

ISSN 1881-9028

日本IVF学会雑誌

Vol.18 No.1

2015

JSAR

Japan Society of Assisted Reproduction



論 文

— 総説 —

日本の生殖医療を考える 2
 吉村 泰典
 吉村やすのり生命の環境研究所

— 総説 —

早発卵巣不全や不妊治療終了後のヘルスケア
 — 生殖医療から女性医療へのシームレスな移行を志向して — 8
 高松 潔
 東京歯科大学市川総合病院産婦人科

— 総説 —

レーザー光が働きかける細胞機能 16
 櫛引 俊宏
 防衛医科大学校医用工学講座

— 原著 —

ARTにおけるホルモン補充はどうあるべきか? 24
 東口 篤司
 KKR 札幌医療センター斗南病院

— 原著 —

提供卵子を用いた ART, 当院の現状と問題点 29
 塩谷 雅英, 松本 由紀子, 岡本 恵理, 水澤 友利, 滝口 修司, 伊原 由幸, 城 綾乃, 江夏 宜シエン,
 十倉 陽子, 安 昌恵, 緒方 誠司, 山田 聡, 片山 和明, 野田 洋一, 苔口 昭次
 英ウイメンズクリニック

— 原著 —

胚の経時的解析を加味した初期胚の分類法と臨床妊娠率の相関 34
 末永 めぐみ, 篠原 真理子, 江口 明子, 川崎 裕美, 松下 富士代, 山口 弓穂, 伊藤 正信, 松田 和洋
 松田ウイメンズクリニック

第 18 回 日本 IVF 学会学術集会 開催概要 41

日本 IVF 学会雑誌発行における投稿論文募集のお知らせ 42

日本 IVF 学会雑誌 投稿規定 43

日本 IVF 学会会則 44

日本 IVF 学会役員 47

編集委員会 48

日本の生殖医療を考える

吉村 泰典

内閣官房参与, 慶應義塾大学 名誉教授

吉村やすのり生命の環境研究所 〒102-0093 東京都千代田区平河町 1-5-15-903

要旨: 近年の生殖医療の進歩は瞠目に値する。わが国において、体外受精関連技術により年間約3.8万人が出生しており、総出生児数に占める割合も27人に1人の時代になってきている。晩婚化とも相まって、今後生殖補助医療によって誕生する子どもは益々増えることが予想される。また近年のがん患者に対する治療法の進歩に伴う治療成績の向上により、生存率の改善がみられるようになってきており、新たな手術術式の開発や卵子・卵巣の凍結保存による妊孕性温存技術も臨床応用されるようになり、oncofertilityの概念を確立しつつある。このような生殖医学の発展は、実は発生生物学や生殖内分泌学の進歩に負うところが大きい。しかし、一方ではこの技術は新たな医学的、社会的、倫理的、法律的な問題を提起し、生命の起源に対する考え方、家族観や社会観を大きく変える医療として捉えられるようになってきている。

キーワード: 生殖補助医療, 妊孕性温存, 子宮移植, 再生医学

近年の生殖医療の進歩にはめざましいものがあり、生殖現象の解明のみならず、ヒトの生殖現象を操作する新しい技術も開発されている。これまで、生殖補助医療 (assisted reproductive technology; ART) は受精・着床といった生命現象の分化のメカニズムの解明を待つことなく、臨床現場の不妊症に悩む夫婦からの切実な訴えに支えられることによって、実験的医療とも考えられる数々の試みが実施されてきた¹⁾。現在のARTの中核を担う体外受精・胚移植法や顕微授精法も、この過程から誕生してきたといえる。21世紀に入り、ますます先端生殖工学技術は進歩を続けている。とりわけ体細胞クローン技術、胚性幹細胞やiPS細胞の再生医療への応用は、今後の生殖医療の展開にブレークスルーをもたらすかもしれない。

本稿では、わが国における生殖医療の現況と問題点、さらには将来の展望について概説する。

治療周期が多く、出生児数も凍結胚による妊娠が最も多く、出生児の3分の2以上を占めていることが特徴である(図1)²⁾。2012年には約3.8万人の子どもがIVF-ET関連技術で出生にいたっており、総出生児数に占める割合は、1999年より100人に1人の時代に突入し、現在では3.66%と27人に1人の割合でARTにより子どもが生まれている(表2)。

凍結胚の移植あたりの妊娠率は33.7%と、欧米に比して極めて高値を示しているが、IVF-ETやICSIの採卵あたりの妊娠率はそれぞれ8.6%、7.3%と低値であり、治療周期あたりの妊娠率は数年前に比較し却って低下している。現在移植あたりの妊娠率は20%以上を示しているが、生産率は14%前後と低値である。この原因は、高齢者が多いこと、低刺激法導入による一周期あたりの採卵数の減少、凍結胚移植周期の増加などが考えられる。

わが国における生殖補助医療の現況

日本産科婦人科学会の報告によれば、2012年現在治療周期総数は326,426周期であり、世界で最も多く体外受精・胚移植 (*in vitro* Fertilization and embryo transfer; IVF-ET) を初めとするARTが実施されている(表1)。治療周期の半数以上で顕微授精 (intracytoplasmic sperm injection; ICSI) が実施されている欧米に比し、わが国においてはその割合が低い。一方凍結胚を用いた

表1 治療法別出生児数および累積出生児数(2012年)

	治療周期総数	出生児数	累積出生児数
新鮮胚(卵)を用いた治療	82,108	4,740	110,764
凍結胚(卵)を用いた治療*	119,089	27,715	145,451
顕微授精を用いた治療	125,229	5,498	85,535
合計	326,426	37,953	341,750

*凍結融解胚を用いた治療成績と凍結融解未受精卵を用いた治療成績の合計
(日本産科婦人科学会)

受付 2014年10月15日/受理 2014年10月22日

責任著者: 吉村 泰典 e-mail [yasu@a5.keio.jp]

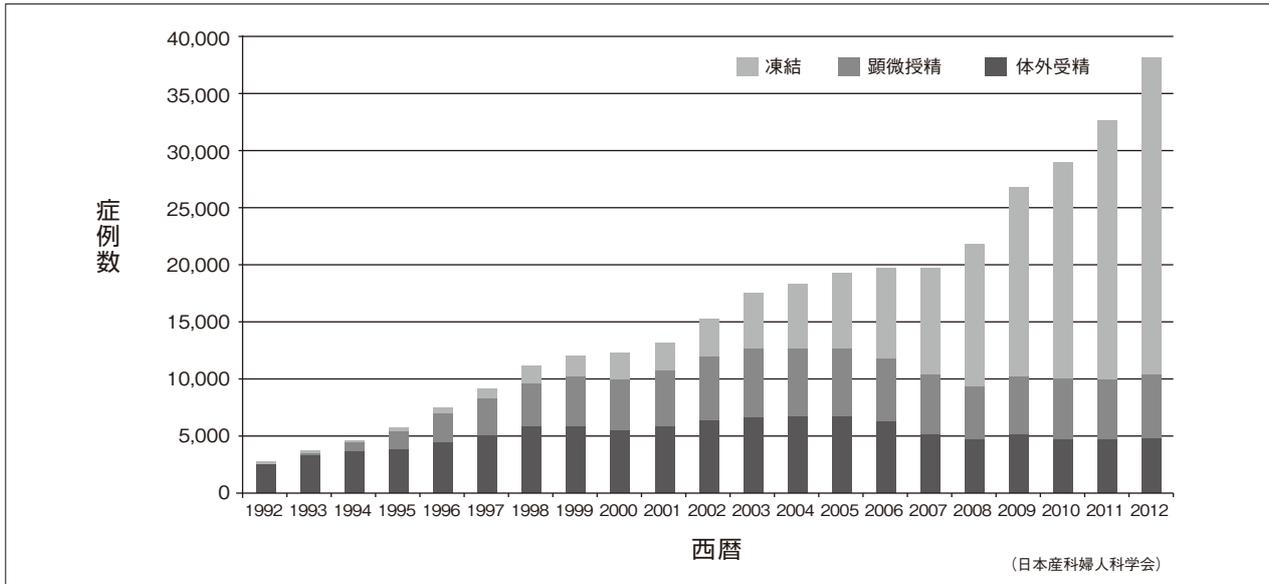


図1 生殖補助医療による出生児数

表2 総出生児数に対するART出生児の占める割合

西暦	ART出生児数	総出生児数	(%)
94	4,576	1,238,328	0.40
95	5,687	1,187,064	0.48
96	7,410	1,206,555	0.61
97	9,211	1,191,665	0.77
98	11,119	1,203,147	0.92
99	11,929	1,177,669	1.01
00	12,274	1,190,547	1.03
01	13,158	1,170,662	1.12
02	15,223	1,153,855	1.32
03	17,400	1,123,610	1.55
04	18,168	1,110,721	1.64
05	19,112	1,062,530	1.80
06	19,587	1,092,674	1.79
07	19,595	1,089,818	1.80
08	21,704	1,091,156	1.99
09	26,680	1,070,035	2.49
10	28,945	1,071,304	2.70
11	32,426	1,050,806	3.09
12	37,953	1,037,231	3.66
累積出生児数	341,750		

また妊娠あたりの流産率は、いずれの治療であっても25%前後と高率にみられ、依然として通常妊娠の2倍前後を占めている。

多胎の出産率の年代別推移を検討すると、1996年の日本産科婦人科学会の会告により移植胚数を3個までと制限して以来、3胎以上の超多胎の出産率は低下してきたが、双胎の頻度は低下せず、ARTの技術の向上によりむしろ実数は増加していた。そのため、2008

年4月に世界に先駆けて「ARTの胚移植において、移植する胚は原則として単一とする。ただし、35歳以上の女性、または2回以上続けて妊娠不成立であった女性などについては、2胚移植を許容する。治療を受ける夫婦に対しては、移植しない胚を後の治療周期で利用するために凍結保存する技術のあることを、必ず提示しなければならない」との見解を出した。この見解の周知徹底以降、双胎を含めた多胎率は減少し、2012年の多胎妊娠

表3 ARTにおける多胎率の比較

	新鮮胚		凍結胚	
	双胎	三胎	双胎	三胎
日本 (2012) ¹⁾	3.83%	0.03%	3.88%	0.07%
ESHRE (2006) ²⁾	19.9%	0.9%	13.4%	0.4%

1) 日本産科婦人科学会, 2014.
2) Hum. Reprod., 25 : 1851-1862, 2010.

率はIVF-ETで3.9%, ICSIで4.1%, 凍結融解胚を用いた治療で4.0%まで低下している。

わが国においては、世界に先駆けて多胎妊娠を防止するために移植胚数の制限に積極的に取り組んできた。わが国の凍結技術の進歩、生殖医療従事者の努力もあり、近年多胎率が急激に減少しているのは世界に誇るべき進歩である。現在、わが国の多胎妊娠率は4%前後であり、20%を超える欧米に比して極めて低率であることは注目に値する(表3)³⁾。このように、国のガイドラインや法律を持たないわが国の生殖医療において、日本産科婦人科学会の会告の果たしてきた役割は至大なるものがある。

生まれた子どもの長期予後

ARTで生まれた子どもの成育実態については欧米では大規模調査が行われているが、わが国においては生後発育に関する学術調査はほとんど実施されていない。これまで日本産科婦人科学会でやってきた調査はARTの実施概要に関するものであり、生まれた子どもの長期予後については調査されていないのが現状であった。わが国では、2005年に日本受精着床学会においてARTの安全性を検証する目的で、5歳児を対象として身体発育、精神発達ならびに先天異常などの実態調査が実施されている。これらは1997年にARTで生まれた809児の中規模調査ではあった。比較的長期にわたり追跡調査ができていた点で意義深いものであった。

生殖医療において忘れてはならないことは、クライエントが希望し、医療者が施術を提供できれば医療行為は成立するが、生殖医療においては他の医療とまったく異なり、新しい生命の誕生があることである。たとえ自己決定に基づく生殖医療であっても、生まれてくる子どもの同意を得ることはできないことを、先ずもってクライエントも医療提供者も十分に認識しておく必要がある。また最近になり、着床前遺伝子診断や配偶子提供さらには代理懐胎など、ARTによる新しい医療への臨床応用が試みられるようになり、これらは胎児の選別、親子や家族という社会の枠組みを改変させるかもしれない問

題を提起するようになってきている。

生殖医療に携わるものにとって、ARTにより出生する児の長期予後を知ることは極めて大切である。子どもは医療行為がなされる時点では現存せず、問題が顕在化する時の状況は全く予想できないため、厳密な意味での事前のリスク評価は困難であるからである。これまでの臨床成績においては、IVF-ETやICSIを施行してはいけないというリスクは認められていない。しかしながら、生殖細胞の人為的操作の影響が次世代以降に継続する可能性があることを常に認識しておくことが大切である。

現在、わが国のARTに求められる最も重要な課題は、児と家族の長期追跡体制を確立することである。これまでの報告はARTの技術統計といわれるものであり、ARTを受ける患者情報や生まれている子のデータが集積されていないことが問題であった。そのため日本産科婦人科学会は2007年より子どもデータも含めたオンライン登録を開始している。これにより、ARTで出生した児の健康状態を知ることができ、長期予後を調査するうえでも基本となる重要なシステムである。欧米に比較し、わが国においてはこれまでARTに関する正確な情報が得られていなかったことが最大の問題点であり、こうしたシステムを利用した子どもの長期フォローが大切となる。

平成22年より著者が厚生労働科学研究の研究代表者となり、生殖補助医療によって生まれた児の長期予後調査が開始されている。この研究はART出生児3000人を対象として、身体発育のみならず、精神発達の追跡調査を15年間にわたって検証するものである。これらの情報収集のためには、生殖医療関係者の理解と協力が不可欠である。ARTで生まれた子どもの長期予後を検証することは、生殖医療に携わる者の最低限の責務であることを忘れてはならない。

