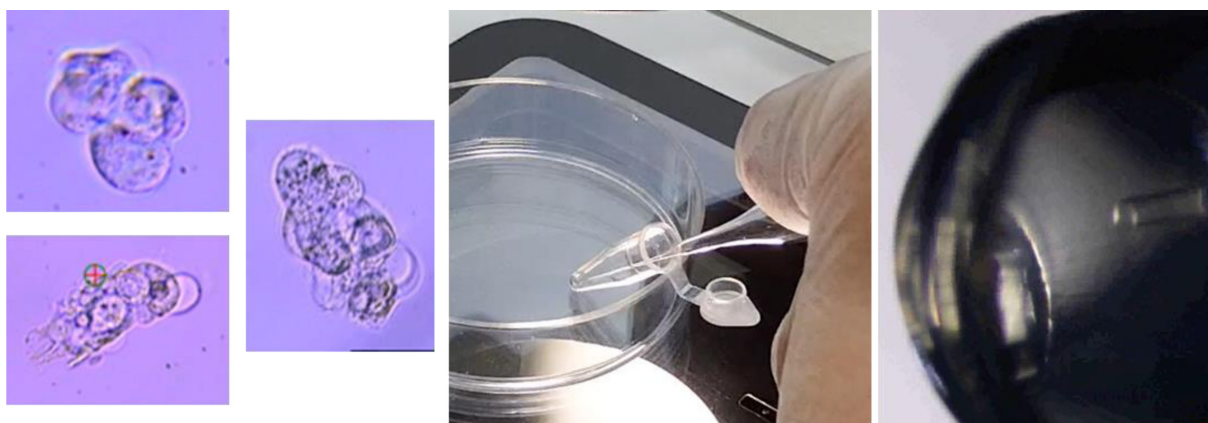


図8 TEをTubingしている様子。左：Biopsy直後のTE，中：Tubingの際にdishの縁に斜めに傾けておいたPCR tube，右：実顕微鏡下でtubeにTEを吐出する様子。採取する細胞数は5-8細胞程度が理想的で、TEの吐出とピペット内に残存していないか2人のスタッフで確認するのが望ましい。

5. 検体移送

PGTを検査会社に委託して行う場合は、冷凍状態が維持できることが検証された運送方法で行う。保冷剤を入れた発泡スチロール容器にPCR tubeを入れたチューブラックを緩衝材で動かない様に固定し、TEを凍らせた状態で検査会社に冷凍便で移送する。検査受託先までの移動距離や期間、配送業者の営業所の対応によって冷凍状態が維持されていなかったという報告もあるため、実際にPGTを臨床で行う前に温度ロガーなどを使用して移送中の温度を確認すること、サンプルを使用して問題なく検査できたかどうかの確認をする必要がある。

検査結果にノイズが多く解析不可である場合、温度管理、回収した有核細胞数が極めて少ない、回収したTEがBiopsyで著しく損傷している、細胞数に対して混入しているフラグメント量が多い、その他の細胞等の混入などが考えられるため、ノイズな結果の頻度が高い場合、各手技を振り返り改める必要がある。また、増幅されなかった場合は移送したPCR tubeにTEが入っていないことが疑われ、確実に入っているかどうかのダブルチェック、および視認できなかったケースとの関連性の検証が必要である。

おわりに

TE Biopsyを用いたPGTは、そこに至る手法が実にさまざまに施設によって異なる。何より、Biopsy時の胚盤胞は非常に個性に溢れ、行うたびに異なる変化をみせる。現時点では、PGT-Aの有用性や方法論に関して一定の見解が得られていないことを鑑み、どのような状況にも対応できるように、自施設に合うさまざまな方法を試してデータを集積し、さらにはトラブルシューティングも身に付けておく必要がある。また、焦らずパニックにならないことも非常に大切である。

文献

- 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.
- 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.
- Munné, 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.
- Brezina, P.R., Anchan, R. and Kearns, W.G. (2016): Preimplantation genetic testing for aneuploidy: what technology should you use and what are the differences? *J. Assist. Reprod. Genet.*, 33, 823–832.
- Dahdouh, E.M., Balayla, J. and García-Velasco, J.A. (2015): Comprehensive chromosome screening improves embryo selection: a meta-analysis. *Fertil. Steril.*, 104, 1503–1152.
- 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.
- 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.
- Yang, D., Feng, D., Gao, Y., Sagnelli, M., Wang, X. and Li, D. (2020): An effective method for trophectoderm biopsy using mechanical blunt dissection: a step-by-step demonstration. *Fertil. Steril.*, 114, 438–439.
- Rubino, P., Tapia, L., Ruiz, de Assin, Alonso, R., Mazmanian, K., Guan, L., Dearden, L., Thiel, A., Moon, C., Kolb, B., Norian, J.M., Nelson, J., Wilcox, J. and Tan, T. (2020): Trophectoderm biopsy protocols can affect clinical outcomes: time to focus on the blastocyst biopsy technique. *Fertil. Steril.*, 113, 981–989.