

【原 著】

胚盤胞到達速度が出生児性比と出生体重へ及ぼす影響

姜 賢淑, 山出一郎, 中山貴弘, 眞田佐知子
井上卓也, 濱田啓義, 澤田守男, 畑山 博

医療法人財団今井会 足立病院 産婦人科

(受付日 2024/4/10)

概要 目的：多くの哺乳類では、XY胚はXX胚よりも胚盤胞への発育速度が速いことが知られている。生殖補助医療では、胚盤胞へ速く到達した胚は妊娠率や生児獲得率の高い良好胚とされ、発育速度は移植胚選別の重要な指標である。通常培養では、Day5で胚盤胞に到達する胚（Day5BL）が最多だが、Day4で到達する胚（Day4BL）や、Day6で到達する胚（Day6BL）も存在する。これまでDay5BLとDay6BLとの比較で出生児性比に差がないという報告はあるが、Day4BLとDay6BLとの比較検討は見られない。当院での凍結融解単胚盤胞移植で、胚盤胞到達速度と出生児性比や出生体重の関連について検討した。方法：2014年1月から2023年7月における19,063例の凍結融解単胚移植のうち、305例の生児を対象とした。Day4BL群とDay6BL群における臨床背景、児の性別および体格を比較検討した。結果：Day4BL群とDay6BL群の間において出生児性比や出生時体格に有意差はなく、胚盤胞到達速度による影響は見られなかった。以上のことからDay6BLも移植胚選定において有効な選択肢と考えられた。〔産婦の進歩77（1）、2025（令和7年2月）〕

キーワード：Day4胚盤胞, Day6胚盤胞, 出生時性比, 出生体重, 傾向スコアマッチング

【ORIGINAL】

**Does the blastocyst development speed affect secondary sex ratio and birth weight?:
A propensity score matched study**Hyun Sook KANG, Ichiro YAMADE, Takahiro NAKAYAMA, Sachiko SANADA
Takuya INOUE, Hironori HAMADA, Morio SAWADA and Hiroshi HATAYAMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Adachi Hospital

(Received 2024/4/10)

Abstract In mammals, XY embryos grow faster than XX embryos. While most human embryos reach the blastocyst stage on Day 5 (Day5BL), blastocysts can develop as early as Day 4 (Day4BL) or as late as Day 6 (Day6BL). Although previous research has compared Day5BL and Day6BL, reporting no difference in their secondary sex ratio (SSR: male/female), no similar comparisons have been drawn between Day4BL and Day6BL. This retrospective study investigated the effect of blastocyst development speed on SSR and birth weight in single-blastocyst frozen-thawed embryo transfer (SBFET) pregnancies. We examined 306 live births resulting from 19,063 SBFET procedures conducted between January 2014 and July 2023. Infants were divided into Day4BL or Day6BL groups to compare their clinical characteristics, SSR, and neonatal anthropometry. Blastocyst development speed had no significant effect on SSR or birth weight. There is no reason to exclude Day6 blastocysts in the embryo selection process, even if blastocysts are only available on Day6 rather than Day5. [Adv Obstet Gynecol, 77(1), 2025(R7.2)]

Key words: Day4 blastocyst, Day6 blastocyst, SSR, birth weight, propensity score matching

緒 言

ヒトを含む多くの哺乳類では、XY胚はXX胚よりも胚盤胞への胚発育速度が速いことが知られており¹⁾、ヒト体外受精胚において、XY胚はXX胚よりも早く細胞分裂し胚発育速度が速いことが報告されている²⁻⁴⁾。

