

東京農業大学

学位論文

細胞外ミトコンドリア DNA および

形態動的パラメーターを用いた胚盤胞の非侵襲的評価

The non-invasive blastocyst evaluation using cell free mitochondrial DNA in spent culture  
medium and morphokinetic parameters obtained from time-lapse monitoring

2020 年

農学研究科 畜産学専攻

小林 充

指導教官 教授 岩田 尚孝

論文題目

細胞外ミトコンドリア DNA および形態動的パラメーターを用いた胚盤胞の非侵襲的評価

博士学位論文 目次

第一章	緒論	1
第二章	ヒト拡張期胚盤胞における形態動的パラメーターと臨床成績の関係	
	第一節 緒言	6
	第二節 材料および方法	8
	第三節 結果	13
	第四節 考察	16
	付表および付図	19
第三章	培養後培地中に含まれる細胞外ミトコンドリア DNA 量と胚の形態動的パラメーターとの関係	
	第一節 緒言	30
	第二節 材料および方法	32
	第三節 結果	37
	第四節 考察	40
	付表および付図	44
	Summary	55
	謝辞	58
	引用文献	59

## 第一章 緒論

ヒト生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology: ART)は、世界的に一般的かつ周知の医療となりつつある。日本産科婦人科学会により公表された全国データによると、2017年における総治療周期数は 44,790 周期、新鮮胚移植数は 64,497 周期、凍結融解胚移植数は 187,132 周期に上り、新生児の約 18 人に 1 人が ART によって誕生している (Ishihara *et al.*, 2020)。一方で、ART の普及に伴い複数の胚の同時移植が盛んに実施されたことにより妊婦胎児共に合併症のリスクとなる多胎妊娠が増加した。多胎妊娠の増加を危惧した日本産科婦人科学会は、2008 年に「生殖補助医療における移植胚数は原則単一とする」という多胎妊娠防止を目的とした見解を発表した。この見解により、2005 年に約 15%であった多胎妊娠率は 2009 年には約 5%に低下するに至り (Hayashi *et al.*, 2015)、単一胚移植 (Single Embryo Transfer ; SET) が我が国の ART のスタンダードとなった。

胚移植では、様々な要因が臨床成績に影響する。そのうちの一つとして、移植胚の発育ステージが挙げられる。胚盤胞期へ発育した胚は分割期胚に比べて高い妊娠率を有することが報告されている (Papnikolaou *et al.*, 2008)。これは、分割期胚のうち胚盤胞へ発育できる胚の割合は約 30-50%であり、胚盤胞へ発育したということ自体がひとつのセレクションとなっているためであると考えられている。また、卵巣刺激法を用いて採卵を行った周期では、新鮮胚移植に比べて凍結融解胚移植の妊娠率が高い。卵巣刺激は、外因性のホルモン投与により自然の LH サージの抑制を行った上で、FSH 投与により複数の卵巣発育を促進する。そのため、採卵後は体内ホルモンバランスが自然周期と大幅に異なり、エストロゲンやプロゲステロンなどの子宮内

膜の発育に重要なホルモンが正常に作用せず、内膜発育不全が誘発される。一方、凍結融解胚移植では、採卵周期と別周期に胚移植を実施できるため、子宮内膜を超音波によって経時的にモニタリングし、内膜厚が規定値に到達していない場合や内膜発育がしづらい患者は、外因性のエストロゲンやプロゲステロン接種を行い内膜厚の増加を促す。これにより、子宮内膜が最適なタイミングで胚移植を実施することができるため、新鮮胚移植よりも凍結融解胚移植の妊娠率が高いと考えられている (Zhu *et al.*, 2011, Roque *et al.*, 2013, Kato *et al.*, 2018)。このような背景と凍結技術の向上により、我が国の ART では単一凍結融解胚盤胞移植が最も生児獲得が期待できる移植方法のひとつとされている。

複数の凍結胚が得られた場合は、その中から最も生児獲得が望める胚を適切に評価し優先的に移植することで、移植回数の減少に繋がり患者の負担が軽減する。現在、一般的に利用されている胚盤胞の評価方法は、主に形態的評価法、形態動的評価法、遺伝的評価法の3つに大別される。

形態的評価法は、特別な装置や操作を必要とせず顕微鏡下で胚盤胞の細胞数や緊密度の違いから格付けを行う (Schoolcraft *et al.*, 1999, Gardner *et al.*, 2000)。この方法は、簡便かつ有用であるため最も普及している方法だが、目視観察のみで判定するため主観的であり、施設間および観察者間でのバラつきが大きいことがデメリットである (Storr *et al.*, 2017)。

形態動的評価法は、タイムラプスインキュベーター (TLI: Time-lapse incubator)により得られた画像データを用いて、胚の発育動態や挙動を用いて評価する方法である。多数の論文が胚の発育動態は臨床成績や胚の正倍数性と関連することを報告している (Reignier *et al.*, 2018)。実際に、従来の形態的評価のみのセレクションと比べて、形態動的評価を加えることで臨床成績

が向上するといった報告がある (Pribenszky *et al.*, 2017)。また、TLI によって明らかとなった異常分割 (Yang *et al.*, 2015) や、胚盤胞の崩壊現象 (Marcos *et al.*, 2015) などの発生過程で観察される挙動がネガティブマーカーとして胚評価に有用であることも報告されている。しかしながら、胚の発育イベント (分割や発育ステージへの到達時間) や挙動のアノテーション作業は煩雑でありラボワークを圧迫し、また、形態的評価法と同様に観察者間および施設間の整合性が低いことがウィークポイントとして考えられる。

最後に、遺伝的評価方法は、胚の細胞を一部採取し核 DNA を解析して胚の染色体正常性を判定し、異常胚を排除する方法である。近年、簡便かつ安価な次世代シーケンサー (NGS: Next generation screening) の出現により胚細胞の染色体数を正確かつ簡便に解析し、臨床利用することが可能となった (Treff *et al.*, 2013)。異数性胚の割合は母体年齢の加齢とともに上昇し (Franasiak *et al.*, 2014)、初期流産検体の約 50% が胚の染色体異常に起因する (Goddijn *et al.*, 2000)。この手法は、Pre-implantation genetic test (PGT) と呼ばれ、欧米では数年前から臨床利用されており正倍数性胚の移植は高い妊娠率と低い流産率が得られる (Simon *et al.*, 2018)。一方で、PGT の実施には、バイオプシーにより栄養膜細胞を 5-10 個程度採取する必要があり、胚への侵襲的なダメージが懸念される。また、PGT 検査は胚 1 個あたり胚移植と同等のコストが発生するため、患者の金銭的負担は増加する。以上のように、良好な胚の選別のために様々な評価方法が存在するが、それぞれ一長一短が存在するとともに、現状では形態的良好胚でかつ正倍数性の胚盤胞を移植したとしても生児獲得率は約 50-70% であり、改善の余地がある (Irani *et al.*, 2018)。

ミトコンドリアは、ATPの産生、アポトーシスの制御、カルシウムの恒常性や活性酸素(Reactive oxygen species; ROS)の生成などを行う細胞の機能維持に不可欠な二重膜結合細胞小器官である。ミトコンドリアは核細胞と独立した環状型の二本鎖DNA (mitochondrial DNA : mtDNA)を持ち、22個のtRNA、2個のrRNA および13個のタンパク質ポリペプチドに翻訳される37個の遺伝子をコードしている (Kim *et al.*, 2019)。体細胞における mitochondrial DNA (mtDNA)量はATP合成と関連するが、卵子や胚の場合その意味合いは異なる (Leese *et al.*, 2012)。卵子における mtDNA の変異やコピー数の減少は低エネルギー生産による受精障害や低発育の原因となる (Reynier *et al.*, 2001、Zeng *et al.*, 2007)。ミトコンドリアのコピー数は卵子の成熟過程で増加し、受精時にピークを迎える。受精後は積極的な増殖が抑えられ胚中のコピー数は減少し、胚盤胞の trophocterm (TE)において再び増加する。胚盤胞におけるミトコンドリアは inner cell mass (ICM)に比べて、TEにおいて多く、活性型ミトコンドリアの割合もTEにおいて多い (Hashimoto *et al.*, 2017)。卵子とは対照的に、胚盤胞における mtDNA のコピー数が多い胚ほど、高齢患者由来胚、異数性胚、着床不成功胚であることが報告されており、胚の質を評価するネガティブマーカーとなる可能性が示唆されている (Fragouli *et al.*, 2015、Diez-Juan *et al.*, 2015)。しかしながら、反対に胚盤胞における mtDNA のコピー数は、患者年齢、染色体正常性、臨床成績に影響しないという報告もある (Victor *et al.*, 2017)。

近年、mtDNA が cell-free DNA (cf-mtDNA)として卵胞液や培養液中に放出されていることが報告されており、我々はブタ卵胞液および体外培養後培地中における cf-mtDNA の定量に成功した (Kobayashi *et al.*, 2020)。さらに、ヒト卵胞液中の cf-mtDNA 量が母体年齢やその後の発育予測に利用できることが報告されている (Liu *et al.*, 2019)。また、ウシ胚では凍結融解操

作を行った胚の cf-mtDNA 量が増加することが報告されている (Hara *et al.*, 2018)。さらに、加齢ドナーウシから採取した顆粒層細胞は若齢に比べて cf-mtDNA の放出量が多いことが報告されており (Nagata *et al.*, 2020)、これらのことは胚の年齢や状態が cf-mtDNA の放出に影響する事を意味している。また、ヒト胚では培養 3 日目の培地中の cf-mtDNA 量が多いほど、胚盤胞発生率や分割期胚移植の着床率が高いことが報告されている (Stigliani *et al.*, 2014)。しかしながら、胚盤胞期胚における培養後培地中の cf-mtDNA 量と胚の質や臨床成績との関連性については不明な点が多い。また、どのような機序で cf-mtDNA が培養液中に放出されているかについても明らかになっていない。

本研究は、ヒト胚盤胞における非侵襲的な評価項目を明らかにすることを目的として行った。最初に、タイムラプスインキュベーターにより得られた形態動的パラメーターから臨床成績に関与するパラメーターについて多変量回帰分析を用いて解析した。そして、タイムラプスインキュベーターにより培養した胚の培養後培地を回収し、real-time PCR にて培地中に含まれる cf-mtDNA を定量し、タイムラプス画像より得られた胚の動的パラメーターおよび胚の形態的評価との関連性を解析した。さらに、単一凍結融解胚盤胞移植を行った胚の臨床成績と cf-mtDNA 量との関連性を解析し、培養後培地中の cf-mtDNA の定量が胚の評価に有用であるか否かについて解析した。

## 第二章

### 拡張期胚盤胞における形態動的パラメーターと臨床成績の関係

#### 第一節 緒言

タイムラプスインキュベーターとは、顕微鏡とカメラが内蔵されたインキュベーターである。商業用の臨床利用に特化した TLI が販売され、一般の不妊施設でも容易に導入可能となったことで爆発的に普及した。TLI では培養開始から 10 分毎に胚の画像を撮影し、つなぎ合わせることで培養経過をほぼ見逃すことなく動画のように観察することが可能となった。これにより、定時に胚をインキュベーターから出して観察する必要性がなくなり、胚を外気に暴露させることなく観察することが可能となった。また、TLI が導入される以前は、胚の分割した瞬間や発育過程に要した時間を正確に観察、記録することは不可能であった。TLI の導入により前核の出現や消失、分割、胞胚腔形成、ICM の出現、孵化など、これまで知り得なかった胚の事象が観察可能となったため、ヒト胚の発育過程における挙動や形態動的パラメーターと臨床成績との関連性についての研究が次々と発表された。代表的な例として、一つの割球が三つ以上に分割する *direct cleavage (DC)* や、一度分割した割球が一つに戻る *reverse cleavage (RC)* などの異常分割様式が発見され、これらは臨床成績に負の影響を与えることが報告されている (Yang *et al.*, 2015)。また、割球内に複数の核が出現する多核や (Desai *et al.*, 2014)、拡張期胚盤胞の胞胚腔が収縮する *blastocyst collapse (BC)* などの存在が明らかとなり、これらも臨床成績との関連が報告されている (Bodri *et al.*, 2016、Sciorio *et al.*, 2019)。さらに PGT と併用

し、どの形態動的パラメーターが、正倍数性と関連しているかについて多数の報告がなされている (Mumusoglu *et al.*, 2017)。しかしながら、臨床成績や正倍数性に統計的有意差のある形態動的パラメーターは報告によって異なっており、施設間で差があることは否定できない。この理由として、施設間における患者背景、アノテーション手法、使用培養液などの違いが形態動的パラメーターに影響していることが考えられる。そのため、報告されたパラメーターが自施設においても臨床成績に影響するかは各施設で再解析する必要がある。さらに、胚盤胞のステージや拡張レベル、形態的評価は臨床成績に大きく影響することが報告されており (Ahlstrom *et al.*, 2013, Thompson *et al.*, 2013)、形態動的パラメーターの解析は対象となる胚の形態評価や拡張度などのバイアスを調整して解析することが重要である。本研究では、対象を内径 170  $\mu\text{m}$  に到達した 4BB 以上の形態良好胚のみに限定し、さらにバイアス調整が可能な多変量回帰分析を用いて単一凍結融解胚盤胞移植を行った胚盤胞の形態動的パラメーターと臨床成績との関連性について後方視的に解析した。

