

当院における血中ホルモン値E₂, P₄の値と凍結融解胚盤胞移植成績の関連

Relationship between serum Estradiol (E₂), and Progesterone (P₄) levels and Outcomes of Frozen-Thawed Blastocyst Transfer

安澤 圭昭 池田栄里奈 池崎 公彦 田村 俊男 中山 洋
藤田 裕彰 笹森 千春 池澤 有加 浅利 真司 長崎 貴幸
村田 惟 村形 沙織 橋本 修志 田中 雄大

YOSHIKI ANZAWA, IKEDA ERINA, KIMIHIKO IKEZAKI, TOSHIO TAMURA, HIROSHI NAKAYAMA, HIROAKI FUJITA, CHIHARU SASAMORI, YUKA IKEZAWA, SHINJI ASARI, TAKAYUKI NAGASAKI, YUI MURATA, SAORI MURAKATA, SHUJI HASHIMOTO, YUDAI TANAKA

Medical Park Shonan 1-24-7 Shonandai, Fujisawa, Kanagawa 252-0804, Japan

要旨: 卵巣性ステロイドホルモンの制御下にある子宮内膜は、複雑なメカニズムのもと受精卵を受け入れる。生殖補助医療の現場では胚の凍結融解技術の進歩により凍結融解胚移植が主流となり良好な成績を得ることができるようになってきたが、母体側の内分泌環境とその妊娠への寄与は不明な点が多い。今回我々は凍結融解胚移植症例 703 周期について、成績と移植当日の血中ホルモン値の関連について後方視的に比較検討した。移植成績は不成功群、化学妊娠群、臨床妊娠群、生産群の 4 群に分類した。血中ホルモンは E₂, P₄ 値を測定した。各群の平均 E₂ 値はそれぞれ、自然周期において 171 pg/ml (25.1 ~ 1,331.1 pg/ml), 184 pg/ml (39.2 ~ 1,549.9 pg/ml), 187 pg/ml (39.2 ~ 1,549.9 pg/ml), 192 pg/ml (39.2 ~ 1,549.9 pg/ml) であった。また、同様にホルモン補充周期では 373 pg/ml (25.0 ~ 1,132.1 pg/ml), 392 pg/ml (25.0 ~ 1,120.1 pg/ml), 390 pg/ml (25.0 ~ 1,091.5 pg/ml), 380 pg/ml (25.0 ~ 1,015.2 pg/ml) であった。各群の平均 P₄ 値はそれぞれ、自然周期で 23.7 ng/ml (8.95 ~ 40.0 ng/ml), 23.0 ng/ml (6.13 ~ 40.0 ng/ml), 22.7 ng/ml (6.13 ~ 40.0 ng/ml), 22.7 ng/ml (6.13 ~ 40.0 ng/ml) であった。また、同様にホルモン補充周期では 23.6 ng/ml (6.86-40 ng/ml), 22.4 ng/ml (7.71-40.0 ng/ml), 22.0 ng/ml (7.71-40.0 ng/ml), 22.5 ng/ml (10.11-40.0 ng/ml) であった。各群において t 検定にて比較検討したところ有意差はなかった。また、E₂/P₄ の比を算出し自然周期において 7.14、ホルモン補充周期において 15.9 を cut off 値として 2 群に分け、それぞれの臨床妊娠率を比較した所、それぞれ 7.14 未満および 15.9 未満の群が有意に高率であった。今回我々の結果より、胚移植における移植日血中ホルモン E₂ と P₄ の至適比率があることが示唆された。

