

不同的胚胎切片技術會影響胚胎著床前遺傳篩檢(PGS)的結果

唐訓翰醫師

前言

胚胎著床前遺傳篩檢(PGS)是生殖醫學與遺傳診斷技術最佳的結合範例。估計每年有5000個PGS週期在美國執行而且有逐年增加趨勢。全球也已經有超過兩千名新生兒透過此項科技的應用而誕生。但是準確性及mosaicism等核心問題，始終牽動這個技術在提高IVF成績的效能。此外，PGS技術仍有其侷限性。不但成功懷孕率約及百分之三十，亦有少數未檢測出胚胎帶因的情形，而待日後的產前檢測始發現。在技術的安全性方面，由於傳統PGS需從發育三天的胚胎採取其中一個細胞來檢驗，不免有安全性的疑慮。雖然文獻多指出，經歷過此技術的胚胎，在著床後所發育而成的胎兒與一般胎兒並沒有不同，出生後的健康狀況亦無二致。然而時至今日，PGS所產生的嬰兒數量畢竟仍稀少，須待未來有更多執行個案，才能做出具有統計上意義的安全性評估。此外有報告顯示，在八細胞期做胚胎切片執行PGS，被診斷為染色體異常的胚胎，若繼續培養至囊胚再檢查，其中近四成居然是正常的。胚胎是否有自我修復能力(self-correct)?或是mosaicism所致?在八細胞期PGS是否真有臨床應用價值，或有可能被囊胚期PGS取而代之，ESHRE PGD Consortium在今年best practice guidelines for polar body and embryo biopsy PGD/PGS(2011)也提到相近的看法，分裂期抑或囊胚期PGS何者為佳，將是今後PGS發展極需檢驗的重要課題。因此針對 **further understanding of human embryogenesis**的角度來思考胚胎切片的操作安全與理論基礎，我們不免有以下幾項考量--

- Are cleavage-stage blastomeres totipotent?
- Which cell or two cells to biopsy?
- How much & how well can an embryo adapt post-biopsy?
- What to do with the current evidence on mosaic embryos?
- Can, and how much can, the embryo “self-correct”?
- How “normal” do embryos have to be?
- Are any detrimental effects due to the loss of cell(s) or the biopsy itself?

本文將主要針對最後一項，探討embryos biopsy techniques對PGS clinical outcome的影響，主要參考文獻有-

1)Embryo biopsy technique influences the cycle outcome in PGS cycles. The journal of clinical embryology 2010 Volume 13, Issue 4, 19-23

2)Comparison of development and implantation of human embryos biopsied with two different methods: aspiration and displacement. Fertil Steril_ 2009;92:536-40.

胚胎著床前遺傳診斷(PGD)及胚胎著床前遺傳篩檢(PGS)的發展概念

PGD 最早是在 1967 年由 Edwards 分辨出兔子胚胎的性別，並植入母體內懷孕成功，奠定此技術的基礎；而直到 1980 年代試管嬰兒之發展，加上基因序列聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 使基因放大之技術純熟，促使 Handyside 等人於 1990 年發表世界上首例人類利用 PGD 成功植入懷孕的例子。這種利用檢測單一胚葉細胞來進行遺傳疾病診斷技術，由於能將篩檢後正常胚胎植入母體，目前已經成為產前基因篩檢的一種新選擇與策略。現今胚胎著床前遺傳診斷 (PGD) 主要是針對 IVF 所產生的胚胎，於植入婦女子宮之前，對於其基因進行檢測的一種技術。這項技術的主要使用者為帶有遺傳疾病基因的父母，讓他們可藉由人工生殖的技術，選擇不帶有遺傳疾病的胚胎用以植入母體，使下一代免受遺傳疾病之苦。PGD 早期主要是應用於胚胎染色體之檢測，因大部分染色體異常的胚胎是沒有辦法著床的，而在懷孕早期流產也大多是因為染色體的異常所致。對於習慣性流產之病患在做試管嬰兒時，會進行胚胎植入前基因診斷來篩選正常胚胎，結果顯示幾乎有高達百分之八十的胚胎是染色體異常的。雖然異常的比例在高年紀的女生比較明顯，但是即使在三十歲的女性，這種異常的比例仍然可能達到百分之三十，因試管嬰兒過程技術較繁瑣，刺激母體排卵、取卵、體外培養受精卵之環境等皆可能造成染色體異常。而 PGD 除了可以篩選染色體在構造上或數目上的異常以外，它還可以讓我們對特定的基因缺陷進行篩檢，因此對於那些有習慣性流產或者高齡的女性，以及已經知道基因有異常的不孕夫妻來說，利用 PGD 進行染色體異常篩檢 (PGD for aneuploidy screening; PGD-AS or PGS) 已被視為一種常規性的診斷及治療工具。