## 第二節 材料および方法

### 1) 対象患者および卵巣刺激

本研究は、通常の治療過程で発生する画像および臨床データを後方視的に解析した観察研究である。対象患者には個人情報特定されない状態での論文および学会発表へのデータ利用に関するインフォームドコンセントを得た。2017年1月から2018年2月までに神奈川レディースクリニックにおいて体外受精治療を施行し、単一凍結融解胚盤胞移植 (Single frozen-thawed blastocyst transfer; FTET)を施行した339症例452周期を対象とした。すべての患者はGonadotropin releasing hormone (GnRH) アゴニスト法またはGnRHアンタゴニスト法による卵巣刺激を行った。Follicle Stimulating Hormone (FSH)投与により卵胞の発育を促進し、定期的な血中Estradiol (E2)濃度および卵胞計の測定により投与量を調整した。平均卵胞計が18 mm以上に到達した際にhuman chorionic Gonadotropin (hCG)を投与し、投与から35～36時間後に経膣により卵胞液を吸引し、卵丘卵子複合体 (cumulus oocyte complexes; COCs) を回収した。COCsはSydney IVF Fertilization Medium (FM; Cook Medical, Brisbane, Australia)にて洗浄し、媒精まで前培養した。

### 2) 精液調整

患者より回収した新鮮精液は、精子濃度、精子運動率、精子奇形率を測定後、精液量と等量のGamete buffer containing HEPES (GB; Cook Medical)を混合し、遠心分離によって洗浄濃縮した(1800 rpm × 10 min)。精子ペレットをGBの入ったチューブの底に充填し、45分間37°Cでインキュベートした後、上清中にswim-upした高運動精子を回収した。

### 3) 体外受精

COCsと $5 \times 10^6$ /mLの運動精子を37°C、6% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、89% N<sub>2</sub>下で5時間共培養した。5時間後、パストゥールを用いたピペッティングにより完全に裸化し、第二極体の放出を確認した。

### 5) 顕微授精

COCsは40 IU/mLのヒトリコンビナントヒアルロニターゼ (ORIGIO, CooperSurgical, Måløv, Denmark) に浸漬し、パストゥールを用いたピペッティングにより裸化した。顕微授精 (Intracytoplasmic sperm injection; ICSI) は、PMM-150HJ PIEZO マイクロマニピレーター (PRIME TECH, Tokyo, JAPAN) を用いて、OVOIL™ (Vitrolife, Goteborg, Sweden) でカバーした GB ドロップ内にて施行した。

### 5) タイムラプスインキュベーターによる体外培養

EmbryoSlide (Vitrolife) のウェルに global total medium (LifeGlobal, Måløv, Denmark) を 180 μL ずつ注入し、1.5 mL の OVOIL™ (Vitrolife) によってカバーした後、インキュベーター内で 6 時間以上平衡化した。媒精後、胚を個別のウェルに移動し、37°C、6% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、89% N<sub>2</sub> 下の EmbryoScope + (Vitrolife) 内で最大 6 日間体外培養を行った。

### 6) 胚盤胞の形態評価

胚盤胞の形態評価は、以下に概説する Gardner らの分類方法に基づいて実施した (Gardner *et al.*, 2000)。胚盤胞のステージは、拡張および孵化の状態により 1 から 6 の値を割りふり、内細

胞塊 (inner cell mass; ICM)および栄養膜細胞 (trophectoderm; TE)は、それぞれ A,B,C の 3 段階で評価した。ICM の評価 A は多数の細胞が緊密に詰まっている状態、B は少量の細胞が大まかに集合している状態、C はほとんど細胞がない状態とした。TE の評価 A は多数の細胞が上皮状に凝集している状態、B は少量の細胞がまばらに散らばっている状態、C は細胞が大きくほとんどない状態とした。

#### 7) 対象胚盤胞および除外胚盤胞の定義

本研究では、Embryoviwer の測定ツールを用いて、胞胚腔計を計測し内径が 170  $\mu\text{m}$  以上に到達した胚盤胞および、Gardner 分類による形態評価で 4BB 以上の形態良好拡張期胚盤胞のみを対象とした。内径 170  $\mu\text{m}$  未満、4BB 未満の形態不良胚盤胞、TESE-ICSI、rescue-ICSI、カルシウムイオノフォア施行由来の胚盤胞は除外した。

#### 8) 胚盤胞凍結

培養 5 日または 6 日目に、拡張期胚盤胞へ到達した胚を Vitrification kit (KITAZATO, Shizuoka, Japan)および Cryotop (KITAZATO)を用いてガラス化凍結を行った。

胚盤胞を平衡液 (ES: equilibrium solution)に室温で 15 分間浸漬し、その後、凍結液 (VS: Vitrification solution)に室温で 1 分間浸漬した後、極少量の VS と共に胚を Cryotop 上にのせ、直ちに液体窒素中に投入し、ガラス化凍結した。

#### 9) 凍結融解胚盤胞移植

自然排卵周期またはホルモン補充周期により、子宮内膜調整を行い、内膜厚が 7 mm 以上を胚移植基準とした。排卵日またはプロゲステロン投与開始日から 5 日目に胚盤胞を融解し、3～5 時間回復培養を行った。融解は Thawing media Kit (KITAZATO)によって行い、融解操作の過程でレーザーによる Assisted hatching を施行した。経腹超音波ガイドにより子宮をモニタリングし、IVF catheters (Fuji System, Tokyo, Japan)に充填した胚盤胞を患者へ移植した。

#### 10) 形態動的パラメーター

媒精時間を 0 時間とし、雌雄前核消失 (Pronuclear fading; tPNf)、2cell から 5cell までの各分割時間 (t2,t3,t4,t5)、胞胚腔形成開始 (start of blastulation; tSB)、胚盤胞期胚 (full blastocyst ; tB)および拡張期胚盤胞 (expanded blastocyst; tEB)についてアノテーションを実施した。さらに、これらのデータを基に、2cell から 3cell に要した時間 (cell cycle from 2 to 3cells; CC2)、3cell から 5cell に要した時間 (cell cycle from 3 to 5cells; CC3)、tSB から tB に要した時間(tB-tSB)、胚盤胞の拡張に要した時間として tSB から tEB (tEB-tSB)および tB から tEB (tEB-tB)を算出した。

#### 11) Blastocysts collapse の定義

胚盤胞の崩壊現象 (Blastocyst collapse; BC)は、Bodriらおよび Sciorioらの方法を一部改変して定義した (Bodri *et al.*, 2016, Sciorio *et al.*, 2019)。収縮現象が起きる直前の画像から Embryo Viewer の測定ツールを用いて胞胚腔の最大径を測定し、その後、最も収縮したタイミングで再び胚盤胞の内径を測定した。収縮時の胚盤胞内径が直前の 50%以下であれば BC とカウントし、51%以上であれば BC とはカウントせず、収縮とした (Fig.1)。

## 12) 臨床妊娠、生児獲得判定の定義

超音波による胎嚢の確認により臨床妊娠と定義し、妊娠 22 週以前の流産を初期流産とした。帝王切開を含む先天性異常のない新生児の出産により生児獲得と定義した。

## 13) 統計解析

データは JMP statistical software version 14.0.0 (SAS institute inc)を用いて統計解析を行った。第一に、臨床妊娠、生産をそれぞれ目的変数とした単変量ロジスティック回帰分析により、患者および胚背景 (患者年齢、媒精方法、凍結日、累積採卵回数、累積移植回数、ICM グレード、TE グレード)の統計的な関連性について解析した。また、マンホイットニーの U 検定を用いて、各形態動的パラメーターを妊娠群、非妊娠群間および生産群、非生産群間で比較した。その後、単変量解析によって臨床成績との関連性が認められた変数を説明変数とし、臨床妊娠、生産をそれぞれ目的変数とした多変量ロジスティック回帰分析により形態動的パラメーターと臨床成績の関連性について解析した。P 値が 0.05 未満の項目において統計的有意差があると判定した。

### 第三節 結果

#### 1) 臨床成績と患者、胚背景の関連性についての解析

臨床妊娠を目的変数とした単変量ロジスティック回帰分析により、患者年齢、媒精方法、凍結日、TE グレードが臨床妊娠と有意な関連性があることが示された。一方で、累積採卵回数および、累積移植回数、ICM グレードは関連性を認めなかった (Table 1)。さらに、生産を目的変数とした単変量ロジスティック回帰分析により、患者年齢、凍結日、累積採卵回数、累積移植回数、TE グレードが生産と有意な関連性があることが示された。一方で、媒精方法および ICM グレードは関連性を認めなかった (Table 1)。

#### 2) 妊娠群および非妊娠群の形態動的パラメーターの比較

妊娠群および非妊娠群における各形態動的パラメーターの平均時間の差を Table 2 に示す。tEB および、tEB-tSB、tEB-tB が非妊娠群と比較して妊娠群において有意に短いことが示された (Table 2)。

#### 3) 生産群および非生産群の形態動的パラメーターの比較

生産群および非生産群における各形態動的パラメーターの平均時間の差を Table 3 に示す。tEB、CC2 (t3-t2) および、tEB-tSB、tEB-tB が非生産群と比較して生産群において有意に短いことが示された (Table 3)。

#### 4) 臨床妊娠に関与する形態動的パラメーターの解析

臨床妊娠を目的変数とし、妊娠に関与することが明らかとなっている患者年齢、TE グレード、媒精方法、凍結日、に加え形態動的パラメーターを説明変数とした多変量ロジスティック回帰分析を実施した。その結果、形態動的パラメーターのうち、tEB-tSB および tEB-tB が臨床妊娠に有意に関連することが示された (Table 4)。

#### 5) 生産に関与する形態動的パラメーターの解析

生産を目的変数とし、生産に関与することが明らかとなっている患者年齢、TE グレード、累積採卵回数、累積移植回数、凍結日に加え形態動的パラメーターを説明変数とした多変量ロジスティック回帰分析を実施した。その結果、形態動的パラメーターのうち、tEB-tSB および tEB-tB が生産に有意に関与していることが示された (Table 5)。

#### 6) 拡張時間 (tEB-tSB, tEB-tB)と凍結日および Blastocyst collapse (BC)との関連性の解析

拡張時間である tEB-tSB および tEB-tB は、凍結日や BC 現象と関連することが予測された。そこで、凍結日別に tEB-tSB、tEB-tB の所要時間の差を比較した。また、培養期間中の BC の有無と tEB-tSB、tEB-tB の所要時間の差を比較し、BC の回数と拡張時間 (tEB-tSB, tEB-tB)の相関関係について解析した。

tEB-tSB および tEB-tB の所要時間は、Day 6 (D6)胚が Day 5 (D5)胚と比較して有意に長かった (tEB-tSB: D5;  $16.6 \pm 4.3$  vs. D6;  $22.0 \pm 7.2$ ,  $P < 0.01$ , Fig 2-A)(tEB-tB: D5;  $10.5 \pm 3.8$  vs. D6;  $14.7 \pm 7.2$ ,  $P < 0.01$ , Fig2-B)。また、tEB-tSB および tEB-tB の所要時間は、BC が起

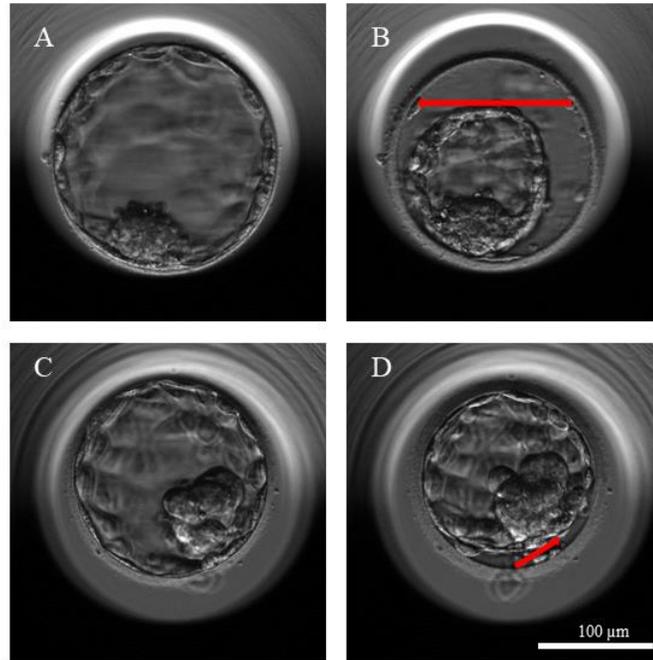
きた (BC)胚が、BC が起きなかった (Non-BC)胚と比較して有意に長かった (tEB-tSB: BC;  $22.6 \pm 6.9$  vs. Non-BC;  $16.9 \pm 4.9$ ,  $P < 0.01$ , Fig 3-A)(tEB-tB: BC;  $14.8 \pm 6.8$  vs. Non-BC;  $10.9 \pm 4.7$ ,  $P < 0.01$ , Fig 3-B)。さらに、BC 回数は tEB-tSB および tEB-tB の所要時間と正の相関関係が認められた (tEB-tSB:  $r = 0.45$ ,  $P < 0.01$ , tEB-tB:  $r = 0.33$ ,  $P < 0.01$ , Fig 4)。

#### 第四節 考察

本研究により、いくつかの形態動的パラメーターが単一凍結融解胚盤胞移植における妊娠率および生産率に影響を与えることが示された。妊娠群における tEB、tEB-tSB、tEB-tB が非妊娠群と比較して有意に短いことが示されたが、患者背景や胚の形態評価などを説明変数として加味したロジスティック回帰分析の結果では、tEB-tSB、tEB-tB のみが妊娠に影響を与えるパラメーターであった。また、生産群における tEB、t3-t2 (CC)、tEB-tSB、tEB-tB が非生産群と比較して有意に短いことが示されたが、患者背景や胚の形態評価などを説明変数として加味した多変量ロジスティック回帰分析の結果では、tEB-tSB、tEB-tB のみが生産に影響を与えるパラメーターであった。以上のことより、本研究の症例データでは、患者背景や胚の形態評価、凍結日などの交絡因子に関わらず妊娠および生産に影響をあたえる形態動的パラメーターは tEB-tSB、tEB-tB の 2 種類のみであることが明らかとなった。tEB-tSB は、桑実胚に初めて胞胚腔が確認できた時間である胚盤胞形成開始時間 (tSB) から、透明帯が薄くなり内径が 170  $\mu\text{m}$  に到達した時間である拡張期胚盤胞 (tEB) へ発育するために要した時間に相当する。一方、tEB-tB は胞胚腔が胚盤胞の 50% 以上を占め、拡張する直前の状態である胚盤胞期胚 (tB) から tEB へ発育するために要した時間に相当する。媒精から tEB への到達時間は、単変量回帰分析では妊娠および生産に影響のある因子であったが、多変量回帰分析では有意な差が認められなかった。このことから、腔形成が行われてから拡張するまでの時間が臨床成績に重要なパラメーターであることが示唆された。Campbell *et al.*, は、tSB と tB の遅