キーワード: 凍結融解胚移植, エストロゲン, プロゲステロン, E₂/P₄ ratio

ABSTRACT: In order to accept embryos, the endometrium, under ovarian steroids, must be strictly controlled by complicated mechanisms. Although advancements in frozen-thawed technology have greatly improved the conception rate of ART, there are still many unclarified details regarding the maternal endocrine environment and its contribution to the pregnancy itself. We retrospectively evaluated serum estradiol (E₂) and progesterone (P₄) levels on the day of embryo transfer and the pregnancy outcomes of 487 frozen-thawed transfer cycles. Transfer results were classified as; unsuccessful, chemical pregnancy, clinical pregnancy, or live birth. The average E₂ values of each of the four groups were 171 pg/ml, 184 pg/ml, 187 pg/ml, and 192 pg/ml as natural cycle, 373 pg/ml, 392 pg/ml, 390 pg/ml, 380 pg/ml as hormone replacement cycle respectively, and the average P₄ values of each of the four groups were 23.7 ng/ml, 23.0 ng/ml, 40.0 ng/ml, and 22.7 ng/ml as natural cycle, 23.6 ng/ml, 22.4 ng/ml, 22.0 ng/ml, 22.5 ng/ml respectively. Statistical analysis showed there were no significant difference either the E₂ or P₄ levels. The ratio of E₂ to P₄ was then calculated. Analysis showed that the pregnancy rate was significantly

受付日: 2016年3月2日 / 受理日: 2017年1月12日

医療法人社団桐杏会メディカルパーク湘南: 〒252-0804 神奈川県藤沢市湘南台1-24-7
TEL: 0466-41-0331 FAX: 0466-41-0332 e-mail: labo_shonan_ivf@yahoo.co.jp

higher when the ratio was below 7.14 as natural cycle and 15.9 as hormone replacement cycle. Our results suggest that there exists no optimal E₂ nor P₄ range, but that there is an optimal E₂/P₄ ratio on the day of embryo transfer.

Key words: frozen-thawed embryo transfer, estrogen, progesterone, E₂/P₄ ratio

緒言

生殖補助医療の進歩は目覚ましく、不妊に悩む患者が子供を授かることができるようになってきた。多胎予防のため単一胚盤胞移植が多く実施され、良好な成績を得ている。その一方で良好胚盤胞を何度移植しても妊娠に至らない症例も少なくない。

胚盤胞移植で移植周期は子宮内膜と同期化することで良好な成績を得ることができると考えられているが、移植時の子宮内膜の機能はブラックボックスとなっており未解明な部分が多いのが現状である。良好な胚の着床には子宮内膜厚が重要で、一般的に良好な妊娠率を得るために必要な着床期内膜厚は7 mm以上とされている。また、子宮内膜細胞はエストロゲン、プロゲステロンなどの卵巣性ステロイドホルモンにより直接的な調節を受けている。内膜は増殖期・分泌期・黄体期と大きく3つのphaseに分類され、それぞれの時期にホルモン感受性のもと様々な因子が発現しており、これらが複雑に相互に作用しながら着床をコントロールしていると考えられている。いわゆるクロストークである。しかし、これら液性因子については不明な点が多く着床障害や不育症を初めとする反復着床不成功例に対し分子レベルでの現象は殆ど明らかにされていないのが現状である。

今回、移植日の血中エストラジオール値(E₂)およびプロゲステロン値(P₄)と胚移植の成績を後方視的に解析を行い、妊娠率との相関関係を調べた。同時にE₂とP₄の比を算出し、治療成績とのcut off値を検討したので報告したい。

対象と方法

2014年1月から2015年12月までの当院で施行した凍結融解胚盤胞移植703周期を対象とした。移植方法の内訳は、自然周期(ov-BT)ホルモン補充周期(HR-BT)の2パターンがあり、内訳として自然周期が377周期(54%)でホルモン補充周期が326周期(46%)であった。ホルモン補充周期ではエストラーナテープをd3より4枚固定で貼付し、内膜が8 mm以上かつ血中E₂が200 pg/mlを超えた段階で移植日を決定した。続いて移植決定日よりエストラーナテープの貼付、ウトロゲスタン1Tを投与し、移植翌日よりプロゲホルモンの投与を開始した。