卵子や卵巣の凍結

近年の未受精卵子と卵巣を凍結する技術の急速な進歩と、それが実際に医療現場で使われている状況を踏まえ、日本生殖医学会は、2013年9月に卵子凍結に関する2つの指針案を示した。この技術の安全性を十分に確保し、希望する女性に正確な理解を促すためのものである。

指針案の第一は医学的な理由によるものである。がん治療成績の向上で、治療後に妊娠・出産を望めるケースも出てきている。そこで放射線や抗がん剤治療で卵巣機能が低下する恐れがある女性に、治療前に未受精卵子を採卵し凍結する。医療現場で既に行われ、最近では卵巣

組織の凍結も実施されており、oncofertilityの概念も定着してきている。注意することは、卵子や卵巣の凍結のためにがん治療の開始が遅れないことと、凍結した卵巣をがん治療後に体内に戻す場合にがん細胞が混入しないようにすることである。実施に際しては十分な説明と同意が肝要である。

指針案の第二は、社会的な理由によるものである。健康な未婚の成人女性が将来の出産に備えるためのものである。卵子の質は年齢とともに低下し、個人差はあるものの35歳を超えた頃から妊娠しづらくなる。晩婚化で妊娠・出産が遅れ、ARTを繰り返しても妊娠に至らない女性が増えている。この事態を避けるため、海外では若いうちに未受精卵を凍結する試みが始まりつつある。実施にあたっては、クライアントに対し凍結卵子を使ったIVF-ETでの妊娠率や出産率が低いことを十分に説明する必要がある。

指針案では卵子の質の低下を考慮し、卵子や卵巣を採取する時期は40歳以上は推奨できないこととしている。また凍結した未受精卵や、凍結した未受精卵や卵巣を使った受精卵を体内に戻す時期については、45歳以上は推奨できないとしている。高齢になってからの妊娠や出産はリスクが高まるためである。このような指針案を作成すると、若い女性が20歳代のうちに卵子を凍結しておけば心配ないと考えたり、若いうちの凍結を勧める人が出てきたりすることも懸念された。しかしながら、高齢出産に伴う妊娠合併症などさまざまなリスクを考えると、クライアントは妊娠・出産には適切な年齢があることを認識すべきである。指針案は、未受精卵や卵巣組織の凍結・保存、妊娠・出産時期の先送りを推奨するものではなく、実態が不明なまま無秩序に実施されているかも知れない卵子の凍結に、警鐘を鳴らすためのものだという事を銘記すべきである。

妊娠や出産をするかしないか、その時期をいつにするかは当事者の選択に委ねられている。しかしながら、女性は25～35歳の間に自然妊娠・出産することが生物学的に最も適していることを忘れてはならない。女性が出産や育児を経験しながら仕事を続けられるような社会にすることが優先課題であることは、言うまでもないことである。高齢になってから妊娠するために卵子を凍結保存する技術は、何らかの事情で適切な時期に妊娠や出産をどうしてもできない人のための、特別な手段と考えるべきである。

卵子や卵巣の凍結操作が原疾患の予後に及ぼす影響、保存された卵子により将来被実施者が妊娠する可能性、妊娠した場合の安全性などいまだ明らかでないことも多いため、被実施者に十分な情報提供を行い、被実施者

自身が自己決定することが重要である。凍結後の卵子の使用の際には、IVF-ETや顕微授精(ICSI)を実施することを前提としているが、通常のARTとは異なる医学的、倫理的、社会的な問題を包含しているため、その対象や卵子の保存や使用については注意を要する。そのため日本産科婦人科学会は、2014年に医学的適応による未受精卵および卵巣組織の採取・凍結・保存に関する見解を示している。

子宮頸がんの治療と妊孕性温存

若年者の子宮頸がんの増加、晩婚化により、妊孕性温存手術を希望する早期子宮頸がん患者が年々増加している。妊孕性温存手術として従来からの円錐切除に加え、若年で将来妊娠を希望する女性がIa2期やIb1期の一部の子宮頸部微小浸潤がん罹患した時に、子宮頸部だけを完全に切除して子宮体部を温存する広汎性子宮頸部摘出術が妊孕性温存治療として試みられ、わが国でも急速に普及しつつある。慶應義塾大学病院では、腹式に骨盤内リンパ節郭清、広汎性子宮全摘術に準じた基韧带処理、子宮動脈本幹を温存して子宮頸部切除、予防的頸管(実際は体下部)縫縮術を行っている。

この治療は縮小手術であるため、標準治療に比較してどうしても追加治療や再発リスクが高くなる。また術後の不妊や妊娠した場合にも早産となるリスク増加が懸念される。術後の妊娠に関しては、ARTが必要となる場合が多く、術後の再発のフォローアップとともに生殖医療の専門医による治療が必要となる。また妊娠後には、頸管短縮による絨毛膜羊膜炎による切迫早産や前前期破水などの妊娠合併症がおこることが多い。

当院での広汎性子宮頸部摘出後の妊娠は40症例で、51妊娠が報告されている。以前は自然妊娠や人工授精による方法が試みられていたが、妊娠するまでの不妊期間が長くなることから、現在では挙児希望のあるカップルにはARTが実施されている(表4)。妊娠率は通常の症例と同程度であるが、妊娠例における早産が問題となり、

表4 広汎性子宮頸部摘出術の妊娠

	妊娠例(40例 51妊娠)	
	症例数	
NI	14	27%
IUI	2	4%
IVF-ET	35	69%

- ✓ NI : natural insemination
- ✓ IUI : intrauterine insemination
- ✓ IVF-ET : in vitro fertilization and embryo transfer

(慶應義塾大学病院)

約半数の症例が32週以前の分娩となっている。特にARTによる妊娠群では、自然妊娠に比べ前前期破水による早産が多くなる傾向がみられている。広汎性子宮頸部摘出術はがんの根治性と妊孕性温存のバランスの上に成立する術式であり、腫瘍・生殖・周産期のすべての領域が深く関与しており、総合的診療が必要となる。

子宮移植に関する臨床研究

先天的に子宮がない女性や、子宮頸がんなどの疾患による子宮摘出した女性に対し、代理懐胎に代わる新たな選択肢として子宮移植という新たな生殖技術が考えられるようになってきている。子宮移植はドナーからの子宮の提供を受け、子宮の移植をうけるレシピエントに妊娠や出産を可能にさせるための技術である。その概要は、まず夫婦の受精卵を事前に凍結保存しておき、レシピエントにドナーの子宮を移植する。この際、卵巣は移植しない。次に移植子宮がレシピエントに生着したのを確認し、1年間かけて拒絶反応の確認や免疫抑制剤を減量する。その後凍結胚を移植し、妊娠および出産を目指す。出産後は移植子宮を摘出することになるので、レシピエントは出産後の免疫抑制剤の服用は不要となる。

2014年スウェーデンにおいて、26歳の女性が子宮移植後1年で胚移植を受け、妊娠し、健康な男児を出産している。しかしながら、子宮移植の臨床応用にあたっては、検討を要するさまざまな医学的、倫理的、社会的な問題点があげられる。その中でも特にレシピエント、ドナー、生まれてくる子に与える負担やリスクは最大限配慮されなければならない課題である。手術手技の困難性、組織適合性、妊娠中に使用する免疫抑制剤の胎児への影響など、医学的にも解決されなければならない問題が多い。またさまざまな領域に跨る医療であり、幅広い職種で構成されたチーム医療体制が必要とされる。産婦人科医や移植外科医のみならず、形成外科医、精神外科医、小児科医、内科医、麻酔科医、移植コーディネーター、看護師、薬剤師、カウンセラーなどのサポート体制の基盤が構築された上で考慮されるべき医療である。

生殖医療への再生医学の応用

再生医学の生殖医療への応用を考えた場合、無精子症や早発月経のような絶対不妊などの生殖機能障害を持つ個人から、ヒト胚性幹細胞(ヒトES細胞)、iPS細胞(induced Pluripotent Stem cell)を樹立し、配偶子へ分化させることが可能となれば、精子や卵子の提供を受けることなく、子どもを持てる時代が到来するかもしれな

い。わが国においてもES細胞、iPS細胞から配偶子を作製する研究が許可されているが、その際、現在のところ作製された配偶子を利用して受精卵の作製をしてはならないとされている。英国やシンガポールではiPS細胞より分化させた配偶子を用いて受精卵を作製する研究が許可されているが、他の国では禁止されている。生殖医学に携わる研究者にとっては、受精をさせた後の胚として正常発育を観察できなければ、配偶子とみなすことはできないとし、受精後の胚を体内に移植することを禁止すればよいとの考えもある。しかしながら、社会のコンセンサスを得るためには、ヒトES細胞やiPS細胞の研究においてはまず配偶子作製が試みられるべきであろう。このような生殖細胞の分化についてはヒトES細胞においても同様に考えられるべきである。

ヒトiPS細胞の樹立は、ヒト胚の破損を伴わないという点においてヒトES細胞に付随する倫理的課題を回避しているが、その一方で新たな課題も提起されている。例えば、ヒトiPS細胞の作製と生殖細胞への分化誘導は、免疫拒絶が起こらず、同一人物や同性に由来する配偶子を用いて受精させることが可能である点は利点であるが、自然界では起こりえない胚の作製により子どもが誕生する可能性があることも考慮しておかなければならない。また、iPS細胞は毛根や血液といった微量の細胞ソースからでも樹立可能であることから、ヒト細胞に対する厳重な管理と、取り扱う科学者の研究に対する倫理認識を新たにする必要がある。ヒトiPS細胞の医療への応用は重要課題であるが、その前に乗り越えなければならないハードルはいくつもある。

これらES細胞やiPS細胞を用いて行う研究は、遺伝的要因を持つ不妊病因の解明や染色体異常の機構解明、加齢に伴う卵形成異常などの病態解明に必ずや役立つものと考えられている。またiPS細胞より卵子や精子を作製することができれば、受精や胚盤胞形成そして着床に至る胚発生まで、これまでヒト材料を対象とすることができなかった領域に分子遺伝的アプローチが適用可能になり、生殖医療のみならず胚発生のメカニズム解明といった新たな基礎医学領域の発展につながることも期待される。しかしながら、iPS細胞についても樹立、研究への利用、臨床応用などの段階でいくつもの倫理的、法的、社会的課題があることを忘れてはならない。

おわりに

近年の生殖医療の進歩は瞠目に値する。これまでARTは、受精・着床といった生命現象の分子メカニズムの解明を待つことなく、臨床現場の不妊症に悩む夫婦

からの切実な訴えに支えられることによって、実験的医療とも考えられる数々の試みが実施されてきた。現在のARTの中核を担う体外受精胚移植法も、この過程から生まれてきたといえる。今後もART技術はさまざまな領域に応用され、新たな局面が展開されるであろう。しかしながら、生殖医療は特に他の臓器再生医療とは異なり、世代の継承に関与しており、その治療結果が個体にとどまらず人類に継承されていくという特殊性をもっていることを忘れてはならない。

参考文献

- 1) 吉村泰典：生殖医療の未来学－生まれてくる子どものために－，診断と治療社，2010。
- 2) 日本産科婦人科学会：平成 25 年度倫理委員会登録・調査小委員会報告。日産婦誌，66:2445-2481，2014。
- 3) Assisted reproductive technology in Europe, 2006: results generated from European register by ESHRE. Hum. Reprod., 25: 1851-1862, 2012.

早発卵巣不全や不妊治療終了後のヘルスケア — 生殖医療から女性医療へのシームレスな移行を志向して —

高松 潔

東京歯科大学市川総合病院産婦人科 〒272-8513 千葉県市川市菅野 5-11-13

要旨： 日本人女性は世界一の長寿を誇っており、生殖医療終了後も長い人生があるが、この時期を華麗に過ごすためには、一生にわたるQOLの維持・向上を考慮する女性医学を意識した生殖医療の実践が重要である。生殖医療は閉経年齢に影響を与える可能性が報告されており、また、不妊の背景因子の中には不妊のみならず、将来の心身へ影響を及ぼす病態・疾患が存在する。一方、閉経後のヘルスケアにはホルモン補充療法(HRT)が有用である。乳癌などの悪性腫瘍リスクが不安視された時期もあったが、現在では一定の条件を遵守すれば少なくともリスクの上昇はないことにコンセンサスが得られている。日本でもガイドラインが策定されており、安全・安心かつ有効に施行できる環境にある。

いわゆる女性医学に携わる者のみならず生殖医療担当者においても、患者の一生におけるヘルスケアの重要性を認識し、早期から正確な情報提供と的確なアドバイスをすることが望まれる。

キーワード： 女性医学, 閉経, トータルヘルスケア, エストロゲン, ホルモン補充療法(HRT)

1. はじめに

— 女性医療を意識した生殖医療の重要性

不妊治療を終了することは患者にとって大きな決断である。しかし、実際にはタイミング法、人工授精、体外受精-胚移植(IVF-ET)それぞれ仮に40%の妊娠率としてステップアップしたとしても、最終的に約20%は妊娠に至らないことになる。また、不妊治療時は近視眼的になりがちである。図1^{1,2)}に示すとおり、日本人女性の寿命は基本的に右肩あがりであり、この150年間ではほぼ倍になったといわれている。平成25年簡易生命表によれば平均寿命は86.61歳と世界一の長寿を誇っているが、一方、閉経年齢の中央値は50.54歳であり、現代の日本人女性は人生の三分の一以上を閉経後として過ごす。150年前には拳児が得られなければ、寿命を迎えていたわけであるが、ライフステージの状況が大きく変化しており、閉経は人生の折り返し地点に過ぎない。つまり、現代では不妊治療により拳児が得られようともそうでなくとも、その後には約40年の人生があるわけであるが、一方で、その間を、高い生活の質(QOL)を維持して、いかに華麗に生きるためにどうすればよいかということに思い至っている者は、患者はもちろん医療サイドにも多くはないと思われる。

