

当院におけるタイムラプス運用の実際

○金森 真希
岡本 裕子

奥裕嗣
山口晶子

今井 和美
田中 舞弥

紺谷 渚
高橋 典子

北川 晴香

篠原 三佳

貴志 瑞季

医療法人 紀映会

レディースクリニック北浜



目的

胚発育過程で多くの情報を得ることができるタイムラプスシステム以下TLは、近年多くの施設に普及している。しかしながら、ルーチンワークにおいてTLを用いたスコア化を導入している施設の妊孕性に関する報告は少ない。当院では、**2014年9月よりPrimo Vision®(Vitrolife社)**を導入した。胚の動態解析により卵割様式、発育速度を独自のアルゴリズムにてスコア化し、ルーチンワークに導入してきた。ルーチンワークとして構築するために再現性と正確性の向上、解析の自動化、作業の効率化を目的として独自の解析ツールを作成し運用している。また、これまで一定期間ごとで、妊孕性の高い胚を選択するために必要なパラメーターの検討を行っている。培養期間、撮影間隔、分割速度、分割異常、形態異常について解析方法の検討を重ね胚移植時の胚選択に有用であることを検証してきた。その結果、解析結果のスコア化が、より妊孕性の高い胚選別法となりうる可能性があると分かった**(2017年受精着床学会)**。そこで当院でのルーチンワークでの構築方法と、運用の実際について報告する。

方法

<構築方法>

①胚発育速度のスコア表作成（表1）

P. Kovacs et al. ASRM2013を参考に至適発育速度を決定、最も高得点を2ポイントとし、それ前後を1ポイント大きく外れた場合を0ポイントとした。
発育速度の点数化は8細胞期までとした。

		Opoint	1point	2point (至適発育速度)
A	beginning of 2cell	$\leq 15:59$ or $\geq 35:01$	$16:00 \sim 19:59$ or $32:01 \sim 35:00$	$20:00 \sim 32:00$
B	end of 2cell	$\geq 00:51$	$00:41 \sim 00:50$	$00:00 \sim 00:40$
C	2-3cell	$\leq 05:59$ or $\geq 14:01$	$06:00 \sim 07:59$ or $12:01 \sim 14:00$	$08:00 \sim 12:00$
D	3-4cell	$\geq 01:31$	$01:11 \sim 01:30$	$0:00 \sim 01:10$
E	5cell	$\leq 36:59$ or $\geq 72:01$	$37:00 \sim 46:59$ or $63:01 \sim 72:00$	$47:00 \sim 63:00$
F	5-8cell	$\geq 02:31$	$02:01 \sim 02:30$	$00:00 \sim 02:00$
	frag. 75.30で観察	$\geq 21\%$	$\leq 20\%$	なし

参考 : P. Kovacs et al. ASRM2013

表1 胚発育速度のスコア表

②異常所見の減点方法の決定（表2）

染色体異常の可能性のある異常所見については全体の半減（1/2）に。

所見	減点
1PN	1/2
Direct cleavage (1-3C)	1/2
Reverse	1/2
不均衡分割	0.5
融合	0.5
退化	0.5
空胞	0.5
透明帶異常	0.5
實質異常	0.5
膜異常	0.5
膣門	0.5
MNB	0.5
SERC	0.5

表2 異常所見の減点表

③ポイント算出方法

胚移植の優先順位を決定するためには点数化が必要と考え、8細胞期までの胚发育速度は加算式(上限14ポイント)で行い、その後異常所見を減点していく加算式+減点方式とした。

④表計算ソフトの作成

発育速度の加算を自動化し、作業の効率化を図る。

結果

スコアシートを見ればそれぞれの胚のスコアがわかり、ポイント順の移植胚選択が容易に可能となる。マニュアル化することで再現性が向上し、複数人でチェックすることにより正確性が向上した。また、一部を自動化およびマニュアル化により作業効率が上がリルーチンワークがスムーズに行えるようになった。さらに、定期的に検診を行い見直すことで、受精から胚盤胞までの形態動態学的に考えられる様々なパラメーターが胚の予後に与える影響を鑑みて、独自のアルゴリズムを確立できている。