血中ホルモン検査は、患者より全血採血後AIA-900(東ソー、東京)にてエンザイムイムノアッセイを行った。

胚融解は、液体窒素下でガラス化保存された胚をKITAZATO VT-102 ThawingMedia (KITAZATO, 静岡)を用いて施行、移植まで3時間前培養した後、胚のグレードを評価した。胚移植はKITAZATO ETカテーテルを用いて経陰超音波ガイド下に施行した。

移植日における血中ホルモン値と移植後の関連を調べるため、移植周期を移植不成功群、化学妊娠群、臨床妊娠群、生産群に分類し、各群における移植日血中ホルモン値の解析を行った。化学妊娠は移植後6日目以降で血中hCG値20.0 mIU/mL以上とした。

また、各ホルモン値の比が妊娠率にどのように影響するかを調べるため、E₂/P₄ ratioとして算出された因子をエクセル統計ソフト(SSRI, 東京)を用いてROC解析で検討した。

統計学的解析はt検定およびχ²検定にて行った。

本内容については、ヒトを対象とした研究に関する倫理指針に準拠し実施された。

結果

対象となる患者背景は表1に示す。融解胚移植を施行した患者の平均年齢は37.8 ± 4.5歳(28~48歳)であった。平均内膜厚は9.6 ± 2.6 mm(7.1~15.9 mm)であった。

凍結融解胚移植における移植日血中平均E₂値を不成功群、化学妊娠群、臨床妊娠群、生産群と比較したところ自然周期においてそれぞれの周期数は148周期、225周期、172周期、119周期でそれぞれ得られた値は171 pg/ml(25.1~1,331.1 pg/ml)、184 pg/ml(39.2~1,549.9 pg/ml)、187 pg/ml(39.2~1,549.9 pg/ml)、192 pg/ml(39.2~1,549.9 pg/ml)であった。また、同様にホルモン補充

表1 患者背景
(2014年1月から2015年12月)

周期数	703
(ov-BT,HR-BT)	(377, 326)
年齢(歳)	37.2 ± 4.1
平均内膜厚(mm)	9.9 ± 2.1

値はmean ± SD.

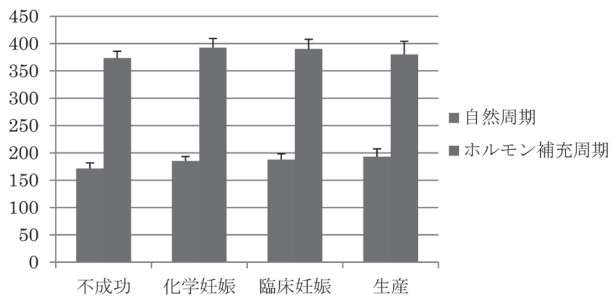


図1 血中E2値 (pg/ml)
各群にて有意差なし。

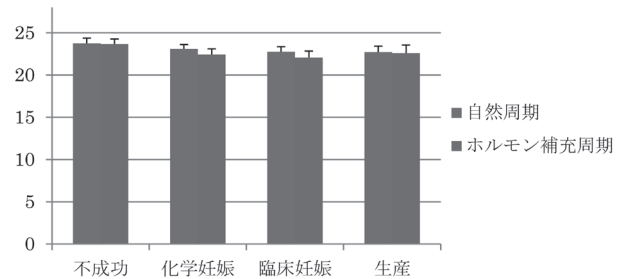


図2 血中P4値 (ng/ml)
各群にて有意差なし。

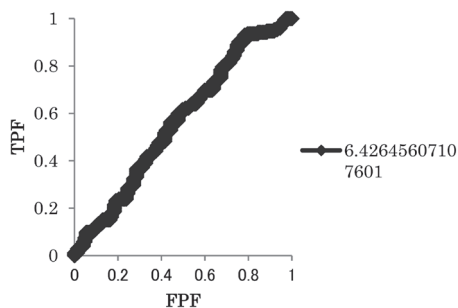


図3 ROC曲線 (自然周期)
TFP: TruePositiveFraction. FPF: FalsePositiveFraction.
AUC=0.566.

