

学 位 論 文 題 名

Bioactivity of human chorionic gonadotropin produced in frozen-thawed embryo transfer cycles with exogenous hormone replacement

(ホルモン補充周期凍結胚移植における
ヒト絨毛性ゴナドトロピンの生物学的活性についての検討)

学位論文内容の要旨

【目的】近年、ホルモン補充周期における凍結胚移植が凍結方法の改良により急速な発展をとげ、生殖補助医療の飛躍的進歩の一因となっている。いわゆる妊娠黄体の存在する自然妊娠とは異なり、ホルモン補充周期では内因性のゴナドトロピン (LH および FSH) を gonadotropin-releasing hormone (GnRH)アナログにて抑制し、外因性のエストロゲン+プロゲステロンを人工的に投与することで着床環境を整える。一方ヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin: hCG) は妊娠時トロホプラスト、あるいは胎状奇胎・絨毛癌などの絨毛性疾患から分泌されるホルモンである。hCG はタンパクおよび糖鎖の両方に構造上の多様性を持ち、妊娠経過にともないその isoform の比率、さらに bioactivity が連続的に変化することが知られており、この特性を利用して、妊娠の予後を判定しようとする試みもなされてきた。本研究ではホルモン補充周期凍結胚移植を施行した患者血清中の hCG bioactivity を測定するためにラット Leydig 細胞を用いたアッセイ系を確立し、hCG bioactivity と妊娠予後の関係について初めて解析を試みたのでここに報告する。【対象、材料と方法】不妊治療を目的に北海道大学病院不妊内分泌外来を受診した患者のうち、ホルモン補充周期で凍結胚移植を受け、血中 hCG 上昇にて妊娠成立を確認した患者 53 名を対象とした。vitrification 法により凍結された胚を融解し、子宮腔内に移植した後、D-23 以降血中 hCG 上昇をもって妊娠を判定し、インフォームドコンセントに基づき妊娠 4 週の時点での血清を採取した。コントロールとして、当科を受診し、自然妊娠が確認された患者 7 名より経時的 (妊娠 4 週-8 週) に血清を採取した。ホルモン補充の有無、妊娠の転帰により、妊娠周期を HRT(+)-NOR (ホルモン補充周期、妊娠継続; 29 周期)、HRT(+)-MIS (ホルモン補充周期、流産; 24 周期)、HRT(-)-NOR (自然周期、妊娠継続; 3 周期、13 ポイント、平均妊娠期間 6 週 1 日)、HRT(-)-MIS (自然周期、流産; 4 周期、12 ポイント、平均妊娠期間 5 週 4 日) の 4 群に分類した。イムノアッセイおよびバイオアッセイのスタンダードとして HCG モチダ[®] 3000 単位を使用した。患者血清中の immunoreactive hCG、血清中および培養液中のテストステロン値は化学発光酵素免疫測定法(IMMULYSE)により

