

2019.2.24 於JA共済ビルカンファレンスホール
日本受精着床学会
第15回ART生涯研修コース

ART Labo技術の最適化と生殖医療最前線 PGT-Aの最近の知見

医療法人 絹谷産婦人科
院長 絹谷 正之

今回の講演内容

1.「染色体数的異常」と妊娠

2.着床前胚の遺伝学的検査

- PGT-A ステップ① 胚生検
- PGT-A ステップ② 遺伝学的解析
- PGT-A ステップ③ 移植胚の選択

3.PGT-AとART成績

4.PGT-Aの課題

- ①細胞生検による胚へのダメージ
- ②モザイク胚の取り扱い
- ③判定の正確性
- ④児の長期フォロー

5.日本における着床前診断

着床前胚の遺伝学的検査法

① PGD (Preimplantation Genetic **Diagnosis**)

原因遺伝子座、染色体の明確な遺伝性疾患に対して着床前の胚を診断して、**遺伝的健常児を出産する目的で実施される受精卵診断**。

② PGS (Preimplantation Genetic **Screening**) ≡ PGT-A

胚の生検細胞の染色体分析、遺伝子解析を行い、de novoの変異を検査し、**Viabilityの高い胚を選別**する。遺伝性疾患の非保因者の**受精卵の染色体の数的異常の検出**。
海外では高齢女性、着床障害、反復流産、重度男性不妊などが適応。

着床前胚の遺伝学的検査法名

- ① PGD (Preimplantation Genetic **Diagnosis**)
- ② PGS (Preimplantation Genetic **Screening**)

狭義の「着床前診断」
=PGD(PGT-M, PGT-SR)
「着床前スクリーニング」
=PGT-A

広義の「着床前診断」
=PGT(着床前診断検査?)

PGT (Preimplantation genetic **testing**)

遺伝学的異常の検出やHLAタイピング
のための卵子や胚のDNA解析

(1) PGT-A: Preimplantation genetic testing **for aneuploidy**
着床前染色体異数性検査

PGS

(2) PGT-M: PGT **for monogenic/single gene defects**
着床前単一遺伝子欠損検査

(3) PGT-SR: PGT **for structural rearrangements**
着床前染色体構造異常検査

PGD

「PGT-A」の基本的な考え

ステップ① 胚生検



これまでのART:
胚の形態的・動

キーワード:「染色体数的異常」

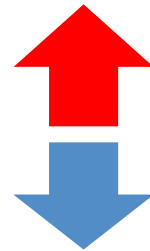


(元日に日で評価)

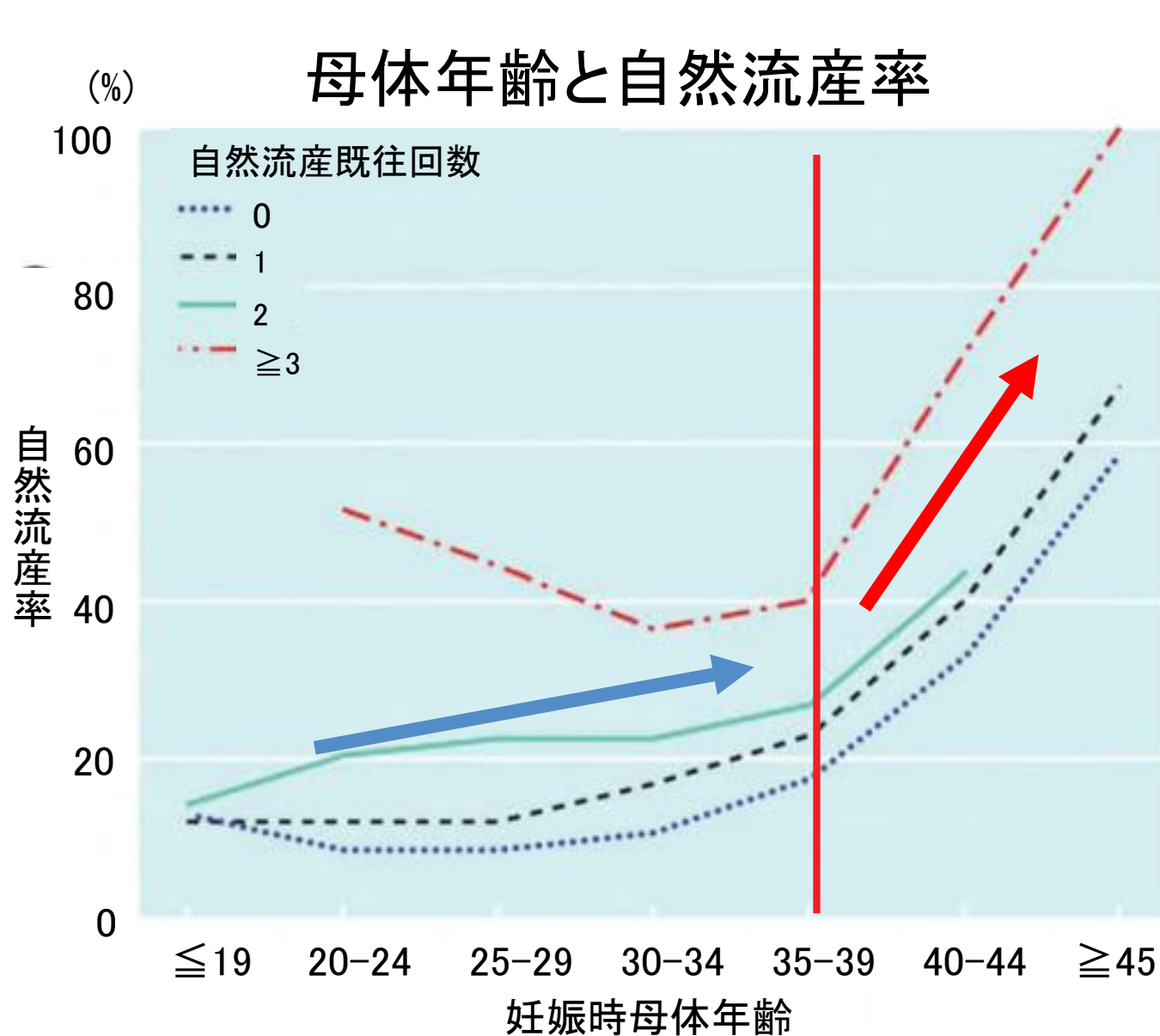
ステップ③ 移植胚の選択(中身で評価)



着床率
流産率



1.染色体数的異常と妊娠



Nybo Andersen AM, et al., BMJ. 2000 Jun 24;320(7251):1708-12.

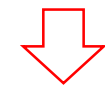
加齢



卵子の質の低下

透明帯の硬化
囲卵腔の狭小化
表層粒の移動・放出
遺伝子発現の制御の変化
卵成熟因子の減少
紡錘体の拡張
Caイオンの減少

染色体分配異常



受精率



胚盤胞発生率



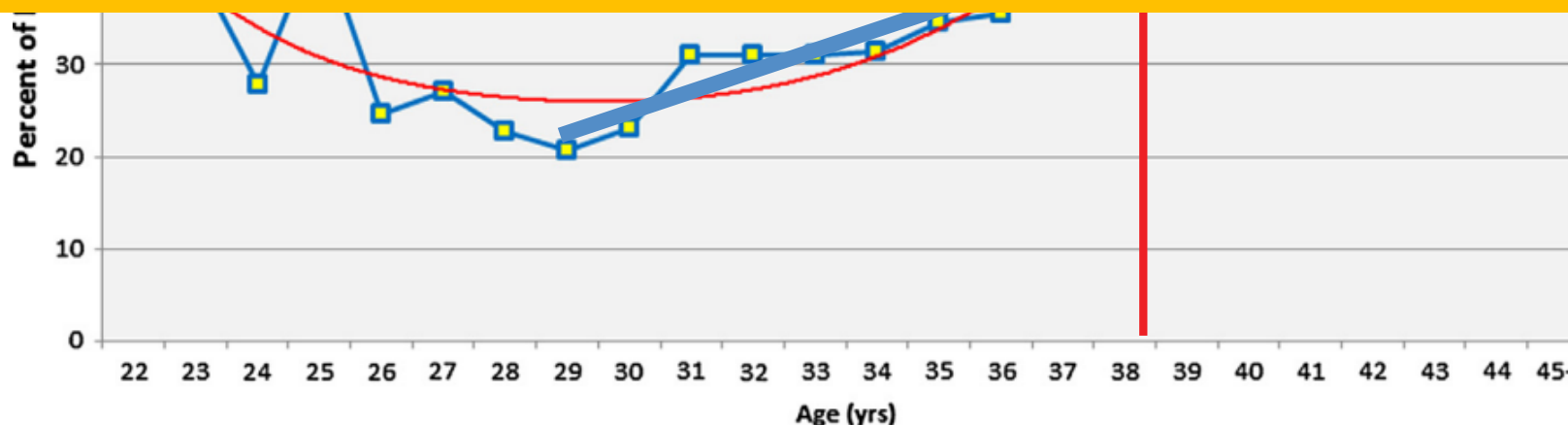
流産率



女性年齢と異数性胚頻度

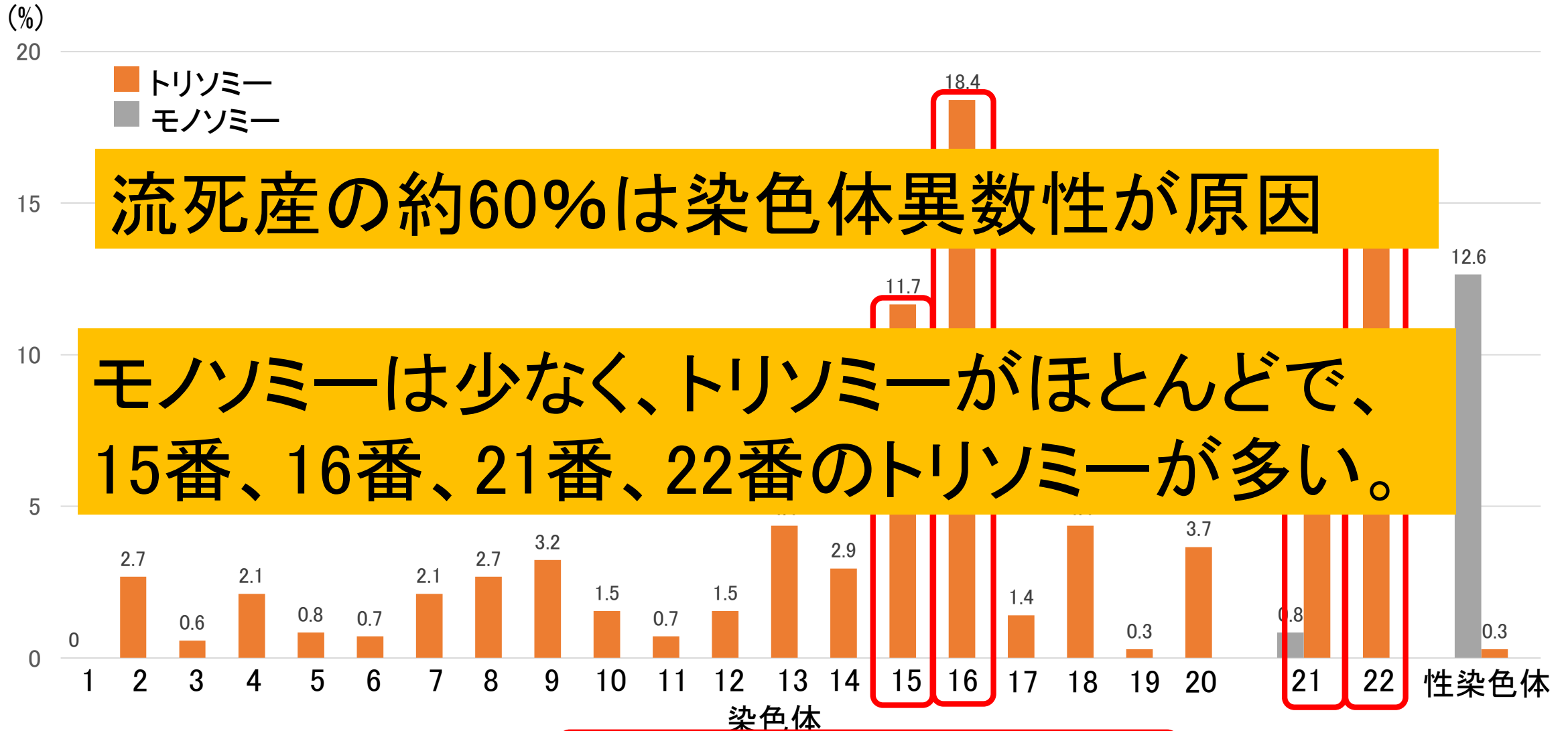


女性の年齢と流産頻度の関係と
女性の年齢と異数性胚頻度の関係が同じ傾向



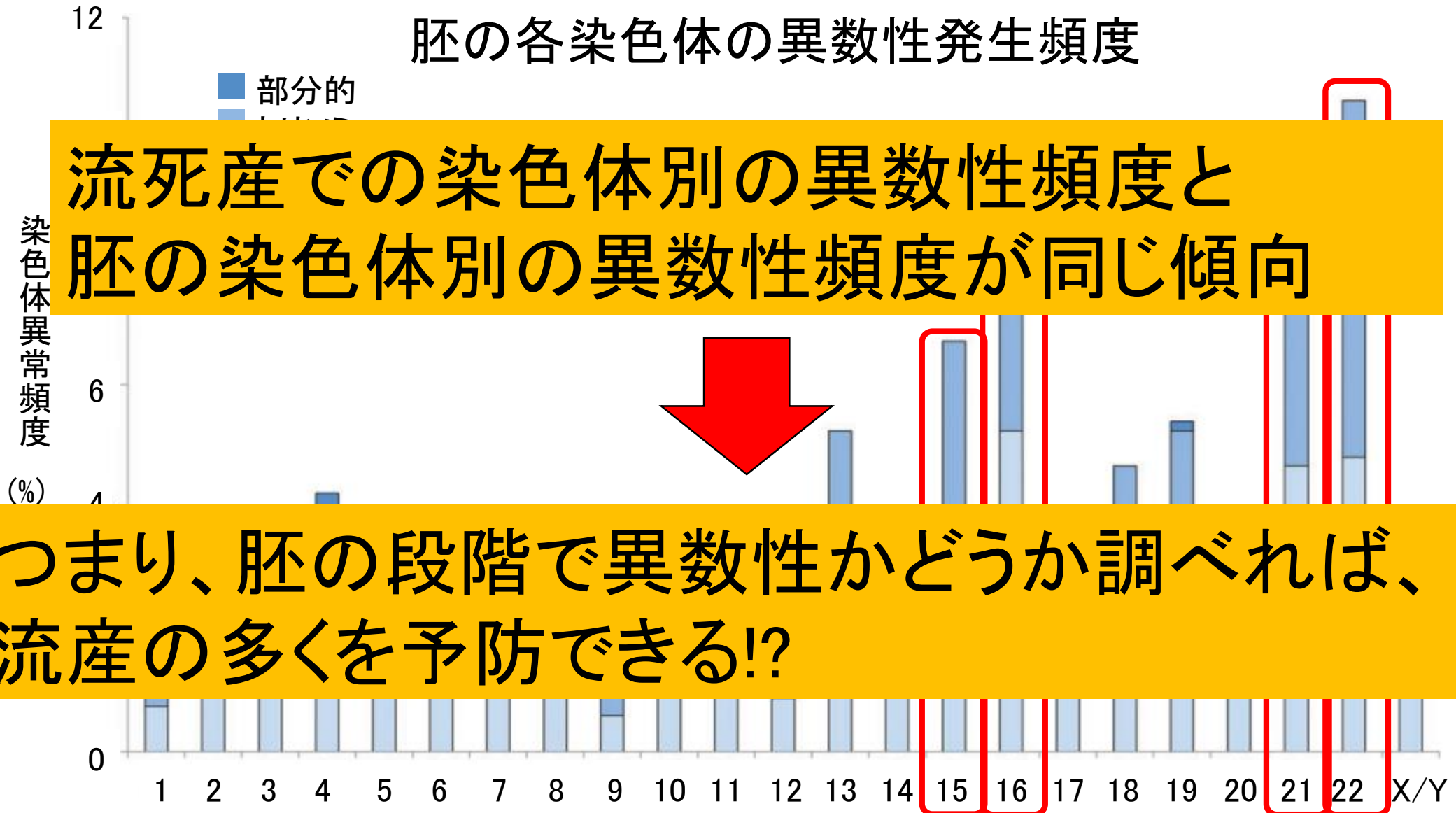
Blastocysts (equivalent to Gardner score of 3~6), TE biopsy, quantitative PCR or SNP array

