

Faster fertilization and cleavage kinetics reflect competence to achieve a live birth after intracytoplasmic sperm injection, but this association fades with maternal age

Mariabeatrice Dal Canto, Ph.D.,^a Alessandro Bartolacci, B.S.,^a Diana Turchi, B.S.,^a Daniela Pignataro, Ph.D.,^a Monia Lain, B.S.,^a Elena De Ponti, B.S.,^b Claudio Brigante, M.D.,^a Mario Mignini Renzini, M.D.,^a and Jose Buratini, Ph.D.^{a,c}

^a Biogenesi, Reproductive Medicine Center, Monza, Italy; ^b Department of Medical Physics, Azienda Socio Sanitaria Territoriale di Monza, Monza, Italy; ^c Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University, Botucatu, Brazil

より速い受精と卵割動態は、ICSI後の生児出産を達成する能力を反映しているが、この関連性は母体の年齢とともに薄れる

目的: 初期発生動態と出産能力との関係、およびこれに関連した母親の年齢の影響を評価すること。

設計: 4,915個の胚を含む遡及的コホート研究であり、1,390個が移植され、形態動態データと組み合わせた臨床結果が提供された。そのうち168人は生児出産に至り(LB)、1,222人は生児出産に至らなかった(NLB)。初期形態動態パラメーターを、2つの年齢グループ(37歳未満と37歳以上)に層別化した患者のLB胚とNLB胚の間、また、37歳未満と37歳以上の患者の同じ能力グループの胚間で比較した。形態動態パラメーターと生児出産との関連性は、単変量解析および多変量解析によって検査された。

調査場所: 不妊治療クリニック。

患者: 研究対象集団には、2日目または3日目に新鮮な1つ(SET)、2つ(DET)、または3つ(TET)の胚移植を伴う自己由来のICSIサイクルを受ける1,066人の患者が含まれており、そのうち669人の患者がNLB胚を、134人がLB胚を作出した。

介入: なし。

主な結果項目: 受精および卵割の形態動態パラメーターおよび生児出産。

結果: 全ての患者において、すべての形態動態パラメーターはNLB胚と比較し、LB胚で早期に到達した。37歳未満の患者においても同様に観察されたが($P < .015$)、37歳以上では観察されなかった。t8(8割球胚が確認された時点)を除いて、すべての形態動態パラメーターは、37歳以上の患者由来のLB胚と比較して、37歳未満の患者由来のLB胚の方が早く到達した。単変量解析では、すべての形態動態パラメーターの早期発生が生児出産と関連していることが明らかになったが、多変量解析では、母体の年齢とは独立して、早期のt2(2つの別の異なる細胞が確認された時間)のみが生児出産と関連していた。

結論: この研究は、遡及的な性質と一つの体外受精センターでの実績にも関わらず、生児出産に至る能力のある胚は、移植後に生児出産に至らない胚と比較して、全体的により速い初期発生動態を示す新規データを提示する。ただし、母親の年齢が上がるにつれてその差は縮まっていく。この研究結果は、受精および卵割の形態運動学的パラメーターが、特に母体年齢が高くなる前に、生児出産率の向上を目的とした胚選択方法の貴重な参考資料となる可能性があることを示唆しているが、母体年齢が高くなると有用性は限定的である。

【背景】

タイムラプス技術によって胚の形態動態をより詳細に評価できるようになったが、その技術の IVF/ICSI の臨床的成功を改善する性能はまだ確実ではない。人工知能システムによる遺伝的、代謝的、および形態学的データの統合によって、胚選択の精度が大幅に向上すると予測されている。形態動態情報の可能性と限界を明らかにすることが、タイムラプスベースの胚選択のパフォーマンスを最適化するために不可欠です。

タイムラプス顕微鏡法 (TLM) は、受精から胚盤胞形成までのさまざまな形態動態パラメーターと、検査結果および臨床結果との関連性を評価するために応用されている。より速い発生動態は、胚細胞数の増加、胚盤胞形成率の向上、より高い着床率および妊娠率と関連しており、これらの研究が、胚選択のための TLM ベースのアルゴリズム開発の基礎となった。TLM による胚選択によって、着床率と妊娠率が向上すると報告されたが、生児出産率向上への寄与は明らかになっていない。