測定した。hCG バイオアッセイであるが 10-12 週令のオス SD ラット精巣より Leydig cell enriched fraction を抽出し、hCG スタンダードあるいは患者血清の添加 24 時間後の培養液中テストステロン濃度を測定し、スタンダード曲線より bioactive-hCG を算出した。患者血清は immunoreactive hCG として EC₅₀ 付近の値である 0.3 mIU/mL となるよう添加された。hCG の bioactivity は bio/immuno (b/i) で表示した。エストラジオール(E₂)が hCG 産生におよぼす影響を解析するため、ヒト絨毛細胞を採取し、培養液中に E₂ を添加し、immunoreactive hCG および b/i を測定した。変数間の相関は回帰分析で求めた。測定値の有意差検定には t 検定を使用した。【結果】血清 E₂ レベルは HRT(+)-NOR で 227.8 ± 26.2 pg/mL、HRT(+)-MIS で 164.1 ± 20.6 pg/mL であり、両群間に有意差を認めなかった。Immunoreactive hCG は HRT(+)-NOR で 555.9 ± 133.4 mIU/mL、HRT(+)-MIS で 283.7 ± 63.8 mIU/mL と有意差を認めなかった(p=0.091)。b/i は HRT(+)-NOR で 0.64 ± 0.04、HRT(+)-MIS で 0.67 ± 0.03 であり、有意差を認めなかった (p=0.52)。さらに b/i と E₂ 値の相関を回帰分析を用いて検討した。b/i と E₂ 値は HRT(+)-NOR において r²=0.035、HRT(+)-MIS において r²=0.010 であり、p-値はそれぞれ 0.33 および 0.64 と、自然妊娠患者サンプルを用いた検討で従来指摘されているような負の相関を認めなかった。Bioactive hCG と血清 E₂ 値の相関を再検討するため、人工的にエストロゲンの投与が行われていない自然妊娠症例 7 例の検討を行った。HRT(-)-NOR での immunoreactive hCG は 80700 ± 23940 mIU/mL、HRT(-)-MIS では 6794 ± 4627 mIU/mL であり、HRT(-)-NOR で高い傾向があった (p= 0.078)。HRT(-)-NOR での E₂ 値は 594.1 ± 121.9 pg/mL、HRT(-)-MIS では 260.1 ± 90.9 pg/mL であり、HRT(-)-MIS で有意に低値を示した (p= 0.041)。また、HRT(-)-NOR での b/i は 0.35 ± 0.052、HRT(-)-MIS では 0.65 ± 0.12 と、HRT(-)-MIS で有意に高値であった (p= 0.031)。回帰分析を行ったが、b/i と血清 E₂ 値の間に有意な相関を認めなかった。b/i と妊娠週数の間にも有意な相関は認めなかった。さらに、絨毛細胞を用いて、*in vitro* での E₂ の hCG 産生能に対する影響を検討した。E₂ は 100 ng/ml の非生理的高濃度において絨毛細胞における hCG 産生量を増加させたが(p=0.014)、絨毛細胞が産生する hCG の b/i は E₂ 添加による影響を受けなかった。【結論】ホルモン補充下凍結胚移植周期の妊娠 4 週時の血清を用いてその bioactivity から妊娠の予後を予測する試みを行った。今回の検討においては血清 E₂、immunoreactive hCG、b/i の各項目に関し、妊娠継続群と流産群との間に有意差を認めなかった。さらに、血清中 E₂ 値と b/i の回帰分析でも、両項目間に有意な相関を認めなかった。これらの結果がホルモン補充周期による影響なのかを確認するため、自然妊娠症例に関し同様の検討を行った。血清中 E₂ 値は妊娠継続群で有意に高値であり、b/i は流産群で有意に高値であった。そのため、E₂ 値と b/i の回帰分析を行ったが、明らかな相関関係は認めなかった。hCG の bioactivity は E₂ のレベルによって直接制御されるのかを確認するため、絨毛細胞に対するエストロゲン添加実験を行った。E₂ は hCG の immunoreactivity をわずかに上昇させたが、その bioactivity は変化させなかった。【結語】ラット Leydig 細胞のバイオアッセイ系を用いて、ホルモン補充周期凍結胚移植における、妊娠初期の hCG の characterization および妊娠の予後を推測する試みを初めて行った。自然妊娠症例では b/i を用いて妊娠予後の推測が可能であったが、ホルモン補充下凍結胚移植周期では、予測は

困難と思われた。E₂が hCG の bioactivity に対し絨毛細胞に直接作用するのではなく、何らかの因子が介在することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 上 尚 典
副 査 教 授 笠 原 正 典
副 査 教 授 三 輪 聡 一
副 査 教 授 櫻 木 範 明

学位論文題名

Bioactivity of human chorionic gonadotropin produced in frozen-thawed embryo transfer cycles with exogenous hormone replacement

(ホルモン補充周期凍結胚移植における
ヒト絨毛性ゴナドトロピンの生物学的活性についての検討)