流死産絨毛・胎児組織の染色体異数性頻度



対象：自然流産した流死産絨毛・胎児組織 1502例（正倍数性553例、核型異常949例:63%）
Gバンド法にて解析。その他、三倍体103例、四倍体22例

胚の各染色体の異数性発生頻度



患者: 37.8歳 (range 37.3–38.6)

TE biopsy, aCGH

2.着床前胚の遺伝学的検査

PGT-A ステップ①
胚生検

生検方法③(動画、胚盤胞)

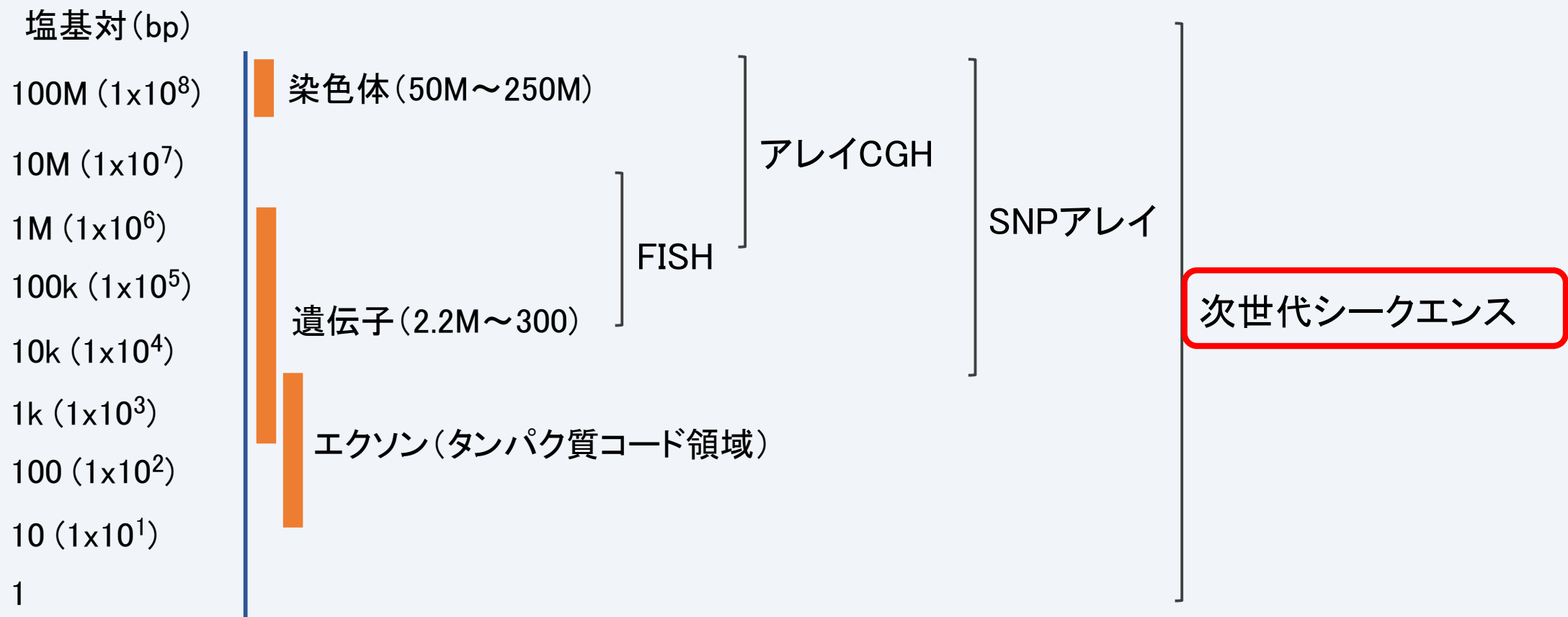
胚生検は少なからず「侵襲」を伴う

Flicking method
(フリック法)

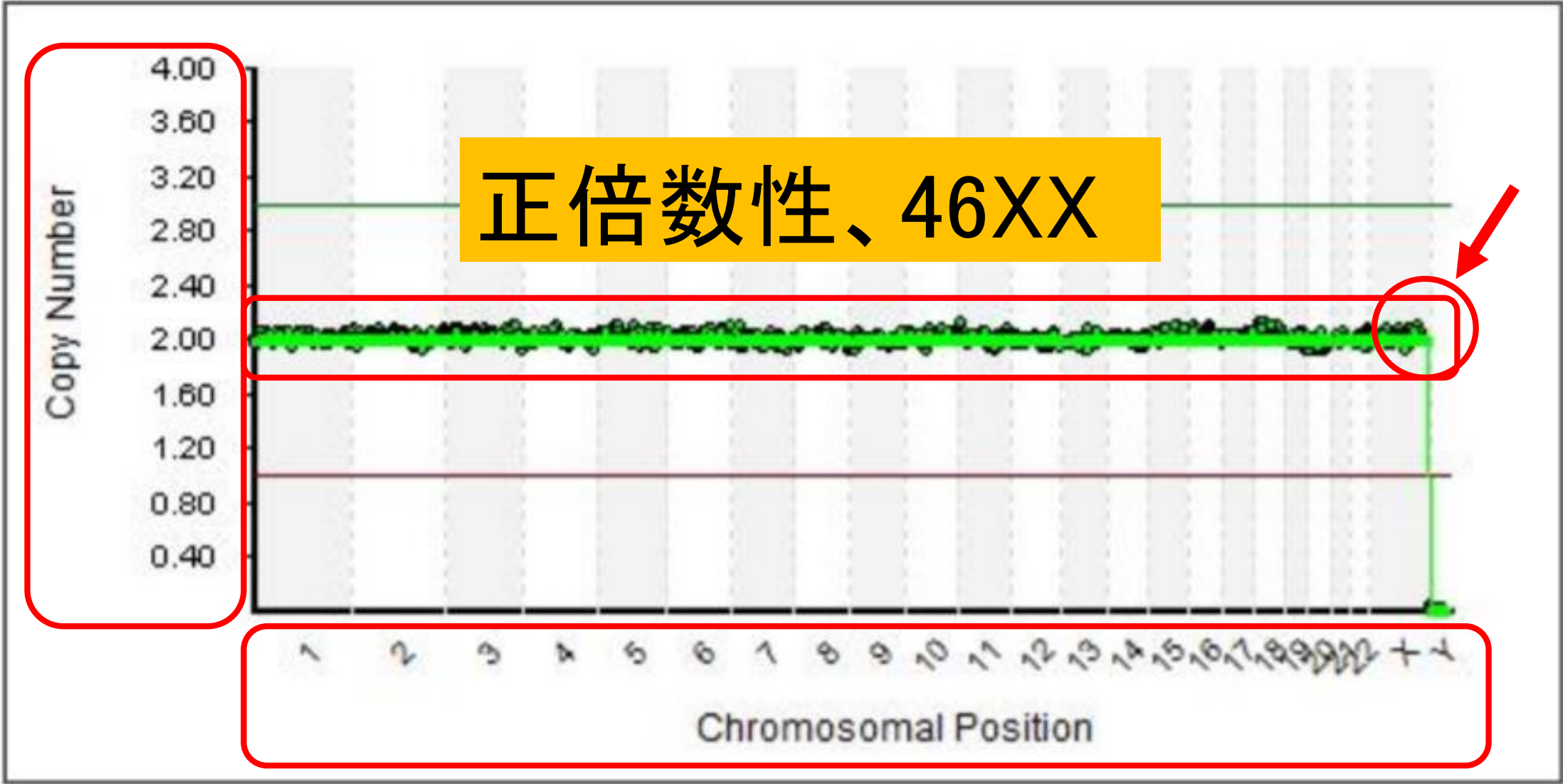
Pulling-stretching method
(レーザー法)