この意味で、女性の一生のQOLの維持・上昇を志向する学問体系が女性医学である。日本産科婦人科学会産

科婦人科用語集・用語解説集によれば、女性医学とは「産婦人科の専門領域のひとつで、QOLの維持・向上のために、女性に特有な心身にまつわる疾患を主として予防医学の観点から取り扱うことを目的とする」と定義されている³⁾。近年、産婦人科学の第4の柱として認知されるようになってきたが、実際には周産期医学、生殖・内分泌学、婦人科腫瘍学のベース、あるいはそれらの間を埋めるマトリックスのようなものであるとも考えられており、これら3分野においても将来のQOLまで視野に入れた対応が望まれている。

そこで本稿では、不妊治療終了後の一生にわたるトータルヘルスケアに対して生殖医療担当者が考えるべきことと知っておくべきこととして、生殖医療が閉経やその後の心身の状態に与える影響と生殖医療から女性医療へのシームレスな移行をどうするかについてまとめてみたい。

2. 生殖医療が閉経や その後の心身の状態に与える影響

生殖医療がその後の女性の心身に与える影響については2つが考えられる。一つはこれまでの治療、つまり卵巣刺激や体外受精時の採卵などが卵巣予備能や閉経年齢に影響するかどうかという問題であり、もう1点は不妊であったこと、あるいは不妊となる要因を持っていることが将来の心身に及ぼす影響である。

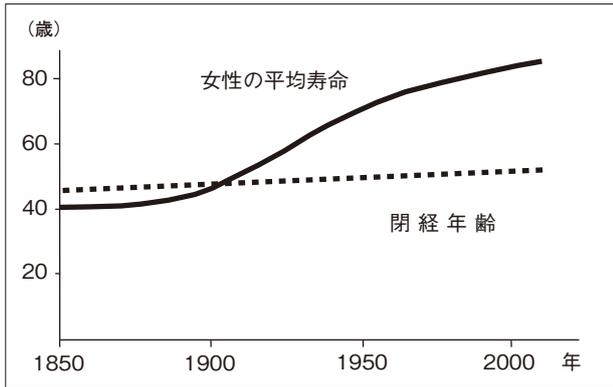


図1 女性の平均寿命と閉経年齢の推移 (文献1を改変した文献2の図から作成)

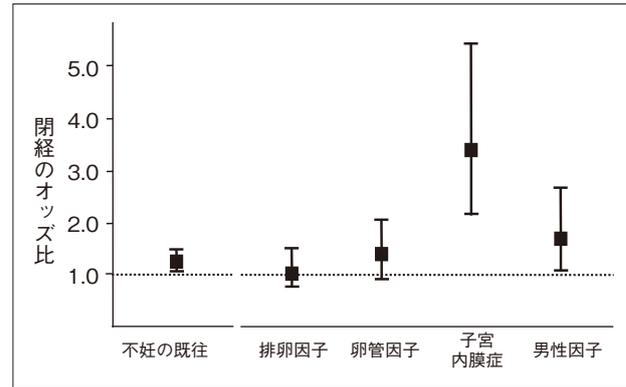


図2 不妊原因が閉経年齢に与える影響 (文献8より作成)

1) 生殖医療が閉経年齢に与える影響

閉経年齢は多因子により規定されていると考えられているが、中でも約50%が遺伝的な因子によるとも言われている。実際、母親の閉経年齢が52% (95%信頼区間 (CI) 35-69%) の関連性を持っているという報告⁴⁾やラテン系・アフリカ系アメリカ人は閉経年齢が早いという報告がある^{5,6)}。

その他の要因としては、生活習慣的要因や環境的要因、社会的要因が考えられているが、ホルモン関連では、初経年齢が早い、月経周期が短い、出産数が少ない、経口避妊薬 (OC) 使用歴がない、抗ミュラー管ホルモン (AMH) が低い、ほど閉経が早いことが報告されている⁷⁾。ただし、各種要因による閉経年齢の変化はOC使用で1~2.5年遅くなり、最も大きく影響すると報告されている喫煙でも1~3.6年早くなる程度である。不妊治療の関連では、日本人看護師における検討であるJapan Nurses' Health Studyにおいて、年齢で補正後では、不妊の既往がある女性はそうでない女性と比較して閉経が早く、特に子宮内

膜症による不妊の場合、閉経が早くなるオッズ比 (OR) は3.43 (95%信頼区間 2.17-5.44) と有意であることが報告されている (図2)⁸⁾。欧米においても不妊女性では閉経が早いという報告が多く、ホルモン治療を受けた不妊症患者では約4歳も閉経が早いという報告もある⁹⁾。ただし、原因不明の不妊は閉経年齢には関連しないという報告^{10,11)}や調節卵巣刺激は卵巣予備能に悪影響を与えない¹²⁾との報告もある。IVFについてはIVF周期数が増えるにもかかわらずではあるが閉経年齢に影響するという報告がある一方¹⁰⁾、3周期までは関連しない¹²⁾、あるいは6周期までは関連しない¹³⁾とも報告されている。しかし、これらの検討では採卵数などで検討しており、年齢が上昇するにつれ必要なゴナドトロピンは増えるので、年齢の因子を考慮する必要がある。また、poor responderでは閉経年齢が早いという (表1)¹⁴⁾。

もちろん手術は卵巣のう腫摘出術はもちろんのこと¹⁵⁾、たとえ腹腔鏡下卵巣ドリリングにおいても卵巣予備能を低下させ¹⁶⁾、閉経を早める¹⁷⁾。出産数が少ないと閉経が

表1 IVFにおける poor responder が観察期間中に閉経となるリスク (文献14より引用)

Study	Study group (IVF poor responders)				Control group (IVF normal responders)			Adjusted odds or hazard ratio
	n	Median follow-up time	Cases entered menopause or menopausal transition(%)	FSH (IU/liter)	n	Median follow-up time	Cases entered menopause or menopausal transition(%)	
Farhi, 1997 case report	12	9 months	100	23-85	-	-	-	-
De Boer, 2003/2002 retrospective cohort	636	6 yr	22		3675	5 yr	7%	~ 3.1 (odds)
Lawson, 2003 retrospective cohort	118	5 yr	50		265	5 yr	16%	~ 3.1 (hazard)
Nikolaou, 2002 case control	12	7 yr	92		24	7 yr	17%	~ 5.3 (odds)

表2 PCOS 女性における将来のメタボリック症候群罹患リスク (文献 23 より引用)

Study or Subgroup	PCOS		Control		Weight	Odds Ratio M-H, Fixed, 95% CI	Year	Odds Ratio M-H, Fixed, 95% CI
	Events	Total	Events	Total				
Faloia 2004	10	50	3	20	14.7%	1.42[0.35, 5.80]	2004	
Alvarez-Blasco 2006	8	32	19	72	37.6%	0.93[0.36, 2.42]	2006	
Shroff 2007b	6	24	4	24	12.9%	1.67[0.40, 6.87]	2007	
Attuoua 2008	17	107	4	100	14.9%	4.53[1.47, 13.98]	2008	
Gulcelik 2008	20	60	7	60	20.0%	3.79[1.46, 9.82]	2008	
Total (95% CI)		273		276	100.0%	2.20[1.36, 3.56]		

早いことも知られており⁵⁾, 明確に不妊治療により閉経が早くなることは示されていないものの, 交絡因子を考慮すれば可能性は否定できないと考えられる。

2) 不妊による閉経年齢の変化や不妊の背景因子が将来の心身に及ぼす影響

女性はエストロゲンで護られているといっても過言ではなく, 早い閉経は更年期障害, 心血管疾患や骨粗鬆症といった退行期疾患のみならず, 皮膚や口腔など全身に影響を及ぼす。また, 死亡率も閉経が早いほど高いことも示されている¹⁸⁾。さらに, 心理的な問題も大きいことが知られており¹⁹⁾, 外科的閉経では将来の抑うつや不安のリスクがハザード比(HR)でそれぞれ1.54, 2.29と有意に上昇することも報告されている²⁰⁾。元々, 不妊患者にはうつや不安が多く, 年齢とともに頻度が増加することも報告されていることから²¹⁾, 対応は必須であると考えられる。

一方, 不妊外来でよく見られる多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)はメタボリック症候群との関連が知られている²²⁾。PCOS女性における将来のメタボリック症候群罹患リスクは非PCOS女性の2.2倍であると報告されており(表2)²³⁾, 閉経後には肥満や脂質プロファイルの悪化が懸念される。妊娠成立の有無にかかわらず, 不妊治療中から将来へ向けての生活習慣の改善などをアドバイスすることは不可欠である。

3. 閉経後のQOL向上へ向けて —ホルモン補充療法の実際とその効果

1) ホルモン補充療法の実際とそのベネフィット

閉経後における最大の変化はエストロゲンレベルが低下することである。エストロゲンの主たる作用は受容体を介して発現するが, α と β の2種類のエストロゲン受容体(ER)のうちどちらがdominantかを別とすれば,

受容体は生殖器以外にもほぼ全身に分布しており, エストロゲンが女性の心身を護っていると言われるゆえである。従って閉経に伴うエストロゲンレベルの低下はERを持つ身体各所における変化を生じさせる。特に, 更年期障害, 脂質異常症, 骨粗鬆症は閉経を1つのチェックポイントとしての検診が必要であると考えられている。

これらの変化に対しては, 消退したホルモンを補うという理にかなった方法である, ホルモン補充療法(Hormone Replacement Therapy: HRT)が頻用されてきた。HRTとはエストロゲン欠乏に伴う諸症状や疾患の予防ないし治療を目的に考案された療法で, エストロゲン製剤を投与する治療の総称である²⁴⁾。表3²⁴⁾にHRTの主なベネフィットをまとめるが, 上記3疾患・病態はもちろんのこと, 皺の改善やコラーゲン維持などの皮膚領域(図3)²⁵⁾, メタボリック症候群や痛風, 糖尿病といった代謝性疾患, また, 歯周病といった口腔領域などへの有効性も注目されており, いわゆるアンチエイジングとしての効果が期待できることが知られている²⁶⁾。実際, 死亡率が約30%低下することも報告されている²⁷⁾。国際閉経学会(IMS)の推奨でも「HRTは症状を有する閉

表3 HRTのベネフィット (文献 24 より引用)

<ul style="list-style-type: none"> ・更年期症状緩和 ・骨吸収抑制・骨折予防 ・糖・脂質代謝改善 ・血管機能改善効果 ・血圧に対する作用 ・中枢神経機能維持 ・皮膚萎縮予防 ・泌尿生殖器症状改善 ・大腸癌(結腸癌・直腸癌) ・口腔における効果
--

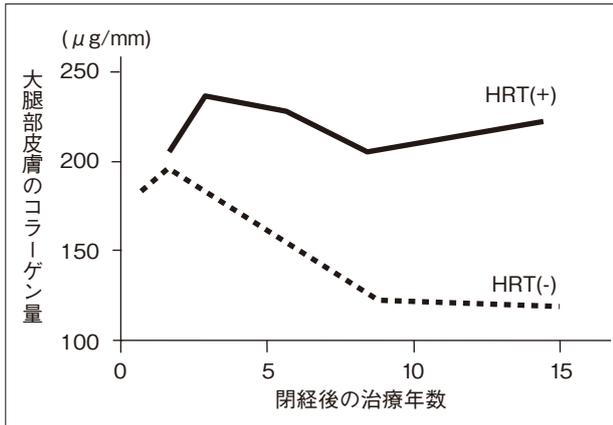


図3 HRTによるコラーゲン量の維持(文献25より引用)

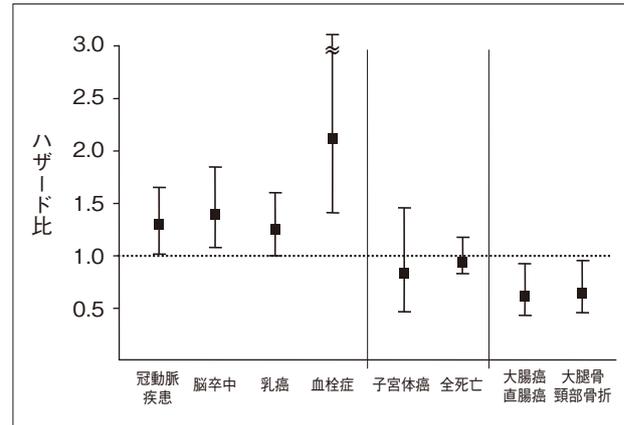


図4 WHI研究における有子宮者に対するHRTによる各疾患リスク(文献28より作成)

経後女性に対する治療の第一選択として考慮されるべきである」となっているとおり、広く閉経以降の愁訴や疾患に対する治療薬としてHRTを選択肢に加えることが勧められており、エストロゲン消退後のQOLの維持・向上にかかすことはできないツールであることには言を待たない。現在では経口剤に加えて、経皮貼付剤や経皮ゲル剤も利用可能であり、海外では経皮や経鼻スプレー剤やデポ剤も臨床に導入されている。日本でもガイドラインが発刊されており²⁴⁾、HRTを安全・安心かつ有効に施行できる環境にある。

2) ホルモン補充療法のリスクは正しく理解されているか？

上記のように、HRTは閉経後女性のQOLの向上に有用な方法であるが、HRTは悪性腫瘍のリスクを上昇させる可能性があると考えられがちであり、特にエストロゲン依存性の組織の癌である乳癌や子宮内膜癌については従来より議論されてきた。しかし、現在では、一定の条件を遵守すれば少なくともリスクの上昇はないことにコンセンサスが得られている。また後述するように、HRTによってリスクの低下する悪性腫瘍もあることはもっと知られてもよい。

a) 乳癌に対するHRTのリスク

HRTの乳癌リスクへの影響について大きく問題とされたのは、2002年に発表された米国における大規模臨床試験であるWomen's Health Initiative (WHI) 研究におけるエストロゲン+黄体ホルモン併用 (E+P) 試験の中間報告²⁸⁾とそれに伴う本試験の中止、さらにその情報伝達のまずさにあった。本試験は5.2年時の中間検討にて、**図4**²⁸⁾に示すように、エストロゲン+黄体ホルモン併用療法 (EPT) 施行者における乳癌リスクが26%上昇 (HR 1.26 (95%CI 1.00-1.59)) しており、これが