TLM ベースの胚選択の精度は、外部で開発されたアルゴリズムが使用される場合に疑問視され、この理由は、施設間の形態動態パラメーター間の差異に由来すると思われ、その主な原因は培養条件と患者の経歴の変動によるものと考えられている。これまでの様々な研究から、患者関連の交絡因子の中では、特に母親の年齢が関連していることが示唆されている。これらの以前の研究のすべてにおいて、すべての胚が異なる年齢グループで割り当てられており、母親の年齢と形態動態に関する胚質に及ぼす影響を分離することができなかったため、母親の年齢が、生児出産を可能にする胚の発生動態を変化させるかどうかは、現在も未解決の問題である。この解明が、胚選択のための TLM 技術による形態動態パラメーターの有用性を解明するための基礎となります。

臨床的価値を明確にし、TLM 由来の形態動態パラメーターの最適な使用法を決定するために、以下の仮説を検証した。

- 1) 生児出産に至る胚は、より速い受精と卵割動を示す。
- 2) 母親の年齢は、初期発生の形態動態と生児出産との関連に影響を与える。

【材料と方法】

・患者と実験計画

イタリアの Biogenesi 生殖医学センターで実施され、2014 年 7 月から 2019 年まで実施された患者自身の卵子を使用した ICSI 周期の終了時に新鮮胚移植 (ET) を受けた患者 1,066 人が含まれており、937 人 (88%) が 1 周期のみ、118 人 (11%) が 2 周期、11 人 (1%) が 3 周期で寄与した。全体として、4,915 個の胚が獲得でき、そのうち 2,093 個が形態学的に選択され、2 日目または 3 日目に 1 個 ~ 3 個 (SET, DET, TET) で移植された。2,093 個の胚のうち、形態動態情報と組み合わせることができる既知の生児出産転帰 [生児出産達成 (LB) VS 未達成 (NLB)] を持つ胚のみが、生児出産を為せる胚の形態動態と母親の年齢の関係の分析に使用された ($n = 1,390$)。移植された胚の数よりも少ない数の産子を出産する結果となった DET および TET は、この分析から除外され、SET で単胎出産となった胚、DET で双児が誕生した胚が、LB 胚として分析に含まれた ($n = 168$)。NLB 胚は、着床に失敗した胚 (hCG 陰性)、hCG 陽性だが臨床妊娠検査で陰性となった胚、および流産となった胚である。 ($n = 1,222$) より速い胚動態が生児出産能力と関連しているという仮説を検証するために、形態動態パラメーターを LB

胚と NLB 胚間で比較した。母親の年齢が胚の発生速度に影響を与えるという仮説を検証するために、LB および NLB 胚の形態動態パラメーターを 37 歳未満と 37 歳以上の患者間で比較し、各年齢グループ内の LB および NLB の胚間で形態動態パラメーターを比較した。

・タイムラプス画像と形態動態パラメーターの評価

EmbryoViewer 画像解析ソフトウェア (Unisense FertiTech) を用いて、ICSI 後数時間の間、全ての胚で以下の形態動態パラメーターが TLM によって評価された。tPNf: 前核消失の時間、t2: 2 つの異なる細胞が識別された時間、t3: 3 割球胚が確認された時間、t4: 4 割球胚が確認された時間、t5: 5 割球胚が確認された時間、t8: 8 個の割球の胚が確認された時間。

・胚のスコアリング、選択、移植

胚の形態は、割球の数、割球の対称性、フラグメントの割合および多核割球の有無を考慮して、2 日目と 3 日目に評価された。移植胚の選択は、direct cleavage や reverse cleavage などの異常な分裂を示す胚を除外し、形態学的基準に基づいて行われた。

胚移植は、2 日後または 3 日後に、新鮮胚のシングル、ダブル、またはトリプル ET を実施した。着床診断は ET 後 12 日目に hCG 検査を行い、臨床的妊娠検査は ET 後 7 週目に超音波検査で行われた。