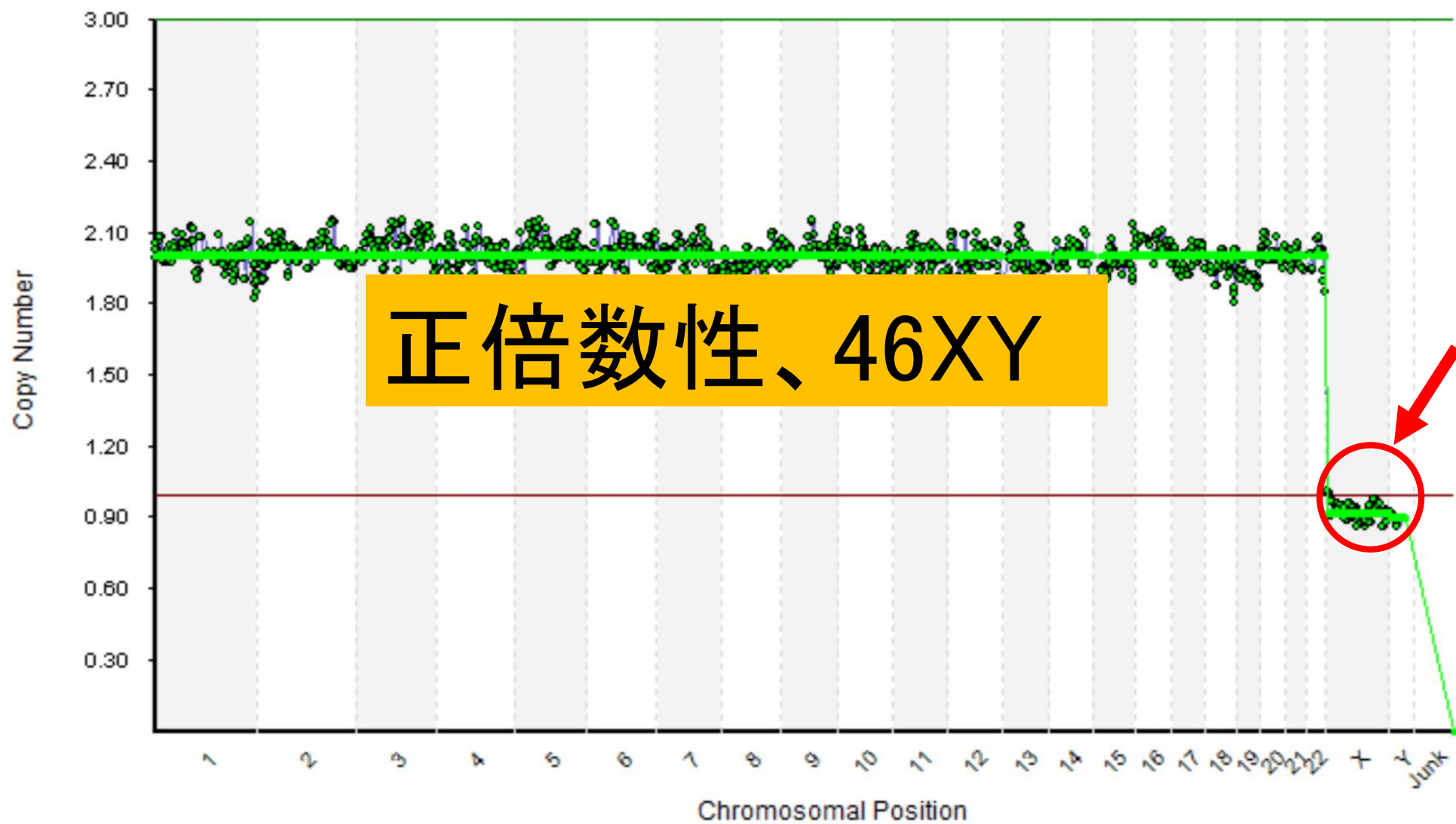
PGT-A ステップ②
遺伝学的解析

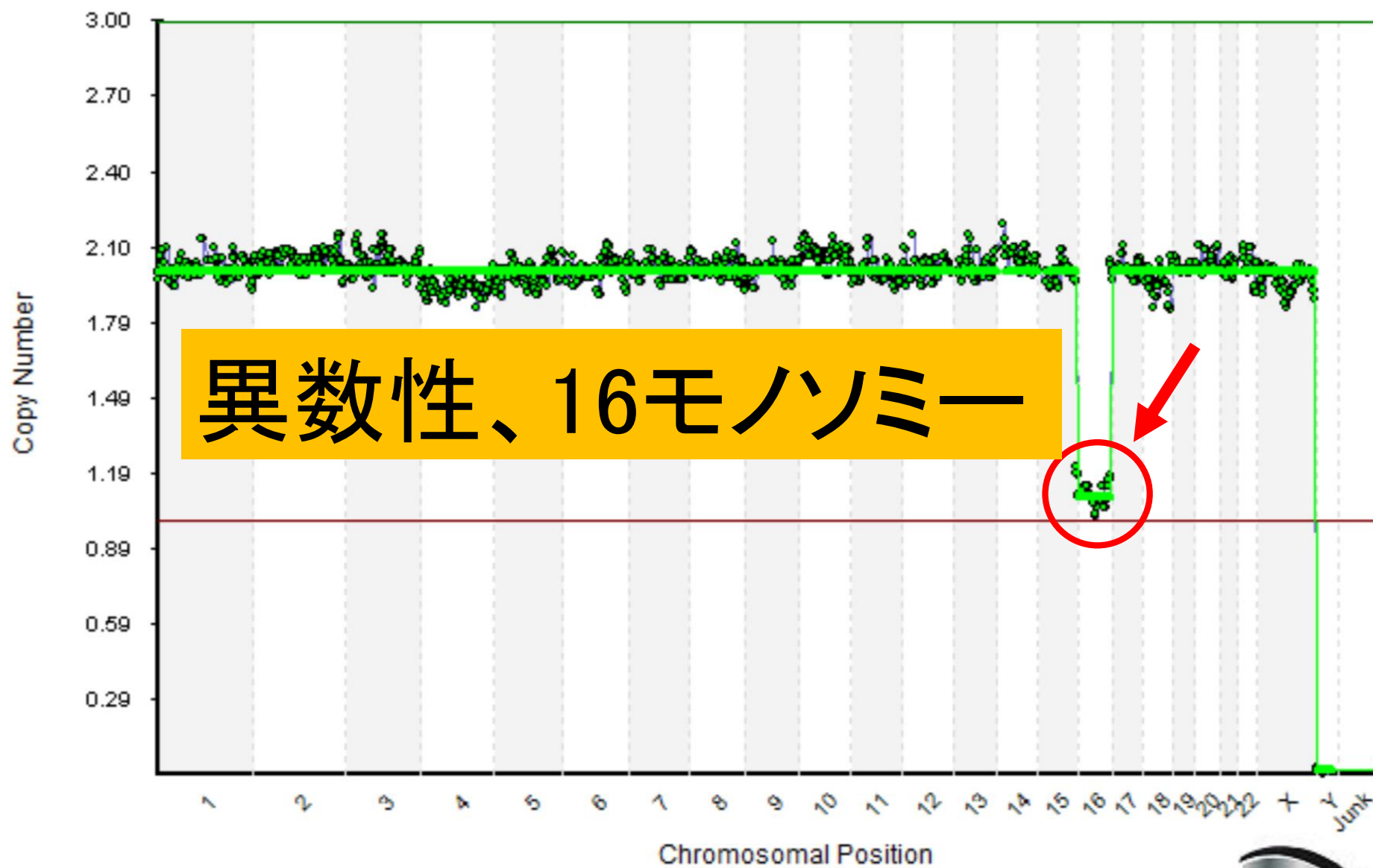
着床前胚の遺伝学的解析方法の種類と解析可能域

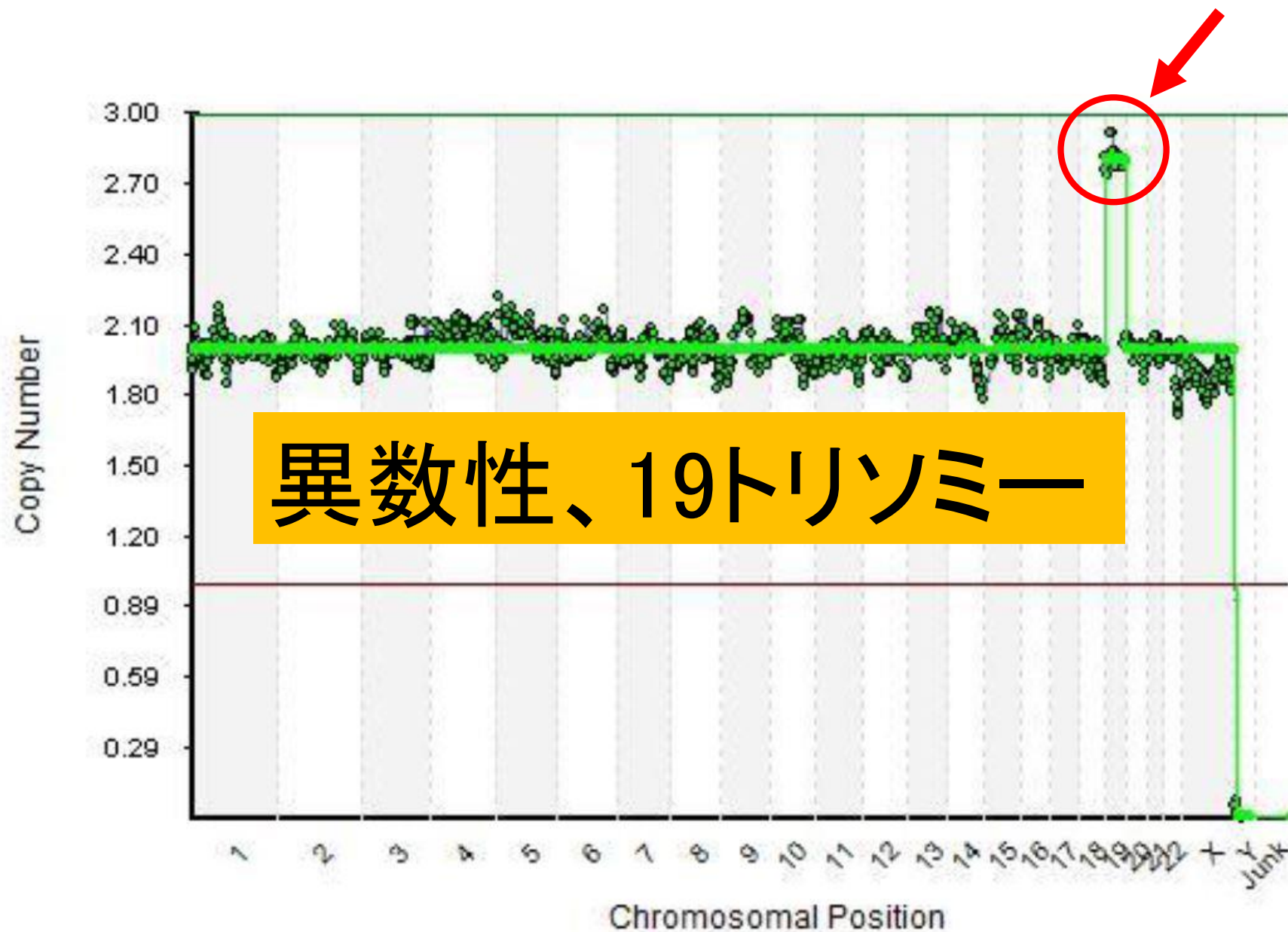


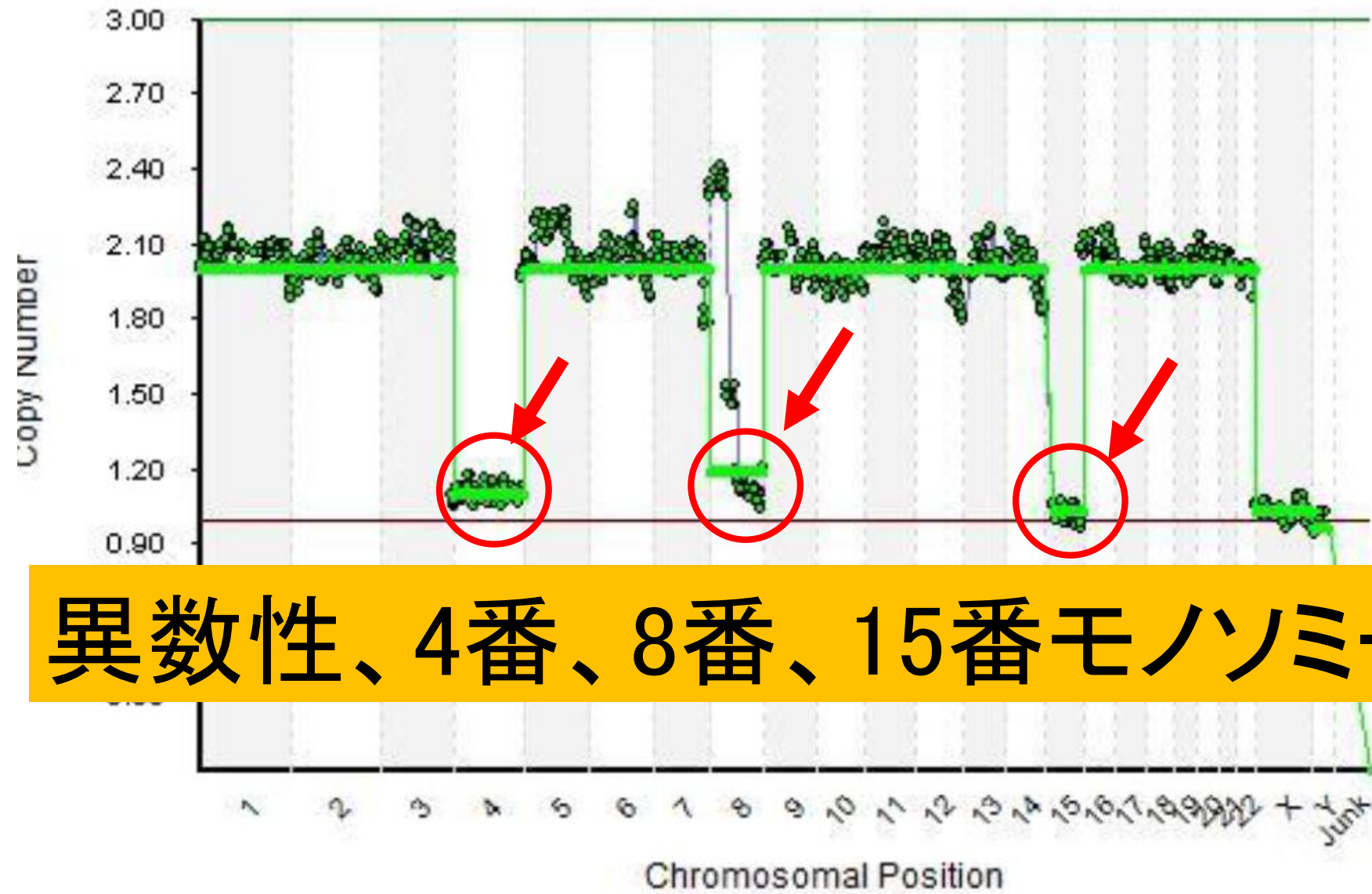
次世代シーケンス解析 (Next generation sequencing: NGS)法による解析結果