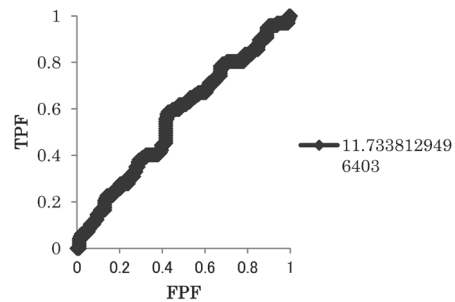


図4 ROC曲線 (ホルモン補充周期)
TFP: TruePositiveFraction. FPF: FalsePositiveFraction.
AUC=0.561.

周期での周期数は193周期, 127周期, 97周期, 54周期でそれぞれ得られた値は373 pg/ml (25.0~1,132.1 pg/ml), 392 pg/ml (25.0~1,120.1pg/ml), 390 pg/ml (25.0~1,091.5 pg/ml), 380 pg/ml (25.0~1,015.2 pg/ml)であった。また, 移植不成功群に対し化学妊娠群, 臨床妊娠群, 生産群における測定値をt検定にて比較検討したところ, 各群間に有意差はなかった(図1)。

同じく移植日血中平均P4値を不成功群, 化学妊娠群, 臨床妊娠群, 生産群で比較したところそれぞれ自然周期で23.7 ng/ml (8.95~40.0 ng/ml), 23.0 ng/ml (6.13~40.0 ng/ml), 22.7 ng/ml (6.13~40.0 ng/ml), 22.7 ng/ml (6.13~40.0 ng/ml)であった。同様にホルモン補充周期では23.6 ng/ml (6.86~40 ng/ml), 22.4 ng/ml (7.71~40.0 ng/ml), 22.0 ng/ml (7.71~40.0 ng/ml), 22.5 ng/ml (10.11~40.0 ng/ml)であった。移植不成功群に対し化学妊娠群, 臨床妊娠群, 生産群における測定値をt検定にて比較検討したところ, 各群間に有意差はなかった(図2)。

また, E2とP4の比をE2/P4 ratioとして算出し, 融解胚移植における臨床妊娠率との関係をROC解析で検討した。縦軸を真陽性率 (TPF), 横軸を偽陽性率 (TFP) とし

曲線下面積 (AUC) を算出したところ自然周期とホルモン補充周期にてそれぞれ0.566および0.561となった。さらに, 予後因子として臨床妊娠率のカットオフ値をROC曲線から決定したところ自然周期では7.14(オッズ比1.632)であり, 感度は0.442特異度は0.564となった(図3)。同様にホルモン補充周期ではカットオフ値は15.9(オッズ比1.912)であり, 感度は0.427, 特異度は0.588となった(図4)。

さらに, 算出されたE2/P4 ratio値において自然周期で7.14未満と7.14以上の群で臨床妊娠率を比較したところ51.3 vs. 40.3%となり, これをχ²検定にて比較検討したところ7.14以上の群で臨床妊娠率が有意に高い結果となった(図5)。ホルモン補充周期において15.9未満と15.9以上の群で臨床妊娠率を比較したところ36.7 vs. 23.3%となり, これをχ²検定にて比較検討したところ15.9以上の群で臨床妊娠率が有意に高い結果となった(図6)。

考 察

黄体期において, P4が必須であることは良く知られた事実である。しかし, 妊娠成立に適した黄体機能に対し

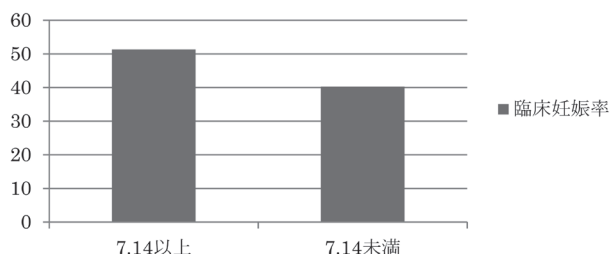


図5 E₂/P₄ ratio (自然周期)
各群にて有意差有り (P<0.05)