・統計解析

統計解析は Stata Software 9.0 (Stata Corp.) を用いて行い、有意水準として $P < .05$ を採用した。

【結果】

SET404 件、DET 642 件、TET 160 件の計 1,206 件の移植のうち、1,001 件が 3 日目に、205 件が 2 日目に行われた。全体的な臨床妊娠率と生児出生率は、それぞれ 27% (325/1,206) と 21.7% (262/1,206) であった。移植された 2,093 個の胚のうち、1,390 個が受精および卵割の形態動態パラメーターと生児出生実績および母親の年齢との関連性を評価するために使用された。1,390 個の胚のうち、168 個は生児出生に成功し (LB)、1,222 個は生児出生に至らなかった (NLB)。168 個の LB 胚は 134 人の患者に由来し、1,222 個の NLB 胚は 669 人の患者に由来した。DET または TET で移植された 733 個の胚は、移植された胚数より少ない産子数となり、既知の生児出生結果が得られなかったため、分析から除外された。

表 1 にすべての患者のベースライン臨床特徴を示しており、LB となった患者は NLB となった患者より若く (34.69 ± 3.68 VS. 38.08 ± 4.30)、また、採卵個数が多くなった (10.45 ± 4.76 VS. 8.70 ± 4.14)。

表 2 には年齢に関係なく評価した結果を示しており、すべての形態動態エンドポイントは、NLB 胚よりも LB 胚の方が早期に到達した。

表 3 における、年齢に従ってグループ化された患者の胚では、異なる形態動態パターンが観察された。すべての形態動態パラメーターは、37 歳未満の患者由来の NLB 胚よりも LB 胚の方が早く到達したが、37 歳以上の患者由来の LB 胚と NLB 胚の間に差は観察されなかった。37 歳未満および 37 歳以上の患者の LB および NLB 胚の形態動態パターンを示す曲線を図 1 に示す。37 歳未満の患者の LB 胚と NLB 胚では明確に分離された曲線が観察されたが、37 歳以上の患者ではほぼ一致する曲線が観察された。さらに、t8 ($P = .07$) を除いて、すべての形態動態パラメーターは、37 歳以上の患者から得た LB 胚よりも、37 歳未満の患者から得た LB 胚の方が早く到達した。

TABLE 1

Baseline clinical characteristics for all patients, patients providing embryos that were transferred but did not result in a live birth, and patients achieving a live birth.

Characteristic	Total	NLB	LB
No. of patients	1,066	669	134
Maternal age, y	37.70 ± 4.13	38.08 ± 4.30 ^a	34.69 ± 3.68 ^a
Maternal BMI, kg/m ²	22.56 ± 3.31	22.67 ± 3.47	22.84 ± 3.34
Number of oocytes retrieved	9.13 ± 4.18	8.70 ± 4.14 ^a	10.45 ± 4.76 ^a
Causes of infertility ^b			
Endometriosis	48 (4.50)	41 (6.13)	5 (3.70)
Polycystic ovarian syndrome	10 (0.94)	6 (0.89)	5 (3.70)
Tubal factor	70 (6.57)	34 (5.08)	7 (5.19)
Reduced ovarian reserve	62 (5.82)	21 (3.14)	12 (8.89)
Male factor	367 (34.42)	254 (37.97)	44 (32.59)
Mixed	201 (18.86)	113 (16.89)	28 (20.74)
Unexplained infertility	308 (28.89)	200 (29.90)	34 (25.19)