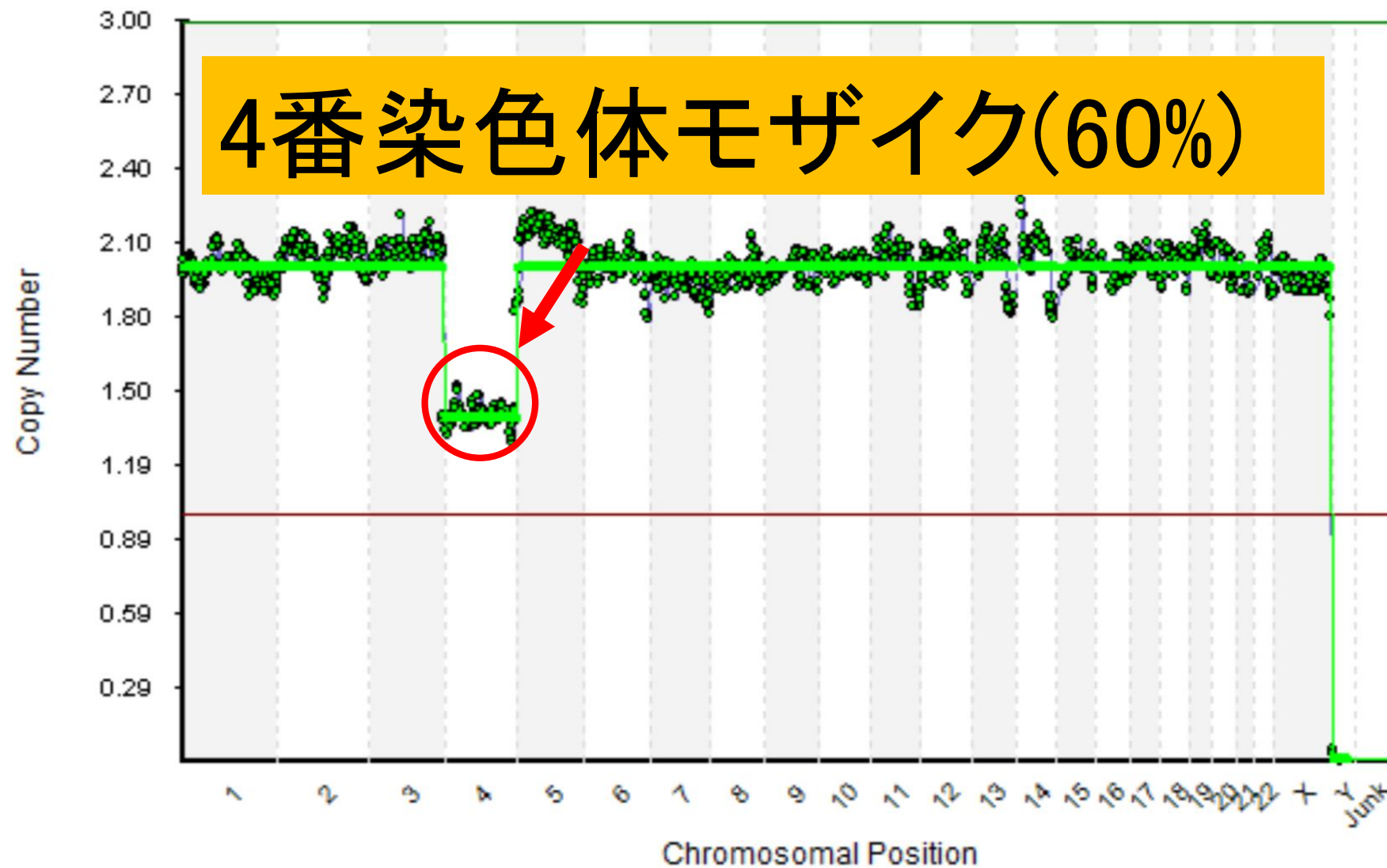








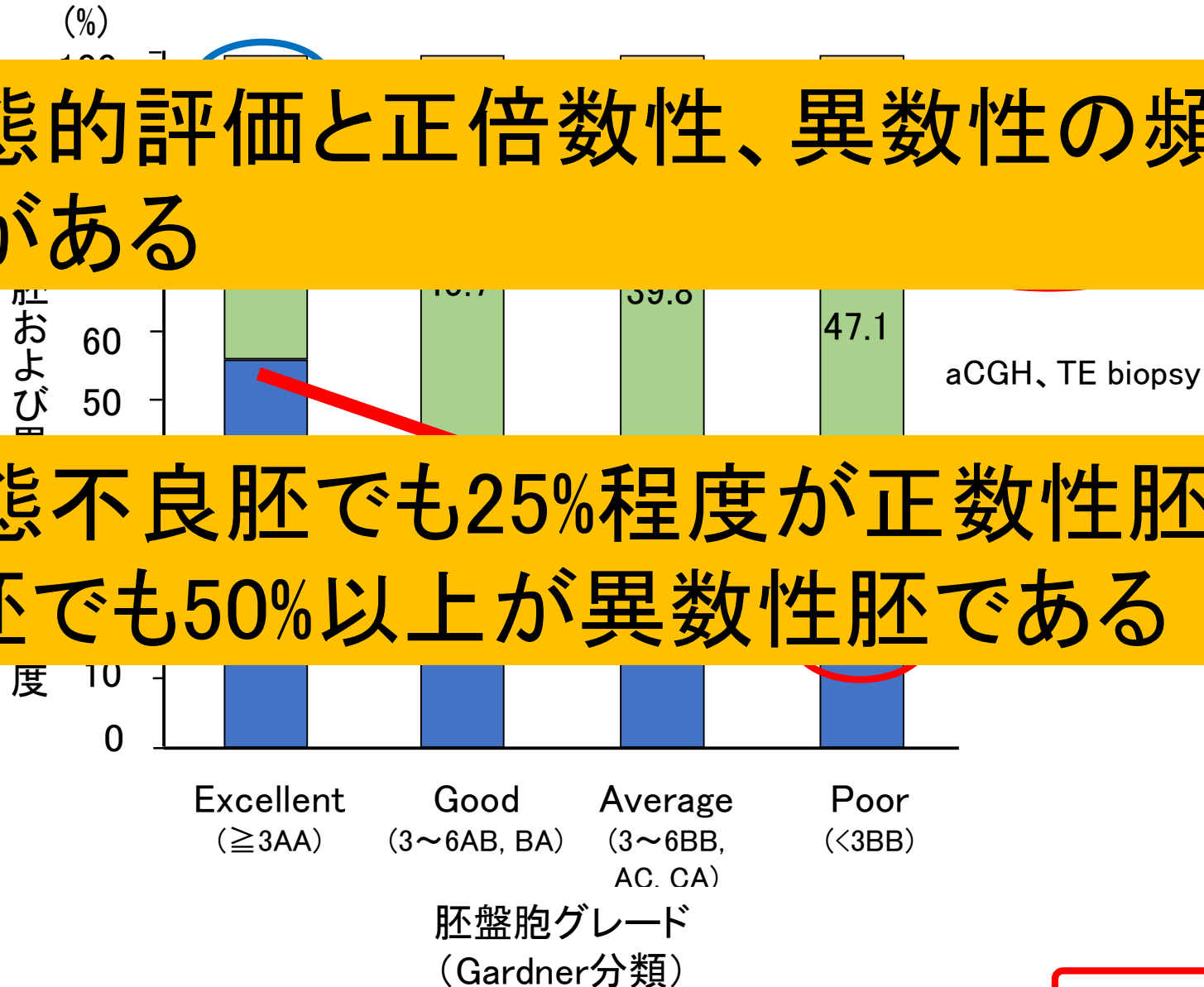
異数性、4番、8番、15番モノソミー



PGT-A ステップ③
移植胚の選択

胚盤胞グレードと倍数性

胚の形態的評価と正倍数性、異数性の頻度に関連性がある



しかし、形態不良胚でも25%程度が正数性胚であり、
形態良好胚でも50%以上が異数性胚である

正倍数性胚盤胞の形態学的分類と着床率

(%)
100
90
80

正倍数性胚盤胞を移植すれば、胚の形態学的評価は着床率に影響しない

胚の形態学的評価での移植胚の選択では限界がある

($\geq 3AA$)

(3~6AB, BA)

(3~6BB,
AC, CA)

(<3BB)

女性年齢: 37.8歳

胚盤胞グレード
(Gardner分類)

～仮想症例～

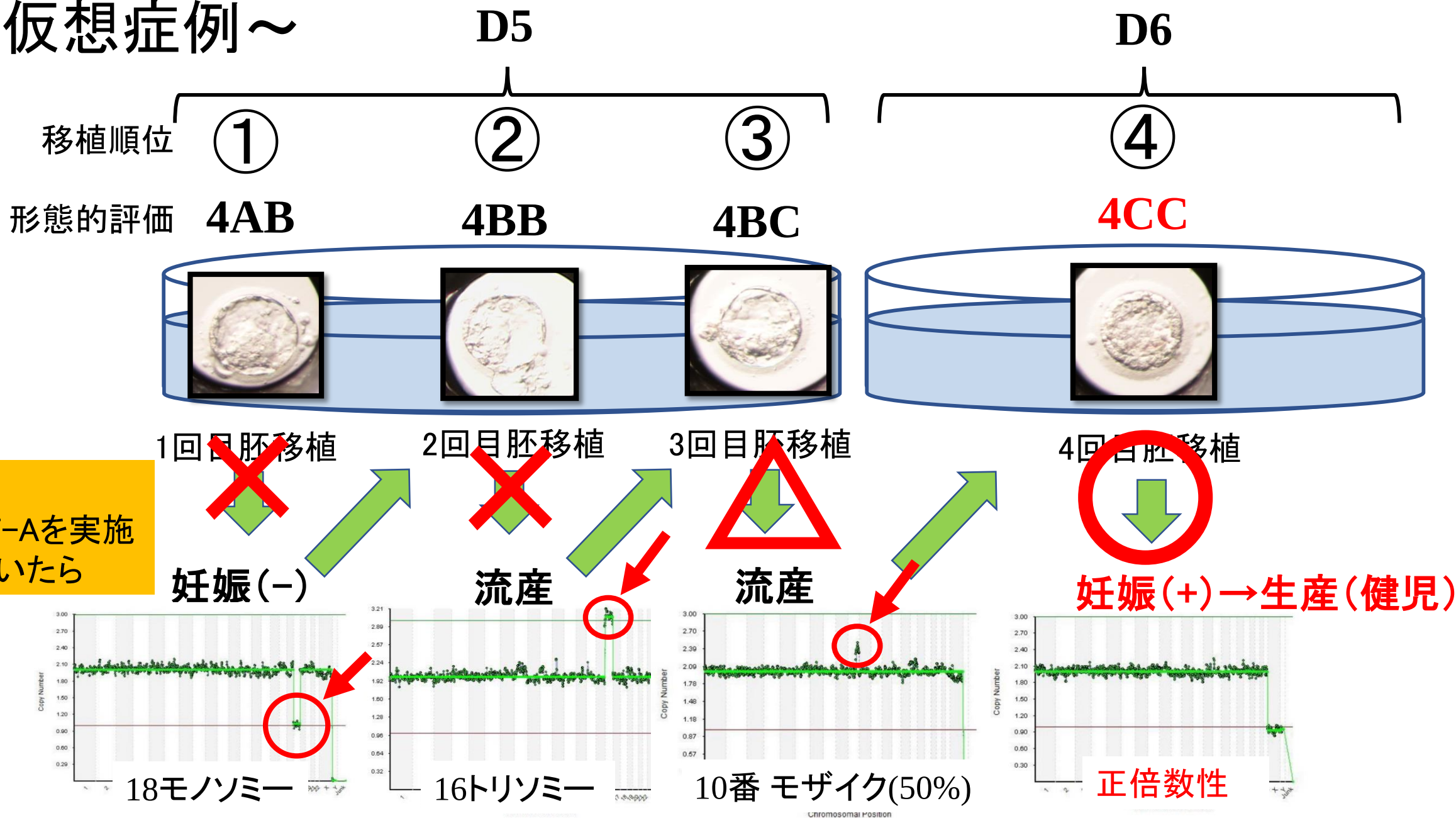
年齢：39歳

不妊原因：男性因子（高度乏精子症、原発性不妊症）

治療歴：採卵2回、胚移植6回、臨床的妊娠2回（いずれも流産）
化学的流産1回

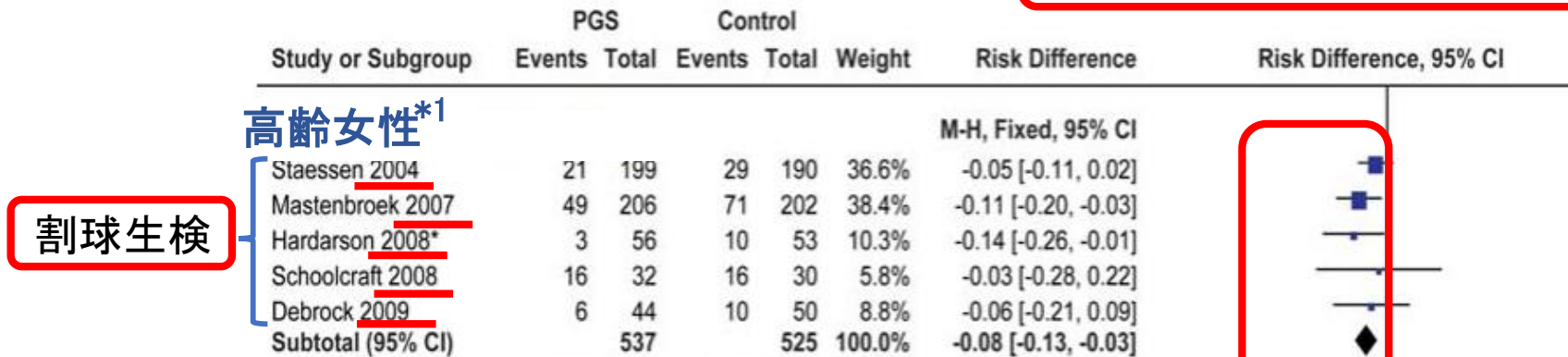
今回の治療：アンタゴニスト法
採卵 10個（成熟卵 7個）
ICSI→2PN2PB 6個
胚盤胞培養実施

～仮想症例～

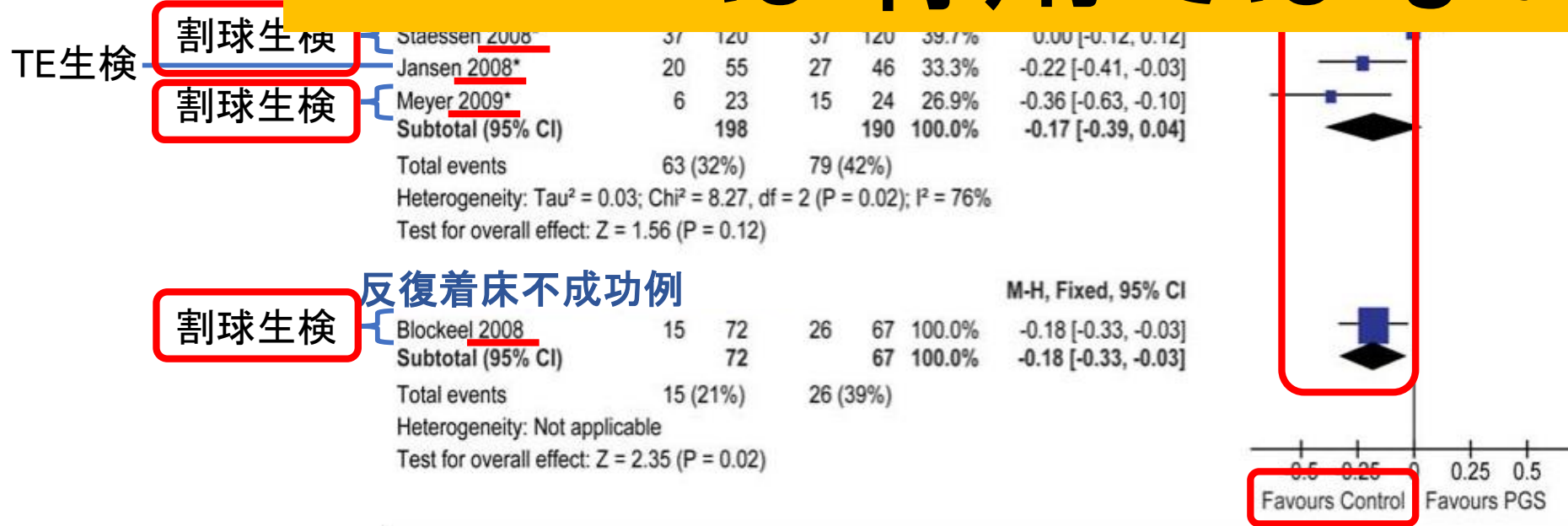


3.PGT-AとART成績

PGT-Aの生児獲得率に対する効果 (FISH法, meta-analysis)



PGT-Aは有用ではない

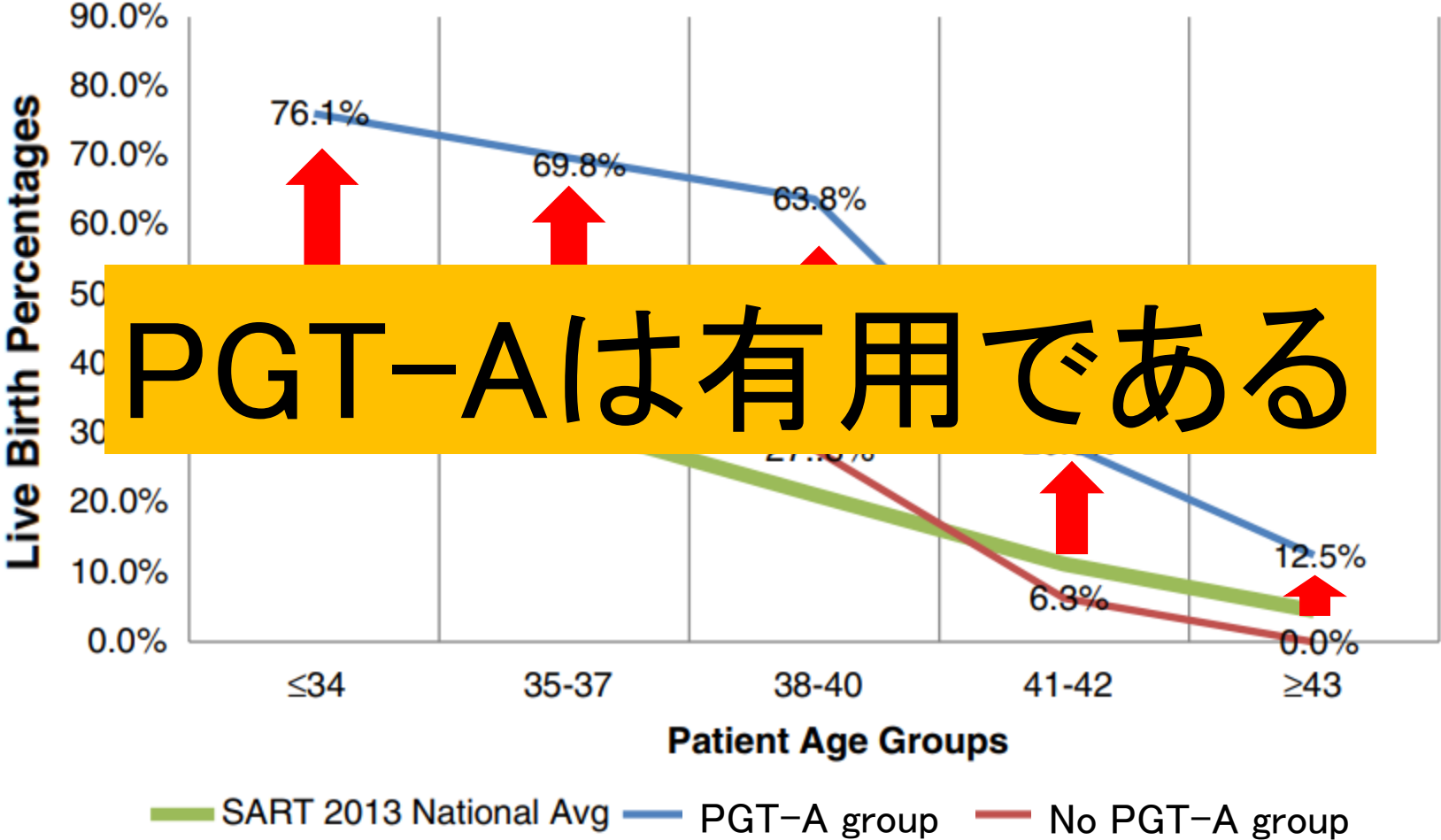


*1: 35歳以上

*2: 正常核型、39歳未満など

年齢別 PGT-AとART成績

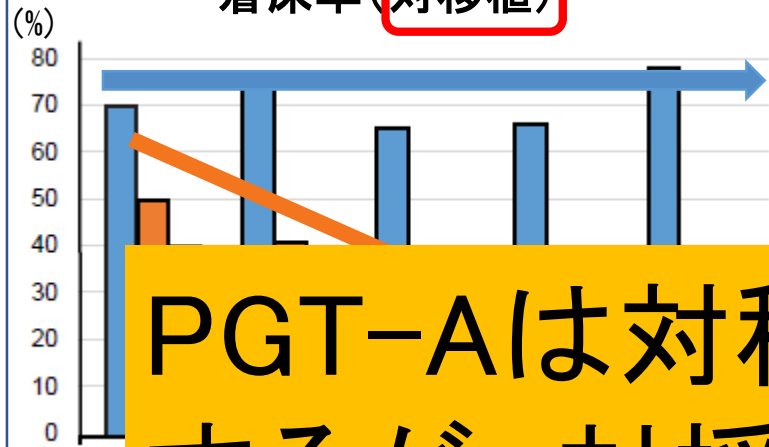
aCGH,
TE biopsy,
cryo ET



SART: Society for Assisted Reproduction Technology (in United States)