てE₂がどのような意義を有するのかはあまり注目されることはなかった。Goldstein²⁾がE₂/P₄比の意義を提唱し、以後E₂とP₄のバランスと妊娠成立について様々な研究がなされるようになった。

排卵後およそ96時間を要して黄体は完成するが、子宮内膜はこの間急激に増加するE₂およびP₄に曝露され、黄体完成と時を同じくしImplantation Windowを開窓する³⁾。この一過性の現象はE₂によってプライミングされた子宮内膜にP₄が作用して初めて出現するものであり、P₄が作用し始めてから約6日目に開窓し約10日目に閉窓すると言われている。ヒトにおける血中E₂は、着床準備期において内膜の炎症態勢の準備と考えられているがその発現ピークが着床ホルモンとして働いているかは未だ確認は得られていない。一方P₄については子宮内膜の脱落膜化に重要な作用があると言われている。

このように子宮内膜は卵巣性ステロイドホルモンと密接な関わりがあり、また移植反復不成功例患者に対しては胚受容能を至適調節することが非常に重要であるとされている⁴⁾。

胚移植とそれに伴う血中ホルモン値については諸家より様々な報告があるが、特に凍結融解胚移植を行うにあたりホルモンの至適補充量や血中量に関しては不明な点が多く十分なコンセンサスが得られていない。胚移植日における性ステロイドホルモンが臨床妊娠における予測因子になりえるかという観点でも、様々な施設にて検討が行われているが、その関連性についても未だ結論は出していないのが現状である⁵⁾。

今回の解析により移植日の血中ホルモン値としてE₂およびP₄の値を調べたところ、妊娠成立において明らかな差はないことが分かった。一方E₂/P₄ ratioにおいては自然周期で7.14未満、ホルモン補充周期で15.9未満で良好な妊娠成績が得られることが分かった。しかし、臨床

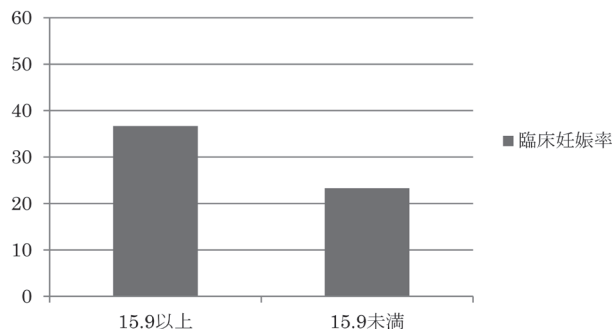


図6 E₂/P₄ ratio (ホルモン補充周期)
各群にて有意差有り (P<0.05)

妊娠の予測因子としては感度、特異度が低く測定精度が低いいため、診断能が低く他の因子と合わせて評価する必要があると考えられた。

今日のARTの現場では過排卵刺激による子宮内膜のImplantation Windowのずれによる着床能低下、OHSS回避などの目的で一度胚を凍結し次周期以降に凍結融解胚盤胞移植を行う方法が治療戦略の1つになっている。日本産科婦人科学会の集計によれば、ART妊娠例の約60.8%は融解胚移植によるものとなっている⁶⁾。移植時の内膜厚および移植胚のグレードが重要であることは間違いないが、それらの良好な条件を満たしても、満足できる結果が残せない症例も多数存在する。胚の着床部位である子宮内膜は様々な生理物質、特に性ステロイドホルモンの影響を受けており、これらの条件を無視することはできない。今回我々の結果より、胚移植における移植日血中ホルモンE₂とP₄のバランスが重要であり特にE₂とP₄値の比率が至適条件から外れることが妊娠率に影響することが示唆された。