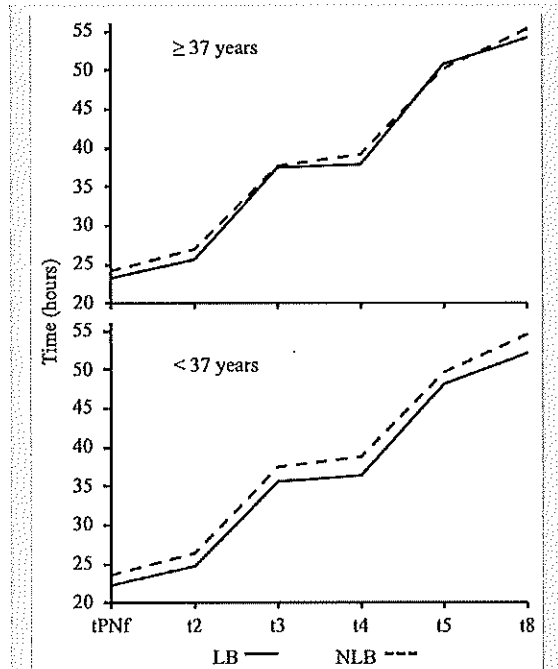
Note: Values are presented as mean ± standard deviation or n (%), unless stated otherwise. BMI = body mass index; LB = live birth; NLB = did not result in live birth.

^a Differences (P < .0001) between patients achieving a LB and those producing embryos that were transferred but did not result in a live birth.

^b Different distribution of infertility causes between NLB and LB (P < .003).

Dal Canto. Maternal age alters embryo morphokinetics. Fertil Steril 2020.

FIGURE 1



Graphical representation of the effect of maternal age on early developmental kinetics of embryos providing a live birth (LB) and embryos that did not reach a live birth (NLB).

Dal Canto. Maternal age alters embryo morphokinetics. Fertil Steril 2020.

TABLE 2

Fertilization and cleavage morphokinetic parameters of all embryos produced, embryos that were transferred and had a birth outcome paired with morphokinetic information, those embryos that achieved a live birth, and those that did not achieve a live birth.

Parameter	Total	Transferred	NLB	LB
n	4,915	1,390	1,222	168
tPNF	24.1 ± 3.6 (n = 4,915)	23.7 ± 3.3 (n = 1,390)	23.9 ± 3.4 ^a (n = 1,222)	22.5 ± 2.7 ^a (n = 168)
t2	27.0 ± 4.0 (n = 4,915)	26.6 ± 3.7 (n = 1,390)	26.8 ± 3.8 ^a (n = 1,222)	25.0 ± 2.7 ^a (n = 168)
t3	38.0 ± 5.2 (n = 4,758)	37.4 ± 4.4 (n = 1,350)	37.6 ± 4.5 ^a (n = 1,183)	36.1 ± 3.3 ^a (n = 167)
t4	39.8 ± 6.1 (n = 4,646)	38.7 ± 4.9 (n = 1,321)	39.0 ± 5.1 ^a (n = 1,155)	36.8 ± 3.6 ^a (n = 166)
t5	50.6 ± 7.5 (n = 4,224)	49.8 ± 6.2 (n = 1,119)	50.0 ± 6.4 ^b (n = 974)	48.8 ± 4.9 ^b (n = 145)
t8	57.8 ± 9.6 (n = 3,565)	54.5 ± 6.6 (n = 904)	55.0 ± 6.6 ^c (n = 769)	52.7 ± 6.1 ^c (n = 145)

Note: Values are presented as mean ± standard deviation, unless stated otherwise. Annotation of t3, t4, t5, and t8 was not possible when their occurrence preceded embryo transfer, which explains the decrease in the number of observations from t2 to t8. LB = live birth; NLB = did not result in live birth; tPNF = time of pronuclear fading; t2 = time at which two separate and distinct cells were identified; t3 = time at which a 3-blastomere embryo was identified; t4 = time at which a 4-blastomere embryo was identified; t5 = time at which a 5-blastomere embryo was identified; t8 = time at which an 8-blastomere embryo was identified.

^{a,b,c} Differences between LB and NLB embryos: ^a P < .0001; ^b P = .009; ^c P = .0002.

Dal Canto. Maternal age alters embryo morphokinetics. Fertil Steril 2020.

TABLE 3

Morphokinetic parameters of all embryos produced, embryos that were transferred and had a birth outcome paired with morphokinetic information, those embryos that achieved a live birth, and those that did not achieve a live birth in different maternal age groups.