妊娠予後（流産/妊娠継続）早期判定は体外受精・胚移植法においては強く求められている。申請者は妊娠予後判定が従来の方法では困難な妊娠早期の血清を用いてホルモン補充周期凍結胚移植後妊娠における hCG 生物活性が妊娠予後を予測するか否かを検討した。申請者はラット Leydig 細胞が hCG 刺激によりプロゲステロン産生・分泌することを利用した hCG 生物活性測定系を用いて hCG 生物活性を測定した。ホルモン補充下凍結胚移植周期の妊娠 4 週時の血清中 hCG 生物活性、hCG 免疫活性、ならびにエストラジオール値は、はいずれも、妊娠継続群 (n=29) と流産群 (n=24) の 2 群間に有意差を認めなかった。さらに、血清中エストラジオール値と hCG 生物活性の回帰分析でも、両者間に有意な相関を認めなかった。これらの結果がホルモン補充周期凍結胚移植妊娠の特徴であるのかを検討するため、自然妊娠症例に対して同様の検討を行った。自然妊娠症例では血清中エストラジオール値は妊娠継続群 (n=13) では流産群 (n=12) に比し有意に高値であった。また hCG 生物活性は流産群で妊娠継続群に比し有意に高値であった。自然妊娠群においてもエストラジオール値と hCG 生物活性の両者間には明らかな相関は認められなかった。本研究においては自然妊娠、ホルモン補充周期凍結胚移植妊娠いずれにおいてもエストラジオール値と hCG 生物活性の両者間に相関関係が認められなかったが既報告ではエストラジオールが hCG 生物活性を直接的に調節している可能性を示唆していたため、この点について *in vitro* 実験を行い検討した。培養絨毛細胞にエストラジオールを添加し hCG の免疫活性ならびに生物活性の変化を検討した。添加エストラジオールは hCG 免疫活性をわずかに上昇させたが、hCG 生物活性に影響を与えなかった。

自然成立妊娠においては妊娠黄体が形成され、妊娠黄体より分泌されるエストロゲンやプロゲステロンが妊娠維持に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、ホルモン補充周期凍結胚移植妊娠においては妊娠黄体は形成されず、エストロゲンとプロゲステロンは外因性に補充されている。このようにホルモン補充周期凍結胚移植妊娠と自然成立妊娠での両者間の決定的な違いは妊娠黄体存在の有無である。自然妊娠症例では hCG 生物活性が妊娠予後を予測したが、ホルモン補充下凍結胚移植周期での hCG 生物活性はそれを予測しなかったこと、またエストラジオールは hCG 生物活性に直接的には影響を与えなかったという結果は妊娠黄体から分泌されるエストラジオール以外の物質が hCG 生物活性を調節している可能性を強く示唆した。

発表終了後笠原教授から、ホルモン補充周期凍結胚移植妊娠において hCG 生物活性は、妊娠黄体の存在する自然妊娠とは異なり妊娠継続群と流産群とで差がないそのメカニズムについての、また自然周期群での採血の時期がホルモン補充周期凍結胚移植妊娠での採血時期と異なっていることの結果への影響に関する質問があった。次いで、三輪教授から、hCG アイソフォームと抗体認識部位との関係や異なるアッセイ系での抗体の hCG アイソフォームに対する親和性についての質問があった。また、櫻木教授から、不妊治療における妊娠予後を早期に予測する意義についての質問があった。最後に、水ト教授から、妊娠黄体より産生・分泌される hCG の生物活性を調節する可能性を持つ具体的物質名について、またホルモン補充周期凍結胚移植妊娠において hCG 生物活性と妊娠週数との関連についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自身の研究結果や文献を引用し、おおむね妥当な回答をした。

本論文は、絨毛より産生される hCG の生物活性を調節する物質がエストロゲンとは異なること、さらにその物質が妊娠黄体から分泌されている可能性を強く示唆した。これは妊娠黄体の絨毛細胞への影響を検討する上での重要な知見と考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。