生殖補助医療においては、一般に胚盤胞への発育速度の速い胚が妊娠率、生児獲得率の高い良好胚とされており、着床前診断を行わずに移植胚を選別する際、胚発育速度をパラメーターとすることが多い。通常培養では、Day5で胚盤胞に到達する胚 (Day5BL) が最も多いが、培養液交換の不要なmediumやタイムラプスインキュベーターの導入により、より早くDay4で完全胚盤胞に到達する胚 (Day4BL) が存在する。また一方でより遅くDay6で胚盤胞に到達する胚 (Day6BL) も認められる。これまでに拡張スコアに関係なくDay5BLと比較して、着床率はDay4BLで高くDay6BLで低いとの報告があり⁵⁾、Day4BLが存在する場合は優先的な移植胚候補となる。

厚生労働省の人口動態調査によると、出生時男女比は男児：女児＝105：100程度と報告されており、出生児の性別はわずかに男児が多いとされている。2021年の生殖補助医療による出生児は過去最多で11.6人に1人 (8.6%) となった。胚発育速度が移植胚の決定の要素とする場合、出生児性比 (secondary sex ratio ; SSR) に影響を及ぼす可能性が懸念される。

一方、児の出生体重に関しては、胚盤胞への発育速度は出生体重に影響しないという報告^{6,7)}、またDay6BLを移植した場合や胚盤胞グレードが高い胚ほど出生体重が重くなる⁸⁻¹⁰⁾などの報告が散見されている。

これまでDay5BLとDay6BLについて比較し、両者間でSSRに違いは認められなかったという報告¹¹⁾は見られる。Day4BL胚移植例は、最近になって増加してきたこともあるのか、発育速度に違いのあるDay4BLとDay6BLでSSRや出生体重に違いが見られるかを検討した報告は見られなかった。

今回当院で凍結融解単胚盤胞移植を行い当院で分娩した症例において、胚盤胞の発育速度に最も差を認めると考えられるDay4BLとDay6BLとの間でSSRが異なるのか、また胚の発育速度は児の成長速度に影響を及ぼすのかについて後方視的に検討した。

研究方法

期間・対象

当院にてインフォームドコンセントを得た2014年1月から2023年7月の期間に、自然周期 (modified) もしくはホルモン調整周期 (hormone therapy ; HT) にて凍結融解単胚移植を施行した19,063例のうち、Day4BLを凍結後、融解単胚移植したのは1,970例、Day6BLを凍結後、融解単胚移植したのは799例であった。そのうち当院で生児を得た単胎妊娠症例305例を対象とした。なお、本研究は院内倫理委員会の承認を得て行い (承認番号24-002)、個人情報保護法に準じてオプトアウトの手続きを病院ホームページに提示した。開示すべき利益相反はない。

卵巣刺激-採卵-受精方法

卵巣刺激は、調節卵巣刺激周期 (Short法, Progestin-primed ovarian stimulation [PPOS] 法)、クロミフェンクエン酸塩 (製品名：クロミッド錠50 mg) やレトロゾール (製品名：レトロゾール錠2.5 mg) を用いた低刺激法による卵巣刺激周期もしくは自然排卵周期で行った。卵胞発育が得られた時点でトリガーとして、ヒト絨毛性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin ; hCG) (製品名：注射用HCG5,000単位「F」)、コリオゴナドトロピンアルファ (遺伝子組換え) (製品名：オビドレル皮下注シリンジ250 μ g)、プセレリン酢酸塩 (製品名：プセレリン点鼻液0.15%「F」)、hCG (製品名：ゴナトロピン筋注用1000単位) を状況に応じて投与し、その38時間後に採卵、すぐに体外受精または裸化30分後に顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection ; ICSI) を施行した。

培養方法

体外受精またはICSI施行直後から培養液に胚を移し、37℃、5.0% O₂、6.0% CO₂の気相条件下で最大6日間培養した。培養液はONESTEP Medium®（ナカメディカル、東京、日本）を使用した。

凍結・融解胚移植

上記の方法で得られた胚盤胞は、Cryotop®（北里コーポレーション、静岡、日本）を用いVitrification media（VT507：北里コーポレーション）を使用し凍結した。移植日当日にThawing media（VT508：北里コーポレーション）を用いて融解し、3-5時間回復培養を行った後、単胚移植を行った。