着床率、妊娠率、生児獲得率に対するPGT-Aの有用性

着床率 (対移植)



臨床的妊娠率 (対移植)



生児獲得率 (対移植)



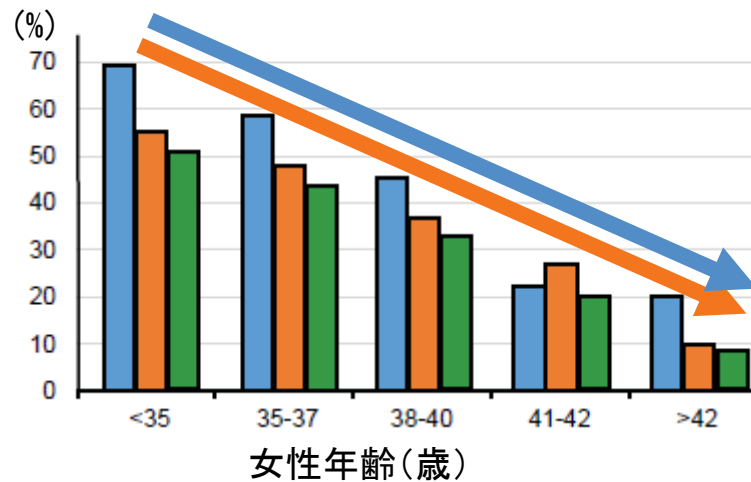
PGT-Aは対移植あたりの臨床成績は改善するが、対採卵あたりでは効果がない

- 凍結胚融解移植 (PGT-A*実施)
- 凍結胚融解移植 (PGT-A実施せず)
- 新鮮胚移植 (PGT-A実施せず)

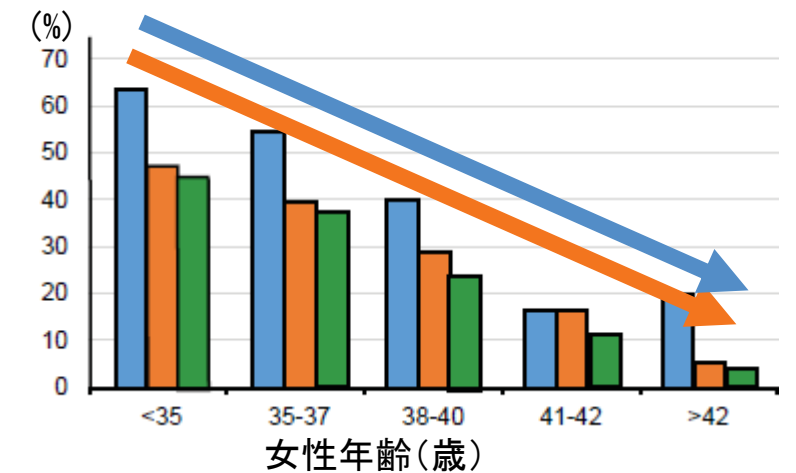
*24-chromosome

SNP-based PGT-A,
TE biopsy

臨床的妊娠率 (対採卵)



生児獲得率 (対採卵)



反復流産に対するPGT-Aの有用性

Parameter	IVF/PGS (n = 158 attempts)	IVF/No PGS (n = 40 attempts)	P-Value
Maternal age (year)	37.3 ± 3.9	37.6 ± 4.3	0.67
No. oocytes per cycle	16.6 ± 8.5	11.9 ± 7.9	0.003 ^c
No. 2PN embryos per cycle	9.8 ± 5.5	5.6 ± 5.0	<0.001 ^c
No. Blastocysts per cycle	5.7 ± 3.2	1.7 ± 2.3	<0.001 ^c
Clinical pregnancy rate ^a n (%)	72 (46)	16 (40)	0.60
Mean no. surplus embryos, cumulative per patient	2.2 ± 2.6	3.0 ± 4.6	0.22

Data are mean ± SD unless stated otherwise.

^aRate calculated per attempt, defined previously.

^bRate calculated per pregnancy.

^cStatistically significant for $P < 0.05$, unpaired two-tailed Student's *t* test.

^dStatistically significant for $P < 0.05$, Fisher's exact test.

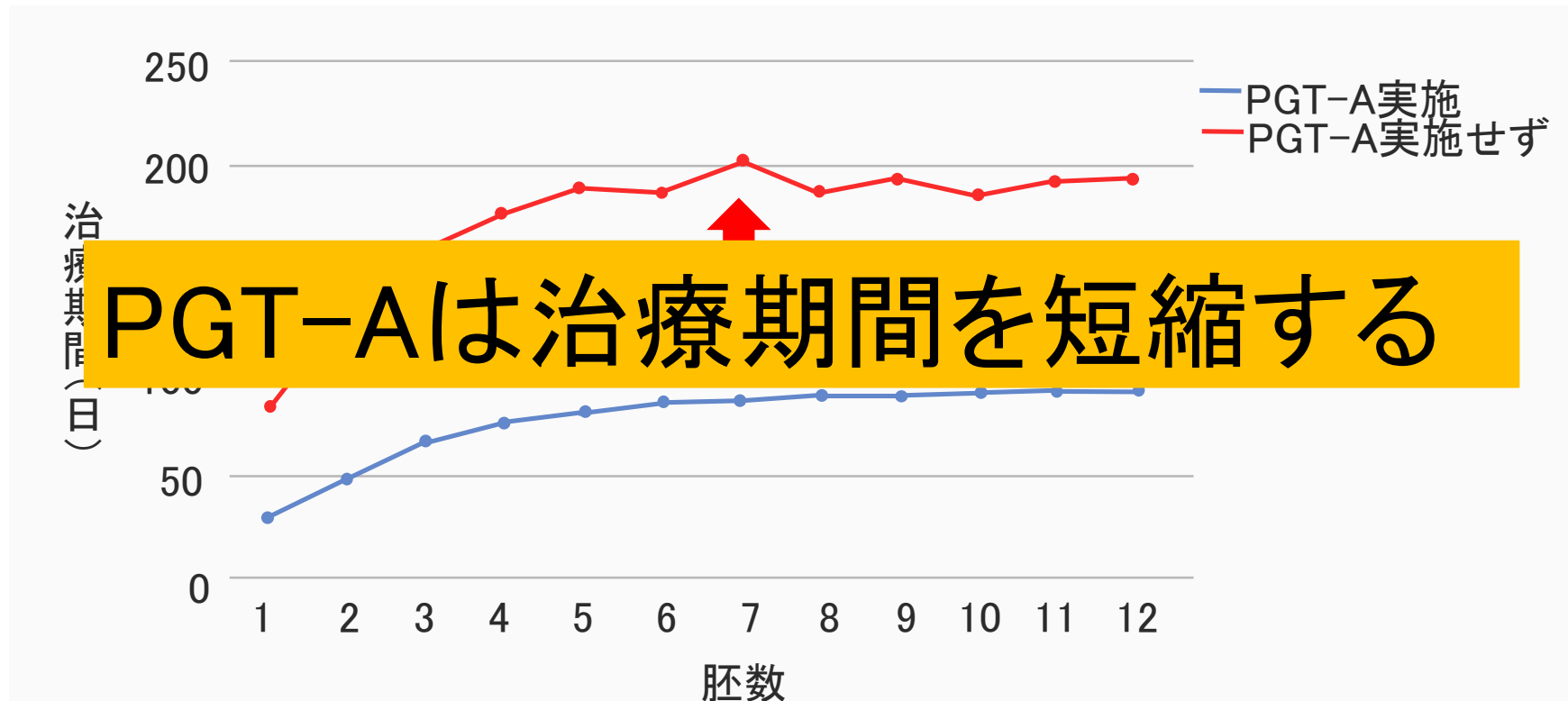
CM: clinical miscarriage

患者背景: 2回以上の流産(妊娠6~20週)、37.1歳

PGT-Aを行えた場合は流産予防になる

aCGH,
TE biopsy,
cryo ET

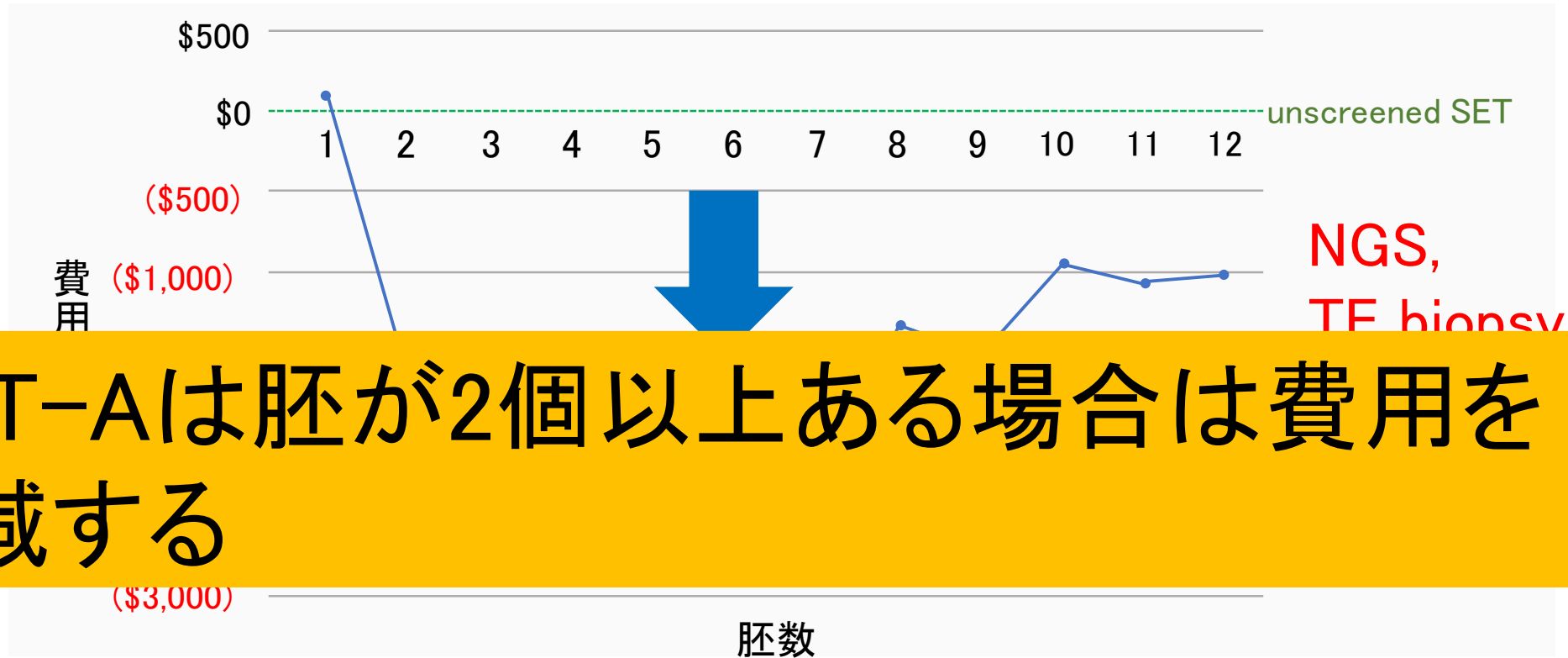
PGT-A実施と最終転帰までの治療期間



エンドポイント: 生児獲得か、または同採卵周期の全てのコホート胚を胚移植したことによる終了のいずれか。
異数性胚は胚移植せず。

PGT-A実施と最終転帰までの費用

(Euploid single embryo transfer (SET) vs. unscreened SET)



PGT-Aは胚が2個以上ある場合は費用を削減する

エンドポイント: 生児獲得か、または同採卵周期の全てのコホート胚を胚移植したことによる終了のいずれか。

含まれる費用(US \$): ①PGT-A (TE生検: \$1,000、PGT-A(NGS)/胚: \$150)

