

—テクニカルノート—

特集：PGT-Aのラボワークのコツ

# ART LaboにおけるTE-Biopsyの実際

## TE-Biopsy practice at ART Labo

後藤 優介

Yusuke Goto

広島HARTクリニック 〒732-0822 広島市

*Hiroshima HART Clinic, 3-1-301 Matsubaracho, Minami-ku, Hiroshima 732-0822, Japan*

**要旨：**本邦では現在、日本産科婦人科学会により着床前胚染色体異数性検査 (PGT-A) の臨床研究が進められている。PGT-Aを実施するにあたって胚盤胞外細胞層のBiopsy (以下TE-Biopsy) は必須な技術である。TE-BiopsyはART Laboで行われる操作のなかで、最も侵襲的な操作でありPGT-Aの結果やBiopsy後の胚の生存性にも大きな影響を与える。当院では胞胚腔が拡張し細胞が十分増加した拡張期胚盤胞に達した時点でLaser Artificial Shrinkage (LAS) により胞胚腔を収縮させた後に、ICMの位置を確認しながらICMから離れた位置の透明帯を開口しTEをBiopsyする、という方法を選択している。本稿では当院でのTE-Biopsyの実際について紹介する。

**キーワード：**PGT-A, Biopsy, LAS

**Abstract:** The current status of clinical programs for preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A) in Japan is that authorization from the PGT-A committee of the Japan Obstetrics and Gynecology Society is necessary in order to conduct a PGT-A program. Theoretically, proper biopsy procedures of the trophoctoderm cell layer of human blastocyst are crucial for the success of a PGT-A program. Since biopsy is one of the most invasive techniques used at ART Labs, it can affect the survival of the biopsied blastocyst and the results of PGT-A. At our center, the biopsy procedure is performed at the expanded stage of the blastocyst, because plenty of cells are available for biopsy, instead of at the early or full blastocyst stage. Also, artificial shrinkage of the blastocoelic cavity with a laser pulse is always performed prior to biopsy, as well as confirmation of the location of intracellular mass (ICM), in order to avoid ICM cell damage due to opening of the zona with the laser pulse and the biopsy itself. In this article, our practical approach is presented in detail.

**Key words:** PGT-A, Biopsy, LAS

### はじめに

本邦では現在、日本産科婦人科学会により着床前胚染色体異数性検査 (PGT-A) の臨床研究が進められている。PGT-Aを実施するにあたって胚盤胞のBiopsy (以下TE-Biopsy) は必須な技術である。TE-BiopsyはART Laboで行われる操作のなかで、最も侵襲的な操作であり、TE-Biopsyの質がPGT-Aの結果を左右し、Biopsy後の胚の生存性にも

大きな影響を与える。その為、Biopsy手技やBiopsy後の細胞の取り扱いには細心の注意を払う必要がある。現在TE-Biopsyの手技には複数の方法があり、どの方法を選択するかはそれぞれのLaboの方針により異なってくる。当院では胞胚腔が拡張し細胞が十分増加した拡張期胚盤胞に達した時点でLaser Artificial Shrinkage (LAS) により胞胚腔を収縮させた後に、ICMの位置を確認しながらICMから離れた位置の透明帯を開口しTEをBiopsyする、という方法を選択している。この手法であれば、ICMの位置を確認しながらBiopsyをすることでTE-Biopsyの場所のコントロールができ、また細胞が十分に増えてからBiopsyを施行することで胚に対するBiopsyの影響をより軽減できる。本稿では、当院でのTE-Biopsyの実際について紹介する。

(受付 2020年11月30日/受理 2021年1月4日)

別刷請求先：〒732-0822 広島県広島市南区松原町3-1-301

広島HARTクリニック

e-mail: labo@hiroshima-hart.jp

準備品

- ・レーザー機器 (Saturn 5 Active: RI)
- ・Biopsy メディウム (G-MOPS PLUS: Vitrolife)
- ・10% PVP (KITAZATO)
- ・ミネラルオイル
- ・Biopsy ピペット : 内径 25 μm (MBB-FP-XS-30: ORIGIO)
- ・Holding ピペット (SHP-90-30: Sunlight Medical)
- ・1 well ディッシュ (FALCON353004)
- ・Transfer Pippet 3 ml (FALCON357575)
- ・0.2 mlPCR チューブ (検査会社のキットに付属)
- ・Wash Buffer (1%PVP-PBS: 検査会社のキットに付属)
- ・Tubing Buffer (1%PVP-PBS: 検査会社のキットに付属)
- ・胚移動用パスツール : 2本
- ・細胞移動用パスツール (直径約 100 ~ 150 μm) : 胚1個につき2本