一方では、その比率について測定の有意性を見出せないとする報告もある。これは着床に重要なimplantation windowはステロイドホルモンだけではなく種々のサイトカインや接着分子におけるautocrine/paracrineによって厳密にコントロールされており、血中ホルモン値だけでは妊娠予後を推測するには難しいという考えである⁷⁾。

1995年NikasらによってImplantation windowを形態的に示す子宮内膜上皮から突出する細胞質突起pinopodesが提唱された⁸⁾。ヒトpinopodesの出現はある程度の量と期間のエストロゲンによるプライミング、それに続くプロゲステロン分泌によって引き金が引かれる。すなわちE₂、P₄の分泌パターンにより制御されるという現象である。E₂/P₄ ratioの破綻はこのような子宮内膜上皮のダイナミックな変化を妨げ、生理学的に不十分な黄体期を

招き着床不成功を引き起こすと考えられている⁹⁾。また, Irmhildらの報告によるとE₂/P₄ ratioは胚と子宮内膜の相互作用だけではなく, 黄体活性の指標となることから胚移植成功の良い予測因子となるとしている¹⁰⁾。このように卵巣ステロイドホルモンと子宮内膜および移植胚の受容についての関係性が分子生物学レベルで少しずつ解明されてきているが, 上記のように臨床におけるそれら関係性においては一定の見解は得られていない。

今後は我々の施設においても年齢や既往など, 他の因子を考慮したうえで更なる詳細な検討が必要であると考えられる。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり, 当院の医師, 看護師, ラボスタッフの皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 鈴木秋悦: カラーアトラス 不妊診療のための卵子学. 東口篤司編, pp.89, 医歯薬出版株式会社, 2010
- 2) 田島朝信・河野哲郎・岩政 仁・本田賀裕・岡村 均・宮北隆志・越田光伸: 妊娠成立に適した黄体機能の指標としての黄体期中期progesterone/estradiol比. 日内分泌会誌, 65: 1278-1285, 1989.
- 3) 森 崇英: 図説ARTマニュアル 改訂第二版. 森 崇英・久保春海・岡村 均編, pp.147-148, 永井書店, 2006
- 4) Kariya, M., Kanzaki, H., Takakura, K., Imai, K., Okamoto, N., Emi, N., Kariya, Y., Mori, T.,: Interleukin-1 inhibits in vitro decidualization of human endometrial stromal cells. J.Clin. Endocrinol. Metab., 73: 1170-1174, 1991.
- 5) Wessam, M.A., Mourad, M.E., Tarek, F.T., Mohamed, I.E., Mahmoud, S. A.: Measurement of serum estradiol/progesterone ratio on the day of embryo transfer to predict clinical pregnancies in intracytoplasmic sperm injection (ICSI) cycles. Is this of real clinical value? Middle East Fertility Society Journal., 18: 31-37, 2013.
- 6) 平成26年度倫理委員会 登録・調査小委員会報告
- 7) Zhihong, N., Yun, F., Yijuan, S., Aijun, Z., Huiqin, Z.: Estrogen level monitoring in artificial frozen-thawed embryo transfer cycles using step-up regime without pituitary suppression: is it necessary? J. Exp. Clin. Assist. Reprod., 5; 4. 2008.
- 8) Nikas, G., Drakakis, P., Loutradis, D., Mara-Skoufari, C., Koumantakis, E., Michalas, S.: Uterine pinopodes as markers of the nidation window in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. Hum. Reprod., 10: 1208-1213, 1995.
- 9) Gore, B.Z., Caldwell, B.V., Speroff, L.: Estrogen-induced human luteolysis. J. Clin. Endocrinol. Metab., 36: 615-617. 1973.
- 10) Irmhild, G., Alexander, J., Monika, B., Alexander, L.: Serum estradiol/progesterone ratio on day of embryo transfer may predict reproductive outcome following controlled ovarian hyperstimulation and in vitro fertilization. J. Exp. Clin. Assist. Reprod., 4: 1. 2007.