PGS 操作成功要素

諸多因素影響 PGS 成功與否其中包括 obtaining a good sample, fixation technique 以及 accurate diagnosis processes。因此，PGS 操作者應該竭盡所能注意每一個環節步驟，其中 embryo biopsy technique 是主要的侵襲性步驟，將直接影響診斷正確性及胚胎發育與其後續著床能力，也就是說操作者本身技能熟練度與切片方法將顯著影響 PGS 成功率。此外，許多因素可能影響切片後胚胎發展，包括雷射操作熟練與時間長短; Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-free 切片培養液暴露; 機械性傷害和移除一個以上胚葉細胞等。多位學者使用不同胚胎切片方法，分析 PGS 臨床結果發現在懷孕率/ 著床率甚至在活產率，似乎都有顯著統計學上的不同。

不同胚胎切片方法與臨床結果的相關性

最近一項 Cochrane 資料庫中，Mastenbroek 等人研究顯示 PGS 不僅不能增加且明顯降低 IVF 懷孕率和活產率，研究者歸納此現象極可能歸因於胚胎切片操作本身。常用分裂期胚胎切片方法包括細胞抽吸法 (aspiration method); 細胞擠迫法 (extrusion method); 細胞推

移法(displacement method) 以及混合法(combined method)等。分裂期胚胎切片傳統上多使用透明帶開口後直接細胞抽吸法(aspiration method)，然而部份學者認為，這種方法並不容易學習，常因吸取過多細胞或破壞切片細胞而需重複抽吸，因而降低胚胎發育能力。細胞擠迫法(extrusion method)則是在透明帶施壓使胚葉細胞迫離洞口而出，混合法(combined method)是指嘗試擠迫法失敗後與抽吸法合併運用。另外一種較無傷害性的細胞推移法(displacement method)，是藉由較小的透明帶開口導入溶液推動促使胚葉細胞分離出洞口，部份學者認為此法容易學習操作時間短，並能保持切片細胞完整與減少原胚胎機械性傷害。

研究者直接比較不同胚胎切片方法與臨床結果包括懷孕率，著床率和活產率的相關性。首先，2009年Wang等人研究合計19個IVF/PGS-FISH週期，採用Day 3 cleavage-stage embryo biopsy，151個胚胎使用細胞推移法，51個胚胎使用細胞抽吸法。結果發現，在切片所需時間部份，推移法使用平均5-10秒，而抽吸法皆超過60秒甚至數分鐘，相對抽吸法有較長切片培養液(Ca⁺⁺/Mg⁺⁺-free medium)暴露時間。推移組允許得到較完整採樣細胞，相較於抽吸組，細胞是被吸擠進玻棒，因為內徑和毛邊的影響更容易損壞細胞導致重複採檢。在分別兩組的囊胚育成率相近下(抽吸組/ 推移組=55.6% / 56.8%)，著床率有明顯差異(抽吸組/ 推移組=25% / 64.7%)，因此研究者推薦使用細胞推移法(displacement method)為分裂期PGS胚胎切片常規方法。

另外，Meyer等人研究106個IVF/PGS-FISH週期，也採用Day 3 embryo biopsy，三個不同操作者分別使用三種不同切片法，分別是擠迫法(extrusion method)，抽吸法(aspiration method)以及混合法(combined method)。胚胎切片之外其餘步驟完全相同。結果發現，臨床懷孕率(per start cycle)在擠迫組為25.6%，抽吸組為53.5%，混合組為25.0%。至於著床率，擠迫組為27.9%，抽吸組為44.6%，混合組為27.6%。而在活產率部分則分別為32.6%，56.9%以及30.0%皆有統計學上的意義。研究者認為擠迫法可能造成胚胎內部損傷對胚胎著床能力有負面影響，抽吸法會是分裂期PGS首選的切片方法。

結語

諸多因素影響PGS成功與否其中包括obtaining a good sample, fixation technique 以及 accurate diagnosis processes。因此，PGS 操作者應該竭盡所能注意每一個環節步驟，其中 embryo biopsy technique 是主要的侵襲性步驟將直接影響診斷正確性及胚胎發育與其後續著床能力，也就是說操作者本身技能熟練度與切片方法將顯著影響PGS成功率。學者使用不同胚胎切片方法包括aspiration method, extrusion method, displacement method 以及 combined method 分析PGS臨床結果發現在懷孕率/ 著床率甚至在活產率似乎都有顯著統計學上的不同，但對不同胚胎切片法的評價卻存有極大差異。