融解胚移植は月経周期、排卵障害の有無や症例の通院可能状況を考慮し、自然周期もしくはHT周期で行った。自然周期では、卵胞発育後にhCGをトリガーとして投与して排卵を誘発し移植日を決定した。HT周期では、エストロゲンとプロゲステロンを投与し、子宮内膜厚を計測して移植日を決定した。

検 討

当院で分娩し生児を得た単胎妊娠症例で性別が判明した305例の内訳は、Day4BL群254例、Day6BL群51例であった。SSRは男性/女性と定義し、Day4BL群とDay6BL群間のSSRと出生体重について後方視的に検討した。出生時体格（appropriate-for-dates；AFD, heavy-for-dates；HFD, light-for-dates；LFD）は厚生労働科学研究班によって提示された「在胎期間別出生時体格標準値」¹²⁾に基づき判定した。

Gardner分類BB以上を良好胚とし、Day4BL群とDay6BL群の2群間の臨床背景として、採卵時年齢、経産回数、分娩週数、Body mass index（BMI）、妊娠合併症（妊娠高血圧症候群、妊娠糖尿病）、喫煙、授精方法（従来法 or ICSI）、移植のプロトコル（自然周期 or HT周期）、良好胚獲得率、不妊原因（男性因子、卵管因子、子宮内膜症、原因不明）を後方視的に検討した。

統計解析

2群間の比較は、連続変数にはMann-Whitney U検定、名義変数の比較には χ^2 検定を用いた。Day4群255例、Day6群51例の2群間の比較を行った後、症例の臨床的背景因子をマッチさせるようcontrol群を選択するため、背景因子（年齢、BMI、男性因子、卵管因子、ICSI、良好胚、HT）を独立変数として、Day6で胚盤胞到達に対するロジスティック回帰分析を行って傾向スコアを算出し、傾向スコアマッチングを行った。多変量解析における独立変数の選択は、臨床的判断に基づき強制投入した。また、各説明変量の分散拡大係数（variance inflation factor；VIF）を計算し、5未満であったため多重共線性を認めないものとした。傾向スコアマッチングは最近傍マッチングで行い、キャリパーは0.2で設定、構成比はone-to-one pair matching非復元抽出とした。マッチング後、名義変数はMcNemar検定を行った。統計ソフトはEZRバージョン1.63¹³⁾を使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

症例の臨床的背景を表1に示す。背景因子として、Day6BL群に比べてDay4BL群は、年齢が有意に低く、また不妊原因として男性因子と卵管因子を有する頻度が有意に多く、良好胚獲得率が有意に高かった。また両群において、経産回数、分娩週数、母体体格、妊娠高血圧症候群や妊娠糖尿病といった妊娠合併症の存在、喫煙の有無、媒精方法、移植のプロトコル、不妊原因としての子宮内膜症の存在および原因不明に有意な差は認められなかった。表2に示すようにSSRは、Day4BL群で1.134、Day6BL群で1.217であり有意差は見られなかった。有意差を認める背景因子を複数認めるため、傾向スコアマッチングを行い2群間の比較を行ったが、やはり有意差は認めなかった。

また出生体重についての2群間の検討では、AFD児はDay4BL群で81.5%（207/254）、Day6BL群で74.5%（38/51）、HFD児はDay4BL群で13.4%（34/254）、Day6BL群で19.6%