I. 準備

Biopsy用ディッシュおよびPCRチューブの準備 (準備は手袋を着用する)

- ① Biopsy メディウム約 20 μl および PVP を 1 well ディッシュの蓋に図1のように分注し、ミネラルオイルでカバーする。
  - ② PCR チューブに傷や亀裂がないことを確認し、Tubing Buffer を 2.5 μl 分注する。
- ※ 当院では PCR チューブを準備する際、チューブの蓋と側面に検体番号の記載および検体識別バーコードを貼付している。

II. ピペットのセッティング

通常の ICSI と同様に Biopsy ピペットと Holding ピペットをマイクロマニピュレーターにセットする。

III. TE-Biopsy

Biopsyの対象となる胚の基準

- ・胚直径が 160 μm 以上の拡張期胚盤胞。
- ・Biopsy 後および凍結・融解後の生存性を考慮し形態良好胚に対して Biopsy を施行する。形態不良胚については患者の背景や治療歴等を踏まえて Biopsy を施行、または Biopsy をせずに凍結するなど判断する。
- ・適切なタイミングで TE-Biopsy を施行するためには胚盤胞発達の過程を注意深く観察する必要があり、Time Lapse Cinematography (TLC) での培養、観察は必要不可欠である。当院では全症例を TLC で培養している。

※ 作業は基本的に Biopsy 施行者と作業の補助者 2 人でダブルチェックを行いながら進める。

① Laser Artificial Shrinkage (LAS)

胞胚腔を収縮させるために外細胞層の境目に Laser を照射する (図2)。この際に胞胚腔液が抜けること (胞胚腔の虚

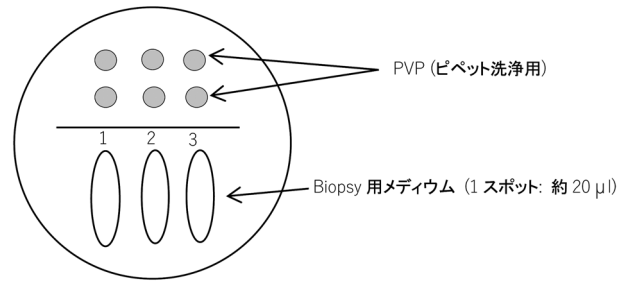


図1 Biopsy用ディッシュ



図2 Laser Artificial Shrinkage

脱)を確認する。この現象が確認できない場合はその後、胞胚腔が収縮しない可能性が高いため、再度 LAS を行い確実に胞胚腔液が抜けることを確認する。胞胚腔の収縮を確認後 Biopsy 用ディッシュへ胚を移動する (当院では LAS は培養ディッシュで行っている)。

- ・胞胚腔の収縮のスピード、収縮の程度は胚によって個体差がある為、LAS 後はいったんワーキングインキュベーター等に培養ディッシュを入れ、数分後に確認する。胚によっては完全に収縮しない場合もあるので、最大 5 分程度待っても収縮しない場合は Biopsy へ進む。

② Biopsy ピペットの rins

透明帯の開口直前に Biopsy ピペットの rins を行う。Biopsy ピペットを Biopsy 用ディッシュに作成した PVP のドロップ (上段) で数回 rins し、ピペット内部を PVP でコーティングする。PVP で rins した後に Oil, PVP (下段の PVP ドロップから) の順に吸引する。

- ・Oil を吸引することで Biopsy 時にマニピュレーションの反応が緩やかになり、操作性が向上するのでしっかりと吸引する。
- ・複数の胚を同時に行う際はこの操作を胚ごとに行う。Biopsy ピペットは胚ごとに交換する必要はないが、次の胚に進む際に PVP のドロップで吸引排出を繰り返し、よく洗浄する。ピペットに細胞が付着して取れない場合はすぐに交換する。

③ 透明帯の開口

胞胚腔が収縮し困卵腔ができたなら、ICM 側を Holding ピ

ペットで固定し、ICMから離れた位置の透明帯をレーザーにて開口する(図3).