延が aneuploid 率に影響を与える形態動的パラメーターであることを報告している (Campbell *et al.*, 2013、2014)。同様に、Minasi *et al.*, は t4、tSB、tB、tEB、tHB の遅延が aneuploid 率に影響を与えることを報告している (Minasi *et al.*, 2016)。さらに、Mumusglu *et al.*, は t9、tM、tSB、tB、tEB の遅延が aneuploid 率に影響を与えることを報告している (Mumusglu *et al.*, 2017)。以上のように、胚盤胞移植において臨床成績に影響を与える形態動的パラメーターとして、tSB、tB、tEB は重要なパラメーターとなり得ることが考えられる。しかしながら、本研究ではこれらの到達時間は臨床成績に関与する因子ではなかった。これは、本研究で対象とした胚盤胞が十分に拡張した拡張期胚盤胞であり、かつ形態良好胚のみであったため、tSB、tB、tEB の到達時間が著しく遅延した胚が少数であったためであると考えられる。そのため、tEB-tSB や tEB-tB などの拡張に要した時間が臨床成績に影響する因子として表面化したと考えられる。また、腔形成後に拡張に時間を要する原因として考えられ得る事象として Blastocyst collapse (BC) や収縮現象が考えられる。そこで本研究では、BC と拡張時間 (tEB-tSB、tEB-tB) との関連性について解析し、BC が起きた胚は、起きなかった胚と比較して拡張時間が有意に長く、また BC 回数と拡張時間は正の相関関係にあることを示した。BC が起きた胚の妊娠率や生児獲得率は有意に低下することが多数の論文により報告されている (Marcos *et al.*, 2015、Bodri *et al.*, 2016、Sciorio *et al.*, 2019)。以上のことより、拡張時間の遅延原因の一つとして BC 現象が関与していることが示唆された。さらに、拡張時間が長い胚盤胞は培養期間が延長されている可能性が考えられる。そこで凍結日別に拡張時間を比較したところ、D6 凍結胚が、D5 凍結胚と比較して有意に拡張時間が長いことが明らかとなっ

た。D6凍結胚は、D5凍結胚と比較して臨床成績が低下することが報告されている (Ferreux *et al.*, 2018)。しかしながら、本研究の多変量回帰分析結果によると凍結日は臨床成績に関連のある因子ではなかったことから、拡張時間が凍結日よりも臨床成績に強く影響する因子であり、D6凍結胚の質が低下する理由のひとつに拡張時間の遅延が関与している可能性が示唆された。



**Fig 1.** Representative images of human blastocyst collapse (BC) and contraction recorded by time-lapse monitoring.

A and B: embryos with BC. A: Embryo before BC. B: Embryo at BC (volume reduction  $\geq 50\%$ ).

C and D: Embryos with contraction but not BC; C: Embryo before contraction. D: Embryo at contraction (volume reduction  $< 50\%$ ). Red line, BC and contraction. Bar = 100  $\mu\text{m}$ .

(Kobayashi *et al.*, 2020)

Table 1. Univariate logistic regression analyses for pregnancy and live birth.

	Pregnancy		Live birth	
	Odds ratio (95%CI)	P value	Odds ratio (95%CI)	P value
Age	0.91 (0.86-0.96)	< <b>0.01</b>	0.88 (0.84-0.93)	< <b>0.01</b>
Type of insemination (IVF or ICSI)	1.58 (1.01-2.32)	< <b>0.05</b>	1.37 (0.90-2.09)	0.37
Day of culture (D5 or D6)	0.65 (0.44-0.96)	< <b>0.05</b>	0.54 (0.35-0.83)	< <b>0.01</b>
Cumulative OPU cycles	0.90 (0.81-1.0)	0.05	0.80 (0.70-0.93)	< <b>0.01</b>
Cumulative ET cycles	0.93 (0.85-1.0)	0.06	0.89 (0.81-0.98)	< <b>0.05</b>
ICM grade (A or B)	0.79 (0.52-1.20)	0.28	0.60(0.38-0.97)	0.36
TE grade (A or B)	0.40 (0.27-0.60)	< <b>0.01</b>	0.29 (0.18-0.46)	< <b>0.01</b>

**Table 1.** Univariate logistic regression analyses for pregnancy and live birth.

Abbreviations: CI, confidence interval; ET, embryo transfer; ICM, inner cell mass; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IVF, in-vitro fertilization; OPU, ovum pick-up; TE, trophoctoderm.

Table 2. Comparison of time-lapse morphokinetic parameters of pregnancy and non-pregnancy blastocysts.

Morphokinetic parameters	Pregnancy	Non-Pregnancy	P value
	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD	
<i>tPNf</i>	23.6 $\pm$ 2.9	23.6 $\pm$ 3.0	0.64
<i>t2</i>	26.2 $\pm$ 2.9	26.1 $\pm$ 3.0	0.56
<i>t3</i>	37.2 $\pm$ 4.2	37.2 $\pm$ 4.1	0.77
<i>t4</i>	38.3 $\pm$ 4.0	38.4 $\pm$ 4.2	0.75
<i>t5</i>	50.6 $\pm$ 6.8	50.8 $\pm$ 6.4	0.99
<i>tSB</i>	102.7 $\pm$ 8.2	103.2 $\pm$ 9.0	0.65
<i>tB</i>	109.0 $\pm$ 8.8	110.0 $\pm$ 9.6	0.33
<b><i>tEB</i></b>	120.1 $\pm$ 9.0	123.0 $\pm$ 10.8	<b>&lt; 0.01</b>
<i>t3-t2 (CC2)</i>	11.0 $\pm$ 2.4	11.1 $\pm$ 2.3	0.56
<i>t5-t3 (CC3)</i>	13.4 $\pm$ 4.0	13.6 $\pm$ 3.9	0.78
<i>tB-tSB</i>	6.3 $\pm$ 3.4	6.8 $\pm$ 3.6	0.12
<b><i>tEB-tSB</i></b>	17.4 $\pm$ 5.4	19.8 $\pm$ 6.6	<b>&lt; 0.01</b>
<b><i>tEB-tB</i></b>	11.0 $\pm$ 4.9	13.0 $\pm$ 6.2	<b>&lt; 0.01</b>

**Table 2.** Comparison of time-lapse morphokinetic parameters of pregnancy and non-pregnancy blastocysts.

Data are shown as means, SD and P value. Abbreviations: h, hours; SD, standard deviation; tB, full blastocyst; tEB, expanded blastocyst; tPNf, pronuclear fading; tSB start of blastulation; t2, t3, t4, t5 onset of 2 –5 cell divisions; CC2, second cell cycle from 2 to 3 cells; CC3, third cell cycle from 3 to 5 cells; tB–tSB, duration of tSB to tB; tEB–tB, duration of tB to tEB; tEB–tSB, duration of tSB to tEB.

Table 3. Comparison of time-lapse morphokinetic parameters of between live birth and non-pregnancy+pregnancy loss blastocysts.

Morphokinetic parameters	Live birth	Non-Pregnancy + pregnancy loss	P value
	mean $\pm$ SD	mean $\pm$ SD	
<i>tPNf</i>	23.5 $\pm$ 2.8	23.6 $\pm$ 3.0	0.88
<i>t2</i>	26.1 $\pm$ 2.8	26.1 $\pm$ 3.1	0.80
<i>t3</i>	37.0 $\pm$ 4.0	37.3 $\pm$ 4.2	0.67
<i>t4</i>	38.1 $\pm$ 3.7	38.4 $\pm$ 4.3	0.73
<i>t5</i>	50.3 $\pm$ 6.8	50.9 $\pm$ 6.5	0.70
<i>tSB</i>	102.2 $\pm$ 7.9	103.3 $\pm$ 9.0	0.32
<i>tB</i>	109.9 $\pm$ 9.6	108.7 $\pm$ 8.6	0.25
<b><i>tEB</i></b>	119.4 $\pm$ 9.0	122.8 $\pm$ 10.6	<b>&lt; 0.01</b>
<b><i>t3-t2 (CC2)</i></b>	10.9 $\pm$ 2.4	11.2 $\pm$ 2.3	<b>&lt; 0.05</b>
<i>t5-t3 (CC3)</i>	13.3 $\pm$ 4.0	13.6 $\pm$ 3.9	0.56
<i>tB-tSB</i>	6.5 $\pm$ 3.6	6.7 $\pm$ 3.6	0.66
<b><i>tEB-tSB</i></b>	17.2 $\pm$ 5.0	19.5 $\pm$ 6.6	<b>&lt; 0.01</b>
<b><i>tEB-tB</i></b>	10.7 $\pm$ 4.4	12.9 $\pm$ 6.2	<b>&lt; 0.01</b>

**Table 3.** Comparison of time-lapse morphokinetic parameters of between live birth and non-pregnancy+pregnancy loss blastocysts.

Data are shown as means, SD and P value. Abbreviations: h, hours; SD, standard deviation; tB, full blastocyst; tEB, expanded blastocyst; tPNf, pronuclear fading; tSB start of blastulation; t2, t3, t4, t5 onset of 2 –5 cell divisions; CC2, second cell cycle from 2 to 3 cells; CC3, third cell cycle from 3 to 5 cells; tB–tSB, duration of tSB to tB; tEB–tB, duration of tB to tEB; tEB–tSB, duration of tSB to tEB.

Table 4. Multivariable logistic regression analysis for pregnancy in FTET.

explanatory variable	Odds ratio (95% CI)	P value
Age	1.08 (10.2-1.14)	< <b>0.01</b>
TE grades (A or B)	2.13 (1.36-3.32)	< <b>0.01</b>
Day of frozen (Day 5 or 6)	1.30 (0.65-2.57)	0.47
Type of insemination (IVF or ICSI)	1.19 (0.78-1.82)	0.53
<i>tPNf</i>	0.87 (0.56-1.36)	0.55
<i>t2</i>	1.12 (0.70-1.75)	0.65
<i>t3</i>	1.06 (0.93-1.20)	0.39
<i>t4</i>	0.96 (0.84-1.10)	0.57
<i>t5</i>	1.00 (0.95-1.07)	0.79
<i>tSB</i>	0.96 (0.90-1.03)	0.23
<i>tB</i>	1.01 (0.99-1.04)	0.33
<i>tEB</i>	0.97 (0.94-1.01)	0.17
<i>t3-t2 (CC2)</i>	1.05 (0.95-1.15)	0.36
<i>t5-t3 (CC3)</i>	1.00 (0.94-1.06)	0.93
<i>tB-tSB</i>	1.04 (0.98-1.11)	0.17
<i>tEB-tSB</i>	1.07 (1.03-1.12)	< <b>0.01</b>
<i>tEB-tB</i>	1.07 (1.02-1.12)	< <b>0.01</b>

**Table 4.** Multivariable logistic regression analysis for pregnancy in FTET.

Abbreviations: CI, confidence interval; ICSI, intracytoplasmic sperm injection; IVF, in-vitro fertilization; TE, trophoctoderm. tB, full blastocyst; tEB, expanded blastocyst; tPNf, pronuclear fading; tSB start of blastulation; t2, t3, t4, t5 onset of 2 –5 cell divisions; CC2, second cell cycle

from 2 to 3 cells; CC3, third cell cycle from 3 to 5 cells;  $t_B-t_{SB}$ , duration of  $t_{SB}$  to  $t_B$ ;  $t_{EB}-t_B$ , duration of  $t_B$  to  $t_{EB}$ ;  $t_{EB}-t_{SB}$ , duration of  $t_{SB}$  to  $t_{EB}$ .