設定された危険域を逸脱したということの主たる理由として中止となった。本研究はこれまでになかった大規模なランダム化比較研究 (RCT) であり、この結果は大きなインパクトであった。加えて、試験のlimitationや対象者の特殊性などを考慮しない報道はHRTに対する考え方をネガティブにした。

しかし、E+P試験におけるHR 1.26に対して、例えばフライドポテトを週に1パック多く摂取すると相対危険率 (RR) 1.27、抗生剤の投与で1.57と言われており²⁹⁾、日本人での報告でもビールを1日大瓶1本以上摂取する女性での乳癌のRRは1.75であると報告されていることを考えれば³⁰⁾、1.26という数字のイメージについて再考する必要があることは自明であろう。HRTによる乳癌リスクは閉経前の体重増加、遅い閉経、第一子出産年齢が遅いといった生活習慣関連因子によるリスク上昇よりも低いことも報告されている³¹⁾。また本来、このようなリスク因子については絶対リスクで評価すべきであるが、E+P試験においては、女性10,000人に対して1年間のフォローアップでプラセボ群30人、HRT群38人と8人の乳癌発生増加でしかない。これは米国でクリニックまでHRTの処方を受けに行くために自動車に乗っている間に交通事故に遭う確率よりも低いという。さらにWHI研究については、参加者の年齢が高かったこと、さらに、アジア系が少なかったことや喫煙者、肥満度、過去のホルモン剤使用歴、HRT施行前検査の状況など必ずしも総合的な解析に適切ではないという意見があり、層別のサブ解析が行われるようになった。特にホルモン剤の服用期間と乳癌リスクの関連性が注目されるようになり、平均5.6年で途中中止されたWHIのE+P試験中止後平均2.4年時における健康状況調査によれば、中止後期間におけるイベント発生リスクは浸潤性乳癌においてはHR 1.27 (95%CI 0.91-1.78) とプ

ラセボ群との間に有意差はなかったことから³²⁾、有子宮者に対するEPTでは少なくとも5年未満の施行であれば安全と考えられるようになった。

HRTガイドラインには「長期のEPTの施行は浸潤性乳癌リスクを増加させるが、5年未満の施行であればリスクは上昇しない」とまとめられているが²⁴⁾、これを逆に解釈して5年以上の施行は危険であると考えてはいけないことにも注意を要する。2010年に報告されたWHI研究におけるE+P試験の長期フォローアップの結果では、確かにHR 1.25 (95%CI 1.07-1.46) と有意に上昇しており³³⁾、この報告からは確かに5年以上のEPTは乳癌リスクを上昇させると考えられる。しかし、上記のとおり、このリスク上昇は生活習慣関連因子によるリスクよりも低く、HRTを危険とする根拠は乏しいと考えられている。

一方、WHI研究の子宮摘出者に対するエストロゲン単独投与(ET)では、フォローアップ研究において、乳癌リスクはHR 0.77 (95%CI 0.62-0.95) とプラセボと比較して有意に低下していた³⁴⁾。現在では乳癌リスクに関連するのはエストロゲンよりも、併用される合成黄体ホルモンであることが明らかになっており、欧米では黄体ホルモンを天然型プロゲステロンにすることが一般的になりつつある。日本ではいまだ天然型プロゲステロンが利用できないため、立体異性体であり、不妊治療において頻用されるジドロゲステロン(デュファストン)を用いたり、乳癌予防効果が知られており、閉経後骨粗鬆症の治療で利用される選択的エストロゲン受容体モジュレーター(Selective Estrogen Receptor Modulator: SERM)を用いる試みもなされている。さらに今後レジメンを考慮することにより、さらに低いリスクでの施行も可能であると考えられる。

b) 子宮内膜癌に対するHRTのリスク

子宮内膜癌もエストロゲン依存性と考えられている。有子宮者に対するエストロゲンの単独投与では18ヵ月で約30%に子宮内膜増殖症が発症すると報告されている³⁵⁾。一方、黄体ホルモンを併用することにより、このリスクが低下することも周知であり、エストロゲンとしてCEEベースの場合、28日間に10日以上、黄体ホルモンを併用することにより、ETによって上昇した子宮内膜増殖症発症率が有意に低下するため³⁵⁾、有子宮者では黄体ホルモンの併用が必須とされている。逆に黄体ホルモンを併用すればリスク上昇を考慮する必要はない。

c) HRTは悪性腫瘍のリスクを高めるのか？

「HRT=がんリスク」のように言われることも少なくはないが、上記のように乳癌についてすら、生活習慣に

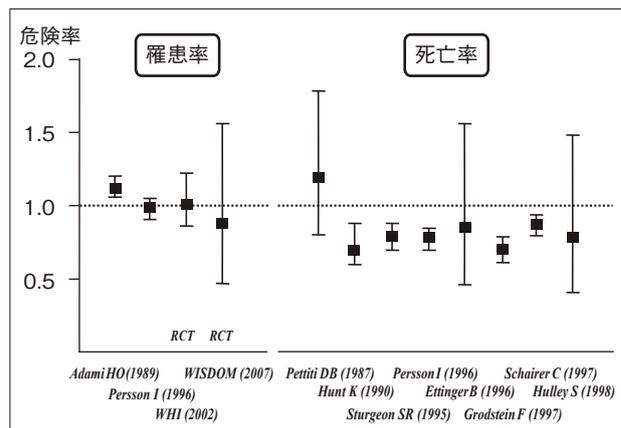


図5 HRT 施行者における全悪性腫瘍の罹患・腫瘍死のリスク(文献 36 より引用)

よるリスクよりも低い。逆にHRTによってリスクが低下する大腸癌や胃癌などもあることから、図5³⁶⁾に示すように、女性における全悪性腫瘍のリスクとしては罹患率では変化はなく、死亡率ではむしろ低下を示す報告が多いことは注目に値する。

3) HRTの禁忌・慎重投与症例

もちろんHRTは万能の治療法ではないし、禁忌症例や慎重投与ないしは条件付きで投与が可能な症例が存在する。詳細はHRTガイドラインを確認していただきたいが、生殖医療からの移行として問題となるのは、開始年齢と継続期間であろう。慎重投与症例ないしは条件付きで投与が可能な症例に「60歳以上または閉経後10年以上の新規投与」とあり、これが60歳で一度中止というような誤解を生んでいるようである。これはプラーク(粥腫)の問題が関係する。閉経後早期、つまり60歳未満や閉経後10年未満から開始すれば、エストロゲンは脂質プロファイルを改善することにより、プラークの形成を防ぐ。一方、エストロゲン、特に経口剤は、蛋白分解酵素であるmatrix metalloproteinase(MMP)を活性化し、プラークの線維性皮膜の脆弱化から破綻の方向へ導く可能性が知られており、既にプラークが存在する可能性のある閉経後年数を経た女性や高齢者へのエストロゲン投与はイベントの増加を招くことが否定できない。従って、HRTは閉経後早期に開始することが望ましく、この情報を伝えるのは生殖医療担当者が適していると考えられる。

但し、この文言は新規投与に限ったものであり、HRTを継続している場合には年齢の制限はない。国際閉経学会のrecommendationも「HRTの継続期間について、決められた上限を設ける理由はない」としており³⁷⁾、もちろん有害事象のチェックは必要ではあるが、何歳までも投与の継続は可能である。

4) HRTのリスク／ベネフィット

HRTにはリスクもベネフィットも共にある。しかし、それぞれが持つインパクトは異なるため、総合的に評価する必要がある。リスクのみで比較すると図6-aのように差異が際立つように思われるが、図6-bのようにホットフラッシュや腔萎縮症状により恩恵を受ける人数は桁が2つも違っており³⁸⁾、総合的なQOLの評価においても、HRTはQOLを改善することが報告されている³⁹⁾。もちろん個人それぞれにより疾患や病態の状況や背景因子が異なることは自明であり、リスクのみに注目することなく、トータルのリスク/ベネフィット評価という視点が極めて重要である。

4. HRT 製剤の代用としての OC/LEP 製剤投与は可能か？

生殖医療においてはホルモン剤の投与が必要となることが多いため、生殖医療担当者は他の subspecialty に比較してホルモン剤に対する抵抗感は低いと考えられる。特に現在では原発性卵巣機能不全 (POI) と呼ばれる、いわゆる早発卵巣不全 (POF) の症例においてFSHが上昇しているような場合などには、下垂体への negative feedback を期待して、EP 配合剤である低用量経口避妊薬 (OC) や低用量エストロゲン・プロゲスチン配合薬 (LEP) 製剤を投与する場合も少なくない。では、OC/LEP 製剤をそのまま継続することにより、HRT 製剤の代用とすることは可能であろうか？

OC/LEP 製剤に使用されているエチニルエストラジオールは、HRT 製剤に使用されている 17β エストラジオールや結合型エストロゲンと比較すると、何に対する効果かで異なるものの、1錠あたり4～8倍のエストロゲン活性を持つことが知られている。つまり、OC/LEP 製剤の継続による閉経後のホルモン補充療法は、例

えばプレマリンを1日4～8錠服用させるのと同じことであり、有害事象を考慮すれば代用できないことは自明である。実際、50歳以上の女性にOCを投与した場合における静脈血栓症リスクは、ホルモン剤非服用者に対してOR 6.3 (95%CI 4.6-9.8) と有意に高く、これは経口HRT施行者におけるOR 1.7 (95%CI 1.1-2.5) と比較しても有意に高いことが報告されている (図7)⁴⁰⁾。どの時期にHRTに切り替えるかについてはいまだ議論があるが、一定の時期、遅くとも50歳までには切り替える必要があることには注意を要する。

5. おわりに

以上のように、不妊治療終了後の長い人生を華麗に過ごすためには不妊治療時からの対応が重要である。実際にはHRTという宝箱のような方法もあるため、挙児希望が無いからといって終診にするのではなく、医師としてその患者の一生におけるヘルスケアの重要性を認識して正確な情報を提供すること、また、自院にてフォローアップするか、適切な施設へ紹介することは生殖医療に従事する者の責務であると言えよう。

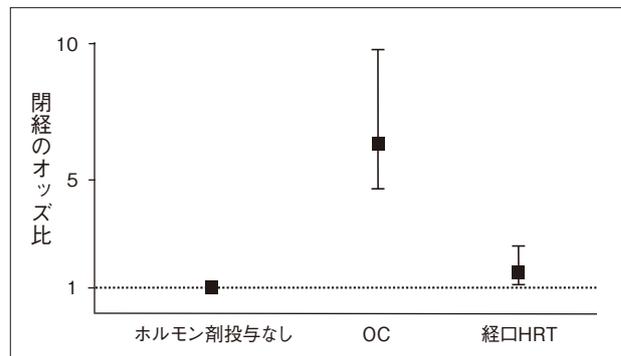


図7 50歳以上の女性におけるOCと経口HRTによる静脈血栓症リスク (文献40より作成)

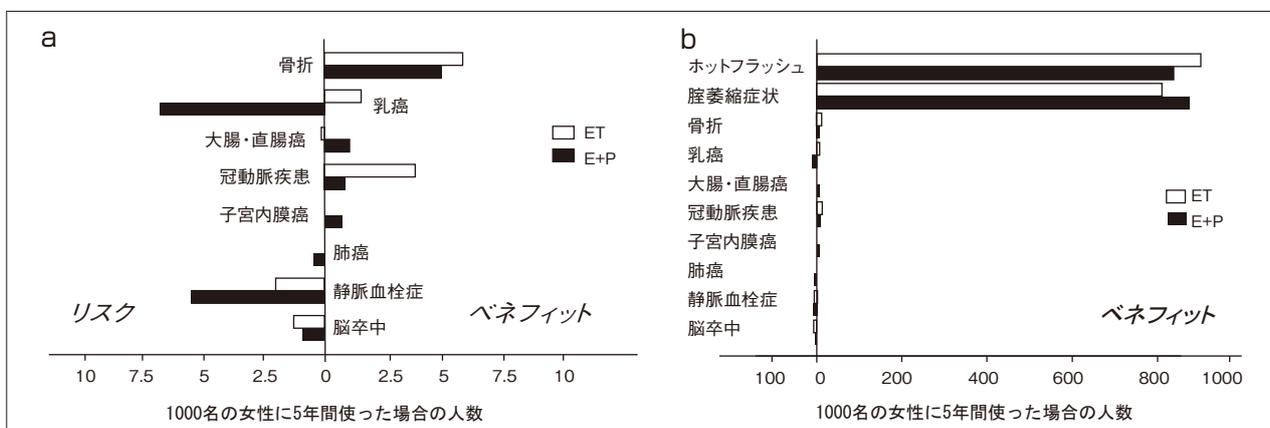


図6 HRTのリスクとベネフィット (文献38より引用)