- ・開口の幅はピペットの幅と同程度.
- ・Fragmentationのある場所はできるだけ避ける. Fragmentationがある場所を開口する場合は, ピペットを挿入する際にFragmentationを吸引しないように注意する.

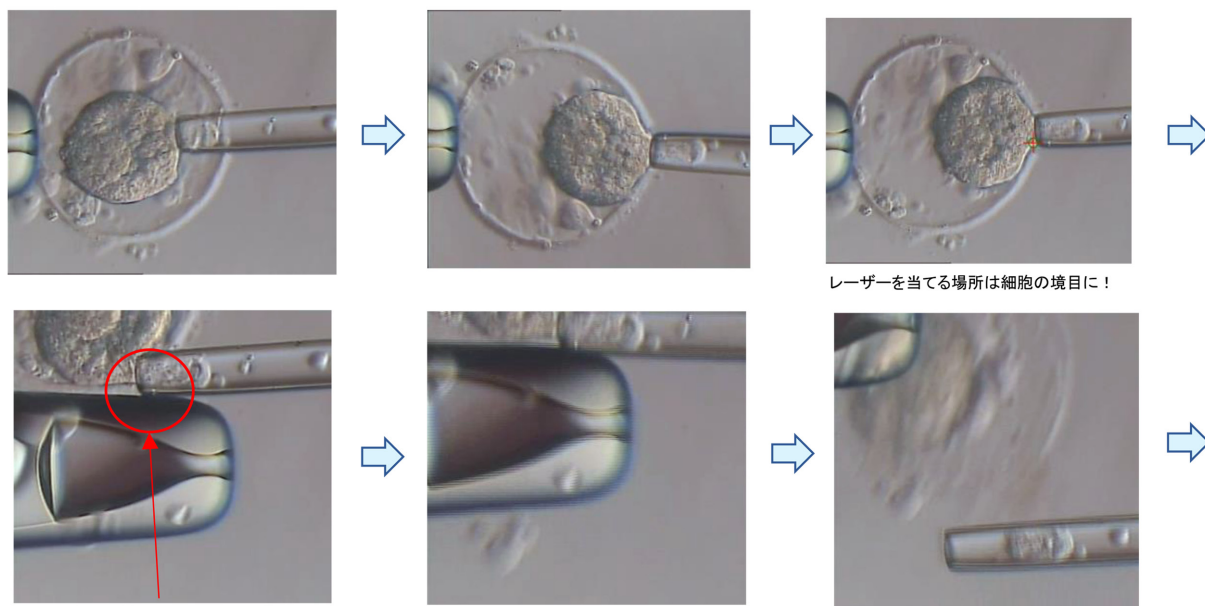


図3 透明帯の開口

- ・ICM側に困卵腔ができた場合は胚を転がし, できる限りICMから離れた場所を開口する.
- ・当院では作業は2人組で行っているため補助者がレーザーを照射している.

#### ④TE-Biopsy

透明帯開口部からBiopsyピペットを挿入しBiopsyピペットの先端を細胞に隙間がないようしっかりあてて吸引を始める. 細胞が少し吸引できたらゆっくりと細胞を透明帯の外へ引っ張っていく. この際, 細胞の吸引の強さに注意する. 吸引が強すぎると細胞膜が破れ, 細胞の保持が難しくなるので注意する. 吸引の圧は一定に保ち細胞を引き伸ばしながら少しずつ吸引していく. 採取する細胞数は5細胞程度を目標にし, 細胞を透明帯の外へ引き出したのち細胞の境界に対して数発レーザーを照射する. 筆者は吸引している細胞の上部, 中部, 下部の計3箇所の細胞の境界にレーザーを照射している. Biopsyピペットの細胞は吸引を保持したまま胚をHoldingピペットから離し, Holdingピペットの先端上部から下部へ振り下ろすように擦り合わせて(フリック)して細胞をBiopsyする(図4). Biopsy後, 細胞は胚から離



レーザーを当てる場所は細胞の境目に!