表1 傾向スコアによるマッチング前後の2群間の臨床的背景

	マッチング前			マッチング後		
	Day4BL群 (n=254)	Day6BL群 (n=51)	p値	Day4BL群 (n=42)	Day6BL群 (n=42)	p値
年齢 (歳), mean (SD)	34.44 (3.95)	36.49 (3.81)	0.001	36.64 (3.78)	36.60 ± 3.49	0.952
経産回数 (回), mean (SD)	0.28 (0.50)	0.27 (0.49)	0.989	0.31 (0.52)	0.29 (0.51)	0.832
分娩週数, mean (SD)	39.09 (1.30)	39.27 (1.37)	0.372	38.88 (1.42)	39.31 (1.33)	0.157
BMI, mean (SD)	20.82 (2.41)	20.62 (2.28)	0.598	20.33 (1.75)	20.52 (2.35)	0.670
GDM	1 (0.4)	0 (0.0)	1	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
HDP	28 (11.0)	8 (15.7)	0.345	2 (4.8)	5 (11.9)	0.433
喫煙	0 (0.0)	0 (0.0)	NA	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
媒精方法: ICSI	131 (51.6)	29 (56.9)	0.541	22 (52.4)	23 (54.8)	1
胚移植プロトコル: HT	142 (55.9)	27 (52.9)	0.758	23 (54.8)	21 (50.0)	0.827
良好胚 (不妊原因)	254 (100.0)	42 (82.4)	<0.001	42 (100.0)	42 (100.0)	NA
男性因子	42 (16.5)	15 (29.4)	0.047	11 (26.2)	12 (28.6)	1
卵管因子	28 (11.0)	0 (0.0)	0.007	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
子宮内膜症	15 (5.9)	1 (2.0)	0.487	0 (0.0)	1 (2.4)	1
不明	172 (67.7)	35 (68.6)	1	31 (73.8)	29 (69.0)	0.810

特に記載がない場合、データは数 (%) で表示

Abbreviations: SD, standard deviation; NA, not available

BMI, body mass index (kg/m²); GDM, gestational diabetes mellitus; HDP, hypertensive disorders of pregnancy

ICSI, intracytoplasmic sperm injection; HT, hormone therapy

表2 2群間におけるSSRと出生時体格の評価

	マッチング前			マッチング後		
	Day4BL群 (n=254)	Day6BL群 (n=51)	p値	Day4BL群 (n=42)	Day6BL群 (n=42)	p値
SSR	1.134	1.217	0.878	1.800	1.333	0.655
LFD	5.1 (13)	5.9 (3)	0.737	2.4 (1)	4.8 (2)	1
AFD	81.5 (207)	74.5 (38)	0.252	85.7 (36)	73.8 (31)	0.277
HFD	13.4 (34)	19.6 (10)	0.275	11.9 (5)	21.4 (9)	0.380

データは% (数) で表示

マッチング後の検定はMcNemar検定

Abbreviations: SSR, secondary sex ratio (male/female)

LFD, light-for-dates; AFD, appropriate-for-dates; HFD, heavy-for-dates

(10/51), LFD児はDay4BL群で5.1% (13/254), Day6BL群で5.9% (3/51) で、出生時体格においても2群間に有意な差は見られなかった。また傾向スコアマッチング後の検討においても有意差は認めなかった。

考 察

以前より、胚移植時期では分割期胚移植よりも胚盤胞胚移植において男児が多く¹⁴⁻¹⁹⁾、媒精方法ではICSIよりも体外受精で男児が多く^{15, 17, 19)}、凍結胚移植よりも新鮮胚移植で男児

が多い^{15, 20)}、とされている。また発育が速い形態良好胚やTEグレード良好胚でも有意に男児が多いと報告されている^{11, 21-24)}。さらに、精子の状態によってもSSRが低下するといわれており、体外受精において乏精子症はSSRに影響を及ぼさないが、精子無力症ではSSRは低下し、ICSIにおいては精子所見が正常でも異常でも体外受精と比較してSSRが低下する¹⁹⁾との指摘がある。

ヒト胚において、糖産生や糖代謝、抗酸化酵

素を制御する2つの遺伝子glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) がX染色体上に存在し, その発現はXY胚よりもXX胚で高く, XY胚が速く発育する原因として, もとものと酵素活性が異なることが推定されている²⁵⁾. G6PDは糖代謝において重要な役割を果たし, 抗酸化ストレス作用を持つニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADPH) の産生に関わる酵素である. XX胚は, エネルギー代謝が高いが代謝が活発なため酸化ストレス下にあり, XY胚よりも成長遅延や胚質低下を起こしやすい. XY胚は, 桑実胚期から胚盤胞期にかけてXX胚よりも糖代謝が高いため早く胚盤胞へ発育し, また酸化ストレスの影響を受けにくく, XX胚よりviabilityの高い胚へ発育すると示唆されている.