参考文献

- 1) Cope, E. : Physical changes associated with the post-menopausal years. In: Cambell, S., ed., *The Management of the Menopause & Post-Menopausal Years*, pp29-42, University Park Press, 1976.
- 2) Speroff, L., Fritz, M.A. : Menopause and the perimenopausal transition. In : Fritz, M.A. and Speroff, L., eds., *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility* 8th ed., pp. 673-748, Lippincott Williams & Wilkins, 2011.
- 3) 日本産科婦人科学会 : 産科婦人科用語集・用語解説集 改訂第3版. 日本産科婦人科学会, 2013.
- 4) Murabito, J.M., Yang, Q., Fox, C., Wilson, P.W.F., Cupples, L.A. : Heritability of age at natural menopause in the Framingham Heart Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 90:3427-3430, 2005.
- 5) Henderson, K.D., Bernstein, L., Henderson, B., Kolonel, L., Pike, M.C. : Predictors of the timing of natural menopause in the multiethnic cohort study. *Am. J. Epidemiol.*, 167:1287-1294, 2008.
- 6) Bromberger, J.T., Matthews, K.A., Kuller, L.H., Wing, R.R., Meilahn, E.N., Plantinga, P. : Prospective study of the determinants of age at menopause. *Am. J. Epidemiol.*, 145:124-133, 1997.
- 7) 高松 潔・小川真里子・牧田和也 : 更年期障害をめぐる最近の話題—改めて更年期障害を考える—. *日女医学会誌*, 19: 72-82, 2011.
- 8) Yasui, T., Hayashi, K., Mizunuma, H., Kubota, T., Aso, T., Matsumura, Y., Lee, J.S., Suzuki, S. : Association of endometriosis-related infertility with age at menopause. *Maturitas*, 69: 279-283, 2011.
- 9) Pines, A., Shapira, I., Mijatovic, V., Margalioth, E.J., Frenkel, Y. : The impact of hormonal therapy for infertility on the age at menopause. *Maturitas*, 41: 283-287, 2002.
- 10) Elder, K., Mathews, T., Kutner, E., Kim, E., Espenberg, D., Faddy, M., Gosden, R. : Impact of gonadotrophin stimulation for assisted reproductive technology on ovarian ageing and menopause. *Reprod. Biomed. Online*, 16: 611-616, 2008.
- 11) de Boer, E.J., den Tonkelaar, I., Burger, C.W., van Leeuwen, F.E.; OMEGA-project group: Are cause of subfertility and in vitro fertilization treatment risk factors for an earlier start of menopause? *Menopause*, 12: 578-588, 2005.
- 12) Luk, J., Arici, A. : Does the ovarian reserve decrease from repeated ovulation stimulations? *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.*, 22: 177-182, 2010.
- 13) Kolibianakis, E., Osmanagaoglu, K., Camus, M., Tournaye, H., Van Steirteghem, A., Devroey, P. : Effect of repeated assisted reproductive technology cycles on ovarian response. *Fertil. Steril.*, 77: 967-970, 2002.
- 14) Broekmans, F.J., Soules, M.R., Fauser, B.C. : Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocr. Rev.*, 30: 465-493, 2009.
- 15) 岸 郁子・岡崎雅子・杉山重里・下川理世・石川光也・谷垣伸治・富永英一郎・中川博之・兼子 智・吉田丈児・高松 潔 : 卵巣子宮内膜症性嚢胞摘出術の体外受精採卵数に及ぼす影響. *日受精着床会誌*, 24: 210-214, 2007.
- 16) Kandil, M., Selim, M. : Hormonal and sonographic assessment of ovarian reserve before and after laparoscopic ovarian drilling in polycystic ovary syndrome. *BJOG*, 112: 1427-1430, 2005.
- 17) Coccia, M.E., Rizzello, F., Mariani, G., Bulletti, C., Palagianio, A., Scarselli, G. : Ovarian surgery for bilateral endometrioma influences age at menopause. *Hum. Reprod.*, 26: 3000-3007, 2011.
- 18) Shuster, L.T., Rhodes, D.J., Gostout, B.S., Grossardt, B.R., Rocca, W.A. : Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas*, 65: 161-166, 2010.
- 19) Singer, D., Mann, E., Hunter, M.S., Pitkin, J., Panay, N. : The silent grief: psychosocial aspects of premature ovarian failure. *Climacteric*, 14: 428-437, 2011.
- 20) Rocca, W.A., Grossardt, B.R., Geda, Y.E., Gostout, B.S., Bower, J.H., Maraganore, D.M., de Andrade, M., Melton, L.J. 3rd: Long-term risk of depressive and anxiety symptoms after early bilateral oophorectomy. *Menopause*, 15: 1050-1059, 2008.
- 21) Ogawa, M., Takamatsu, K., Horiguchi, F. : Evaluation of factors associated with the anxiety and depression of female infertility patients. *Biopsychosoc. Med.*, 5: 15, 2011.
- 22) Essah, P.A., Nestler, J.E. : The metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome. *J Endocrinol. Invest.*, 29: 270-280, 2006.
- 23) Moran, L.J., Misso, M.L., Wild, R.A., Norman, R.J. : Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Hum. Reprod. Update*, 16: 347-363, 2010.
- 24) 日本産科婦人科学会・日本女性医学学会 : ホルモン補充療法ガイドライン 2012 年度版. 日本産科婦人科学会, 2012.
- 25) Brincat, M., Moniz, C.J., Studd, J.W., Darby, A., Magos, A., Emburey, G., Versi, E. : Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness. *Brit. J. Obstet. Gynaecol.*, 92: 256-259, 1985.
- 26) 高松 潔・小川真里子 : エストロゲンとアンチエイジング. *最新医学*, 69: 31-39, 2014.
- 27) Salpeter, S.R., Cheng, J., Thabane, L., Buckley, N.S., Salpeter, E.E. : Bayesian meta-analysis of hormone therapy and mortality in younger postmenopausal women. *Am. J. Med.*, 122: 1016-1022. e1, 2009.
- 28) Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA*, 288: 321-333, 2002.
- 29) Bluming, A.Z., Tavis, C. : Hormone replacement therapy: real concerns and false alarms. *Cancer J.*, 15: 93-104, 2009.
- 30) Suzuki, R., Iwasaki, M., Inoue, M., Sasazuki, S., Sawada, N., Yamaji, T., Shimazu, T., Tsugane, S. and the Japan Public Health Center-Based Prospective Study Group: Alcohol consumption-associated breast cancer incidence and potential effect modifiers: the Japan Public Health Center-based Prospective Study. *Int. J. Cancer*, 127: 685-695, 2010.
- 31) Santen, R.J. : Endocrine-responsive cancer. In Kronenberg, H.M., Melmed, S., Polonsky, K.S., Larsen, P.R., eds., *Williams Textbook of Endocrinology*, 11th edn., pp.1764, Saunders Elsevier, 2008.
- 32) Heiss, G., Wallace, R., Anderson, G.L., Aragaki, A., Beresford, S.A., Brzyski, R., Chlebowski, R.T., Gass, M., LaCroix, A., Manson, J.E., Prentice, R.L., Rossouw, J., Stefanick, M.L.; WHI Investigators: Health risks and benefits 3 years after

- stopping randomized treatment with estrogen and progestin. *JAMA*, 299: 1036-1045, 2008.
- 33) Chlebowski, R.T., Anderson, G.L., Gass, M., Lane, D.S., Aragaki, A.K., Kuller, L.H., Manson, J.E., Stefanick, M.L., Ockene, J., Sarto, G.E., Johnson, K.C., Wactawski-Wende, J., Ravdin, P.M., Schenken, R., Hendrix, S.L., Rajkovic, A., Rohan, T.E., Yasmeeen, S., Prentice, R.L.; WHI Investigators: Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA*, 304: 1684-1692, 2010.
 - 34) Anderson, G.L., Chlebowski, R.T., Aragaki, A.K., Kuller, L.H., Manson, J.E., Gass, M., Bluhm, E., Connelly, S., Hubbell, F.A., Lane, D., Martin, L., Ockene, J., Rohan, T., Schenken, R., Wactawski-Wende, J.: Conjugated equine oestrogen and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women with hysterectomy: extended follow-up of the Women's Health Initiative randomised placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.*, 13: 476-486, 2012.
 - 35) Whitehead, M.I., Fraser, D. : Controversies concerning the safety of estrogen replacement therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 156: 1313-1322, 1987.
 - 36) 高松 潔 ,・小川真里子・牧田和也 : 日本人における HRT と乳癌以外の悪性腫瘍 . 日更年期医学会誌, 17: 84-93, 2009
 - 37) Sturdee, D.W., Pines, A.; International Menopause Society Writing Group, Archer, D.F., Baber, R.J., Barlow, D., Birkhäuser, M.H., Brincat, M., Cardozo, L., de Villiers, T.J., Gambacciani, M., Gompel, A.A., Henderson, V.W., Kluff, C., Lobo, R.A., MacLennan, A.H., Marsden, J., Nappi, R.E., Panay, N., Pickar, J.H., Robinson, D., Simon, J., Sitruk-Ware, R.L., Stevenson, J.C.: Updated IMS recommendations on postmenopausal hormone therapy and preventive strategies for midlife health. *Climacteric*, 14: 302-320, 2011.
 - 38) Santen, R.J., Allred, D.C., Ardoin, S.P., Archer, D.F., Boyd, N., Braunstein, G.D., Burger, H.G., Colditz, G.A., Davis, S.R., Gambacciani, M., Gower, B.A., Henderson, V.W., Jarjour, W.N., Karas, R.H., Kleerekoper, M., Lobo, R.A., Manson, J.E., Marsden, J., Martin, K.A., Martin, L., Pinkerton, J.V., Rubinow, D.R., Teede, H., Thiboutot, D.M., Utian, W.H.; Endocrine Society : Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 95:s1-s66, 2010.
 - 39) Smith, A.J., Hall, D.R., Grove, D.: Postmenopausal hormone therapy and quality of life. *Int. J. Gynaecol. Obstet.*, 95: 267-271, 2006.
 - 40) Roach, R.E., Lijfering, W.M., Helmerhorst, F.M., Cannegieter, S.C., Rosendaal, F.R., van Hylckama Vlieg, A.: The risk of venous thrombosis in women over 50 years old using oral contraception or postmenopausal hormone therapy. *J. Thromb. Haemost.*, 11: 124-131, 2013.

レーザー光が働きかける細胞機能

櫛引 俊宏

防衛医科大学校医用工学講座 〒359-8513 埼玉県所沢市並木3-2

要旨： 低出力のレーザーを用いた治療であるLow-reactive Level Laser Therapy (LLLT)とは、細胞内に存在する光受容体にレーザーのエネルギーを受容させ、引き続いて起こる生理変化を利用したものである。LLLTが提唱されて40年間で創傷治癒促進、疼痛や炎症の緩和といった有効な生物学的作用が報告されており、近年では幅広い治療分野において応用が試みられている。本論文では、LLLTに用いられている種々の光源や照射パラメーターを列挙し、これまでの著者らの報告を含めて、細胞レベルでのLLLTのメカニズムについて論じる。

キーワード： Low-reactive Level Laser Therapy (LLLT), 細胞内光受容体, 遺伝子発現制御

1. 緒言

低出力のレーザーを用いた治療であるLow-reactive Level Laser Therapy (LLLT)とは、およそ数百mW以下の照射パワーで生体にレーザーを照射し、その生理活性変化を期待したものである。全く同じ治療方法であるLow Intensity Laser Therapy (LILT)やLow Energy Laser Therapy (LELT)など多くの呼称があるが、Low-reactive Level Laser Therapy: LLLTを用いている研究者や医療従事者が多い。LLLTに用いるレーザー(LASER)は“Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”の頭文字をとったものであり、ランプなどから発せられる光と異なり、指向性(まっすぐ進む)、単色性(波長および周波数が固定)および干渉性(位相が時間的にそろっている)に優れている。レーザーではないLED (Light Emitting Diode) やランプの光源を医療に用いる光治療であるLow Level Light Therapy (同じくLLLT)と混同して議論されることが散見されるが、ここではレーザーを用いたLLLTについて述べる。1967年、Mesterらは生体組織へのレーザー照射による発がん要因の有無をテストするため、低エネルギーのレーザー(波長694 nmのルビーレーザー)を剃毛したマウス背部へ照射した。その結果、発がんという結果は認められなかったが、レーザー照射部位の体毛成長速度が非照射部位に比べて促進されていることを発見した¹⁾。この現象は生体に対する初めてのレーザー作用の確認といわれ、LLLTの始まりであるとされている。そもそも、レーザーではない光を用いた治療は古くから行われており、紫外線療法も100年以上前より行

われていたが²⁾、光のなかでも単色性および干渉性に優れるレーザーによる生物作用は初めての報告であった。Mesterらは引き続いて1971年に、レーザーを用いたLLLTの創傷治癒促進効果に関する報告を行っている³⁾。それ以降、LLLTに関する報告は多岐にわたり、臨床例をはじめとして、前述の創傷治癒促進効果、コラーゲン合成促進だけでなく、細胞増殖効果、炎症抑制、疼痛緩和、骨折治癒促進や局所の血流改善など広範な生物学的効果が報告されている。一方で、Mesterらの報告から35年余りを経た2003年のJournal of Clinical Laser Medicine and Surgeryに、LLLT分野では著名なLanzafameが、“Why doesn't everyone use it?”という簡明な問いを投げかけている⁴⁾。LLLTは、これまでの多数の臨床経験により、副作用の少ない治療方法として広く普及しても問題ないようにも思えるが、さらに10年以上が経過した現在も臨床現場に広く普及しない原因は何なのであろうか？

1971年のMesterらの最初の報告では、創傷治癒効果を得るためには照射パワー5-25 mWのヘリウムネオンレーザーを1-1.5 J/cm²の照射エネルギー密度(フルエンス)で患部に照射することを提唱している^{3,5)}。実際、そのレーザー照射条件によって多くの有効な報告が出ているが、必ずしも効果の再現性が得られていないといった報告もある。一方では、レーザー照射による単なる温度上昇による効果であるといった意見や、術者や施設により異なった結果が表れているという意見もある。LLLTは歴史ある治療方法であるが、発展がめざましい分子生物学的手法などを用いて治療メカニズムを解明し、治療効果を詳細に検証しなければならない新しい学

受付 2014年12月29日/受理 2015年4月7日

責任著者：櫛引 俊宏 e-mail [toshi@ndmc.ac.jp]