ホールディングピペットとバイオブシーピペットのピントをしっかりと合わせる



図4 TE-Biopsyの流れ

れた位置に排出する。

- ・レーザーを照射せずにフリックのみでもBiopsyはできるが、レーザーを細胞の境界に照射することによって、より容易にフリックすることができる。
- ・フリックする際、Biopsyピペットとホールディングピペットのピペットのピントを確実に合わせる事が重要である。ピントがずれていると1度でBiopsyできないことや、フリックの衝撃で不必要な細胞が引き出され胚にダメージを与えてしまうことがあるので注意する。
- ・Biopsyピペットの吸引が強すぎると、フリックし細胞が切れた瞬間に細胞がピペット上部に吸い込まれてしまい回収が困難になるので注意する。フリックした際に細胞がBiopsyピペット先端部に留まっているのが理想だが吸引が強いと感じたらフリックの際に細胞がBiopsyピペット上部に吸い込まれないように注意が必要である。
- ・当院では一度に行うBiopsyの個数を最大3個にしている。4個以上胚盤胞がある場合はLASを初めに全ての胚に施行し、その後Biopsyおよび細胞のTubingを3個ずつ施行している。

⑤ Biopsy 施行後、胚盤胞は培養ディッシュへ戻し、細胞のTubingが終わり次第凍結を行う

※ 当院ではBiopsyの動画を全て録画保存しており、PGT-Aの結果が波形の乱れやPCR時の増幅不良等で解析不能だった場合に動画を見直して、細胞の状態等をチェックし原因を考察している。

※吸引している細胞の細胞膜が破れた場合の対処

- ・細胞が保持できていれば、そのままBiopsyへ。
- ・細胞の保持が難しい場合は同じ場所で無理せず、Biopsyの場所を変更する。胚の状態により再度の吸引が難しい

場合は、透明帯開口部を広げてHatchingさせてからBiopsyを行うなど臨機応変に対応する。

※完全脱出胚盤胞に対するBiopsy

- ・HoldingピペットでICM側を軽く吸引し固定する。Holdingピペットの吸引が強すぎると細胞を吸引してしまうので注意する(吸引の強さは軽く胚を支える程度)。反対側の細胞をBiopsyピペットで軽く吸引後、採取したい細胞から少し離れた位置の細胞の境目にLASを行い、胚を収縮させる(収縮させずに吸引を続けると細胞が破れてしまう為。初めから収縮している場合はこのLASは必要なし)。胚が収縮すると細胞の吸引がしやすくなるので必要細胞数を吸引する。以後は通常のBiopsyと同様だがフリックの際の透明帯がないので、ピントが合わせ辛いので注意する(図5)。

IV. 細胞のTubing

※コンタミネーションを防ぐためゴム手袋を着用

① 細胞wash用のディッシュの作成(補助者が作成する)

10%PVPとWash Bufferを図6のように分注する。1個の胚につきPVPのドロップ1つとWash用のドロップ3つを分注する。

- ・PCRチューブにOilが混入しないようにOilのカバーはしない為、Biopsyが終わった後、Tubingの直前に作成する。
- ・同時に複数の胚の細胞をTubingする場合は細胞の混入を防ぐ為、一度使用したドロップは使用しない。

② Tubing

細胞がパスツールに付着することを防ぐためにPVPのドロップでパスツールをリンスする(1本目のパスツール)。1段目のWash Bufferを少し吸引し、実体顕微鏡下でBiopsy用