今回, 当院におけるDay4BL群とDay6BL群における粗な比較では, SSRに有意差は見られなかった. 背景因子を比較すると, Day4BL群では有意に年齢が若く良好胚獲得率が高かった. また不妊原因としてDay4BL群で男性因子および卵管因子が有意に多く, これはDay4BL群が若齢層で卵子予備能が保たれている群であると考えられた. これらの背景因子を調整するために傾向スコアマッチングを行った後に比較したが, 2群間でのSSRに有意な差は認められなかった.

われわれは当初, 発育の速いDAY4BLではXY胚が多くなり出生児は男児が多くなると予測したが解析の結果, 両群間でSSRに差は見られなかった. XY胚は, 母体局所の軽度慢性炎症状態が存在すると着床不全をきたすことが知られている. 低用量アスピリンやビタミンDの抗炎症効果が, XY胚を救済しSSRの上昇につながったとの報告がある^{26, 27)}. 今回, 母体炎症の有無についての検討を加えていないが, われわれが当院妊婦に対して以前行った調査では, 妊娠初期のビタミンD充足率は1%未満ときわめて低いことが明らかとなっている²⁸⁾. このことは母体炎症が背景に存在し, SSRの上昇を認めなかった要因とも考えられる. プレコンセプ

ションケアとして着床前よりビタミンD充足状況を改善できれば, 結果が今回と異なる可能性も示唆されるが, 今後の検討課題としたい.

一方, 出生時体格はDay4BL群とDay6BL群における粗な比較においても傾向スコアマッチング後の比較検討においても有意差は見られなかった.

これまでに発育の遅い胚について, 胚盤胞の培養期間が長くなることが胚の遺伝子発現やメチル化パターンに影響する可能性^{29, 30)}, また胚盤胞全体のメチル化レベルが良好胚と不良胚では異なっており, そのエピジェネティックな変化の違いが胎児成長パターンに変化をもたらす可能性³¹⁾, 非良好胚と子宮内膜脱落膜間質細胞との応答が胎盤形成・胎児発育へ影響する可能性^{32, 33)} など, 多数の報告が見られる.

しかし, 胚の発育スピードは出生体重には影響せず, 発育の遅いDay7胚盤胞では出生体重2500 g未満の率は変わらないこと^{6, 7)}, またICMグレードにもTEグレードにも出生体重との相関がなく³⁴⁾, 胚盤胞の発育段階・形態は出生体重と有意な相関はないが, TEグレードC胚ではTEグレードA胚よりも有意に出生身長が0.4 cm高くなることなどの報告がある⁷⁾. さらに胚盤胞グレードと出生体重との間には負の関連を認め, 低グレード胚盤胞は高グレード胚盤胞よりも出生体重が183.5 g有意に少なかったとの報告もあり⁷⁾, 結論は一定していない. もともと発育の遅いDay6胚盤胞はDay5胚盤胞と比較して妊娠率が低いことや細胞分裂異常をもつ細胞の割合が高いなどとの報告があるが^{35, 36)}, 今回の検討では, 最も早く胚盤胞に到達するDay4BL群との比較においても, Day6BL群における出生時体格に差は見られず, 発育が遅い胚でも出生児には影響を与えないことが示された.

