

## 着床前診断を目的とした発育段階別胚盤胞からの栄養膜細胞採取の検討

医療法人三慧会 IVF なんばクリニック

中野達也 赤松芳恵 佐藤学 橋本周 西澤知佳 姫野隆雄

大西洋子 井上朋子 伊藤啓二郎 中岡義晴 森本義晴

【目的】現在、均衡型染色体異常を対象とする着床前診断(PGD)には、3 日目胚の 1 ないし 2 細胞を用いる Fluorescence in Situ Hybridization(FISH 法)が多く使われている。一方、近年の分子遺伝学検査の発達により、FISH 法より正確で多くの情報が得られる Array Comparative Genomic Hybridization(aCGH 法)の臨床への応用が認められるようになってきた。aCGH 法はより多くの細胞を用いることでより正確な診断ができるため、胚盤胞からの細胞採取が適している。本研究では aCGH 法を PGD に応用することを目的とし、どの発育段階からの細胞採取が適しているかを採取細胞数および翌日の胚盤胞の生存率をもとに検討した。【方法】患者同意のもと凍結保存されている廃棄予定の胚を用いた。前核期胚を融解し、それぞれ初期胚盤胞(n=17)、後期胚盤胞(n=25)、拡張期胚盤胞(n=15)、完全脱出胚盤胞(n=11)まで培養した。各胚盤胞の透明帯を ZIROS-tk laser system により 20-30 $\mu$  m 開孔し、さらに 3~5 時間培養し開孔部より栄養膜細胞を脱出させた。初期から拡張期胚盤胞は透明帯開孔部から脱出した栄養膜細胞を吸引しながらレーザーを用いて採取した。また、完全脱出胚盤胞は収縮しないように固定し、栄養膜細胞をレーザーにより採取した。その後、採取した細胞を Hoechst 33342 とプロピジウムイオダイドで染色し、細胞数およびその中の生細胞数を調べた。さらに、採取後の胚盤胞を翌日まで培養し、生存の確認を行った。【結果】初期、後期、拡張期、完全脱出胚盤胞から採取できた総細胞数はそれぞれ 3.5 $\pm$ 0.5 個、6.3 $\pm$ 0.5 個、7.2 $\pm$ 0.8 個、8.7 $\pm$ 1.0 個であった。生細胞数はそれぞれ 2.1 $\pm$ 0.4 個、4.7 $\pm$ 0.3 個、4.7 $\pm$ 0.7 個、6.4 $\pm$ 0.9 個であった。初期胚盤胞に比べ後期、拡張期、完全脱出胚盤胞は有意に多く生細胞が得られた。また、採取後の胚盤胞の生存率はそれぞれ 94.1%(16/17)、88.0%(22/25)、93.3%(14/15)、72.7%(8/11)となり、有意な差は認められなかった。【考察】本研究により、どの発育段階の胚盤胞からでも確実に生細胞を採取することが可能であった。しかし、初期胚盤胞は細胞のサイズが大きく、開孔部からの細胞の脱出が少ないため、採取できた生細胞も少なかった。以上のことから、aCGH 法を行うのに必要な生細胞を十分得るには初期胚盤胞よりも、後期胚盤胞以降からの細胞採取が適していると考えられた。