儘管真正的原因並不明瞭，但研究發現成功的PGS週期往往代表較少的採檢細胞破壞

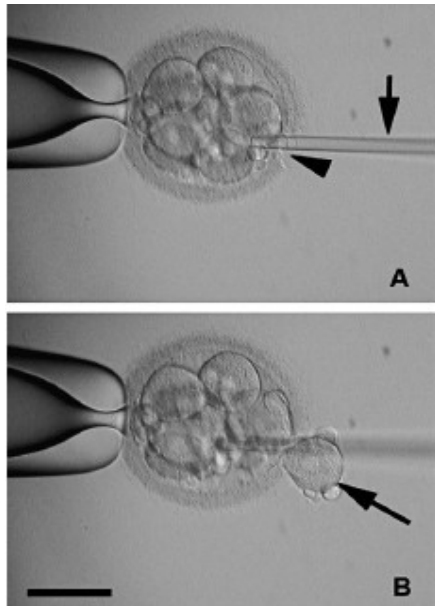
及最少的受檢胚胎損傷。儘管學者使用不同胚胎切片方法分析PGS臨床結果發現有顯著統計學上的不同，然而這些比較文獻都存有明顯的限制，包括分別由不同操作者使用不同切片方法，使用的方法並未標準化以及每一個實驗室操作者存在能力差異性等，雖然能透過操作訓練與統計方法改進，但顯然無法完全去除inter- & intra-observer bias。因此實驗室操作PGS成功關鍵除了要重視每一個步驟外，針對embryo biopsy technique 部分，應時時檢視不同方法與臨床結果包括囊胚育成率/ 懷孕率/ 著床率和活產率的相關性，實驗室操作者最能勝任的方法往往就是個別實驗室最佳的選擇方法。

參考文獻

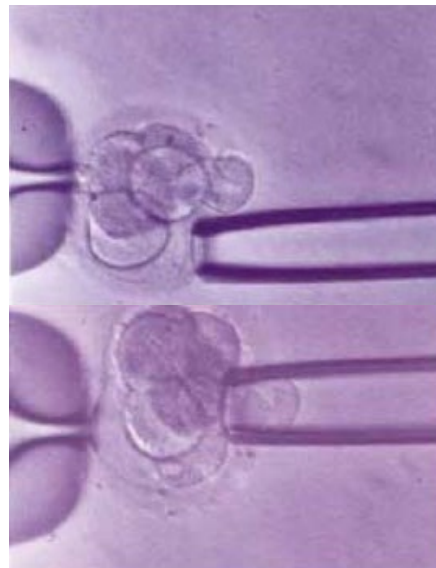
1. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, et al. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril* 2004;82:292–4.
2. Munn_e S, Fischer J, Warner A, Chen S, Zouves C, Cohen J. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril* 2006;85:326–32.
3. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, et al. Improved implantation after implantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91–7.
4. Otani T, Roche M, Mizuike M, Colls P, Escudero T, Munn_e S. Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and unsuccessful pregnancies. *Reprod Biomed Online* 2006;13: 869–74.
5. Munn_e S, Gianaroli L, Tur-Kaspa I, Magli C, Sandalinas M, Grifo J, et al. Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. *Fertil Steril* 2007;88:781–4.
6. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaa JC, Verhoeve HR. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med* 2007;357:9–17.
7. Pierce KE, Michalopoulos J, Kiessling AA, Seibel MM, Zilberstein M. Preimplantation development of mouse and human embryos biopsied at cleavage stages using a modified displacement technique. *Hum Reprod* 1997;12:351–6.
8. Wang WH, Kaskar K, Gill J, DeSplinter T. A simplified technique for embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril* 2007
9. De Vos A, Van Steirteghem A. Aspects of biopsy procedures prior to implantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* 2001;21:767–80.
10. Joris H, De Vos A, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using

acid Tyrode medium or a laser. Hum Reprod 2003;18:1896–902.

11. Jones AE, Wright G, Kort HI, Straub RJ, Nagy ZP. Comparison of laserassisted hatching and acidified Tyrode's hatching by evaluation of blastocyst development rates in sibling embryos: a prospective randomized trial. Fertil Steril 2006;85:487–91.
12. ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group--best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). Hum Reprod. 2011 Jan;26(1):41-6.
13. Embryo biopsy technique influences the cycle outcome in PGS cycles. The journal of clinical embryology. 2010 Volume 13, Issue 4, 19-23
14. Comparison of development and implantation of human embryos biopsied with two different methods: aspiration and displacement. Fertil Steril_ 2009;92:536–40.



Displacement method(A &B)



Extrusion method(上)

Combined method(下)