②新鮮胚移植: \$1,050

③胚凍結: \$1,000

④凍結胚融解移植周期: \$3,812

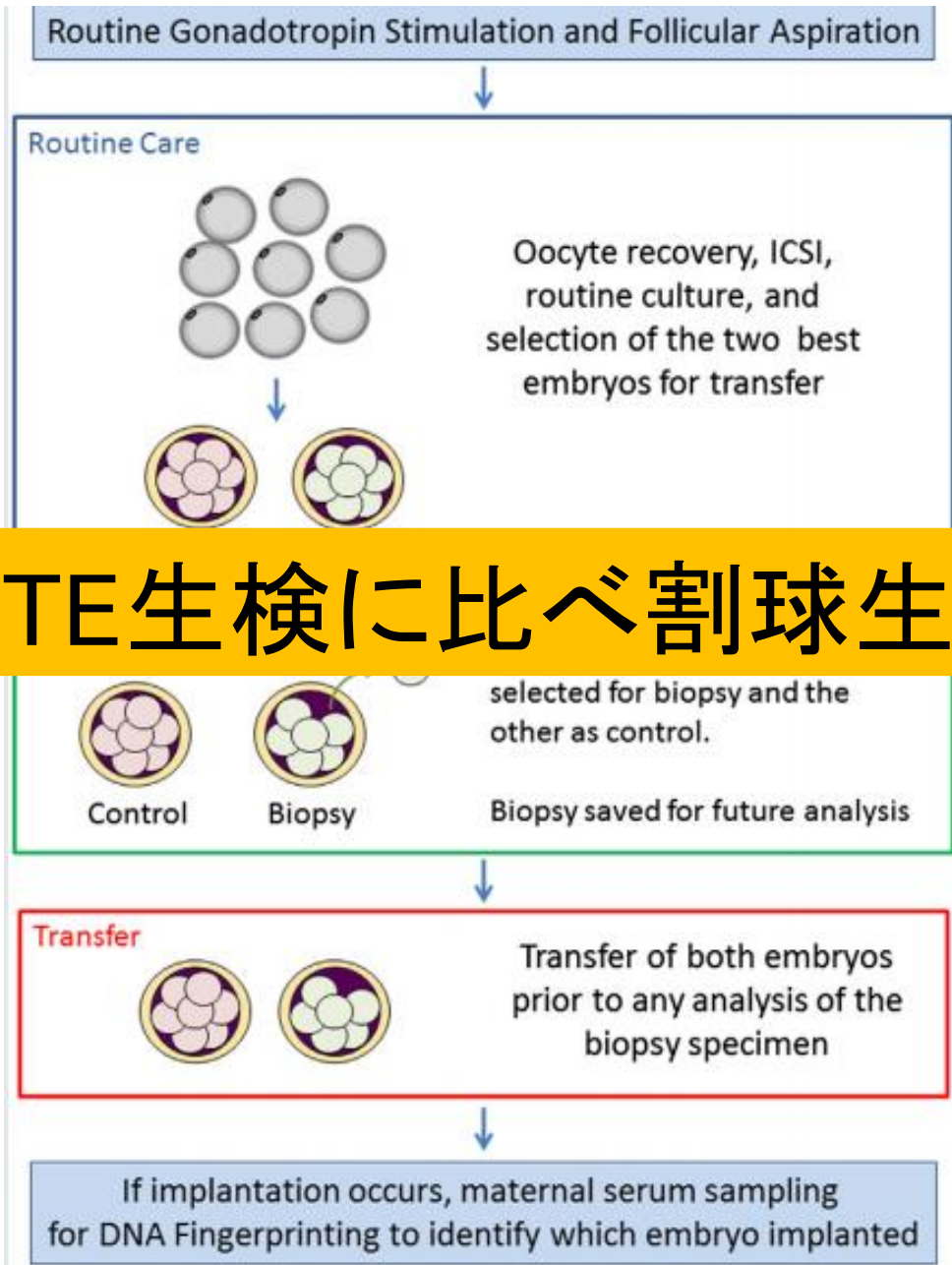
⑤D&C: \$1,304

4.PGT-Aの課題

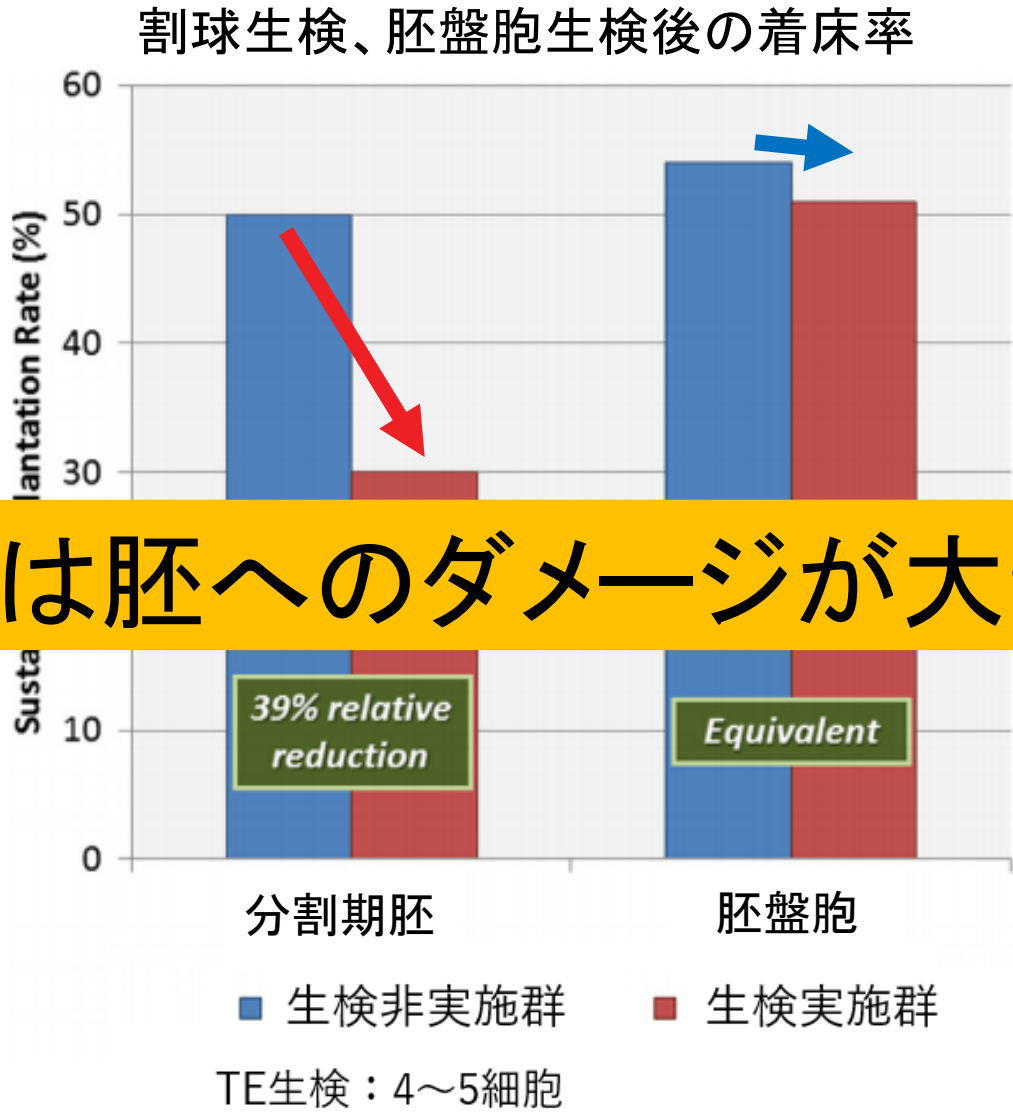
PGT-Aにより生じる課題

- ①細胞生検による胚へのダメージ
- ②モザイク胚の取り扱い
- ③判定の正確性
- ④児の長期フォロー

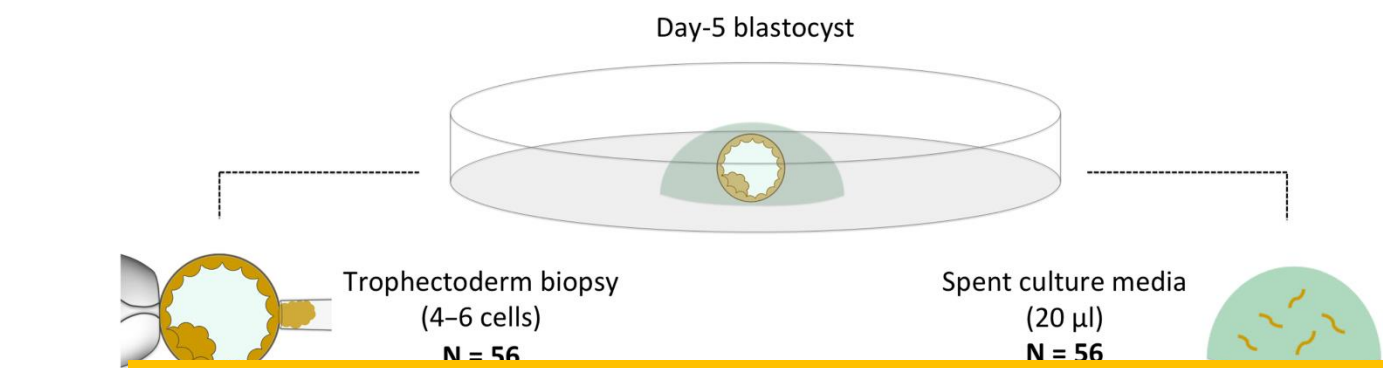
①細胞生検による胚へのダメージ



TE生検に比べ割球生検は胚へのダメージが大きい



培養液中のcell free DNAによる着床前診断(NGS法)



培養液を用いたPGT-Aは精度が低い

一致率: 30.4%

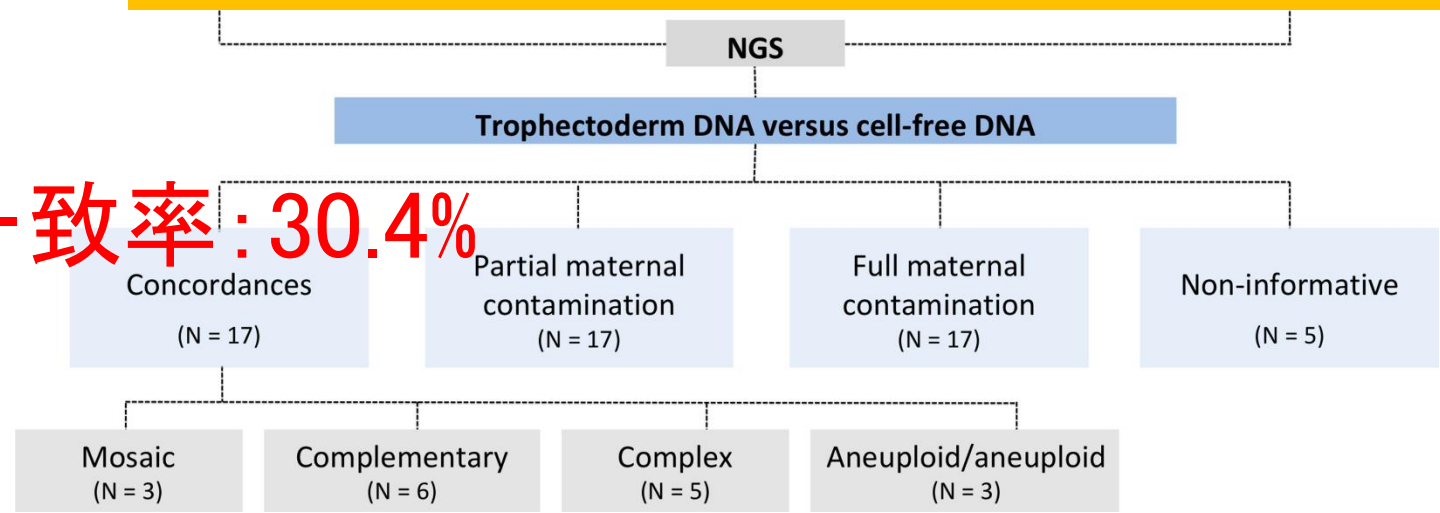


Table I Concordance of trophectoderm DNA and cell-free DNA (N = 56).

Sample	Trophectoderm DNA	Cell-free DNA
Concordances		
Aneuploid-mosaic		
CL640 ⁺	-15 XY	-15mos XY
CL660 ⁺	-21 XY	-21mos XY
CL838	-4 XY	-4mos XYY
Aneuploid-complementary		
CL696 ⁺⁺	+15 XY	-15mos XX
CL842 ⁺⁺	-11 -13 XX	+11 +13 XX
CL852 ⁺⁺	-15 XX	+15 XX
Aneuploid-complex		
CL710 ⁺⁺	+16 -19 XX	-1 +16 XX
CL750 ⁺	+16 -22 XY	+3 +4 +5 +6 -14p -22 XX
CL776 ⁺⁺	+14 -22 XY	-1p +20 +22 XX
CL850 ⁺⁺	-16 XY	-16 -17 XX
CL870	+2 -21 +22 XY	-22mos XX
Aneuploid-aneuploid		
CL628 ⁺	+6 -20 XX	+10 X0
CL700 ⁺⁺	+13q XX	+19 -22 XX
CL836 ⁺⁺	+17mos+22 XY	+16 +20q XX

胞胚腔液中のcell free DNAによる着床前診断(NGS法)

胞胚腔液を用いたPGT-Aは精度が低い

BF vs. ICM	40.0% (4/10)	30.0% (3/10)	30.0% (3/10)
------------	--------------	--------------	--------------

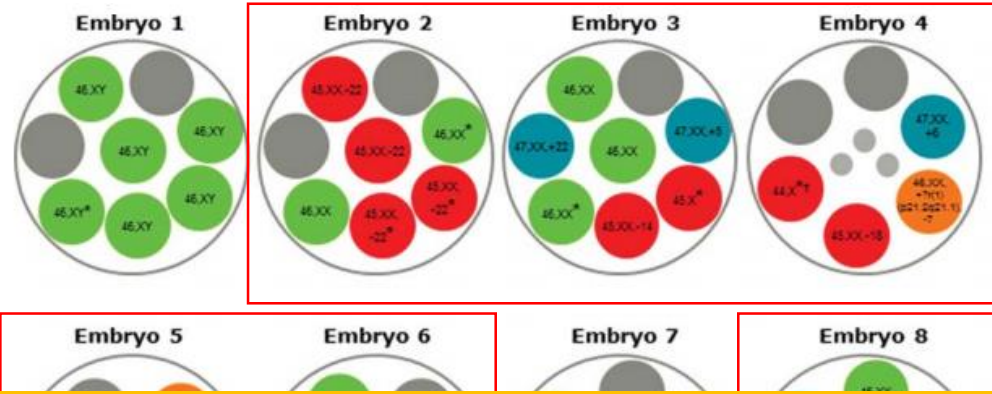
TEとICMは必ずしも一致しない

BF: 胞胚腔液、TE: 栄養外胚、ICM: 内部細胞塊

Tsuiiko O. et al., Fertil Steril. 2018 Jun;109(6):1127-34.