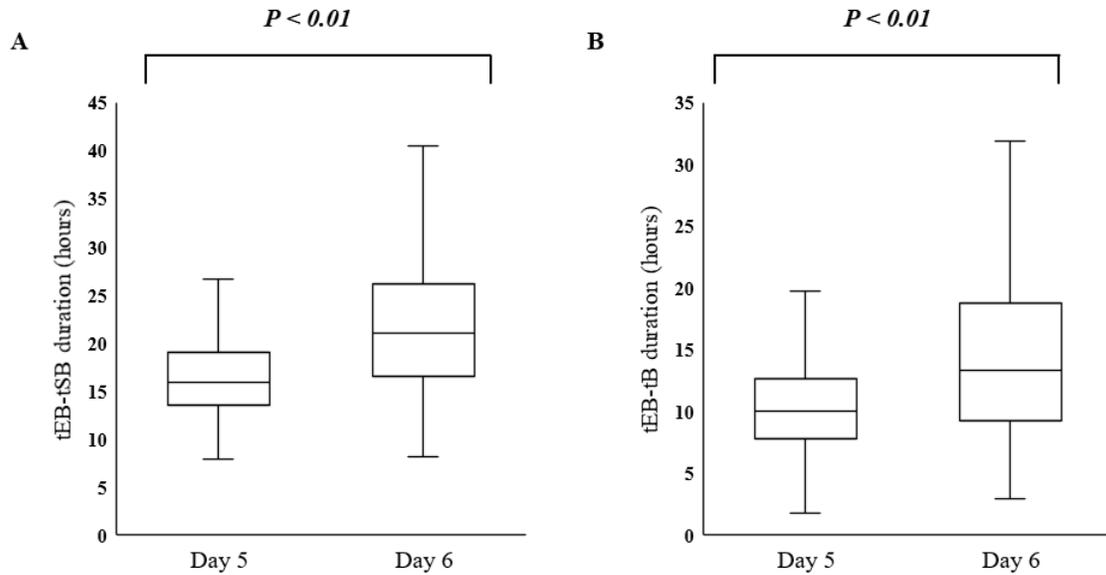
Table 5. Multivariable logistic regression analysis for live birth in FTET.

explanatory variable	Odds ratio (95%CI)	P value
Age	1.09 (1.03-1.16)	< <b>0.01</b>
TE grades (A or B)	2.92 (1.76-4.85)	< <b>0.01</b>
Day of frozen (Day 5 or 6)	0.94 (0.56-1.59)	0.81
Cumulative OPU cycles	1.14 (0.92-1.45)	0.44
Cumulative ET cycles	0.95 (0.82-1.11)	0.67
<i>tPNf</i>	0.81 (0.56-1.36)	0.41
<i>t2</i>	1.10 (0.67-1.89)	0.71
<i>t3</i>	1.11 (0.96-1.27)	0.16
<i>t4</i>	1.00 (0.86-1.19)	0.93
<i>t5</i>	0.99 (0.93-1.06)	0.97
<i>tSB</i>	1.00 (0.93-1.08)	0.84
<i>tB</i>	1.01 (0.99-1.04)	0.32
<i>tEB</i>	0.98 (0.94-1.01)	0.18
<i>t3-t2 (CC2)</i>	1.09 (0.99-1.06)	0.08
<i>t5-t3 (CC3)</i>	0.99 (0.93-1.05)	0.86
<i>tB-tSB</i>	0.99 (0.93-1.06)	0.82
<i>tEB-tSB</i>	1.06 (1.01-1.10)	< <b>0.05</b>
<i>tEB-tB</i>	1.08 (1.03-1.14)	< <b>0.01</b>

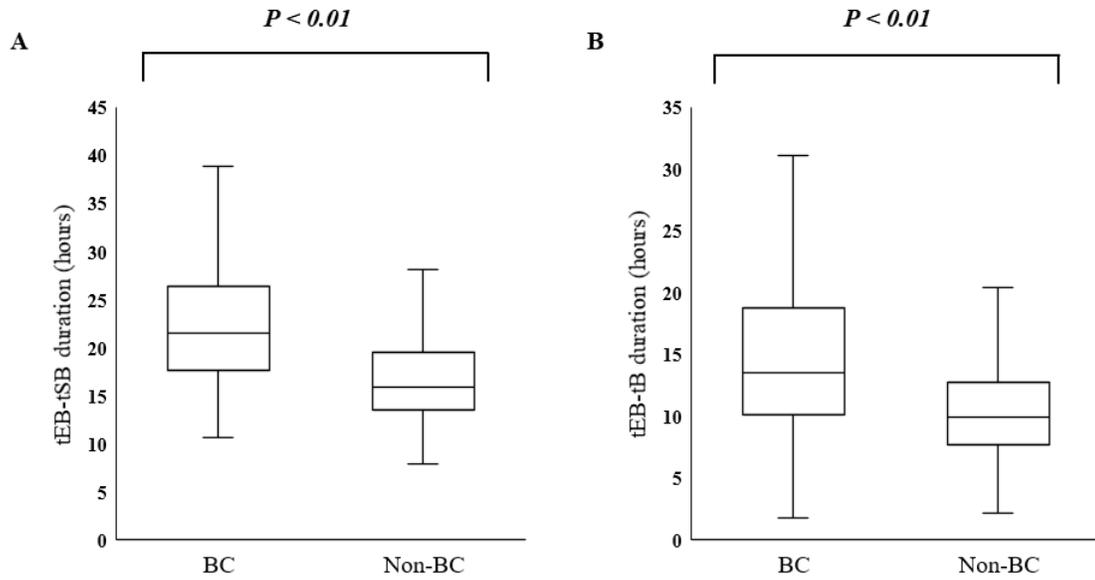
**Table 5.** Multivariable logistic regression analysis for live birth in FTET.

Abbreviations: CI, confidence interval; ET, embryo transfer; OPU, ovum pick-up; TE, trophoctoderm. tB, full blastocyst; tEB, expanded blastocyst; tPNf, pronuclear fading; tSB start of blastulation; t2, t3, t4, t5 onset of 2 –5 cell divisions; CC2, second cell cycle from 2 to 3 cells;

CC3, third cell cycle from 3 to 5 cells;  $t_B-t_{SB}$ , duration of  $t_{SB}$  to  $t_B$ ;  $t_{EB}-t_B$ , duration of  $t_B$  to  $t_{EB}$ ;  $t_{EB}-t_{SB}$ , duration of  $t_{SB}$  to  $t_{EB}$ .

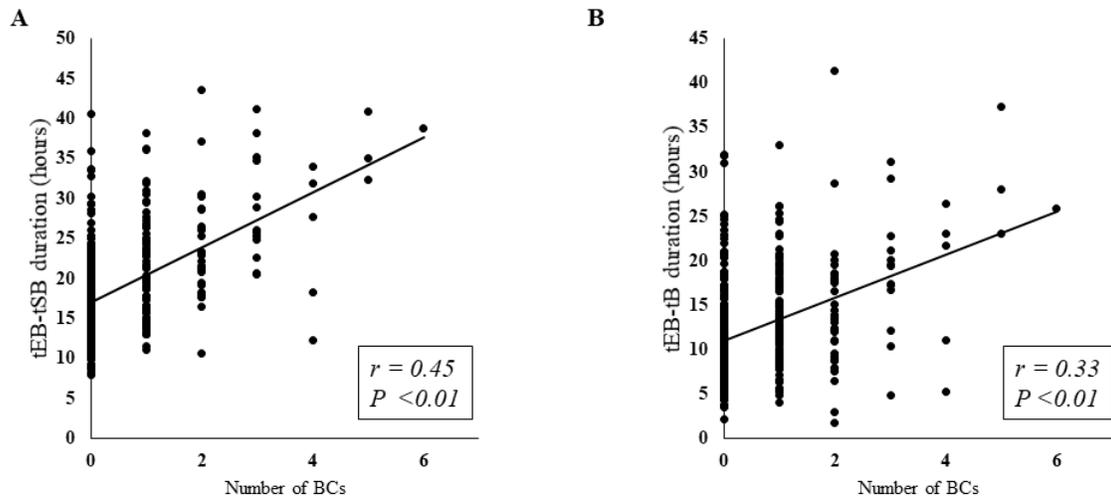


**Fig 2.** Comparison of tEB-tSB and tEB-tB duration between Day 5 and Day 6 blastocysts. Boxplots show Day 5 and Day 6 blastocysts. Y axis, durations of tEB-tSB (A) or tEB-tB (B) (hours).  $P < 0.01$ . Abbreviations: tEB-tB, duration between blastocyst stage (tB) and expanded blastocyst (tEB); tEB-tSB, duration between start of blastulation (tSB) and expanded blastocyst (tEB).



**Fig 3.** Comparison of tEB-tSB and tEB-tB duration between blastocysts with and without BC.

Boxplots show blastocysts with (BC) and without BC (Non-BC). Y axis, durations of tEB-tSB (A) or tEB-tB (B) (hours).  $P < 0.01$ . Abbreviations: BC, blastocyst collapse; tEB-tB, duration between blastocyst stage (tB) and expanded blastocyst (tEB); tEB-tSB, duration between start of blastulation (tSB) and expanded blastocyst (tEB).



**Fig 4.** Correlation between tEB–tSB and tEB–tB durations and number of BCs.

A: Y axis, tEB–tSB durations (hours). X axis, Number of BCs. Spearman coefficient ( $r$ ), 0.45.  $P < 0.01$ . B: Y axis, tEB–tB durations (hours). X axis, Number of BCs. Spearman coefficient ( $r$ ), 0.33.  $P < 0.01$ . Abbreviations: BC, blastocyst collapse; tEB–tB, duration between blastocyst stage (tB) and expanded blastocyst (tEB); tEB–tSB, duration between start of blastulation (tSB) and expanded blastocyst (tEB).

### 第三章 培養後培地中に含まれる cell free mitochondrial DNA 量

#### と胚の形態動的パラメーターとの関係

##### 第一節 緒言

近年、培養後培地 (Spent culture medium; SCM)中に含まれている胚由来の cf-DNA は、非侵襲的に胚を評価する遺伝的ソースとして利用できる可能性が報告されている (Xu *et al.*, 2016)。しかしながら、SCM 中の cf-DNA と胚細胞内の DNA の染色体一致率が低いことや、卵丘細胞などの母体細胞由来 DNA のコンタミネーションを否定しきれないことから、SCM 中の cf-DNA を用いて胚の染色体正常性を正確に評価することは難しいといった報告もある (Capalbo *et al.*, 2018)。一方で、SCM 中には核ゲノム由来の cf-nDNA の他にミトコンドリアゲノム由来の cf-mtDNA が存在していることが知られており、胚細胞は核ゲノムよりもミトコンドリアを多く持つため、SCM 中の cf-mtDNA は cf-nDNA よりも検出が容易であることが考えられる。実際に、ブタ卵胞液中やブタ顆粒膜細胞を培養した SCM 中に含まれる cf-mtDNA 量は、cf-nDNA 量と比較して数十倍から数百倍多く検出される (Kansaku *et al.*, 2019、Ichikawa *et al.*, 2019、Kobayashi *et al.*, 2020)。また、ヒト胚を 3 日間培養した SCM 中における cf-mtDNA 量が多いほど、その後の胚盤胞発生率や着床率が高いことが報告されており、SCM 中の cf-mtDNA 量が胚評価に利用できることが示唆されている (Stigliani *et al.*, 2014)。しかしながら、胚由来の cf-mtDNA がどのように SCM 中に分泌されているかについてはまだ不明な点が多く、また、SCM 中の cf-mtDNA 量が胚盤胞の質や移植後の臨床成績に影響するか否かについては明らかになっていない。本検討では、タイムラプスインキュベーターにより拡張期胚盤胞まで培養した胚

の SCM を回収し、real-time PCR によって SCM 中の cf-mtDNA 量を測定した。そして、SCM 中の cf-mtDNA 量と患者背景、胚盤胞の形態評価およびタイムラプス画像より得られた形態動的データとの関連性について解析した。さらに、単一凍結融解胚移植における移植成績と SCM 中の cf-mtDNA 量との関係性について解析した。

## 第二節 材料および方法

### 1) 倫理承認

本研究は、2017年に実施された神奈川レディースクリニック倫理委員会において倫理承認を得た。また、本研究は後方視的観察研究であり、参加患者はインフォームドコンセントによる同意患者のみを対象とした。

### 2) 対象患者および卵巣刺激

2019年に神奈川レディースクリニックにおいて体外受精治療を施行した20夫婦を対象とした。卵巣刺激方法については、第二章第二節を参照。COCsはFM (Cook Medical)にて洗浄し、媒精まで前培養した。

### 3) 精液調整

第二章第二節を参照。

### 4) 体外受精

第二章第二節を参照。

### 5) 顕微授精

第二章第二節を参照。卵丘細胞除去後、顕微鏡下で残存卵丘細胞が付着していないか確認した。

#### 6) タイムラプスインキュベーターによる体外培養

EmbryoSlide (Vitrolife)の各ウェルに global total medium (LifeGlobal)を 25  $\mu$ L ずつ注入し、1.5 mL の OVOIL™ (Vitrolife)によってカバーし、インキュベーター内で 6 時間以上平衡化した。媒精後、透明帯に付着した卵丘細胞および精子がないことを顕微鏡下で確認した後、卵子を 1 個ずつウェルに移動した。その後、スライドをタイムラプスインキュベーターである EmbryoScope (Vitrolife)へ移動し、37°C、6% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>、89% N<sub>2</sub> 下で最大 7 日間体外培養を行った。

#### 7) 胚盤胞凍結

第二章第二節参照。

#### 8) 凍結融解胚盤胞移植

第二章第二節を参照。妊娠判定は、超音波による胎嚢の確認を持って臨床妊娠と定義した。

#### 9) 培養後培地のサンプリング

凍結や培養終了により胚をウェルから取り除いた後、25  $\mu$ L の培養後培地のうち 20  $\mu$ L をピペットマンにより回収した。回収した培養後培地中の残存細胞や精子のコンタミネーションを回避するため、遠心分離処理 (2500 g  $\times$  1 min)を行い、上清のみを -20°C で冷凍保存した。

#### 10) 対象胚盤胞および除外胚盤胞の定義

本研究では、Embryo Viewer の測定ツールを用いて胚盤胞の内径を測定し、内径が 170  $\mu\text{m}$  以上に到達した胚盤胞のみを拡張期胚盤胞と定義し研究対象とした。胚盤胞へ発育しなかった胚、内径が 170  $\mu\text{m}$  未満の胚盤胞、孵化した胚盤胞、および変性した胚は本研究の対象から除外した。