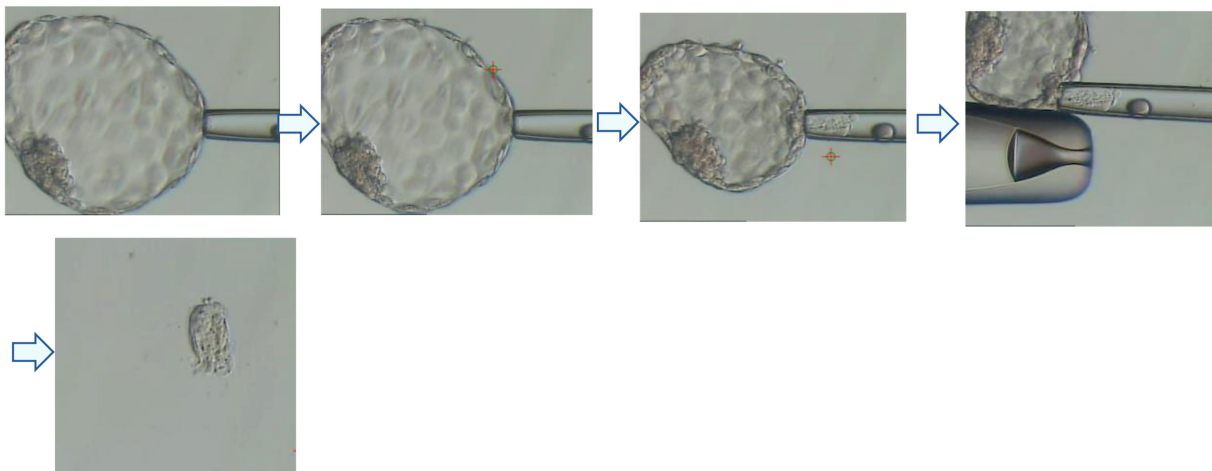


図5 完全脱出胚盤胞のBiopsy

ディッシュから細胞をWash Bufferのドロップに移動する。この際、Biopsy時に出た胚のFragmentationやドロップ内の細胞以外のゴミと間違えやすいので注意する。Wash Bufferに細胞を移動した後にOilがPCRチューブに混入することを防ぐため新しいパストツールに変える(2本目のパストツール)。各ドロップで3回程度細胞をwashし細胞をPCRチューブへ入れる。PCRチューブを顕微鏡のステージに置き、図7のように顕微鏡下で細胞がPCRチューブに入ったことを確認する。

- ・ Bufferの蒸発を防ぐ為、作業スペースのウォームプレートはオフにして室温で作業する。

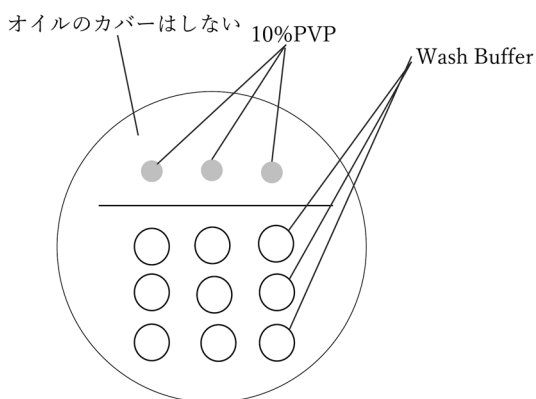


図6 細胞wash用ディッシュ

- ・ 細胞移動用のパストツールは2本用意しておき、胚ごとに交換もしくは引き直す。パストツールは太すぎると操作性が悪いので注意する。
- ・ 細胞をチューブに入れる際に、Wash Bufferを入れすぎると、その後の解析に影響があるのでBufferを入れすぎないように注意する。
- ・ パストツール内に細胞が付着した場合は慌てず吸引、排出を繰り返し、細胞を離す。どうしても回収できない場合や細胞の状態が不良の場合は再度Biopsyを行う。

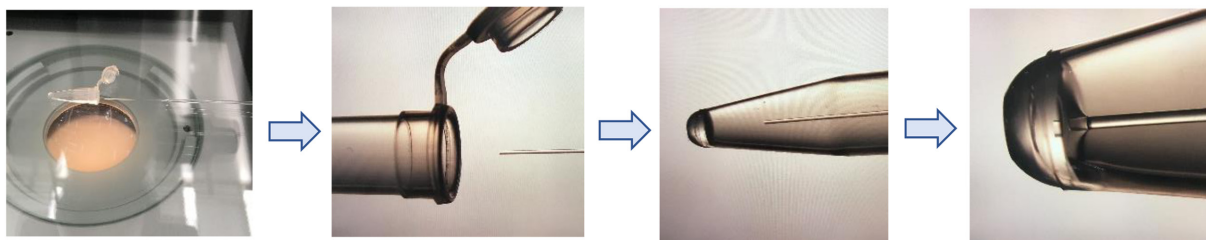
- ③ チューブへ細胞を入れた後は直ちに遠心を行い-20℃で冷凍保存する。

## V. 細胞の検査会社への移送

基本的に各検査会社の指示にしたがい、梱包、発送する。自施設でDNA抽出および増幅をせずに、細胞の状態で発送する場合は移送の過程で温度が上がらないよう細心の注意を払う。

### 最後に

TE-BiopsyはART Laboにおいて最も侵襲的な操作であり、上記に示したようにあらゆるステップで繊細な管理が必要となる。TE-Biopsyを施行する際、胚の発達速度やLASの反応の状態はいつも最適の状態とは限らず、状況に応じた臨機応変な判断が求められる。さまざまな状況に落ち着いて対応できるよう十分なトレーニングを積むことが重要である。



実体顕微鏡下で細胞がチューブに入ったことを確認する

図7 細胞のTubing