際的な研究領域といえる。そのためにも、これまで積み上げられている臨床報告例を丹念に精査し、分子生物学的知見を踏まえた生物作用、細胞作用についての研究を行うことが重要であると著者らは考えている。レーザーによるLLLTが始まってすでに40年以上になる今日、毎年100を超える臨床報告例、*in vitro*研究、多数の動物実験の結果が得られているにもかかわらず、"Why doesn't everyone use it?"なのか。総説論文でよく拝見するのが、レーザー照射パラメータが統一されていないということであるが、すべての治療条件を各研究者や医療従事者にあてはめることは容易ではない。これら治療パラメータの違いによる治療結果の違いも十分考慮されるべき要因であるが、レーザーが照射される側の生体(細胞)にも目を向ける必要がある。もし種々の要因が複雑に絡み合うために適切な治療法が確立されていないとするならば、それらを網羅的に整理し、問題点を洗い出し、有効な治療方法の確立に向けて研究を行わなければならない。そこで本稿では、まず、LLLTにおける治療パラメータを列挙する。続いて、生体側からみた細胞のレーザーに対する応答例を挙げる。著者らのこれまでの研究結果から、①細胞内光受容体の存在と光受容に続く生理活性変化、②レーザー照射後の細胞内シグナルカスケードの変化、③レーザー照射後の遺伝子発現調節が起こることを確認している。①から③は単独で起こっているのではなく、相互作用しながら最終的にレーザー照射

後の細胞機能変化が起きていることを中心に考察する。これまでに著者らは、レーザーの波長、パワー、照射時間を変化させ(一部の波長についてはレーザーのパルス幅も変化させ)、また、照射対象となる細胞も様々な動物種および組織由来の細胞を用いてきている。その中から得られた代表的な結果についても記述する。

2. LLLT におけるレーザー照射パラメータ

先に書いたが、各研究者、各報告により異なる結果が報告されており、それらはレーザー照射パラメータが異なることが主な原因であるとされている。これらのレーザー照射条件が異なれば、培養細胞・実験動物やヒトの個体差以上に得られる結果の差異も大きくなる。本稿では、過去12年間(2002年以降)のLLLTによる細胞増殖効果のみに関する約40報の報告を調査した⁶⁻⁵⁰。一つ一つの報告はそれぞれとても興味深いものであるが、ここでは照射パラメータが多岐にわたっているという点を強調して記述する(表1)。

a) 波長 (nm)

これまでのLLLTの研究では、波長405 nmから波長2,940 nmまで広範な波長のレーザーが使用されているが、そのほとんどの報告(80%以上)ではヘリウムネオンレーザーをはじめとした赤色光領域(632

表1 臨床使用における LLLT のパラメータ

	パラメータ
技術的	レーザーの種類、波長(例 ヘリウムネオンレーザー、波長 632 nm) レーザービーム特性(偏光性、発散性、平行性) レーザーデリバリー方法(光学ファイバー、プローブ、スキャナータイプ) パルスまたは連続光(周波数、パルス幅) ピークパワー、平均パワー、パルス当たりのエネルギー パワー密度 (mW/cm ²) レーザー製造会社
治療的	治療面積(サイズや照射回数) エネルギー密度 (J/cm ²) 治療方法(接触、圧着、非接触照射) 照射距離、照射時の動かし方 照射治療部位(体表、ファイバーによる体内へのデリバリー、など) 治療組織とその組織の体表からの距離 治療回数 治療回数頻度(例 1週間に2回、1か月間、など)
医学的	病歴 患者情報(性別、年齢) 適応外疾患(妊娠、高血圧、てんかん、など) 患者状態(急性期、慢性期など) 薬歴 治療歴(超音波、薬剤、鍼灸など) 経過観察時間(長期または短期)

nm-670 nm) のレーザーが用いられている。これは後述するチトクロム c オキシダーゼが細胞内光受容体となり、その活性を増加させる作用があるためと報告されている^{51, 52)}。波長532 nmのQスイッチNd:YAGレーザーと波長808 nmの半導体レーザーを用いた報告の一部で過度な熱作用などによる細胞増殖の抑制効果が認められたという報告があるものの、それらレーザーを使用した他の報告および大多数の報告は、種々の細胞を用いて細胞増殖効果を報告したものである。いくつかの波長のレーザーを用いて、細胞増殖効果の波長依存性を報告した例もある。

b) パワー (mW)

レーザーの波長と同様、広範なレーザー照射パワーを用いた研究が行われている(0.5 mW-7,500 mW)。多くの報告が後述するエネルギー (J) で示しているため、正確なレーザー照射パワー値が不明な報告も多い。

c) パワー密度(mW/cm²)

照射するレーザーのパワー (mW) をスポットサイズまたは照射面積で除したものである。レーザー照射部位でのパワー密度を記載した報告、レーザーの照射対象(細胞や生体組織)近傍で測定した報告、さらには機器のマニュアルに記載されてあるパワー密度を記述しているだけという報告も散見される。これらを混同してはいけないが、報告をまとめると0.005-80 cm²のエリアを照射対象とし、1-400 mW/cm²のパワー密度を用いている報告が多い。

d) エネルギー (J)およびエネルギー密度(フルエンス) (J/cm²)

エネルギー (J) は出力パワー (mW) と照射時間(秒) の積で計算される。調べた報告では照射時間が2秒から3時間と大きな幅がある。必然的に記述されているエネルギーも0.01-1,200 Jと幅広い。これに伴い、フルエンス(J/cm²)も、広範な設定がされている。

e) 照射対象とする細胞

最も多いのは線維芽細胞を用いた報告である。他に角化細胞、内皮細胞、幹細胞などの報告がある。それぞれの報告で異なる細胞種や由来があり、目的にあった細胞を使用している。

f) その他のパラメータを挙げれば、レーザーの特性(polarized, divergent, collimated)、デリバリー方法(fiber optics, hand held probe, scanner)、照射レーザーがパルス波か連続波(frequency, type of pulsing and duty cycle)、出力(peak power / average power / energy per pulse)、照射回数や照射時間推移、照射方法(接触照射、接触圧、照射距離)、患者の年齢・性別や病歴、照射後の結果取得時間などが挙げられる。

著者が調べた過去約10年間のLLLTの細胞増殖効果に関する報告では、ほとんどが赤色光領域(632 nm-670 nm)のレーザーを用いて細胞増殖を促進するという報告であった。これらの報告の多くはヒトまたはマウスなどの哺乳類に由来する培養細胞系を使用しており、レーザー照射がおよぼす代表的な細胞作用であると言える。

3. レーザーに応答する細胞作用

続いて、レーザーが照射される生体側の要因について記述する。

1) 細胞内光受容体

光生物学分野でよく話題となる細胞内での光受容とは、細胞内の特定の吸収帯を有する物質にフォトンが吸収されることである⁵³⁾。また、光受容体とはその分子(または分子の一部)にフォトンのエネルギーを吸収することのできる物質である。細胞内では特にミトコンドリア呼吸鎖内において光受容体が多く存在するといわれている。

a) チトクロム c オキシダーゼ(Cytochrome c oxidase)

チトクロム c オキシダーゼはミトコンドリア呼吸鎖において呼吸基質からチトクロム系を経て伝達される電子を直接分子状酸素に渡す酵素である。種々の酸化状態におけるチトクロム c オキシダーゼの光吸収スペクトルが測定されており、それは光に対する生体の応答スペクトルにととても近似している。チトクロム c オキシダーゼは特に可視域の波長600 nmから近赤外領域の光に対する光受容体とされている⁵⁴⁾。

これまでに、チトクロム c オキシダーゼを光受容体であるとした細胞への光作用に関する研究、特に神経系細胞を用いた研究が多く報告されている。神経細胞への赤外光照射がテロドトキシン誘発性電位依存性ナトリウムチャンネル抑制によって促進されるチトクロム c オキシダーゼの還元状態を逆転させ、その活性を増加させることが報告されている⁵¹⁾。また、ミトコンドリアにレーザー照射を行った後、チトクロム c オキシダーゼの活性増加とポーラログラフィーによる酸素取り込み量の増加を確認し、それに続くATP産生増加に関する報告もある⁵²⁾。他にもレーザー照射後のチトクロム c オキシダーゼ活性やATP産生増加による細胞増殖促進効果についての*in vivo*および*in vitro*の研究が多く報告されている⁵⁵⁻⁶³⁾。

b) ポルフィリン

ポルフィリンとは4つのピロール環が4つのメチン基と交互に結合した大環状化合物とその誘導体の

総称である。多くは緑色または赤色を呈し、特異な吸収スペクトルおよび赤色蛍光を示す。生体内を含め、自然界に存在するポルフィリン類はピロール環の4個の窒素原子に鉄原子またはマグネシウム原子が配位して錯体を作って存在している。その中でもプロトポルフィリンIX (PPIX) の鉄錯体はヘモグロビン、カタラーゼやペルオキシダーゼなどの配位原子団として含まれ、ミトコンドリア内のチトクロムにも鉄ポルフィリンが存在している (b型以外)。PPIXの光吸収スペクトルには波長400-650 nmにかけて5つのピークが存在し、吸収波長が長いほどその吸収ピークの大きさは相対的に減少している。レーザー照射によって光子を吸収して3重項状態となったPPIXは、近傍に存在する基底状態の酸素原子にエネルギーを移動し活性酸素種を生成する。外部からPPIXまたはその前駆体である5-ALAなどを投与し、局所のレーザー照射によって活性酸素種を発生させ、がん細胞や血管内皮細胞を死滅させるのが光線力学療法 (Photodynamic Therapy) として知られている。しかし、活性酸素種によって細胞を死滅させるのではなく、低いエネルギーで長時間のレーザー照射を行った際に細胞増殖活性が増加することも報告されている⁶⁴⁾。著者らも細胞を死滅させることなく、低用量のPPIXが細胞内に存在するときにレーザーを照射すると、細胞機能の変化がみられることを確認している。活性酸素種については後述するが、細胞内光受容体であるポルフィリン類は光受容後に発生する活性酸素種を介して、さまざまな生物化学反応を細胞内で行っていると考えられている。

c) フラボタンパク質 (フラビタンパク質)

フラボタンパク質 (フラビタンパク質) とは、リボフラビン (フラビンアデニンジヌクレオチド; FAD またはフラビンアデニンモノヌクレオチド; FMD) を補欠分子団とした複合タンパク質の総称である。ほとんどのフラボタンパク質は鉄、モリブデン、銅やマンガンのような重金属を含み、フラビン酵素として機能している。波長350-500 nmにかけて吸収ピークが存在する。フラボタンパク質は生物発光、酸化ストレスによるラジカルの除去、DNA修復やアポトーシスといった広範な生物プロセスに関与している⁶⁵⁾。フラボタンパク質を細胞内光受容体として研究している報告も、著者らの報告も含めて、多く存在している⁶⁶⁻⁶⁸⁾。

d) その他

本稿ではLLLTTに関与する細胞内光受容体として主に報告されている上述の3種類を紹介したが、その他の光受容体としてロドプシン、ビリルビン、メラニン、

プテリン、ビタミンB6やビタミンK、NAD(P)Hやウロカニン酸やトリプトファンなど数多く存在する。

2) レーザー照射後の細胞内シグナルカスケード

光子のエネルギーが吸収された細胞内光受容体が他のタンパク質などへエネルギー遷移を繰り返して細胞内シグナルカスケードに変化を与え、そのシグナルカスケードの変化により、遺伝子発現・タンパク質発現変化へと結びついていると考える研究者が多い。しかしながら、光子のエネルギーを受けた光受容体が、どのようにして核内へそのシグナルを伝えているのか、また、どのようにして、シグナルが伝えられた核内で個別の遺伝子発現制御を行っているのかについて報告はされていない。後述するが、これまでに著者らは、FADを補酵素として有している細胞内クリプトクロムを光受容体として解析を進め、未分化幹細胞の分化促進・抑制に関する研究を行ってきた^{67, 68)}。光を受容したクリプトクロムの構造が変化し、そのものが核内へ移動することで自らの発現調整とE-boxとよばれる遺伝子配列下流に存在するタンパク質の発現が制御されている可能性を示唆している。さらに、活性酸素種などの数多くの因子が相互作用して細胞機能を制御していると考えている。本章では光受容体への光子のエネルギー吸収以外に、LLLTTによってどのような現象が細胞内で起きているのか、いままでわかっている範囲で記述してみたい。

a) 酸化還元経路

これまでにいくつかの活性酸素種または活性窒素種がミトコンドリアから核へのシグナル伝達に関与していると報告されている。それらは細胞内において、NADまたはNADH、NADPまたはNADPH、グルタチオンまたは硫化グルタチオン、チオレドキシシンまたは硫化チオレドキシシンといった化合物と反応する⁶⁹⁾。また、これらの活性種に対するいくつかのセンサー (代表的なものとしてスーパーオキシドジスムターゼ; SOD) が細胞内に存在している⁷⁰⁾。細胞内で活性酸素種が発現すると、細胞は自身を防御するために種々の遺伝子発現制御を行う (それでも解決できない場合はアポトーシスを起こす)⁷¹⁾。特に細胞自身の増殖活性をコントロールするタンパク質が発現し、活性酸素種の有無やその量によって遺伝子発現が厳密に制御されており、活性酸素種がまるで細胞内のセカンドメッセンジャーとして振舞っている^{72, 73)}。また、活性酸素種が細胞機能を変化させることも報告されている⁷⁴⁾。LLLTTの分野においては、波長630 nm付近のレーザーを細胞に照射することで細胞内に活性酸

素種が発生することが報告されている^{75, 76)}。また、著者らも波長405 nmのレーザーを細胞に照射すると、細胞内の活性酸素種量が著しく増大する現象を発見している。レーザー照射によって細胞内で活性酸素種が発生するメカニズムは不明のままであるが、細胞内に存在するPPIXなどの光受容体からのエネルギー遷移の関与も考えられる。さらに、レーザー照射により増加する一酸化窒素(NO)やその合成酵素(iNOS)も細胞機能を制御していると報告されている⁷⁶⁻⁸⁰⁾。