#### 11) 胚盤胞の形態評価

第二章第二節参照。

#### 12) 形態動的パラメーター

形態動的パラメーターのアノテーションは、Mumusoglu らの方法に基づいて実施した (Mumusoglu *et al.*, 2017)。媒精時間を 0 時間と設定し、雌雄前核消失 (Pronuclear fading; tPNf)、2cell から 9cell までの各分割時間 (t2,t3,t4,t5,t6,t7,t8,t9+)、桑実胚形成 (morula formation; tM)、胞胚腔形成開始 (start of blastulation; tSB)、胚盤胞期胚 (full blastocyst ; tB) および拡張期胚盤胞 (expanded blastocyst; tEB) についてアノテーションを実施した。さらに、これらのデータを基に、2cell から 3cell に要した時間 (cell cycle from 2 to 3cells; CC2)、3cell から 5cell に要した時間 (cell cycle from 3 to 5cells; CC3)、tSB から tB に要した時間(tB-tSB)、胚盤胞の拡張に要した時間として tSB から tEB (tEB-tSB) および tB から tEB (tEB-tB) を算出した。

#### 13) Blastocysts collapse の定義

第二章第二節参照。

#### 14) DNA 抽出およびリアルタイム PCR

回収した SCM サンプルに 20  $\mu$ L の DNA 抽出液 (20 mM Tris, 0.4 mg/mL proteinase K, 0.9% Nonidet p-40 および 0.9% Tween 20)を加え、サーマルサイクラーにて 55°C で 30 分間、95°C で 5 分間インキュベートすることで SCM 中の DNA を抽出した。Cf-mtDNA のコピー数は、Real-time PCR (CFX connect, Bio-Rad)によって測定した。プライマーはヒトリファレンスシーケンスにおけるミトコンドリアゲノムのデータ (NC\_012920.1, 16,569bp)を参照し Primer-BLAST を用いて設計した。これらのプライマーはヒトミトコンドリアゲノムの 3486-3612 の領域にある 126 bp を増幅するように設計した (Forward: 5'-ccctaaaaccgccacatct-3', Reverse: 5'-ggcctaggttgaggttgacc-3')。PCR 反応液には、得られたサンプルを 9  $\mu$ L、プライマー混合液を 1  $\mu$ L (0.5  $\mu$ M)および KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2X) (KAPA BIOSYSTEMS)を 10  $\mu$ L 混合し合計 20  $\mu$ L とした。PCR 反応条件は、initial denaturation 95°C で 3 分間行った後、97°C で 6 秒、60°C で 10 秒を一つのサイクルとして 40 サイクル行った。PCR 効率は融解曲線および電気泳動像により確認した。スタンダード曲線は、外部標準の 10 倍希釈系列を用いて作成した。使用した外部標準は PCR 産物を Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kits (Invitrogen)を用いてクローニングし、得られたプラスミド DNA をシーケンスによって目的の遺伝子配列と一致していることを確認した。スタンダードの PCR 産物のコピー数は DNA 濃度とアボカドロ係数を用いて算出した。Cf-mtDNA のコピー数は、20  $\mu$ L の SCM 中に含まれるコピー数として算出した。

## 15) 統計解析

データは JMP statistical software version 14.0.0 (SAS institute inc)を用いて統計解析を行った。様々な項目と SCM 中の cf-mtDNA 量との関連性や相関関係は以下に示す統計手法を用いて解析した。患者背景 [患者年齢、body mass index (BMI)、血中抗ミュラー管ホルモン(anti-mullerian hormone ; AMH) レベル、累積採卵回数、累積移植回数]は線形重回帰モデル、胚盤胞の形態評価 (A、B、C の 3 群間)は Kruskal-Wallis 検定、形態動的パラメーターと所要時間、BC の回数との相関関係はそれぞれ Spearman の順位相関係数により解析した。さらに、媒精方法の違い(IVF or ICSI)、BC の有無、培養日数(Day5 or Day6)、形態良好胚か否かにおける SCM 中の cf-mtDNA 量の差は、マンホイットニーの U 検定により解析した。P 値が 0.05 未満の項目において統計的有意差があると判定した。

### 第三節 結果

#### 1) 患者背景と SCM 中の cf-mtDNA 量との関連性

53 個の胚盤胞を培養した SCM 中の cf-mtDNA 量を定量した。cf-mtDNA コピー数の全体平均は 13.0 コピー/20  $\mu$ L であった。平均年齢 (36.0 [31-44] 歳)、BMI (20.9 [18.9-25.6] kg/m<sup>2</sup>)、血中 AMH レベル (1.53 [0.03-5.82] ng/mL)、累積採卵回数 (0.9 [0-4]回)、累積移植回数(0.8 [0-7]回)は、SCM 中の cf-mtDNA 量と有意な相関関係は認められなかった (Table 6)。

#### 2) 胚背景と SCM 中の cf-mtDNA 量との関連性

SCM 中の cf-mtDNA 量は、媒精方法の違い (IVF:  $12.0 \pm 6.9$  vs. ICSI:  $13.4 \pm 7.7$ ,  $P = 0.79$ , Fig 5)および、培養日数の違い (Day 5:  $11.2 \pm 7.2$  vs. Day 6:  $13.9 \pm 7.7$ ,  $P = 0.18$ , Fig 6)において有意な差は認められなかった。

#### 3) 形態的評価と SCM 中の cf-mtDNA 量との関連性

SCM 中の平均 cf-mtDNA 量は、培養していた胚盤胞の ICM (A:  $11.9 \pm 8.0$ , B:  $14.2 \pm 6.8$ , C:  $13.2 \pm 5.0$ ,  $P = 0.20$ , Fig 7-A)および TE (A:  $12.1 \pm 6.4$ , B:  $12.1 \pm 8.2$ , C:  $15.9 \pm 5.8$ ,  $P = 0.20$ , Fig 7-B)の形態評価間で有意な差は認められなかった。また、SCM 中の平均 cf-mtDNA 量は、形態良好胚群 (AA, AB, BA, BB)と形態不良胚群 (BC, CC) (良好胚;  $12.3 \pm 7.4$  vs. 不良胚;  $15.5 \pm 6.3$ ,  $P = 0.20$ , Fig 8)間において有意な差は認められなかった。

#### 4) 形態動的パラメーターと SCM 中の cf-mtDNA 量との関連性

SCM 中の cf-mtDNA 量は、全ての形態動的パラメーターの到達時間と有意な相関は認められなかった (Table 7)。一方で、ステージ間の所要時間のうち拡張に要した時間である tEB-tSB ( $r = 0.46$ ,  $P < 0.01$ ) および、tEB-tB ( $r = 0.47$ ,  $P < 0.01$ ) において cf-mtDNA 量と有意な正の相関が認められた (Table 8)。

#### 5) Blastocyst collapse (BC) および SCM 中の cf-mtDNA 量との関連性

SCM 中の平均 cf-mtDNA 量は BC が起きた群 (BC) が、起きなかった群 (Non-BC) と比較して有意に多いことが示された (BC:  $14.9 \pm 7.7$  vs. Non-BC:  $7.7 \pm 3.9$ ,  $P < 0.01$ , Fig 9-A)。また、SCM 中の平均 cf-mtDNA 量と BC 回数は有意な正の相関関係が認められた ( $r = 0.31$ ,  $P < 0.01$ , Fig 9-B)。

#### 6) BC および胚盤胞の拡張に要した時間との関連性

第二章第三節で示した通り、胚盤胞の拡張に要した時間は BC 現象によって胞胚腔が収縮することで遅延する。そこで、本章のデータにおいても同様の傾向が見られるかどうかを確認するため、BC の有無と拡張に要した時間との関係を解析した (Fig 10)。

平均 tEB-tSB および tEB-tB とともに、BC 群において Non-BC 群と比較して有意に長いことが示された (tEB-tSB; BC:  $22.9 \pm 6.0$  vs. Non-BC:  $17.2 \pm 4.5$ ,  $P < 0.01$ , Fig.10 A) (tEB-tB; BC:  $15.9 \pm 5.9$  vs. Non-BC:  $11.3 \pm 4.1$ ,  $P < 0.01$ , Fig.10 B)。

#### 7) 形態良好胚のみにおける拡張時間および BC と SCM 中の cf-mtDNA 量との関連性

本研究の結果では、胚盤胞の形態評価と SCM 中の cf-mtDNA 量との有意な関連性は認められなかったが、胚盤胞の形態評価は最も臨床成績に強く影響を与える因子である。そこで、対象を形態良好胚盤胞 (AA,AB,BA,BB) のみに限定し、SCM 中の cf-mtDNA 量が tEB-tSB、tEB-tB および BC の有無と関連性があるかを検討した。tEB-tSB は形態良好胚のみでは SCM 中の cf-mtDNA 量と有意な正の相関は認められなかったが、同様の傾向が見られた ( $r = 0.28, P = 0.07$ ; Fig 11-A)。一方で、tEB-tB は形態良好胚のみであっても SCM 中の cf-mtDNA 量と有意な正の相関が認められた ( $r = 0.35, P = 0.025$ ; Fig 11-B)。さらに、形態良好胚のみであっても SCM 中の平均 cf-mtDNA 量は、BC が起きた群 (BC) が、起きなかった群 (Non-BC) と比較して有意に多いことが示された ( $14.9 \pm 7.7$  vs.  $7.67 \pm 3.9, P = 0.02$ ; Fig 12)。

#### 8) SCM 中の cf-mtDNA 量と胚盤胞移植における臨床成績との関連性

28 個の SCM 中の cf-mtDNA 量を定量した胚盤胞を凍結融解胚移植法により移植し、8 個の胚盤胞の臨床妊娠を確認した。妊娠陽性胚盤胞の SCM 中に含まれる平均 cf-mtDNA 量は  $11.9 \pm 7.3$  ( $n = 8$ ) であり、妊娠陰性胚盤胞における  $15.5 \pm 8.1$  ( $n = 20$ ) と比較して低い傾向が見られたが、有意な差は認められなかった ( $P = 0.33$ )。また、総測定胚の平均値である 14.5 を指標に、cf-mtDNA Large 群と Small 群に分類して臨床妊娠率を比較した。その結果、妊娠率は Large 群が 23.1% (3/13)、Small 群が 33.3% (5/15) であり、有意な差は認められないものの Small 群で妊娠率が高い傾向が観察された ( $P = 0.20$ )。

#### 第四節 考察

本研究は、タイムラプスインキュベーターにより培養を行った胚盤胞の SCM 中の cf-mtDNA を定量した初めての研究であり、SCM 中の cf-mtDNA 量と胚盤胞の拡張に要した時間および BC 現象との関連性について実証した。患者年齢や BMI、卵巣機能を反映する血中の AMH 濃度などの患者背景は、胚発育率および臨床成績に大きく関与している (Fedorcsa'k *et al.*, 2004, Ligon *et al.*, 2019)。また、反復不成功患者を表す累積採卵回数や移植回数が多い患者は臨床成績が低い。そこで本研究では、SCM 中の cf-mtDNA 量と患者背景との関連性について重回帰分析により解析し、患者年齢、BMI、血中 AMH 濃度および累積採卵回数、移植回数と有意な関連がないことを確認した。以上により、本研究に用いたデータは SCM 中の cf-mtDNA 量と患者背景との関連性は低いことが示されたため、患者背景因子の影響を考慮せずに以後の解析を行った。

Cf-mtDNA の測定にはコンタミネーションの可能性を極限まで低下させる必要がある。そこで本研究では、胚に付着した精子由来の cf-mtDNA のコンタミネーションを避けるために体外受精後に顕微鏡下で透明帯に付着する精子がないことを観察した。また ICSI では、透明帯に付着する卵丘細胞をピペッティングにより完全に除去した。さらに、培養液採取後、遠心分離によって培養液中の細胞や精子を沈下させ、上清のみを PCR に供した。また、本研究では、IVF 由来と ICSI 由来胚の間で SCM 中の cf-mtDNA 量に差は認められなかった。以上のことから、本研究の定量手法では精子や卵丘細胞のコンタミネーションの可能性は低いと考えられる。

一方で、胚の細胞数が多いほど SCM 中の cf-DNA 量が増加することが考えられる。しかしながら、ブタ胚を用いた研究において、胚細胞数は SCM 中の cf-nDNA 量に影響を与えるが、cf-mtDNA には影響しないことが報告されている (Kobayashi *et al.*, 2020)。また、本研究において SCM 中の cf-mtDNA 量は、胚盤胞の形態評価 (ICM、TE 共に)のの違いによって差がないことを示しており、cf-mtDNA 量は胚盤胞の細胞数と関連が低いことが示唆された。

本研究では、SCM 中に含まれる cf-mtDNA 量と tEB-tSB および tEB-tB の所要時間が正の相関関係にあることを明らかにした。すなわち、拡張に要した時間が長い胚盤胞ほど培養液中に多数の cf-mtDNA を放出していることを意味する。Campbell *et al.*, は tSB および tB が遅延した胚盤胞は、異数性胚率が有意に高いことを示し、これらのカットオフ値をそれぞれ < 96.6 h、< 118.1 h と定義した (Campbell *et al.*, 2013, 2014)。また、Desai *et al.*, は tEB および tEB-tSB が正倍数性に関与していることを示し、それぞれ < 116 h、< 13h のカットオフ値を定義した (Desai *et al.*, 2018)。これらの報告は、胚盤胞への到達時間や拡張時間が胚質を評価するキーパラメーターであることを示唆している。さらに本研究の第二章において、tEB-tSB および tEB-tB に要した時間が短い胚盤胞ほど FTET の臨床成績が高いことを示している。以上のことから、SCM 中の cf-mtDNA 量は、臨床成績に影響を与える拡張時間と関連するため、拡張期胚盤胞のネガティブマーカーとなる可能性が示唆された。

一方で、SCM 中の cf-mtDNA がどのように胚盤胞から培養液中へ放出されているのかについては明らかになっていない。本研究は胚盤胞の BC 現象が SCM 中の cf-mtDNA 量と関連することを実証した。BC は胚盤胞の収縮現象のひとつであり、弱い収縮は孵化に関与し、BC のような強い収縮は再拡張に時間を要することで孵化を阻害することが報告されている