②モザイク胚の取り扱い～初期胚と胚盤胞(TE)のモザイク率

異数性細胞の割合
 ～20%: 正倍数性
 20～80%: モザイク
 80%～: 異数性



初期胚

正倍数性胚 4/14 (28.6%)

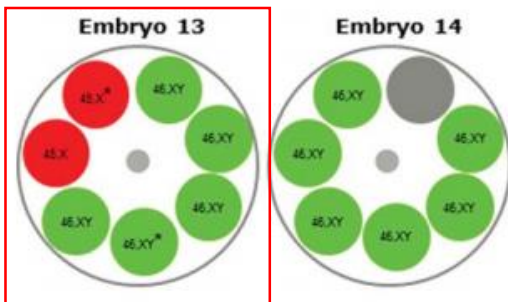
初期胚と胚盤胞でモザイク率に大きな差異がある



正倍数性胚 643/1,547 (41.6%)

異数性胚 634/1,547 (40.9%)

モザイク胚 270/1,547 (17.5%)



- 正倍数性
- 1種類の染色体が異数性(モノソミー)
- 1種類の染色体が異数性(トリソミー)
- 2種類以上の染色体が異数性
- 解析できず(技術的エラーによる)

女性年齢 36.5歳(28-47歳)

TE biopsy, NGSにて解析

②モザイク胚の取り扱い

モザイク胚種類と発生頻度

Type	Type 1	Type 2	Type 3	Type 4	Type 5	
						
Percentage	28%	52%	7%	3%	3%	7%
Number	8	15	2	1	1	2
TE ploidy	Euploid	Aneuploid	Mosaic	Euploid	Mosaic	Mosaic
ICM ploidy	Euploid	Aneuploid	Mosaic	Mosaic	Euploid	Aneuploid
Confined mosaicism	No	No	No	Yes	Yes	Yes

 Aneuploid lineage

 Euploid lineage

 Mosaic (mixture of aneuploid and diploid lineages)

NGS法

対象胚盤胞: ICM grading ≥ BかつTE grading ≥ C

②モザイク胚の取り扱い～モザイク胚の移植(単一胚盤胞移植)

Patient No.	Chromosomal Constitution	Mosaicism† percent	Karyotype‡	Clinical Outcome
1	arr(4)x1,(10)x1	40	46,XX	Baby healthy at birth
2	arr(6)x1,(15)x1	50	46,XX	Baby healthy at birth
3	arr(2)x1	40	46,XX	Baby healthy at birth
4	arr(2)x1	35	46,XY	Baby healthy at birth

モザイク胚の移植で18例中6例で健児が得られた

11	arr 9p21.2q34.3(26,609,645-140,499,771)x3	45	NA	Biochemical pregnancy§
12	arr(15)x3	30	NA	No pregnancy
13	arr(18)x1	50	NA	No pregnancy
14	arr(18)x1	50	NA	No pregnancy
15	arr(18)x1	40	NA	No pregnancy
16	arr(4)x1	50	NA	No pregnancy
17	arr(5)x3	40	NA	No pregnancy
18	arr 10q21.3q26.3(67,216,644-134,326,648)x3	50	NA	No pregnancy

18 women for whom IVF had resulted in no euploid embryos.
Blastocyst, aCGH NA: not available. 核型:絨毛検査による

Greco E. et al., N Engl J Med. 2015 Nov 19;373(21):2089-90.

aCGH,
TE biopsy

②モザイク胚の取り扱い～モザイク種類および異数性細胞の割合と着床率

		異数性細胞の割合(%)	周期数	着床率 (n)	p値
モザイクを呈する染色体	≥3種類	20-40	17	12% (2)	NS
		>40-80	4	0% (0)	
	2種類	20-40	22	41% (9)	NS
		>40-80	7	57% (4)	
モザイクの種類	全染色体モノソミー	20-40	28	50% (14)	NS
		>40-80	6	33% (2)	
	全染色体トリソミー	20-40	17	65% (11)	NS

モザイクの程度は着床率に影響しない

1種類(全染色体)	20-40	45	56% (25)	.059
-----------	-------	----	----------	------

3種類以上のモザイクは程度に関わらず着床率が低下する

染色体種

関与する染色体数	1種類	54	50% (27)	<.005
	部分的	39	41% (16)	
	1種類	93	46% (43)	
	2種類	29	45% (13)	
	≥3種類	21	10% (2)	
合計		143	41% (58)	

②モザイク胚の取り扱い～PGDISの声明

Preimplantation Genetic Diagnosis International Society (PGDIS) (2016)

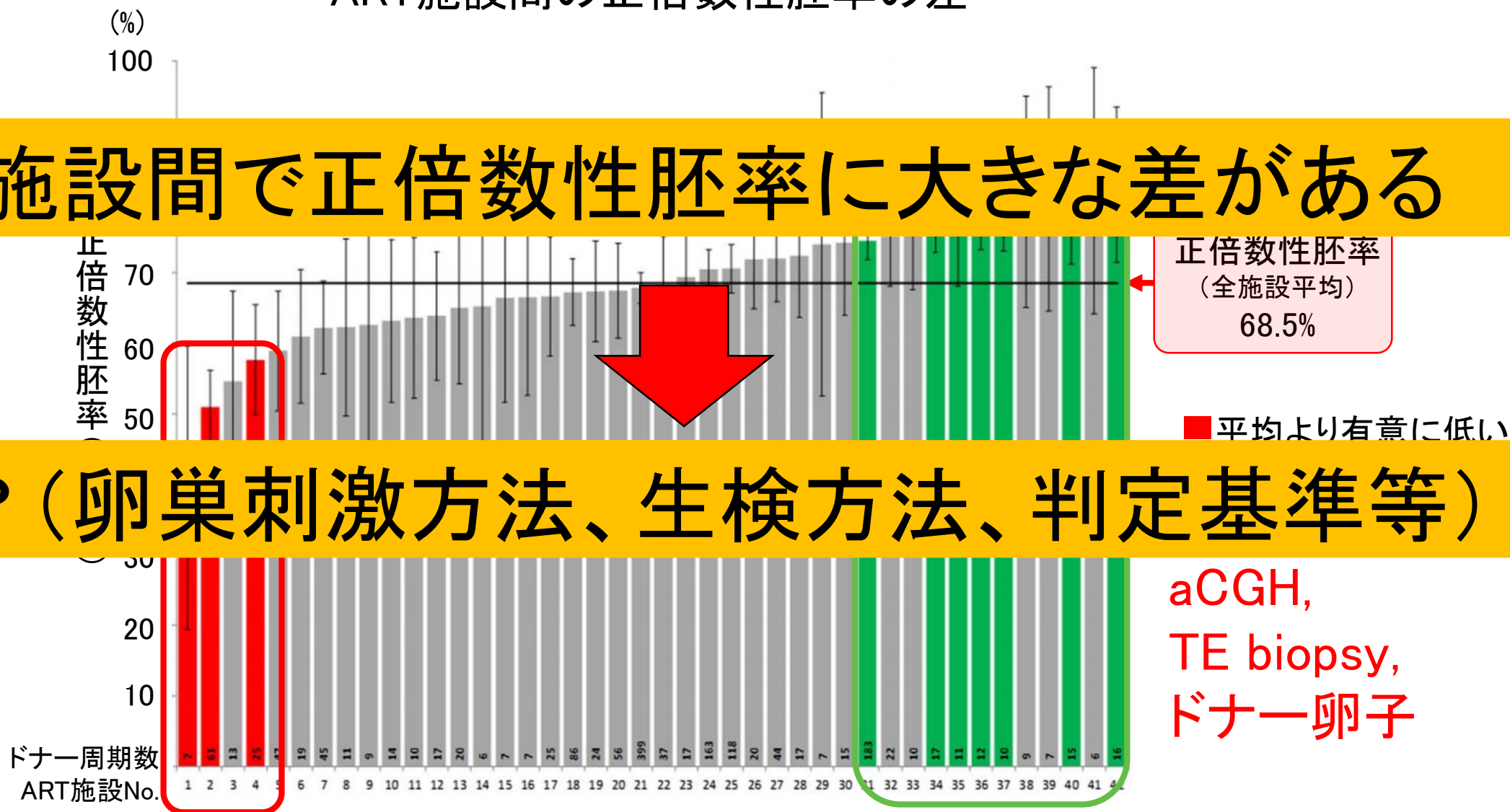
Suggested guidelines to prioritize mosaic embryos for transfer

- ①モザイク**モノソミー** (mosaic euploid/monosomy) : 移植 (45,Xを除く)
(背景: モノソミーの流産は少なく、そのほとんどが45,X。稀に21モノソミーがある。)
- ②モザイク**トリソミー** (単一の染色体で) : モザイクのレベルと染色体種類を考慮して移植
 - 1. 移植可能トリソミー: 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 17, 19, 20, 22番染色体、X, Y染色体
 - 2. 片親性ダイソミー (14, 15番染色体: Prader-Willi症候群、Angelman症候群) と子宮内胎児発育不全に関連するトリソミー (2, 7, 16番染色体) は優先順位を下げる
 - 3. 生存可能なトリソミー (13, 18, 21番染色体) は最も優先順位を下げる

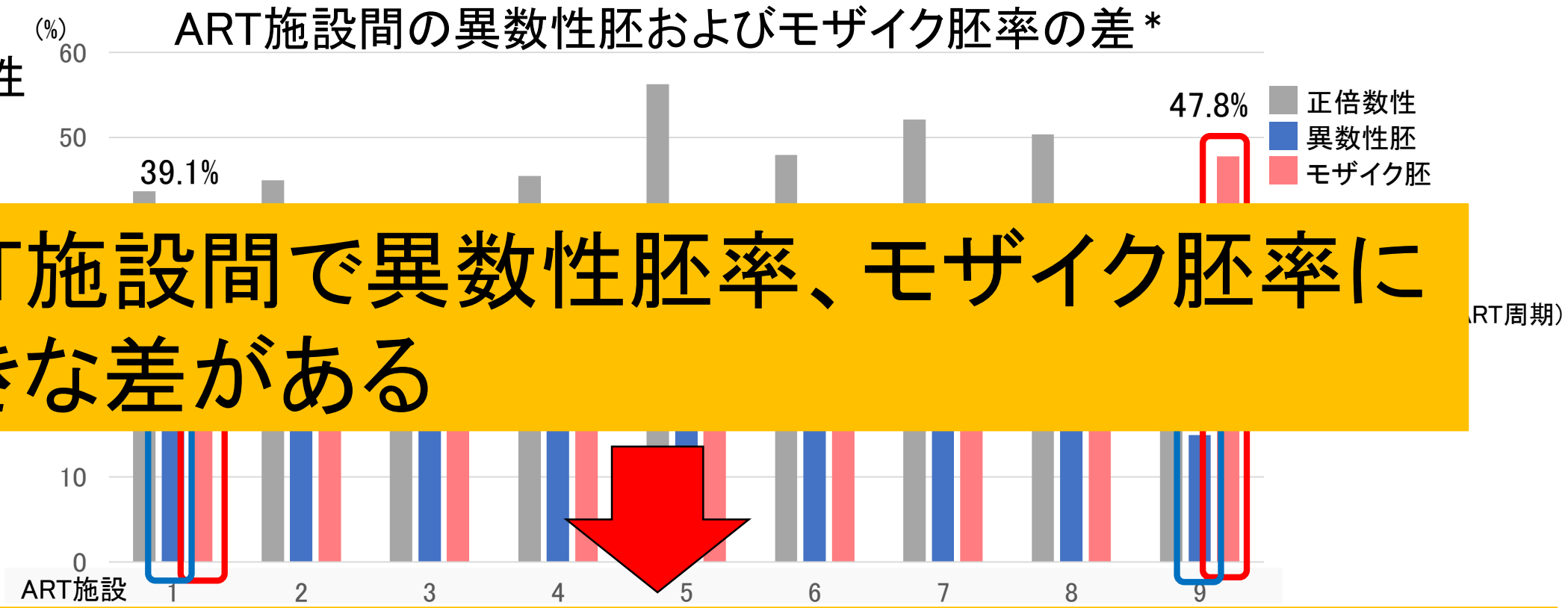
③判定の正確性

ART施設間の正倍数性胚率の差*

ART施設間で正倍数性胚率に大きな差がある



③判定の正確性



ART施設間で異数性胚率、モザイク胚率に大きな差がある

原因？（卵巣刺激方法、培養環境、生検方法、判定基準等）

6	25.4±3.1	47.9±24.6	18.1±21.0	34.0±21.7
7	25.3±2.4	52.1±27.7	18.1±19.0	29.9±26.6
8	24.0±2.0	50.4±21.6	17.5±10.7	32.2±19.8
9	25.3±2.4	37.3±22.2	14.9±12.2	47.8±21.3

p=0.005 p=0.169 p=0.018 p<0.001

トナー卵子

④児の長期フォロー～児に対するPGTの影響

Human Reproduction, Vol.29, No.9 pp. 1968–1977, 2014
Advanced Access publication on July 3, 2014 doi:10.1093/humrep/deu165

2014年

human
reproduction

ORIGINAL ARTICLE *Psychology and counselling*

Cognitive and psychomotor
development of 5- to 6-year-old

Human Reproduction, Vol.30, No.5 pp. 1122–1136, 2015
Advanced Access publication on March 6, 2015 doi:10.1093/humrep/dev036

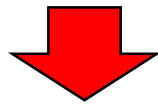
2015年

human
reproduction

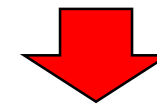
ORIGINAL ARTICLE *Psychology and counselling*

Psychosocial development of full term
singletons, born after preimplantation
genetic diagnosis (PGD) at preschool

現時点では明らかな危険は確認されていない
が、今後もフォローが必要



5～6歳時の心理社会的発達過程は、PGD
群、ICSI群、自然妊娠群で同等であった。



PGDにより出生した児の就学前の認知発達
度は、ICSI群および自然妊娠群と同等であっ
た。

The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion

Practice Committees of the American Society for Reproductive Medicine and the Society for Assisted Reproductive Technology

American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama

Fertil Steril. 2018 Mar;109(3):429-436.