結 論

生殖補助医療において胚盤胞到達速度によりSSRの偏りが起こることが懸念されたが, 当院の結果では出生児の性比に変化は見られなかった. また発育が最も早いDay4胚盤胞との比較

において、発育の遅いDay6胚盤胞移植でも出生時体格に影響はなく、Day5で胚盤胞が得られずDay6でしか胚盤胞が得られない症例においても、Day6胚盤胞の移植は有効な選択肢と考えられた。

参考文献

- Mittwoch U : Blastocysts prepare for the race to be male. *Hum Reprod*, 8 : 1550-5, 1993.
- Avery B, Jørgensen CB, Madison V, et al. : Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol Reprod Dev*, 32 : 265-270, 1992.
- Bronet F, Nogales M-C, Martínez E, et al. : Is there a relationship between time-lapse parameters and embryo sex? *Fertil Steril*, 103 : 396-401.e2, 2015.
- 緒方誠司, 塩谷雅英 : 胚発育段階, 胚発育速度が出生時性比に与える影響の検討. 産婦の実際, 62 : 1141-1144, 2013.
- Ozgun K, Berkkanoglu M, Bulut H, et al. : Blastocyst age, expansion, trophectoderm morphology, and number cryopreserved are variables predicting clinical implantation in single blastocyst frozen embryo transfers in freeze-only-IVF. *J Assist Reprod Genet*, 38 : 1077-1087, 2021.
- Du T, Wang Y, Fan Y, et al. : Fertility and neonatal outcomes of embryos achieving blastulation on Day 7: are they of clinical value? *Hum Reprod*, 33 : 1038-1051, 2018.
- Hiraoka K, Hiraoka K, Miyazaki M, et al. : Perinatal outcomes following transfer of human blastocysts vitrified at day 5, 6 and 7. *J Exp Clin Assist Reprod*, 6 : 4, 2009.
- Borgström MB, Kesmodel US, Klausen TW, et al. : Developmental stage and morphology of the competent blastocyst are associated with sex of the child but not with other obstetric outcomes: a multicenter cohort study. *Hum Reprod*, 37 : 119-128, 2021.
- Zhang J, Huang J, Liu H, et al. : The impact of embryo quality on singleton birthweight in vitrified-thawed single blastocyst transfer cycles. *Hum Reprod*, 35 : 308-316, 2020.
- Zhang J, Wang Y, Liu H, et al. : Effect of in vitro culture period on birth weight after vitrified-warmed transfer cycles: analysis of 4, 201 singleton newborns. *Fertil Steril*, 111 : 97-104, 2019.
- Lou H, Li N, Zhang X, et al. : Does the sex ratio of singleton births after frozen single blastocyst transfer differ in relation to blastocyst development? *Reprod Biol Endocrinol*, 18 : 72, 2020.
- 板橋家頭夫, 藤村正哲, 楠田 聡, 他 : 新しい在胎期間別出生時体格標準値の導入について. 日児誌, 114 : 1271-1293, 2010.
- Kanda Y : Investigation of the freely available easy-to-use software "EZR" for medical statistics. *Bone Marrow Transplant*, 48 : 452-458, 2012.
- Perlman BE, Minis E, Greenberg P, et al. : Increased male live-birth rates after blastocyst-stage frozen-thawed embryo transfers compared with cleavage-stage frozen-thawed embryo transfers: a SART registry study. *FS Rep*, 2 : 161-165, 2021.
- Hentemann MA, Briskemyr S, Bertheussen K : Blastocyst transfer and gender: IVF versus ICSI. *J Assist Reprod Genet*, 26 : 433-436, 2009.
- Chang HJ, Lee JR, Jee BC, et al. : Impact of blastocyst transfer on offspring sex ratio and the monozygotic twinning rate: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 91 : 2381-2390, 2009.
- Dean JH, Chapman MG, Sullivan EA : The effect on human sex ratio at birth by assisted reproductive technology (ART) procedures—an assessment of babies born following single embryo transfers, Australia and New Zealand, 2002-2006. *BJOG*, 117 : 1628-1634, 2010.
- Luna M, Duke M, Copperman A, et al. : Blastocyst embryo transfer is associated with a sex-ratio imbalance in favor of male offspring. *Fertil Steril*, 87 : 519-523, 2007.
- Arikawa M, Jwa SC, Kuwahara A, et al. : Effect of semen quality on human sex ratio in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: an analysis of 27, 158 singleton infants born after fresh single-embryo transfer. *Fertil Steril*, 105 : 897-904, 2016.
- Ménézo YJ, Chouteau J, Torelló J, et al. : Birth weight and sex ratio after transfer at the blastocyst stage in humans. *Fertil Steril*, 72 : 221-224, 1999.
- Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, et al. : The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*, 95 : 520-524, 2011.
- Hu K-L, Zheng X, Hunt S, et al. : Blastocyst quality and perinatal outcomes in women undergoing single blastocyst transfer in frozen cycles. *Hum Reprod Open*, 2021 : hoab036, 2021.
- 片岡万里乃, 高橋瑞穂, 服部裕充, 他 : 凍結融解胚盤胞移植における栄養外胚葉の形態が臨床成績と出生児に与える影響. 日受精着床会誌, 40 : 225