Parameter	< 37 y				≥ 37 y			
	Total (n = 2,378)	Transferred (n = 573)	NLB (n = 448)	LB (n = 125)	Total (n = 2,537)	Transferred (n = 817)	NLB (n = 774)	LB (n = 43)
tPNF	23.9 ± 3.5 (n = 2,378)	23.3 ± 3.2 (n = 573)	23.6 ± 3.3 ^{a,c} (n = 448)	22.3 ± 2.7 ^{a,c} (n = 125)	24.2 ± 3.6 (n = 2,537)	24.0 ± 3.3 (n = 817)	24.1 ± 3.4 ^c (n = 774)	23.2 ± 2.4 ^c (n = 43)
t2	26.8 ± 4.0 (n = 2,378)	26.1 ± 3.7 (n = 573)	26.5 ± 3.8 ^{a,c} (n = 448)	24.8 ± 2.8 ^{a,c} (n = 125)	27.1 ± 4.0 (n = 2,537)	26.8 ± 3.6 (n = 817)	26.9 ± 3.7 ^c (n = 774)	25.7 ± 2.5 ^c (n = 43)
t3	37.9 ± 5.3 (n = 2,322)	37.1 ± 4.4 (n = 564)	37.4 ± 4.6 ^a (n = 440)	35.7 ± 3.1 ^{a,d} (n = 124)	38.2 ± 5.2 (n = 2,436)	37.6 ± 4.4 (n = 786)	37.7 ± 4.4 (n = 743)	37.4 ± 3.4 ^d (n = 43)
t4	39.6 ± 6.2 (n = 2,270)	38.2 ± 4.9 (n = 554)	38.8 ± 5.2 ^a (n = 431)	36.4 ± 3.5 ^{a,d} (n = 123)	39.9 ± 6.1 (n = 2,376)	39.1 ± 4.9 (n = 767)	39.2 ± 5.0 (n = 724)	37.9 ± 3.6 ^d (n = 43)
t5	50.3 ± 7.5 (n = 2,126)	49.2 ± 6.0 (n = 495)	49.6 ± 6.3 ^{b,e} (n = 386)	48.1 ± 4.7 ^{b,d} (n = 109)	50.8 ± 7.4 (n = 2,098)	50.3 ± 6.3 (n = 624)	50.3 ± 6.4 ^e (n = 588)	50.8 ± 5.0 ^d (n = 36)
t8	57.6 ± 9.7 (n = 1,846)	54.0 ± 6.6 (n = 423)	54.6 ± 6.8 ^b (n = 321)	52.2 ± 6.0 ^{b,d} (n = 102)	57.9 ± 9.6 (n = 1,719)	55.2 ± 6.5 (n = 481)	55.3 ± 6.5 (n = 448)	54.2 ± 6.2 ^d (n = 33)

Note: Values are presented as mean ± standard deviation, unless stated otherwise. Annotations of t3, t4, t5, and t8 were not possible when their occurrence preceded embryo transfer, which explains the decrease in the number of observations from t2 to t8. LB = live birth; NLB = did not result in live birth; tPNF = time of pronuclear fading; t2 = time at which two separate and distinct cells were identified; t3 = time at which a 3-blastomere embryo was identified; t4 = time at which a 4-blastomere embryo was identified; t5 = time at which a 5-blastomere embryo was identified; t8 = time at which an 8-blastomere embryo was identified.

^{a,b} Differences between NLB and LB embryos from patients aged < 37 years (^a P < .0001; ^b P < .015). No significant difference was observed between NLB and LB embryos from patients aged ≥ 37 years (P > .1).

^{c,d,e} Differences between embryos in equivalent outcome groups from different maternal ages: ^c P < .03; ^d P < .01; ^e P < .05; ^f P < .07.

Dal Canto. Maternal age alters embryo morphokinetics. Fertil Steril 2020.