レーザーを照射することで光受容体の活性制御や細胞内活性酸素種発生量の制御を行うことによって、最終的に細胞機能を制御していると考えられている。

b) 遺伝子転写因子

上述の酸化還元経路が引き金となり、多くの転写因子の発現が変化していることが報告されている。ここでは代表的な転写因子としてNF- κ B^{81, 82)}の簡単な紹介にとどめるが、一つ一つの報告を丹念に見ていくと、非常に多くの細胞機能を担っている転写因子の発現がレーザー照射によって増減していることが分かる。

NF- κ Bは転写因子としてinterleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12やtumor necrosis factor (TNF)- α など炎症性サイトカインを同時に複数発現させるだけでなく、癌細胞の増殖や不死化に重要なアポトーシス関連タンパク質も発現させる。LLLTによって生じた酸化還元経路が引き金となってNF- κ Bの発現が増加することが報告されており^{81, 82)}、LLLTによって間接的に各種サイトカインの発現が亢進している一因とされている。

c) サーカディアンリズム

1日を1周期とするサーカディアンリズムは、生物の進化の初期に獲得された生命機能であり、単細胞生物から哺乳類・ヒトにいたるまで、現在の地球に生存する多くの生物種に見られる生命現象である。哺乳類の時計遺伝子は数種の遺伝子群からなり、安定した約24時間周期の分子リズムを作り出している。Brain-Muscle ARNT-like protein 2 (BMAL2), CLOCK (CLK), Cryptochrome(CRY), Period(PER)など、種々のタンパク質が研究されているが、これらの分子時計は体中ほぼすべての細胞に存在して細胞内の時計の役割を果たし、細胞分裂など種々の細胞活動の時間を規定している。その中でもCRYは青色光を吸収し励起されるFADを補酵素(発色団)としてもっている。CRYは高等植物やショウジョウバエなどでは青色光受容体として知られているが⁸³⁾、CRYの光受容によりCRY分子内で何が起きているのかという光受容過程は依然として不明のままである。これまでに知られている光受容体は、いずれも発色団の光異性化をきっかけに

その構造変化がアポタンパク質に伝わり、タンパク質全体の構造変化が引き起こされることにより光受容シグナルが伝えられている。しかしCRYの場合、発色団がFADであるため光異性化は起こりえない。光により励起されたFADから何らかの基質に電子移動が起こることが考えられるが、詳細は明らかになっていない。

4. これからの研究

レーザー医学・光生物学に関する研究は、臨床・基礎研究分野ともに多岐多方面にわたっており、いずれの分野でも新しい診断・治療法の開発の研究が活発に行われている。本稿で紹介させていただいたレーザー・光がおよぼす細胞作用もその一分野であり、今後もそれらの適応範囲や研究のブレイクスルーを目指して多くの研究結果が公表されると確信している。私はこれまでに、ドラッグデリバリーシステム、生体組織工学や再生医学についての研究を行い、数年前からレーザー医学あるいは光生物学という研究も合わせて進めているが、これまで得られた多くの研究結果から感じることは、レーザー・光に必ず生体(細胞)は反応するということである。それらのメカニズムも、使用するレーザー・細胞・実験条件などによって大きく異なり、それらを一つずつ解析して結果を積み上げていく必要がある。漠然とした記述になってしまったが、生命誕生当初から利用してきた光エネルギーを、これからはイメージングなどに代表される光診断、LLLTやPhotodynamic Therapy (PDT)を中心とした疾病の治療のツールとして積極的に利用できる技術・方法の開発を目指している。

5. おわりに

本稿では紙面の都合によりレーザー照射後の代表的な生物作用と著者らが行ってきた研究の一部についてのみ記述したが、細胞内光受容体やレーザー照射によって変化する細胞内シグナルカスケードがこれら以外にも多く存在する。LLLTが始まってすでに40年以上になろうとしている今日、“Why doesn't everyone use it?”. 統一されていないレーザー照射パラメータだけでなく、これまで積み上げられている臨床報告例を丹念に精査し、分子生物学的知見を踏まえた生物作用、細胞作用についての研究を行うことが重要であると考えている。

なお、本研究は(独)日本学術振興会 科学研究費補助金の補助を受けて行ったものである。また、本稿の内容は、第17回日本IVF学会学術集会において講演した内容をまとめたものである。

参考文献

- 1) Mester, E., Szende, B. and Gartner, P.: The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*, 9: 621-626, 1968.
- 2) Roelandts, R.: The history of phototherapy: something new under the sun? *J. Am. Acad. Dermatol.*, 46: 926-930, 2002.
- 3) Mester, E., Spiry, T., Szende, B. and Tota, J. G.: Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.*, 122: 532-535, 1971.
- 4) Lanzafame, R. J.: Why doesn't everyone use it? *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 21: 335-336, 2003.
- 5) Mester, E. and Jaszszagi-Nagy, E.: Biological effects of laser radiation. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*, 12: 377-385, 1971.
- 6) Azevedo, L. H., de Paula Eduardo, F., Moreira, M. S., de Paula Eduardo, C. and Marques, M. M.: Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth : a pilot study. *Lasers Med. Sci.*, 21: 86-89, 2006.
- 7) Brondon, P., Stadler, I. and Lanzafame, R. J.: A study of the effects of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg. Med.*, 36: 409-413, 2005.
- 8) Chen, C. H., Hung, H. S. and Hsu, S. H.: Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surg. Med.*, 40: 46-54, 2008.
- 9) de Castro, J. L., Pinheiro, A. L., Werneck, C. E. and Soares, C. P.: The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomed. Laser Surg.*, 23: 586-589, 2005.
- 10) De Oliveira, R. F., Oliveira, D. A., Monteiro, W., Zangaro, R. A., Magini, M. and Soares, C. P.: Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomed. Laser Surg.*, 26: 6-9, 2008.
- 11) Eduardo Fde, P., Bueno, D. F., de Freitas, P. M., Marques, M. M., Passos-Bueno, M. R., Eduardo Cde, P. and Zatz, M.: Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg. Med.*, 40: 433-438, 2008.
- 12) Eduardo, F. P., Mehnert, D. U., Monezi, T. A., Zzell, D. M., Schubert, M. M., Eduardo, C. P. and Marques, M. M.: Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg. Med.*, 39: 365-372, 2007.
- 13) Evans, D. H. and Abrahamse, H.: Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 24: 199-210, 2008.
- 14) Gao, X., Chen, T., Xing, D., Wang, F., Pei, Y. and Wei, X.: Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *J. Cell. Physiol.*, 206: 441-448, 2006.
- 15) Gavish, L., Perez, L. and Gertz, S. D.: Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg. Med.*, 38: 779-786, 2006.
- 16) Gulsoy, M., Ozer, G. H., Bozkulak, O., Tabakoglu, H. O., Aktas, E., Deniz, G. and Ertan, C.: The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 82: 199-202, 2006.
- 17) Hawkins, D. and Abrahamse, H.: Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomed. Laser Surg.*, 23: 251-259, 2005.
- 18) Hawkins, D. and Abrahamse, H.: Influence of broad-spectrum and infrared light in combination with laser irradiation on the proliferation of wounded skin fibroblasts. *Photomed. Laser Surg.*, 25: 159-169, 2007.
- 19) Hawkins, D. and Abrahamse, H.: How Long After Laser Irradiation Should Cellular Responses be Measured to Determine the Laser Effect? *J. Laser Appl.*, 19: 74-83, 2007.
- 20) Hawkins, D. H. and Abrahamse, H.: The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg. Med.*, 38: 74-83, 2006.
- 21) Hawkins, D. H. and Abrahamse, H.: Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 88: 147-155, 2007.
- 22) Hou, J. F., Zhang, H., Yuan, X., Li, J., Wei, Y. J. and Hu, S. S.: In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg. Med.*, 40: 726-733, 2008.
- 23) Houeld, N. N. and Abrahamse, H.: Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabetic-wounded fibroblast cells. *Photomed. Laser Surg.*, 25: 474-481, 2007.
- 24) Houeld, N. N. and Abrahamse, H.: Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers Med. Sci.*, 23: 11-18, 2008.
- 25) Hu, W. P., Wang, J. J., Yu, C. L., Lan, C. C., Chen, G. S. and Yu, H. S.: Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J. Invest. Dermatol.*, 127: 2048-2057, 2007.
- 26) Kreisler, M., Christoffers, A. B., Willershausen, B. and d'Hoedt, B.: Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.*, 30: 353-358, 2003.
- 27) Kreisler, M., Christoffers, A. B., Willershausen, B. and d'Hoedt, B.: Low-level 809 nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. *Lasers Med. Sci.*, 18: 100-103, 2003.
- 28) Liu, Y. H., Ho, C. C., Cheng, C. C., Hsu, Y. H. and Lai, Y. S.: Photoradiation could influence the cytoskeleton organization and inhibit the survival of human hepatoma cells in vitro. *Lasers Med. Sci.*, 21: 42-48, 2006.
- 29) Marques, M. M., Pereira, A. N., Fujihara, N. A., Nogueira, F. N. and Eduardo, C. P.: Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg. Med.*, 34: 260-265, 2004.
- 30) Mirsky, N., Krispel, Y., Shoshany, Y., Maltz, L. and Oron, U.: Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid. Redox Signal.*, 4: 785-790, 2002.
- 31) Mirzaei, M., Bayat, M., Mosafa, N., Mohsenifar, Z., Piryaei, A., Farokhi, B., Rezaei, F., Sadeghi, Y. and Rakhshan, M.: Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. *Photomed. Laser Surg.*, 25: 519-525, 2007.
- 32) Miyata, H., Genma, T., Ohshima, M., Yamaguchi, Y., Hayashi,

- M., Takeichi, O., Ogiso, B. and Otsuka, K.: Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation. *Int. Endod. J.*, 39: 238-244, 2006.
- 33) Mognato, M., Squizzato, F., Facchin, F., Zaghetto, L. and Corti, L.: Cell growth modulation of human cells irradiated in vitro with low-level laser therapy. *Photomed. Laser Surg.*, 22: 523-526, 2004.
 - 34) Moore, P., Ridgway, T. D., Higbee, R. G., Howard, E. W. and Lucroy, M. D.: Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg. Med.*, 36: 8-12, 2005.
 - 35) Mvula, B., Mathope, T., Moore, T. and Abrahamse, H.: The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Lasers Med. Sci.*, 23: 277-282, 2008.
 - 36) Mvula, B., Moore, T. J. and Abrahamse, H.: Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers Med. Sci.*, 25: 33-39, 2010.
 - 37) Pal, G., Dutta, A., Mitra, K., Grace, M. S., Romanczyk, T. B., Wu, X., Chakrabarti, K., Anders, J., Gorman, E., Waynant, R. W. and Tata, D. B.: Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 86: 252-261, 2007.
 - 38) Pereira, A. N., Eduardo Cde, P., Matson, E. and Marques, M. M.: Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.*, 31: 263-267, 2002.
 - 39) Pinheiro, A. L., Carneiro, N. S., Vieira, A. L., Brugnera, A., Jr., Zanin, F. A., Barros, R. A. and Silva, P. S.: Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 20: 23-26, 2002.
 - 40) Poon, V. K., Huang, L. and Burd, A.: Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: collagen remodeling and pigmentation. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 81: 1-8, 2005.
 - 41) Posten, W., Wrone, D. A., Dover, J. S., Arndt, K. A., Silapunt, S. and Alam, M.: Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol. Surg.*, 31: 334-340, 2005.
 - 42) Pourzarandian, A., Watanabe, H., Ruwanpura, S. M., Aoki, A. and Ishikawa, I.: Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.*, 76: 187-193, 2005.
 - 43) Reddy, G. K.: Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 22: 141-150, 2004.
 - 44) Schindl, A., Merwald, H., Schindl, L., Kaun, C. and Wojta, J.: Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br. J. Dermatol.*, 148: 334-336, 2003.
 - 45) Skopin, M. D. and Molitor, S. C.: Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 25: 75-80, 2009.
 - 46) Taniguchi, D., Dai, P., Hojo, T., Yamaoka, Y., Kubo, T. and Takamatsu, T.: Low-energy laser irradiation promotes synovial fibroblast proliferation by modulating p15 subcellular localization. *Lasers Surg. Med.*, 41: 232-239, 2009.
 - 47) Tuby, H., Maltz, L. and Oron, U.: Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg. Med.*, 39: 373-378, 2007.
 - 48) Vinck, E. M., Cagnie, B. J., Cornelissen, M. J., Declercq, H. A. and Cambier, D. C.: Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers in medical science*, 18: 95-99, 2003.
 - 49) Vinck, E. M., Cagnie, B. J., Cornelissen, M. J., Declercq, H. A. and Cambier, D. C.: Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomed. Laser Surg.*, 23: 167-171, 2005.
 - 50) Zungu, I. L., Mbene, A. B., Hawkins Evans, D. H., Houreld, N. N. and Abrahamse, H.: Phototherapy promotes cell migration in the presence of hydroxyurea. *Lasers Med. Sci.*, 24: 144-150, 2009.
 - 51) Wong-Riley, M. T., Liang, H. L., Eells, J. T., Chance, B., Henry, M. M., Buchmann, E., Kane, M. and Whelan, H. T.: Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.*, 280: 4761-4771, 2005.
 - 52) Pastore, D., Greco, M., Petragallo, V. A. and Passarella, S.: Increase in $\text{c}^{-}\text{H}^{+}\text{e}^{-}$ ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 34: 817-826, 1994.
 - 53) Sutherland, J. C.: Biological effects of polychromatic light. *Photochem. Photobiol.*, 76: 164-170, 2002.
 - 54) Karu, T. I. and Kolyakov, S. F.: Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed. Laser Surg.*, 23: 355-361, 2005.
 - 55) Barolet, D., Duplay, P., Jacomy, H. and Auclair, M.: Importance of pulsing illumination parameters in low-level-light therapy. *Journal of biomedical optics*, 15: 048005, 2010.
 - 56) Chu, J., Wu, S. and Xing, D.: Survivin mediates self-protection through ROS/cdc25c/CDK1 signaling pathway during tumor cell apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. *Cancer Lett.*, 297: 207-219, 2010.
 - 57) Karu, T. I., Pyatibrat, L. V. and Afanasyeva, N. I.: Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg. Med.*, 36: 307-314, 2005.
 - 58) Lan, C. C., Wu, S. B., Wu, C. S., Shen, Y. C., Chiang, T. Y., Wei, Y. H. and Yu, H. S.: Induction of primitive pigment cell differentiation by visible light (helium-neon laser): a photoacceptor-specific response not replicable by UVB irradiation. *J. Mol. Med.(Berlin, Germany)*, 90: 321-330, 2012.
 - 59) Lim, J., Sanders, R. A., Snyder, A. C., Eells, J. T., Henshel, D. S. and Watkins, J. B., 3rd: Effects of low-level light therapy on streptozotocin-induced diabetic kidney. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 99: 105-110, 2010.
 - 60) Santana-Blank, L., Rodriguez-Santana, E. and Santana-Rodriguez, K.: Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. *Photomed. Laser Surg.*, 28 Suppl 1: S41-52, 2010.
 - 61) Silveira, P. C., Streck, E. L. and Pinho, R. A.: Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 86: 279-282, 2007.
 - 62) Wu, S., Xing, D., Gao, X. and Chen, W. R.: High fluence low-