- 231, 2023.
- 24) Mao Y, Zeng M, Meng Y-M, et al. : Effect of blastocyst quality on human sex ratio at birth in a single blastocyst frozen thawed embryo transfer cycle. *Gynecol Endocrinol*, 39 : 2216787, 2023.
- 25) Nagata C, Mekaru K, Gibo K, et al. : Sex ratio of infants born through in vitro fertilization and embryo transfer: Results of a single-institution study and literature review. *JBRA Assist Reprod*, 25 : 337-340, 2021.
- 26) Radin RG, Mumford SL, Silver RM, et al. : Sex ratio following preconception low-dose aspirin in women with prior pregnancy loss. *J Clin Invest*, 125 : 3619-3626, 2015.
- 27) Purdue-Smithe AC, Kim K, Nobles C, et al. : The role of maternal preconception vitamin D status in human offspring sex ratio. *Nat Commun*, 12 : 2789, 2021.
- 28) Yamade I, Inoue T, Hamada H, et al. : Ineffectiveness of antenatal guidance intervention for vitamin D insufficiency and deficiency in pregnant women in Kyoto, Japan. *J Obstet Gynaecol Res*, 47 : 3540-3550, 2021.
- 29) Mäkinen S, Söderström-Anttila V, Vainio J, et al. : Does long in vitro culture promote large for gestational age babies? *Hum Reprod*, 28 : 828-34, 2013.
- 30) Zhang J, Wang Y, Liu H, et al. : Effect of in vitro culture period on birth weight after vitrified-warmed transfer cycles: analysis of 4, 201 singleton newborns. *Fertil Steril*, 111 : 97-104, 2019.
- 31) Li G, Yu Y, Fan Y, et al. : Genome wide abnormal DNA methylome of human blastocyst in assisted reproductive technology. *J Genet Genomics*, 44 : 475-481, 2017.
- 32) Macklon NS, Brosens JJ : The human endometrium as a sensor of embryo quality. *Biol Reprod*, 91 : 98, 2014.
- 33) Brosens JJ, Salker MS, Teklenburg G, et al. : Uterine selection of human embryos at implantation. *Sci Rep*, 4 : 3894, 2014.
- 34) Ebner T, Tritscher K, Mayer RB, et al. : Quantitative and qualitative trophectoderm grading allows for prediction of live birth and gender. *J Assist Reprod Genet*, 33 : 49-57, 2016.
- 35) Sciorio R, Thong KJ, Pickering SJ : Single blastocyst transfer (SET) and pregnancy outcome of day 5 and day 6 human blastocysts vitrified using a closed device. *Cryobiology*, 84 : 40-45, 2018.
- 36) Tong J, Niu Y, Wan A, et al. : Comparison of day 5 blastocyst with day 6 blastocyst: Evidence from NGS-based PGT-A results. *J Assist Reprod Genet*, 39 : 369-377, 2022.