考察

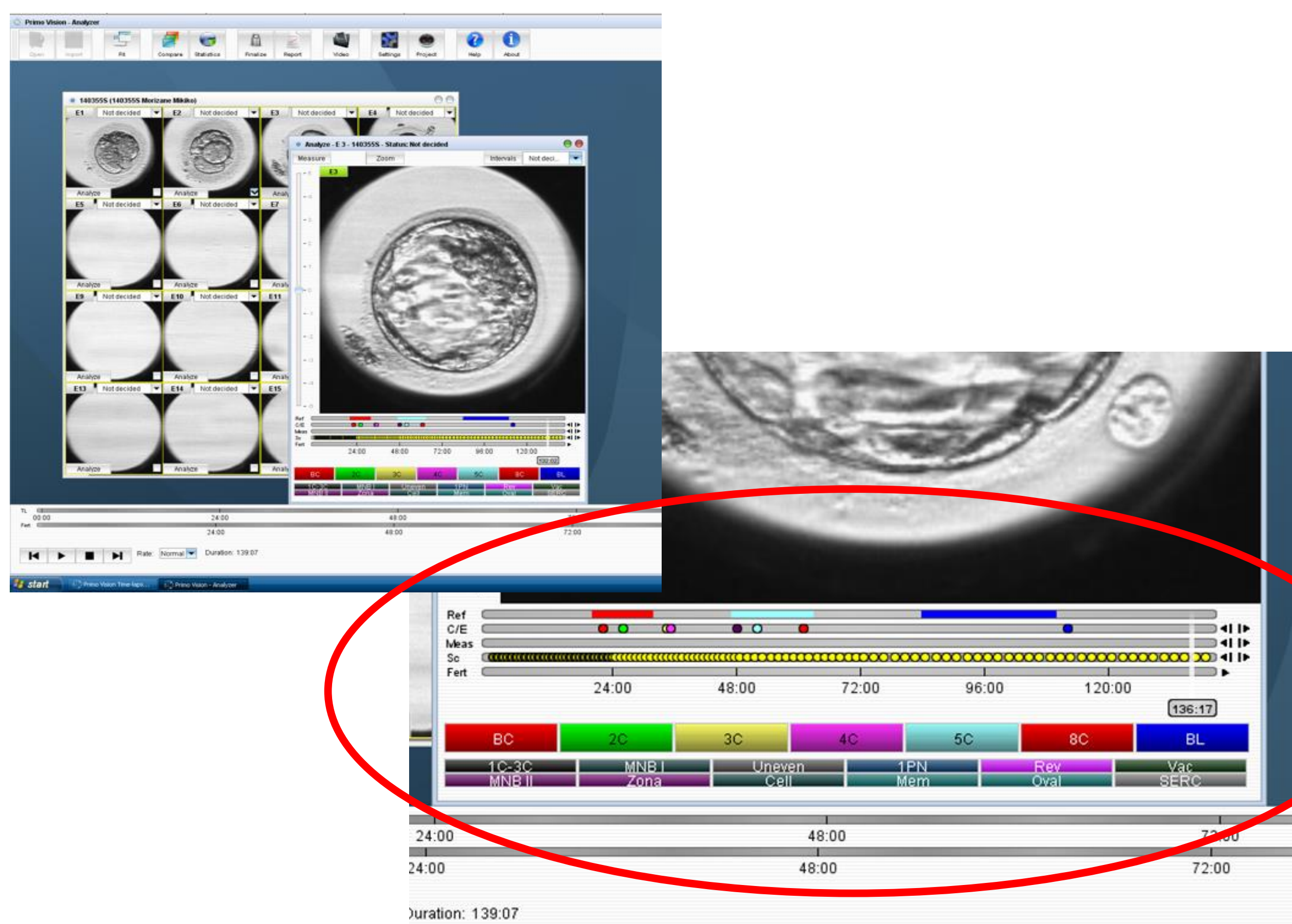
解析とアルゴリズムの複雑さにより培養期間のすべての時間をTLで培養しスコア化している施設は少ないが、当院ではマニュアル化及び自動化により効率よく解析を行うことができています。

AIを用いた自動検出や自動解析システムの開発が進みつつあるものの、施設間での差異も考慮に入れた各施設でのアルゴリズムの確立が重要であると考えられる。当院で行った検証によると、TLスコアが6.0以上の症例群と5.9以下の症例群を比較すると臨床妊娠率(63.7% vs 22.2%)及び妊娠継続率(52.6% vs 8.3%)において6.0以上の症例群が有意に高かったことから(2017年受精着床学会)、解析結果が妊娠成立に有効であり、スコアリングによって予後の予測が可能と考えられる。これらのことから、当院での運用は有用であると考えた。

母性RNAの働きにより細胞分裂を行う分割期からcompactionを経てゲノムDNAの制御により分化していく胚盤胞までの変化で、TLにより得られる撮影データは膨大であり、解析によって得られる形態動態様式は多岐にわたるため、妊孕性の予後の予測も複雑化している。また、予後に大きく影響を与えるfactorに統一された見解がないため、今後も検討を継続して行っていくことが重要である。