【考察】

この研究では、より速い受精と卵割動態が生児出産能力と関連しており、母親の年齢が上がるにつれて有能な胚の初期動態が遅くなることを示している。

生児出産に適した胚は、生児出産に至らない胚よりも早く tPNf、t2、t3、t4、および t8 に達することを示しており、初期発生と胚質の関係を評価したこれまでの研究と一致しており、tPNf および t2 が速いほど、3 日目の胚の形態が良好であり、t2 が速いほど胚盤胞形成および着床能を反映することも報告されている。同様に、t3、t4、t5 が早いことが、より高い着床率と関連しており、t4 においては胚盤胞の質を反映している。t8 の間隔が短いことは、胚盤胞形成と着床能力の改善に関連している。本研究は、受精と卵割動態と出産能力との関連性を初めて報告したものである。

初期胚の発育の低下も母親の年齢が治療の妨げとなる原因には初期胚の発育の低下も関連しており、母親の年齢の変動は、さまざまな臨床現場で TLM ベースの方法で観られる一貫性のない結果の潜在的な原因と考えられている。しかし、母親の年齢が胚の形態動態に及ぼす影響の解明は、研究毎の異なるカットオフ年齢の設定と、年齢に応じた胚のグループ化により困難となっている。本研究では、同じ能力ステータスを持つ胚の発生動態への年齢の影響を評価することにより、この母親の変動が生児出産に至る胚の受精および卵割動態の遅さとの関連を実証した。さらに、受精と卵割の網羅的な形態動態マーカーは、37 歳未満の患者の LB 胚と NLB 胚の間でのみ有意な差が示され。

初期胚の形態動態に対する年齢の影響は、多変量解析によっても強調され、t2 は、年齢とは独立して生児出産と有意に関連するパラメーターであった。興味深いことに、多変量解析では t5 が生児出産と関連していることも示されたが、オッズ比は以前の文献などとは一致しなかった。この不一致は、多変量解析におけるさまざまな年齢グループの患者からの LB 胚と NLB 胚の異なる動態パターンだけでなく、生児出産に対する母親の年齢の強い影響を反映している可能性がある。

この研究が 1 つの施設由来のデータによるものであり、移植された胚の数のばらつき、データベース内の不均一な患者の選抜、およびアノテーションの潜在的なばらつきが結果に影響を与えた可能性があることも認識しているが、出産結果が既知である多数の胚を評価することで、母親の年齢が胚の形態動態に及ぼす影響を初めて適切に評価できるようになったと考える。

結論として、この研究は、出産能力が母体の年齢に応じてより速い受精と卵割速度に関連しているという新たな証拠を提示している。また、今回のデータは、初期発生動態と胚の能力との関係が母親の年齢とともに薄れることを示している。したがって、初期形態動態マーカーは、若い患者における胚選択の貴重な参考となる可能性があるが、高齢患者では、その臨床的関連性は非常に限定されるだろう。この研究は、胚の能力に関連する発生動態パターンのより良い特徴付けに貢献すると同時に、母親の年齢を考慮した胚選択方法の改善のための重要な参考資料を提供する。

Supplemental Table 1. Association between maternal variables (age and BMI) and morphokinetic parameters with live birth as assessed by means of univariate and multivariate logistic analysis.

Variable	Univariate analysis		Multivariate analysis	
	OR (95% CI)	<i>P</i> value	OR (95% CI)	<i>P</i> value
Age (cutoff 37 y)	5.0 (3.5–7.2)	<.0001	4.5 (2.9–6.9)	<.0001
BMI	1.0 (1.0–1.1)	.548	1.0 (1.0–1.1)	.145
tPNF	0.9 (0.8–0.9)	<.0001	1.4 (1.0–2.0)	.055
t2	0.8 (0.8–0.9)	<.0001	0.6 (0.4–0.9)	.007
t3	0.9 (0.9–1.0)	<.0001	1.0 (0.8–1.2)	.763
t4	0.9 (0.9–0.9)	<.0001	0.9 (0.8–1.1)	.460
t5	1.0 (0.9–1.0)	.026	1.1 (1.0–1.2)	.006
t8	0.9 (0.9–1.0)	<.0001	1.0 (0.9–1.0)	.052

Note: BMI = body mass index; CI = confidence interval; OR = odds ratio; tPNF = time of pronuclear fading; t2 = time at which two separate and distinct cells were identified; t3 = time at which a 3-blastomere embryo was identified; t4 = time at which a 4-blastomere embryo was identified; t5 = time at which a 5-blastomere embryo was identified; t8 = time at which an 8-blastomere embryo was identified.