(Niimura *et al.*, 2003)。ヒト胚において、BC が起きた胚は起きなかった胚と比較して移植後の臨床妊娠率および生児獲得率 が有意に低下することが報告されており、BC は胚盤胞のセレクションに有用な指標である (Marcos *et al.*, 2015、Bodri *et al.*, 2016、Sciorio *et al.*, 2019)。本研究では、BC が起きた胚の SCM は起きなかった胚の SCM と比較して、有意に cf-mtDNA 含有量が多いことが示した。また、BC 回数は SCM 中の cf-mtDNA 量と正の相関関係にあることも示した。さらに、BC の起きた胚は起きなかった胚と比較して tEB-tSB および tEB-tB の所要時間が有意に長いことが明らかとなっている。これらのことにより、BC は胚盤胞の拡張を遅延させる要因の一つであるとともに、胚から cf-mtDNA が放出される機序の一つである可能性が示唆された。また、BC は臨床成績のネガティブマーカーであることから、相関関係にある SCM 中の cf-mtDNA 量もまたネガティブマーカーとなり得る可能性が示唆された。

Stigliani *et al.*, は、分割期胚 (Day 3)まで培養した SCM 中の cf-mtDNA 量を定量し、その後の胚発育および、臨床成績について検討した。その結果、SCM 中の cf-mtDNA 量が多いほど、胚盤胞への発生率および分割期胚移植における着床率が高いことを報告し、発育および臨床成績を予測するポジティブマーカーとして機能すると結論付けた (Stigliani *et al.*, 2014、2019)。しかしながら、本研究は彼らの結論に反して、SCM 中の cf-mtDNA が胚盤胞のネガティブマーカーとなる可能性を示唆している。結論が相反する原因として、胚発生における卵子および胚のミトコンドリア量の変化が挙げられる。卵子におけるミトコンドリア量は、質の指標となることが報告されており、低ミトコンドリア量の卵子は受精能および発育能が低い (Reynier *et al.*, 2001、Zeng *et al.*, 2007)。反対に、胚盤胞期胚の TE 細胞におけるミトコンドリア量が多い胚盤胞の異常染色体率が有意に高いことが報告されている (Fragouli *et al.*, 2015、Diez-Juan *et*

al.,2015)。受精後、胚のミトコンドリア量は著しく減少し、胚盤胞期胚に発育してから増加する (Hashimoto *et al.*, 2017)。そのため、初期胚におけるミトコンドリア量は、成熟卵子のミトコンドリア量を直接反映しており、胚盤胞期胚よりもミトコンドリア含有量が少ないと考えられる。さらに、SCM 中の cf-mtDNA 量は Day 3 と比較して Day 5 および 6 において有意に多いことが報告されており、SCM 中の cf-mtDNA の含有量は培養日数や胚のステージによって異なることが示されている (Hammond *et al.*, 2017)。これらのことから、本研究と既報の差異は、対象とした胚の培養日数やステージの違いによるものであることが考えられた。

本研究で、移植後の臨床結果と SCM 中の cf-mtDNA 量の関係性について解析したが、cf-mtDNA 量と移植後の臨床成績について明確な結果が得られるに至らなかった。しかしながら、妊娠陽性胚盤胞の平均 cf-mtDNA 量は、妊娠陰性胚盤胞よりも低い傾向が見られたため、検討移植胚数の増加により SCM 中の cf-mtDNA 量が臨床成績に關与する結果が今後得られる可能性が考えられた。

本研究により、拡張期胚盤胞の cf-mtDNA は SCM 中に放出されており、そのメカニズムは胞胚腔液に蓄積されていた cf-mtDNA が、BC や収縮によって SCM 中に放出されていることが推察された。すなわち、SCM 中の cf-mtDNA 量は BC の回数や拡張時間を反映しており、臨床成績に負の影響を与えることが示されている BC 回数や拡張時間の増加により SCM 中の cf-mtDNA も増加することから、SCM 中の cf-mtDNA はタイムラプスインキュベーターを必要としない非侵襲的なネガティブマーカーとして利用できる可能性が示唆された。

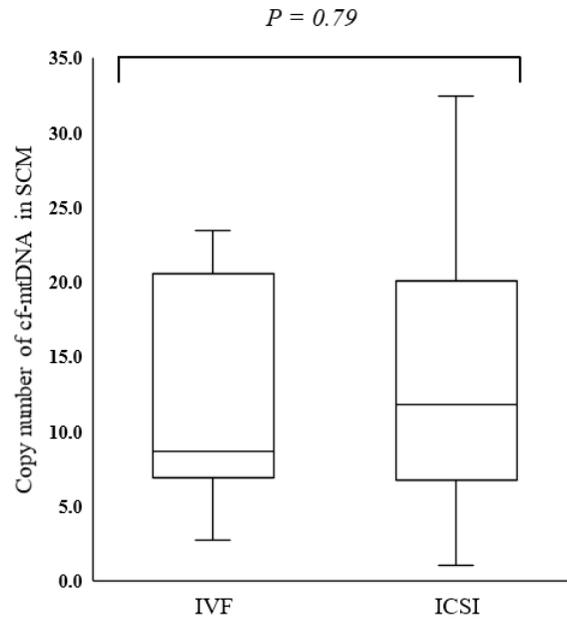
Table 6. Patient background and association with cf-mtDNA abundance in SCM.

Explanatory variables	Mean	Median	Range	SD	Association with cf-mtDNA abundance <i>P</i> values
Age (years)	36.0	35	31 - 44	3.5	0.50
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	20.9	20.2	18.9 - 25.6	1.8	0.31
AMH (ng/mL)	1.5	1.5	0.03 - 5.8	1.1	0.52
Cumulative OPU cycles (times)	0.9	0	0 - 4	1.3	0.13
Cumulative ET cycles (times)	0.8	0	0 - 7	1.8	0.94

**Table 6.** Patient background and association with cf-mtDNA abundance in SCM.

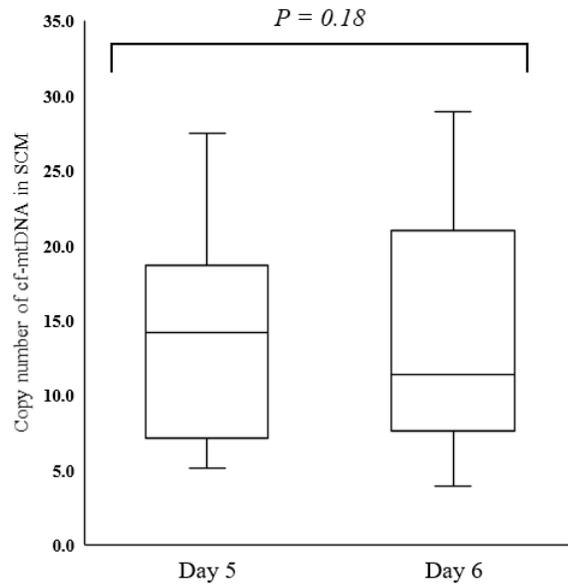
Associations between abundance of cf-mtDNA in SCM and age, BMI, AMH level, cumulative OPU and ET cycles (including frozen-thawed ET) were analyzed by multiple linear regression models. Data are shown as means, medians, range, and SD. Abbreviations: AMH, anti-Müllerian hormone; BMI, body mass index; cf-mtDNA, cell-free mitochondrial DNA; ET, embryo transfer; OPU, ovum pick-up; range, minimum to maximum; SD, standard deviation.

(Kobayashi *et al.*, 2020)



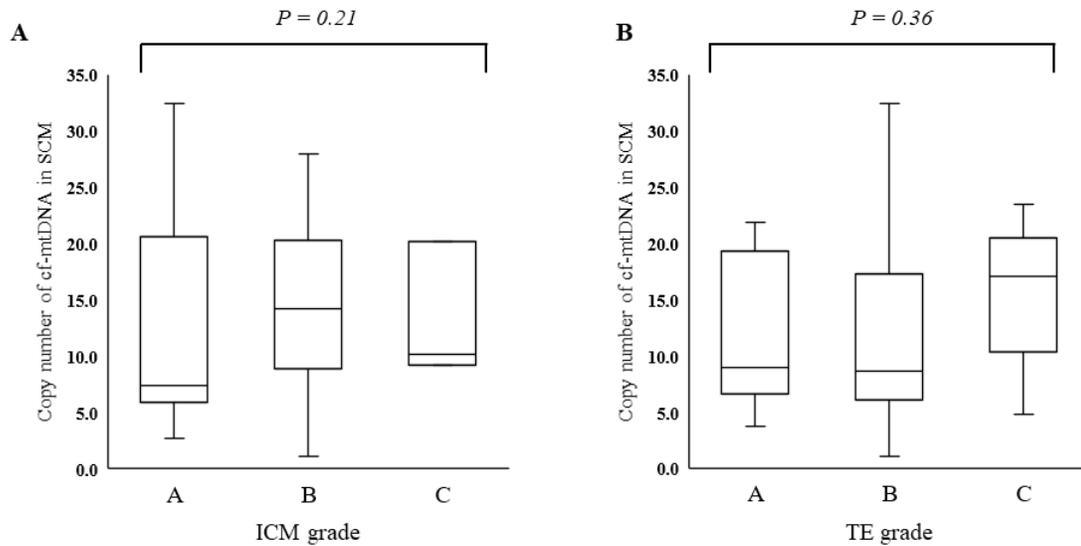
**Fig 5.** Comparison of cf-mtDNA abundance in SCM between insemination methods.

Cell-free mitochondrial DNA (cf-mtDNA) copy numbers in spent culture medium (SCM) of expanded blastocysts were compared between standard in vitro fertilization (IVF: n = 15) and intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI: n = 32). Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM.  $P = 0.79$ . (Kobayashi *et al.*, 2020)



**Fig 6.** Comparison of cf-mtDNA abundance in SCM between Day 5 and Day 6 blastocysts.

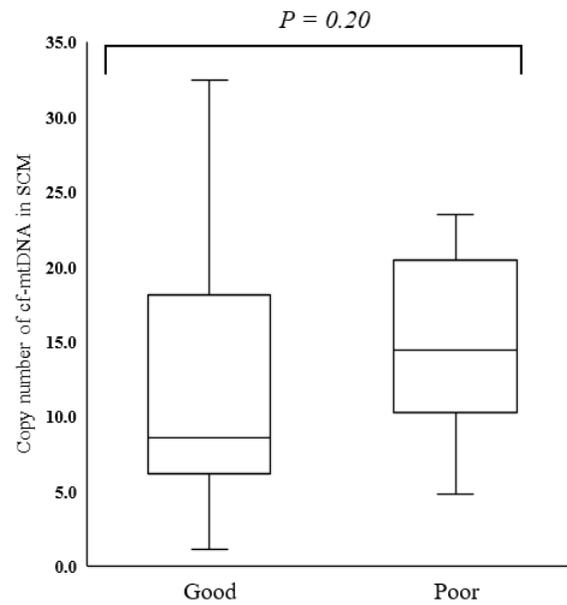
Cell-free mitochondrial DNA (cf-mtDNA) copy numbers in spent culture medium (SCM) were compared between SCM at culture day 5 ( $n = 18$ ) and culture day 6 ( $n = 35$ ). Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM.  $P = 0.18$ . Abbreviations: cf-mtDNA, cell-free mitochondrial DNA; SCM, spent culture medium. (Kobayashi *et al.*, 2020)



**Fig 7.** Comparison of cf-mtDNA abundance in SCM among morphological blastocyst grades.

Blastocysts were categorized as grades A, B, or C according to volume and tightly packed cells in ICM and into grades A, B, or C according to numbers and cohesiveness of epithelial cells in TE. SCM of expanded blastocysts was collected, and the cf-mtDNA copy numbers in SCM were compared among ICM grades (A, n = 27; B, n = 23; C, n = 3;  $P = 0.21$ ) or TE grades (A, n = 13; B, n = 28; C, n = 12;  $P = 0.36$ ). Y axis, copy numbers of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM.

Abbreviations: cf-mtDNA, cell-free mitochondrial DNA; ICM, inner cell mass; SCM, spent culture medium; TE, trophoctoderm. (Kobayashi *et al.*, 2020)



**Fig 8.** Comparison of cf-mtDNA abundance in SCM between Good and poor blastocysts.

Cell free-mtDNA copy numbers in SCM were compared between morphologically good (AA, AB, BA and BB, n = 40) and poor (BC and CC, n = 13) blastocysts. Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM.  $P = 0.20$ . Abbreviations: cf-mtDNA, cell-free mitochondrial DNA; SCM, spent culture medium. (Kobayashi *et al.*, 2020)

Table 7. Correlation between morphokinetic parameters and cf-mtDNA abundance in SCM.