<手順>

媒精またはICSI後TLで観察開始し、受精確認後、Veeck分類またはGardner分類に基づく従来同様の形態学的評価と共に、TLによる動態評価も同時に行う。TLによる形態動態解析は8細胞期までの发育速度と分割異常及び形態異常の12項目(1PN, Direct Cleavage, Reverse, MNB,不均等分割,退化,液胞,透明帯異常,実質異常,膜異常,楕円,sERC)をパラメーターとする。異常所見についてはそれぞれ見受けられたタイミングでBad Eventとしてアノテーションを付加する。Day7までの培養終了後、評価を行ったアノテーションをエクスポートした後、胚发育速度のアノテーションをポイントに換算する関数を組み込んだ表計算ソフト(スコアシート)に貼り付ける。Bad Eventは項目別に減点する。



②エクスポートし、関数を組み込んだ表計算ソフトに張り付ける。

B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S
		Timing of sequential events from fertilization						Timing of non sequential events from fertilization									
Patient ID	embryo No.	1C	2C	3C	4C	5C	6C	BL	Vac	MB/BL	zona	cell	SERC	1C-3C	Rev	Embryo No.	beginning of 2cell
	E6	28:00	28:10	31:40	42:14	56:25	67:29		13:46				01:36	00:56		E8	28:00
	E7	22:00	24:20	35:00	36:10	50:15	56:15	96:13			47:55	00:26				E7	22:00
	E8	23:20	26:00	36:10	36:20	50:35	53:55	97:53			42:44					E8	23:20
GTL	E9	30:16	36:36	50:01	50:01	50:01	50:51				39:40				50:11	E9	30:16
	E10											01:00				E10	
	E11	24:46	30:26	30:26	38:01	38:51	53:31	104:09			33:56				29:36	E11	24:46
	E12	27:06	29:26	41:31	42:21	42:21	55:51	99:29			34:26				42:21	E12	27:06
	...	...	...	...	...	...	...	...			...				...	E13	27:06

③スコアシートを見ればそれぞれの胚のポイントが一目でわかる。

P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK
		Embryo No.	beginning of 2cell	end of 2cell	2-3cell	3-4cell	5cell	5-8cell	frag		SCORE beginning of 2cell	SCORE end of 2cell	SCORE 2-3cell	SCORE 3-4cell	SCORE 5cell	SCORE 5-8cell	SCORE frag	SCORE event	SCORE total	TOP No.	
1C-3C	Rev	E8	28:00	0:10	3:30	10:34	58:25	11:04	5		2	2	0	0	2	0	1	1.5	5.5	不可	
		E7	22:00	2:20	10:40	1:10	50:15	6:00	0		2	0	2	1	2	0	2	1.0	8.0	不可	
		E8	23:20	2:40	10:10	0:10	50:35	3:20	0		2	0	2	2	2	0	2	0.5	9.5	不可	
50-11		E9	30:16	6:20	13:25	0:00	50:01	0:50	5		2	0	1	2	2	2	1	5.3	4.8	不可	
		E10																0.0	0.0	不可	
29-36		E11	24:46	5:40	0:00	7:35	38:51	14:40	5		2	0	0	0	1	0	1	2.3	1.7	9	
42-21		E12	27:06	2:20	12:05	0:50	42:21	13:30	10		2	0	1	2	1	0	1	3.8	3.3	7	
		E13	30:55	9:30	11:55	0:35	55:44	15:10	0		2	0	2	1	1	2	0	3.0	3.0	7	

緑色のセルは手入力となっており、
74 h 時点でのfragmentを手入力し、それぞれの胚のbad eventを減点する。

④File Makerで管理することで、胚のその後を容易に把握できる。

<運用開始からこれまで行ったパラメーターの検討>

年齢：35歳以上を対象。

培養期間：Day7

撮影時間：10分毎。 Day1では2PNの見逃しを回避するためスキャンタイミングを20分毎と短く設定。

MNB：0.5Pの減点とした。運用当初、2細胞期でのMNBは0.5P減点、3細胞期以降のMNBは1/2半減と設定していたが、妊娠継続率に差がなかったことから、どちらも0.5P減点とした。異なる細胞ステージで複数回MNBが出現する場合は出現のたびに0.5P減点している。

Direct Cleavage：染色体異常の可能性が高いため運用当初から現在も継続して1/2半減としている。現在は5細胞期以降のDCは他の胚が補うことで妊孕性のある胚盤胞になる可能性があると考えたため、アノテーションしていない。

Fragment : Fragment は発生後吸収される可能性から、8細胞期のポイント加算時間である74:30h以前で最も高い割合(%)とした。