PGT-Aに関するASRM委員会意見 (2018年)

異数性解析とeSETによる生児獲得率の上昇や多胎の抑制効果が報告されており、PGT-Aの有用性が期待できる。ただし、RCTによる報告が少なく、特にART周期スタート時から患者をランダムに選択したRCTを行う必要がある。

効果だけでなく安全性やリスクを考慮した上で、PGT-A以外の方法（genomics, time-lapse, transcriptomics, proteomics, metabolomicsなど）と組み合わせて評価する大規模な前向き試験が必要

5.日本における着床前診断

日本における着床前診断(日本産科婦人科学会見解等の推移)

- 1998年** 日本産科婦人科学会「**着床前診断**」に関する見解」
着床前診断を臨床研究として位置付け
適応対象: **重篤な遺伝性疾患に限る**(遺伝情報の網羅的なスクリーニングを目的としない)
当該機関の倫理委員会と学会の許可を要する
- 2004年** 学会が**初めて**着床前診断の申請を承認(慶応義塾大学、Duchenne型筋ジストロフィー)
- 2006年** **染色体転座に起因する反復・習慣流産**が着床前診断の審査対象に含められる(**対象の拡大**)
(2013年) (NIPT臨床研究開始)
- 2014年** 「着床前スクリーニング」の臨床研究開始
- 2015年** 診療施設と解析施設の分離を許可(アレイCGHでの解析を承認)
- 2017年** 「日本産科婦人科学会PGS特別臨床研究(PGSの有用性に関する多施設共同研究)」開始
対象: 反復ART不成功、原因不明習慣流産(反復流産を含む)
評価項目: 生児獲得率、流産率
- 2018年** 着床前診断を「臨床研究」→「**医療行為**」と変更
実施施設: 認定登録制、学会での審査が先に変更
- 2019年** 「PGS特別臨床研究」パイロットスタディー終了→？

まとめ(私見)

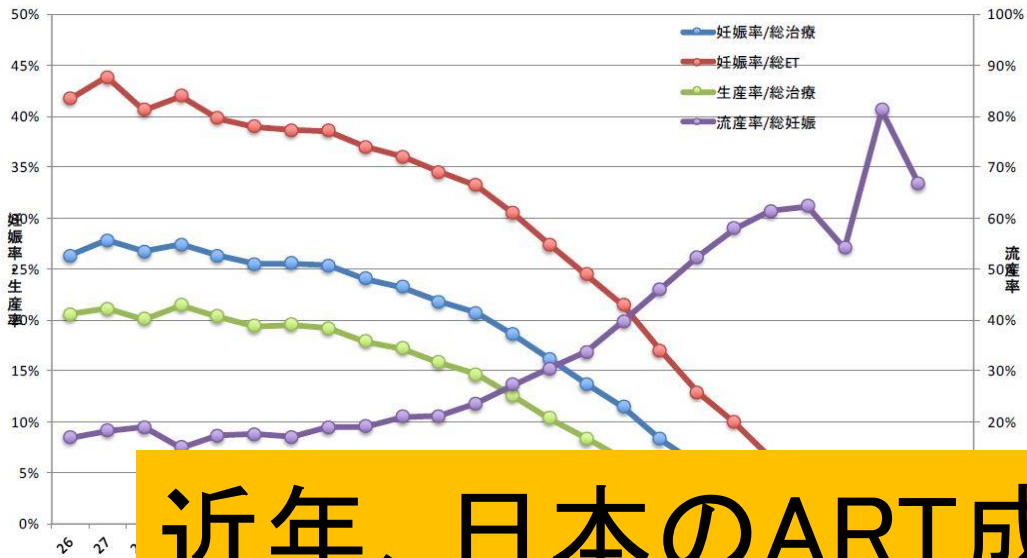
PGT-Aの「光」:

- ・胚移植あたり生児獲得率 
 - ・流産率 ( 身体的・精神的負担  時間の節約
- (胚評価法の一つで、形態的・動態的評価より信頼性が高い)

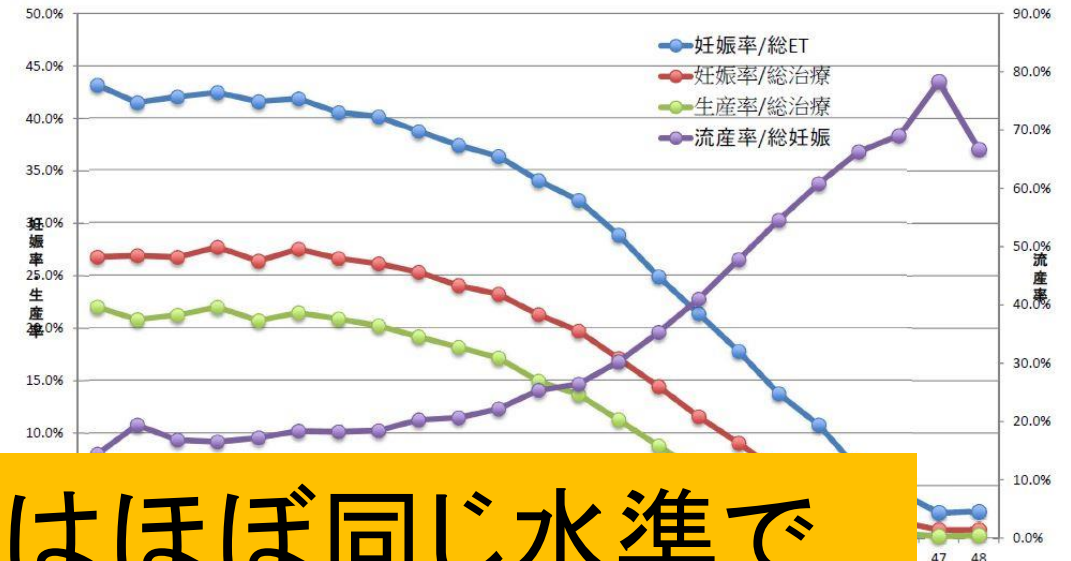
PGT-Aの「影」:

- ・治療あたりの生児獲得率は改善しない
- ・ARTリスクを伴う
- ・胚生検による胚ダメージ(+胚盤胞培養、胚凍結)
- ・偽陰性、偽陽性の可能性(モザイク、ICM≠TE)

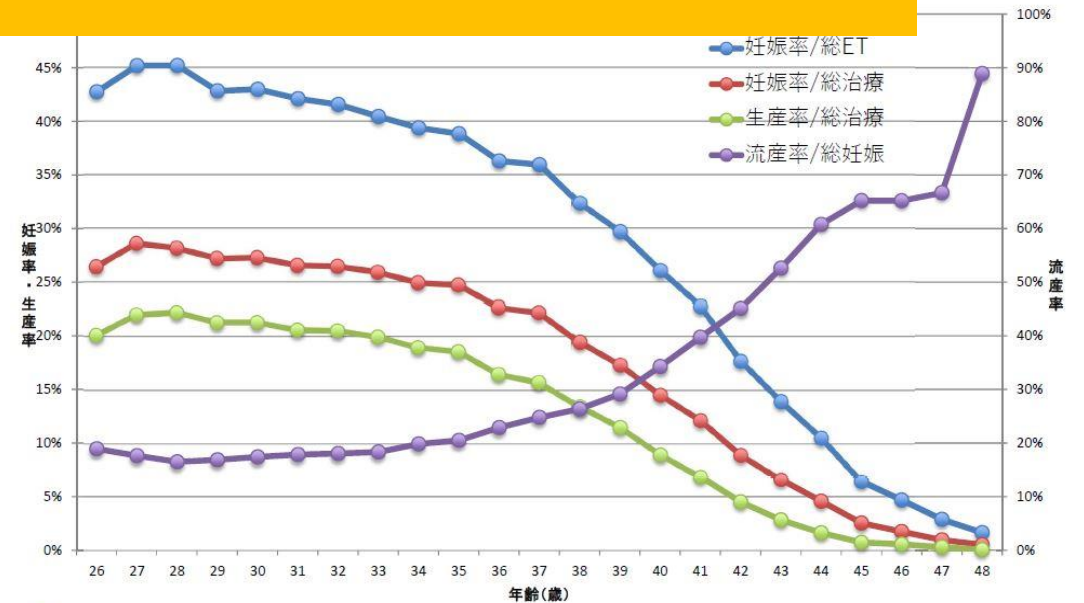
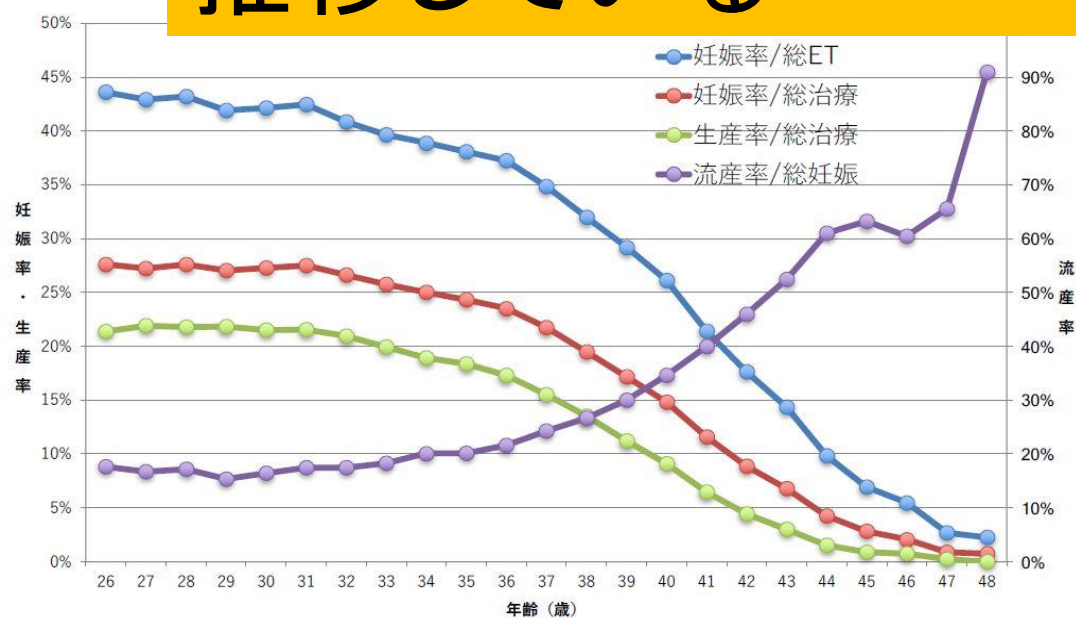
ART妊娠率・生産率・流産率 2013



ART妊娠率・生産率・流産率 2014



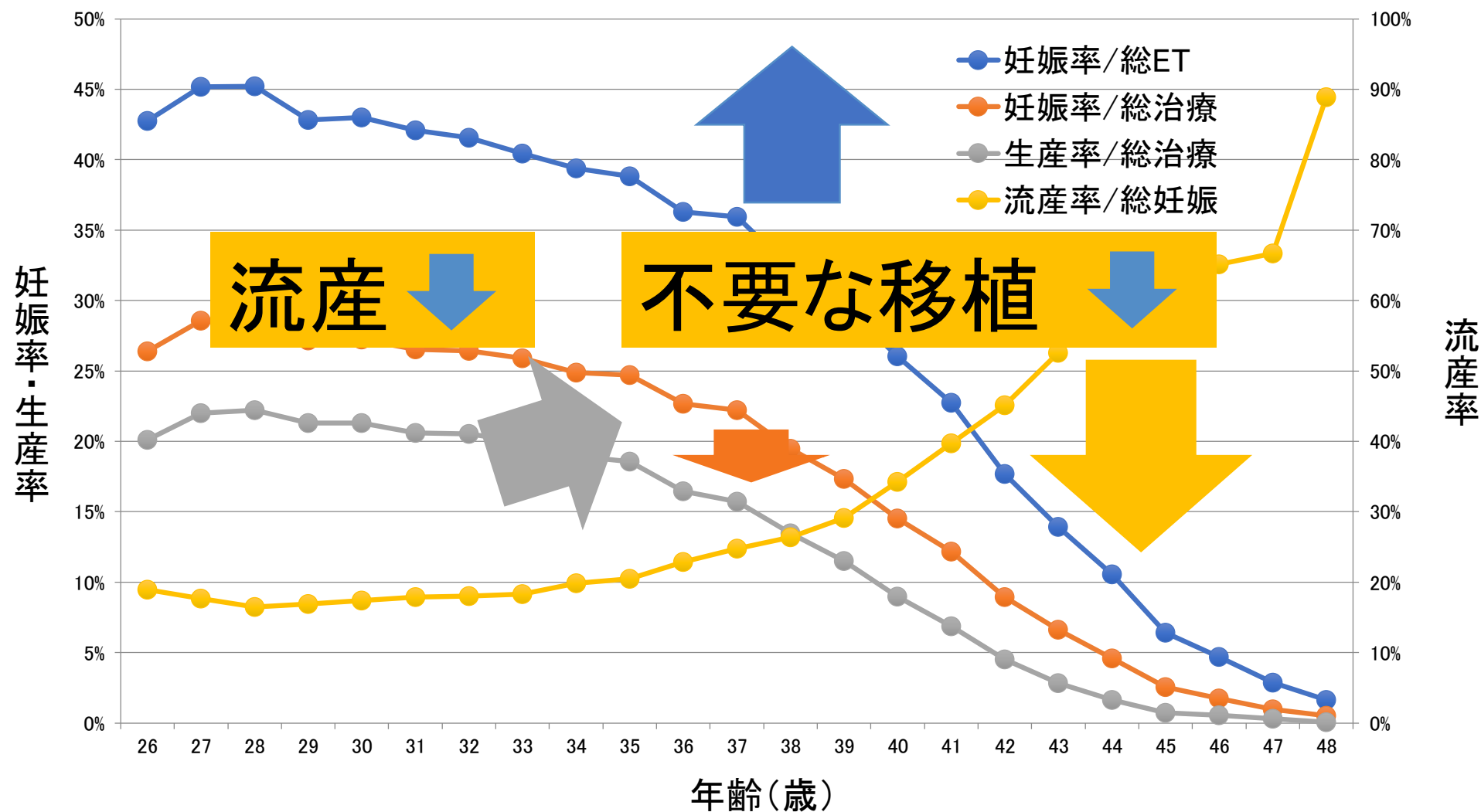
近年、日本のART成績はほぼ同じ水準で推移している



日本でPGT-Aが広く実施されると、

(国)

総移植数



PGT-Aの今後(私見)

- ステップ①: 胚生検 (ART、胚盤胞培養、胚凍結)
いかに「侵襲」を減らせるか→非侵襲的な方法？
- ステップ②: 遺伝学的解析
NGSは決して万能ではない→遺伝・解析の専門家の関与
- ステップ③: 移植胚の選択
解析結果の判定精度管理
(モザイク胚の対応、偽陰性、偽陽性の可能性: ICM ≠ TE)
- カウンセリング体制の整備
- 適応は？
- 費用は？

ご清聴、ありがとうございました。

*本講演の資料をご希望の方はこちら✉ kwc@kinutani.org へご連絡下さい。

着床前胚遺伝的解析の歴史

1967年	Edwards & Gardner	動物胚の性別診断(ウサギ、アセトオルセイン染色による性染色体染色、胚盤胞TE)
1978年	Edwards & Steptoe	世界初IVF baby誕生
1989年	Handyside et al.	PGD臨床応用(X連鎖劣性遺伝病、PCR法(+in situ hybridization)、分割期胚)
1990年	Verlinsky et al.	極体生検法の開発(α 1-antitrypsin deficiency、PCR法、未受精(MII)卵)
1990年	Greif et al.	FISH法による染色体検本(X、Y、X染色体)の開発(分割期胚)
1990年		
1992年		
1992年		
1993年	Munné et al.	FISH法による染色体異数性解析(X, Y, 18, 13, 21番)の開発(分割期胚)
1995年	Verlinsky et al.	染色体異数性(FISH, 極体, X, 18 and/or 13/21)解析によるIVF baby 誕生(=PGS)
2004年	Boer et al.	胚盤胞生検の開発

世界的にはPGT-Aは急速に普及し、年間1万件以上が実施されている

1997-1998年 392 PGT cycles → 2011~2012年 11,481 PGT cycles (ESHRE PGD Consortium data)

2007年 4,293 PGT cycles → 2011~2012年 10,407 PGT cycles (CDC and SART data)

2008年 8,673 PGT cycles (30か国) → 2011年 12,614 PGT cycles (31か国)(ICMART data)

CDC: Centers for Disease Control and Prevention, SART: Society for Assisted Reproduction Technologies

ICMART: International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technologies

胚盤胞日齢と倍数性