Morphokinetic parameters	Mean (range)h	Correlation with cf-mtDNA abundance ( <i>r</i> )	<i>P</i> values
<i>tPNf</i>	24.7 (19.5 - 33.4)	-0.11	0.45
<i>t2</i>	27.2 (21.6 - 35.9)	-0.07	0.63
<i>t3</i>	39.8 (26.8 - 53.4)	-0.08	0.60
<i>t4</i>	41.5 (33.3 - 55.2)	-0.16	0.28
<i>t5</i>	53.8 (34.1 - 74.1)	-0.10	0.50
<i>t6</i>	56.6 (38.6 - 76.1)	-0.12	0.42
<i>t7</i>	60.0 (38.6 - 85.4)	-0.06	0.67
<i>t8</i>	64.6 (47.8 - 86.4)	-0.08	0.58
<i>t9+</i>	76.0 (49.8 - 95.6)	-0.24	0.11
<i>tM</i>	98.0 (73.4 - 128.9)	-0.08	0.58
<i>tSB</i>	106.9 (88.6 - 137.1)	-0.26	0.08
<i>tB</i>	113.6 (94.1 - 139.7)	-0.28	0.05
<i>tEB</i>	128.3 (107.8 - 160.2)	-0.05	0.75

**Table 7.** Correlation between morphokinetic parameters and cf-mtDNA abundance in SCM.

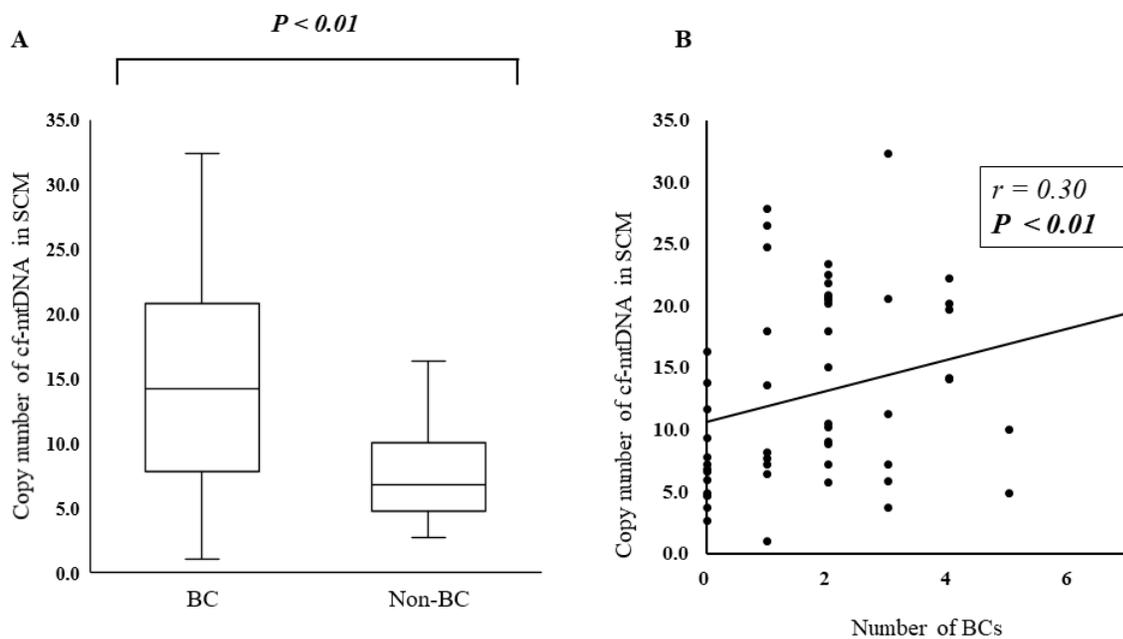
Data are shown as means, range, correlation coefficient and P value. Abbreviations: h, hours; r, Spearman rank-order correlation coefficient; tB, full blastocyst; tEB, expanded blastocyst; tM, morula formation; tPNf, pronuclear fading; tSB start of blastulation; t2, t3, t4, t5, t6, t7, t8, t9+, onset of 2 –9 cell divisions. (Kobayashi *et al.*, 2020)

Table 8. Correlation between morphokinetic durations and cf-mtDNA abundance in SCM.

Morphokinetic durations	Mean (range) h	Correlation with cf-mtDNA abundance ( <i>r</i> )	<i>P</i> values
<i>t3-t2</i> (CC2)	12.6 (3.3 - 17.5)	-0.14	0.34
<i>t5-t3</i> (CC3)	14.0 (0.0 - 25.6)	-0.12	0.45
<i>tB-tSB</i>	6.7 (2.0 - 17.5)	-0.06	0.68
<b><i>tEB-tSB</i></b>	<b>21.4 (8.3 - 38.0)</b>	<b>0.46</b>	<b>&lt; 0.01</b>
<b><i>tEB-tB</i></b>	<b>14.7 (5.0 - 27.7)</b>	<b>0.47</b>	<b>&lt; 0.01</b>

**Table 8.** Correlation between morphokinetic durations and cf-mtDNA abundance in SCM.

Data are shown as means, range, correlation coefficient and P value. Abbreviations: CC2, second cell cycle from 2 to 3 cells; CC3, third cell cycle from 3 to 5 cells; h, hours; r, Spearman rank-order correlation coefficient; tB–tSB, duration of tSB to tB; tEB-tB, duration of tB to tEB; tEB–tSB, duration of tSB to tEB. (Kobayashi *et al.*, 2020)

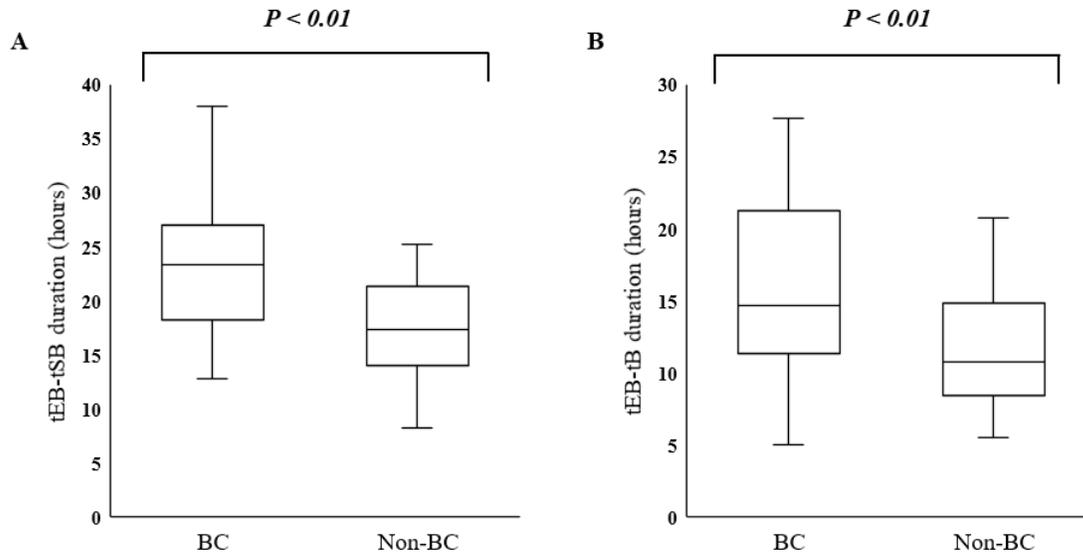


**Fig 9.** Comparison of cf-mtDNA abundance in SCM between blastocysts with and without BC and relationship between abundance of cf-mtDNA in SCM and number of BC.

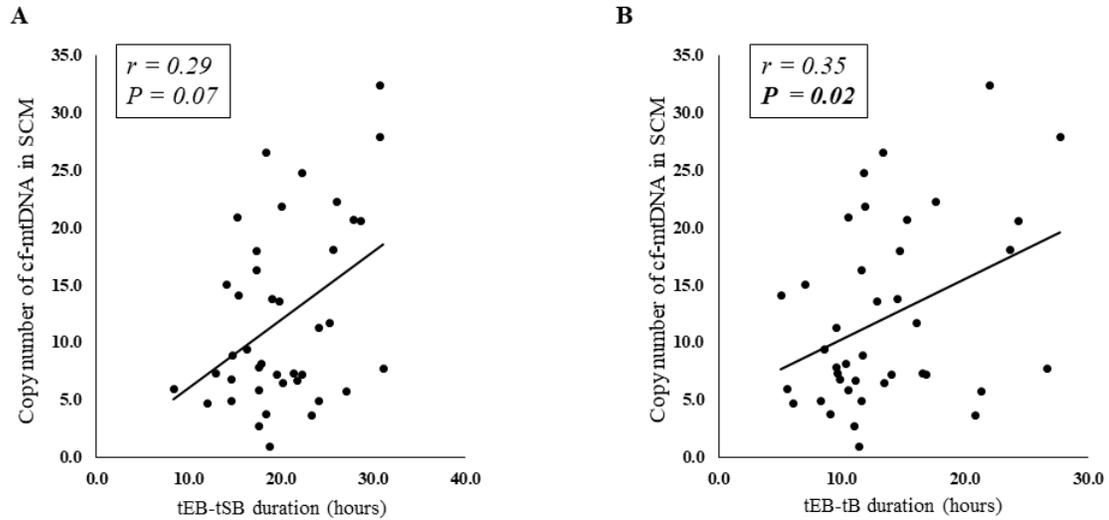
A: Cf-mtDNA copy numbers in SCM were compared between blastocysts with (BC; n = 39) and without (Non-BC; n = 14) BC. Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM.  $P < 0.01$ .

B: Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM. X axis, number of BC episode in corresponding expanded blastocyst. Spearman coefficient ( $r$ ), 0.30.  $P < 0.01$ .

Abbreviations: BC, blastocyst collapse; cf-mtDNA, cell-free mitochondrial DNA; SCM, spent culture medium. (Kobayashi *et al.*, 2020)



**Fig 10.** Comparison of tEB–tSB and tEB–tB durations between blastocysts with and without BC. Boxplots show blastocysts with (BC; n = 39) and without (Non-BC; n = 14) BC. Y axis, durations between tEB–tSB (A) or tEB–tB (B) (hours).  $P < 0.01$ . Abbreviations: BC, blastocyst collapse; tEB–tB, duration between blastocyst stage (tB) and expanded blastocyst (tEB); tEB–tSB, duration between start of blastulation (tSB) and expanded blastocyst (tEB). (Kobayashi *et al.*, 2020)



**Fig 11.** Correlation between cf-mtDNA abundance in SCM and tEB–tSB and tEB–tB durations using data from morphologically good blastocysts.

A: Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM. X axis, tEB–tSB durations (hours).

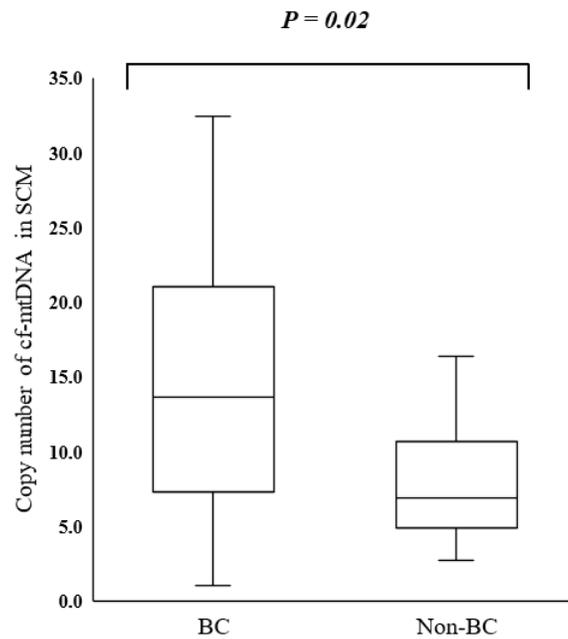
Spearman coefficient ( $r$ ), 0.29.  $P = 0.07$ . B: Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of

SCM. X axis, tEB–tB durations (hours). Spearman coefficient ( $r$ ), 0.35.  $P = 0.02$ . Abbreviations:

cf-mtDNA, cell-free mitochondrial DNA; SCM, spent culture medium; tEB–tB, duration

between blastocyst stage (tB) and expanded blastocyst (tEB); tEB–tSB, duration between start of

blastulation (tSB) and expanded blastocyst (tEB). (Kobayashi *et al.*, 2020)



**Fig 12.** Comparison of cf-mtDNA abundance in SCM between blastocysts with and without BC using the data from good blastocysts.

Cf-mtDNA copy numbers of SCM were compared between blastocysts with BC (BC; n = 27) and without BC (Non-BC; n = 13). Y axis, copy number of cf-mtDNA in 20  $\mu$ L of SCM.  $P = 0.02$ .

Abbreviations: BC, blastocyst collapse; cf-mtDNA, cell-free mitochondrial DNA; SCM, spent culture medium. (Kobayashi *et al.*, 2020)

## Summary

Abundance of cell-free mitochondrial DNA in spent culture medium associated with morphokinetics and blastocyst collapse of expanded blastocysts.

Single blastocyst transfer (SBT) is a useful method of reducing the likelihood of multiple pregnancies that place patients at risk. Morphological evaluation with microscopy is a typical noninvasive approach used in embryo selection. In addition to morphological evaluation, morphokinetic data of embryos, including profiles of embryo cleavage and developmental speed obtained using a time-lapse incubator, closely relate to clinical pregnancy rates (CPR), euploidy, and live birth rates (LBR). A pre-implantation genetic test (PGT) has recently been developed to select chromosomally normal embryos before SBT, which improves CPR and reduces spontaneous abortion rates. Although these evaluation methods are useful for embryo selection, the LBR after elective SBT remains low, at 40%–70%. Therefore, other parameters are needed for embryo evaluation. Spent culture medium (SCM) contains cell-free DNA (cf-DNA) derived from embryos and might serve as a non-invasive marker of embryo status. The mitochondrial DNA (mtDNA) than nuclear DNA is detected in SCM because cells and embryos harbor more copies of the mitochondrial, than the nuclear genome. However, how abundance of cf-mtDNA in SCM relates to the developmental events and quality of the blastocysts remains unknown. In this retrospective observational study investigated relationships between the abundance of cell-free mitochondrial DNA (cf-mtDNA) in SCM of human expanded blastocysts and their morphokinetics to address the question of whether the abundance of cf-mtDNA in SCM could predict the quality of blastocysts. The physiological status of patients considerably affects the

quality of embryos. Therefore, we investigated whether patient status affects the abundance of cf-mtDNA in SCM. We confirmed that the abundance of cf-mtDNA in SCM was not associated with the age, or the BMI, AMH level, or cumulative OPU and ET cycles of patient. These results indicate that patient-associated factors did not strongly affect cf-mtDNA abundance in the SCM in the present study. Furthermore, we found no significant differences in cf-mtDNA abundance in the SCM with respect to morphological blastocyst quality (ICM and TE grades). In the other hands, we found that cf-mtDNA abundance in the SCM significantly and positively correlated with the duration of tEB–tSB and of tEB–tB. In addition, when the data were filtered by morphological blastocysts grade, the difference was also observed in good blastocysts. Furthermore, we identified a positive association between cf-mtDNA abundance in SCM and the presence and frequency of blastocysts collapse (BC), and confirmed longer tEB–tSB and tEB–tB duration in blastocysts with, than without BC. BC is a hallmark of poor embryo quality, which results in low CPR and LBR in human blastocyst transfer. These and the present results suggest that BC is one cause of delayed blastocyst expansion, and that BC increases the abundance of cf-mtDNA in the SCM. Stigliani *et al.* associated abundance of cf-mtDNA in the SCM of early cleaved embryos (Day 3) with good blastocyst formation and implantation rates. Stigliani *et al.* also summarized data derived from multi-center studies and found higher cf-mtDNA abundance in the SCM of embryos derived from younger, than older patients. Therefore, they concluded that cf-mtDNA abundance in the SCM of early-stage embryos is a positive predictive marker of embryo development and clinical outcome. Hammond *et al.* also found more cf-mtDNA in the SCM in day 5 and 6 embryos than in the medium of day 3 embryos, showing that embryos stage-specifically secrete cf-mtDNA. We targeted cf-mtDNA abundance in the SCM at the expanded blastocyst stage on days 5 or 6. Thus, the different developmental stage could explain the

contradictory conclusions. In conclusion, this study revealed more abundant cf-mtDNA in the SCM of embryos with delayed blastocyst expansion and BC. This suggests that cf-mtDNA abundance in the SCM could serve as an additional or alternative marker of blastocyst evaluation.

## 謝辞

本稿を執筆するにあたり、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、また本研究の遂行ならびに本論文のご高閲をいただきました東京農業大学家畜繁殖学研究室教授 岩田尚孝博士に深甚なる謝意を表します。常に私の立場や心中を思いやって下さり、御助力と御助言を頂いたことは生涯忘れません。また、本研究の遂行にあたり暖かい御指導と適切な御助言を頂きました同教授 桑山岳人博士、同助教 白砂孔明博士に心から感謝申し上げます。さらに、本研究を遂行する機会と御支援を賜りました医療法人社団 樹慶会 神奈川レディースクリニック 小林淳一院長に深甚なる謝意を表します。最後に、研究を遂行できる環境を与えてくださった神奈川レディースクリニック培養部の皆様と私の家族に心から感謝いたします

## 引用文献

Ahlström A, Westin C, Wikland M, Hardarson T. Prediction of live birth in frozen-thawed single blastocyst transfer cycles by pre-freeze and post-thaw morphology. *Hum Reprod.* 2013;28:1199–209.

Bodri D, Sugimoto T, Yao Serna J, Kawachiya S, Kato R, Matsumoto T. Blastocyst collapse is not an independent predictor of reduced live birth: a time-lapse study. *Fertil Steril.* 2016;105:1476-1483.e3.

Campbell A, Fishel S, Bowman N, Duffy S, Sedler M, Fontes C, et al. Modelling a risk classification of aneuploidy in human embryos using non-invasive morphokinetics. *Reprod Biomed Online.* 2013;26:477–85.

Campbell A, Fishel S, Laegdsmand M. Aneuploidy is a key causal factor of delays in blastulation: Author response to “A cautionary note against aneuploidy risk assessment using time-lapse imaging.” *Reprod Biomed Online.* Reproductive Healthcare Ltd.; 2014;28:279–83.

Capalbo A, Romanelli V, Patassini C, Poli M, Girardi L, Giancani A, Stoppa M, Cimadomo D, Ubaldi FM, Rienzi L. Diagnostic efficacy of blastocoel fluid and spent media as sources of DNA for preimplantation genetic testing in standard clinical conditions. *Fertil Steril.* 2018;110:870-879.e5.

Desai N, Goldberg JM, Austin C, Falcone T. Are cleavage anomalies, multinucleation, or specific cell cycle kinetics observed with time-lapse imaging predictive of embryo developmental capacity or ploidy? *Fertil Steril.* 2018;109:665–74.

Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T. Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2014 20;12:54.

Diez-Juan A, Rubio C, Marin C, Martinez S, Al-Asmar N, Riboldi M, et al. Mitochondrial DNA content as a viability score in human euploid embryos: Less is better. *Fertil Steril*. 2015;104:534-541.e1.

Fedorcsák P, Dale PO, Storeng R, Ertzeid G, Bjercke S, Oldereid N, Omland AK, Abyholm T, Tanbo T. Impact of overweight and underweight on assisted reproduction treatment. *Hum Reprod*. 2004 Nov;19(11):2523-8

Fragouli E, Spath K, Alfarawati S, Kaper F, Craig A, Michel CE, et al. Altered Levels of Mitochondrial DNA Are Associated with Female Age, Aneuploidy, and Provide an Independent Measure of Embryonic Implantation Potential. *PLoS Genet*. 2015;11:1–18.

Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: A review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*. 2014;101:656-663.e1.

Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: Towards a single blastocyst transfer. *Fertil Steril*. 2000;73:1155–8.

Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Bailliere's Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14:855–65.

Hammond ER, Shelling AN, Cree LM. Nuclear and mitochondrial DNA in blastocoele fluid and embryo culture medium: Evidence and potential clinical use. *Hum Reprod*. 2016;31:1653–61.

Hara T, Kin A, Aoki S, Nakamura S, Shirasuna K, Kuwayama T, et al. Resveratrol enhances the clearance of mitochondrial damage by vitrification and improves the development of vitrifiedwarmed bovine embryos. *PLoS One*. 2018;13:1–17.

Hashimoto S, Morimoto N, Yamanaka M, Matsumoto H, Yamochi T, Goto H, et al. Quantitative and qualitative changes of mitochondria in human preimplantation embryos. *J Assist Reprod Genet. Journal of Assisted Reproduction and Genetics*; 2017;34:573–80.

Hayashi M, Satoh S, Matsuda Y, Nakai A. The effect of single embryo transfer on perinatal outcomes in Japan. *Int J Med Sci*. 2015;12:57–62.

Ichikawa K, Shibahara H, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Cell-free DNA content in follicular fluid: A marker for the developmental ability of porcine oocytes. *Reprod Med Biol*. 2020;19:95–103.

Irani M, Neill CO, Palermo GD, Ph D, Xu K, Ph D. Blastocyst development rate in fluences implantation and live birth rates of similarly graded euploid blastocysts. *Fertil Steril*. 2018;110:95-102.e1.

Ishihara O, Jwa SC, Kuwahara A, Katagiri Y, Kuwabara Y, Hamatani T. Assisted reproductive technology in Japan: A summary report for 2017 by the Ethics Committee of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology. *Reprod Med Biol*. 2020;19:3–12.

Kansaku K, Munakata Y, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Mitochondrial cell-free DNA secreted from porcine granulosa cells. *Zygote*. 2019;27:272–8.

Kato K, Ezo K, Yabuuchi A, Fukuda J, Kuroda T, Ueno S, et al. Comparison of pregnancy outcomes following fresh and electively frozen single blastocyst transfer in natural cycle and clomiphene-stimulated IVF cycles. *Hum Reprod Open*. 2018;2018:1–8.

Kim J, Seli E. Mitochondria as a biomarker for IVF outcome. *Reproduction*. 2019;157(6): 235-242.

Kobayashi M, Ito J, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Comparative analysis of cell-free DNA content in culture medium and mitochondrial DNA copy number in porcine parthenogenetically activated embryos. *J Reprod Dev*. 2020;10.1262/jrd.2020-097.

Kobayashi M, Kobayashi J, Shirasuna K, Iwata H. Abundance of cell-free mitochondrial DNA in spent culture medium associated with morphokinetics and blastocyst collapse of expanded blastocysts. *Reprod Med Biol*. 2020;404–14.

Leese HJ. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. *Reproduction*. 2012;143(4): 417-27.

Ligon S, Lustik M, Levy G, Pier B, D M. Low antimüllerian hormone (AMH) is associated with decreased live birth after in vitro fertilization when follicle-stimulating hormone and AMH are discordant. *Fertil Steril*. 2015;112:73-81.e1.

Liu Y, Shen Q, Zhao X, Zou M, Shao S, Li J, et al. Cell-free mitochondrial DNA in human follicular fluid: A promising bio-marker of blastocyst developmental potential in women undergoing assisted reproductive technology. *Reprod Biol Endocrinol. Reproductive Biology and Endocrinology*; 2019;17:1–9.

Marcos J, Pérez-Albalá S, Mifsud A, Molla M, Landeras J, Meseguer M. Collapse of blastocysts is strongly related to lower implantation success: A time-lapse study. *Hum Reprod*. 2015;30:2501–8.

Minasi MG, Colasante A, Riccio T, Ruberti A, Casciani V, Scarselli F, et al. Correlation between aneuploidy, standard morphology evaluation and morphokinetic development in 1730 biopsied blastocysts: A consecutive case series study. *Hum Reprod*. 2016; 31:2245–54.

Mumusoglu S, Yarali I, Bozdog G, Ozdemir P, Polat M, Sokmensuer LK, et al. Time-lapse morphokinetic assessment has low to moderate ability to predict euploidy when patient- and ovarian stimulation-related factors are taken into account with the use of clustered data analysis. *Fertil Steril*. 2017;107:413-421.e4.

Nagata S, Tatematsu K, Kansaku K, Inoue Y, Kobayashi M, Shirasuna K, Iwata H. Effect of aging on mitochondria and metabolism of bovine granulosa cells. *J Reprod Dev*. 2020; 10.1262/jrd.2020-071.

Nimura S. Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J Reprod Dev*. 2003;49:413-23.

Papanikolaou EG, Kolibianakis EM, Tournaye H, Venetis CA, Fatemi H, Tarlatzis B, et al. Live birth rates after transfer of equal number of blastocysts or cleavage-stage embryos in IVF. A systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod*. 2008;23:91-9.

Pribenszky C, Nilselid AM, Montag M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2017;35:511-20.

Reignier A, Lammers J, Barriere P, Freour T. Can time-lapse parameters predict embryo ploidy? A systematic review. *Reprod Biomed Online*. 2018;36:380-7.

Reynier P, May-Panloup P, Chrétien MF, Morgan CJ, Jean M, Savagner F, et al. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Mol Hum Reprod*. 2001;7:425-9.

Roque M, Lattes K, Serra S, Solà I, Geber S, Carreras R, et al. Fresh embryo transfer versus frozen embryo transfer in in vitro fertilization cycles: A systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2013;99:156-62.

Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: Analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril.* 1999;72:604–9.

Sciorio R, Thong KJ, Pickering SJ. Spontaneous blastocyst collapse as an embryo marker of low pregnancy outcome: A time-lapse study. *J Bras Reprod Assist.* 2020;24:34–40.

Simon AL, Kiehl M, Sc M, Fischer E, Proctor JG. Pregnancy outcomes from more than 1,800 in vitro fertilization cycles with the use of 24-chromosome single-nucleotide polymorphism – based preimplantation genetic testing for aneuploidy. *Fertil Steril.* 2018;110:113–21.

Stigliani S, Persico L, Lagazio C, Anserini P, Venturini PL, Scaruffi P. Mitochondrial DNA in Day 3 embryo culture medium is a novel, non-invasive biomarker of blastocyst potential and implantation outcome. *Mol Hum Reprod.* 2014;20:1238–46.

Stigliani S, Orlando G, Massarotti C, Casciano I, Bovis F, Anserini P, Ubaldi FM, Remorgida V, Rienzi L, Scaruffi P. Non-invasive mitochondrial DNA quantification on day 3 predicts blastocyst development: a prospective, blinded, multi-centric study. *Mol Hum Reprod.* 2019; 25:527–37.

Storr A, Venetis CA, Cooke S, Kilani S, Ledger W. Inter-observer and intra-observer agreement between embryologists during selection of a single Day 5 embryo for transfer: A multicenter study. *Hum Reprod.* 2017;32:307–14.

Thompson SM, Onwubalili N, Brown K, Jindal SK, McGovern PG. Blastocyst expansion score and trophoctoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): A national study. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:1577–81.

Treff NR, Fedick A, Tao X, Devkota B, Taylor D, Scott RT. Evaluation of targeted next-generation sequencing-based preimplantation genetic diagnosis of monogenic disease. *Fertil Steril*. 2013;99:1377-1384.e6.

Victor AR, Brake AJ, Tyndall JC, Griffin DK, Zouves CG, Barnes FL, et al. Accurate quantitation of mitochondrial DNA reveals uniform levels in human blastocysts irrespective of ploidy, age, or implantation potential. *Fertil Steril*. 2017;107:34-42.e3.

Xu J, Fang R, Chen L, Chen D, Xiao JP, Yang W, et al. Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:11907–12.

Yang ST, Shi JX, Gong F, Zhang SP, Lu CF, Tan K, et al. Cleavage pattern predicts developmental potential of day 3 human embryos produced by IVF. *Reprod Biomed Online*. 2015;30:625–34.

Zeng HT, Ren Z, Yeung WSB, Shu YM, Xu YW, Zhuang GL, et al. Low mitochondrial DNA and ATP contents contribute to the absence of birefringent spindle imaged with PolScope in in vitro matured human oocytes. *Hum Reprod*. 2007;22:1681–6.

Zhu D, Zhang J, Cao S, Zhang J, Heng BC, Huang M, et al. Vitrified-warmed blastocyst transfer cycles yield higher pregnancy and implantation rates compared with fresh blastocyst transfer cycles - Time for a new embryo transfer strategy? *Fertil Steril*. 2011;95:1691–5.