- power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.*, 218: 603-611, 2009.
- 63) Wu, Z. H., Zhou, Y., Chen, J. Y. and Zhou, L. W.: Mitochondrial signaling for histamine releases in laser-irradiated RBL-2H3 mast cells. *Lasers Surg. Med.*, 42: 503-509, 2010.
 - 64) Plaetzer, K., Kiesslich, T., Krammer, B. and Hammerl, P.: Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to ALPcS4-PDT. *Photochemical & photobiological sciences: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, 1: 172-177, 2002.
 - 65) Massey, V.: The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.*, 28: 283-296, 2000.
 - 66) Eichler, M., Lavi, R., Shainberg, A. and Lubart, R.: Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. *Lasers Surg. Med.*, 37: 314-319, 2005.
 - 67) Kushibiki, T. and Awazu, K.: Controlling osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stromal cells by regulating a circadian clock protein with laser irradiation. *Int. J. Med. Sci.*, 5: 319-326, 2008.
 - 68) Kushibiki, T. and Awazu, K.: Blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells. *Photomed. Laser Surg.*, 27: 493-498, 2009.
 - 69) Schafer, F. Q. and Buettner, G. R.: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/ glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.*, 30: 1191-1212, 2001.
 - 70) Storz, P.: Mitochondrial ROS-radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol.*, 17: 13-18, 2007.
 - 71) Liu, H., Colavitti, R., Rovira, II and Finkel, T.: Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ. Res.*, 97: 967-974, 2005.
 - 72) Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Sundaresan, M., Finkel, T. and Goldschmidt-Clermont, P. J.: Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science*, 275: 1649-1652, 1997.
 - 73) Schreck, R. and Baeuerle, P. A.: A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol.*, 1: 39-42, 1991.
 - 74) Droge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.*, 82: 47-95, 2002.
 - 75) Lavi, R., Shainberg, A., Friedmann, H., Shneyvays, V., Rickover, O., Eichler, M., Kaplan, D. and Lubart, R.: Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 40917-40922, 2003.
 - 76) Borutaite, V., Budriunaite, A. and Brown, G. C.: Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1459: 405-412, 2000.
 - 77) Guzzardella, G. A., Fini, M., Torricelli, P., Giavaresi, G. and Giardino, R.: Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers Med. Sci.*, 17: 216-220, 2002.
 - 78) Leung, M. C., Lo, S. C., Siu, F. K. and So, K. F.: Treatment of experimentally induced transient cerebral ischemia with low energy laser inhibits nitric oxide synthase activity and up-regulates the expression of transforming growth factor-beta 1. *Lasers Surg. Med.*, 31: 283-288, 2002.
 - 79) Moriyama, Y., Moriyama, E. H., Blackmore, K., Akens, M. K. and Lilge, L.: In vivo study of the inflammatory modulating effects of low-level laser therapy on iNOS expression using bioluminescence imaging. *Photochem. Photobiol.*, 81: 1351-1355, 2005.
 - 80) Tuby, H., Maltz, L. and Oron, U.: Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg. Med.*, 38: 682-688, 2006.
 - 81) Eichler, M., Lavi, R., Friedmann, H., Shainberg, A. and Lubart, R.: Red light-induced redox reactions in cells observed with TEMPO. *Photomed. Laser Surg.*, 25: 170-174, 2007.
 - 82) Rizzi, C. F., Mauriz, J. L., Freitas Correa, D. S., Moreira, A. J., Zettler, C. G., Filippin, L. I., Marroni, N. P. and Gonzalez-Gallego, J.: Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg. Med.*, 38: 704-713, 2006.
 - 83) Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S. and Reppert, S. M.: Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell*, 107: 855-867, 2001.

ARTにおけるホルモン補充はどうあるべきか？

東口 篤司

札幌 エンドメトリウム リサーチ 〒064-0953 札幌市中央区宮の森3条2丁目4-17

要 旨： 1978年以来2012年までに、500万人といわれるARTによる出生児の妊娠時に補充されたステロイドホルモンのほぼ100%はestradiolとprogesteroneである。つまり、estradiolとprogesteroneは多くの卵胞ホルモン、黄体ホルモン製剤のなかで有効性と安全性が最も検証されている薬剤であるということがいえる。さらに、estradiolとprogesteroneは妊娠によって産生される天然のホルモンであり、日常の診療で効果判定に参照される血中濃度を測定できる唯一のホルモンでもある。これらの理由からARTにおけるホルモン補充として第1に選択すべき製剤は、卵胞ホルモンとしてはestradiol、黄体ホルモンとしてはprogesteroneであると考えられる。

キーワード： ART, 卵胞ホルモン, 黄体ホルモン, ホルモン製剤

緒 言

2012年のESHREにおけるICMARTの発表によるとARTによる出生児は世界で500万人にのぼるといわれる。その多くで卵胞ホルモン、黄体ホルモンの補充が行われている。世界のARTで補充されている卵胞ホルモンは、ほぼ100%が天然型のestradiolであり、黄体ホルモンもほぼ100%が天然型のprogesteroneである^{1,2)}。しかし、日本国内でARTに補充される卵胞ホルモンはestradiolの他、14～19%にconjugated estrogenが使用されており、黄体ホルモンはprogesteroneの他、58～59%に合成黄体ホルモンが使われている。また、世界では全く報告のない経口避妊用ピルが5～13%に使われている²⁾。

本項では、個々の薬剤の特徴、有効性、安全性、利便性、さらに添付文書における妊娠中の取り扱いについて検証しながら、この世界と日本の違いを変える必要はあるのか、あるいはこのままで良いのかを考えてみたい。

各 薬 剤 の 特 徴

1) 卵胞ホルモン製剤

表1に国内外で使用可能な卵胞ホルモンの種類と特徴を示した。1～6は天然型で7は合成型である。

1. エステル型estradiol 経口剤 (Progynova など)

体内ではエステル結合が離れestradiolとして作用する。国内にはなく輸入して使用される。1984年Lutjenらが世界で初めてホルモン補充による内膜調

整に用いた卵胞ホルモンであり³⁾、文献的にもmicronized estradiol経口剤と並んで世界で最も多く使われている卵胞ホルモン製剤である¹⁾。Progynovaのlabelには他の欧米のestradiol製剤と同様に妊娠中contraindicationと記載されている。

2. Micronized estradiol経口剤 (ジュリナ, Estrace など)

Micronizeされたestradiolである。micronizationとは特殊な技術で固形粒子を微小化し溶解速度、吸収速度、生理的利用率を改善する方法である。国内ではジュリナが入手可能だが1錠0.5mgとARTに使用するには含量が少ない。

3. Estradiol patch経皮剤 (エストラーナ など)

貼付剤なので局所のかぶれや剥れることがある。卵胞ホルモン製剤では国内で最も多く使われており41%の施設が使用している²⁾。

4. Estradiol gel 経皮剤 (ル・エストロジェル, ディビゲル など)

ゼリー状の薬剤を皮膚に塗るタイプ。Patchのように剥れることはなく、かぶれの頻度はpatchより少ないといわれる。

5. エステル型estradiol筋注剤 (オバホルモンデポー, ペラニンデポー など)

オバホルモンデポー (プロピオン酸エステル)は添付文書に妊娠中の取り扱いに関する記載がなく、ペラニンデポー (吉草酸エステル)は妊娠中禁忌とされており、製剤によって取扱いが異なる。

6. Conjugated estrogen経口剤 (プレマリン など)

妊馬尿から精製されるので天然型ではあるが、

equilinなどヒトにも作用する馬独特の卵胞ホルモンが含まれるのでestradiolとは区別される⁴⁾。ARTでホルモン補充に使用されたとするPubMed文献は2014年12月までに数編と少ない。

7. Mestranol経口剤 (デボシンなど)

体内でethynilestradiolとして作用する。Ethinylestradiolのethynil基が体内でとれることはなく、合成の卵胞ホルモンである。経口ではestradiolの8倍の活性があるといわれる⁵⁾。国外ではヒトの卵胞ホルモン補充に使われた報告はなく¹⁾、有効性、安全性に関しては全く不明である。

2) 黄体ホルモン製剤

表1に国内外で使用可能な黄体ホルモンの種類と特徴を示した。1, 2, 3, 4は天然型である。5は見方によって異なるが合成型とされることが多い。6, 7, 8, 9は合成型である。

1. Progesterone筋注剤 (プロゲホルモン, ルテウムなど)

有効性に関してはコクランレビューでmicronized

progesterone腔剤と同等とされる⁶⁾。ASRMは新鮮胚移植においてmicronized progesterone腔剤とprogesterone筋注剤を推奨している⁷⁾。2008年の段階で世界に5例だけだが好酸球性肺炎が報告されている⁸⁾。

2. Micronized progesterone腔剤 (ルティナス, ウトロゲスタン, クリノンなど)

コクランレビューでprogesterone筋注剤と同様の有効性とされる⁶⁾。血液循環を介するのみでなく直接子宮内膜に移行する (first uterine pass effect) といわれる^{9,10)}。前述のごとくASRMはprogesterone筋注剤とともに本剤を推奨している。世界的なARTに関するアンケート調査のウェブサイトであるIVF-worldwide.comの統計によると世界の新鮮胚移植における黄体補充の77%を占めるとされる¹¹⁾。Progesterone筋注剤, 経口剤の使用頻度は減少しているが本剤は増加傾向にある。添付文書において2014年12月の時点ではルティナスのみがARTによる妊娠中に使用を許可されている。

表1 各卵胞ホルモン, 黄体ホルモン製剤の特徴

卵胞ホルモン	体内で作用する時の構造	妊娠中の取り扱い (添付文書)
1) エステル型 estradiol 経口剤	Estradiol	国内にはないので添付文書はない
2) Micronized estradiol 経口剤	Estradiol	禁忌
3) Estradiol patch 経皮剤	Estradiol	禁忌
4) Estradiol gel 経皮剤	Estradiol	禁忌
5) エステル型 estradiol 筋注剤	Estradiol	禁忌または妊娠中の取扱いの記載なし
6) Conjugated estrogen 経口剤	Estrone Equilin など 10 種類以上	禁忌
7) Mestranol 経口剤	Ethinylestradiol	妊娠中の取扱いの記載なし

黄体ホルモン	体内で作用する時の構造	妊娠中の取り扱い (添付文書)
1) Progesterone 筋注剤	Progesterone	禁忌 (切迫流産に適応あり)
2) Micronized progesterone 腔剤	Progesterone	一部の薬剤は使用が認められている
3) Micronized progesterone 経口剤	Progesterone	国内にはないので添付文書はない
4) 自家製 progesterone 腔剤	Progesterone	実験用試薬なので添付文書はない
5) Hydroxyprogesterone caproate 筋注剤	Hydroxyprogesterone caproate	禁忌 (切迫流産に適応あり)
6) Chlormadinone acetate 経口剤	Chlormadinone	妊娠中の取扱いの記載なし
7) Dydrogesterone 経口剤	Dydrogesterone	切迫流産に適応あり
8) エステル型 medroxyprogesterone 経口剤	Medroxyprogesterone	切迫流産に適応あり

卵胞ホルモン+黄体ホルモンの合剤	体内で作用する時の構造	妊娠中の取り扱い (添付文書)
1) 避妊用ピル経口剤	Norgestrel (ピルの一部) など	禁忌

3. Micronized progesterone経口剤 (ウトロゲスタンなど)

ウトロゲスタンは腔剤としても経口剤としても使用できる。しかし、ASRMは低い妊娠率と高い流産率からprogesteroneの経口摂取を推奨していない⁷⁾。また、経口後に生じる代謝産物が極めて強い催眠鎮静作用を惹起することが知られる¹²⁾。

4. 自家製progesterone腔剤

国内で医薬品を製造するためには医薬品製造許可が必要であり、各医療機関は医薬品製造許可を持たないため、実験用のprogesterone原末から本剤を作製している。実験用のprogesteroneをヒトに用いても良いかという疑義を伴う。

5. エステル型hydroxyprogesterone筋注剤 (オオホルミルテウムデポーなど)

Hydroxyprogesteroneは天然型の黄体ホルモンだがprogesterone receptor (PR) にはprogesteroneの1/100しか親和性がなく、ほとんど活性を持たない。しかし、caproateとエステル結合することによってprogesteroneの26-30/100の親和性が生じるといわれる¹³⁾。通常エステル結合は体内で加水分解されるがhydroxyprogesterone caproateは加水分解されずそのままの形で作用しているとされ¹³⁾、その場合は合成型ということになる。有効性は新鮮胚移植で検討されたPubMed論文が2014年12月の時点で数編認められるがprogesteroneの筋注¹⁴⁾、腔剤¹⁵⁾と変わらないとされている。報告はすべて新鮮胚移植における使用経験であり、凍結胚移植では用いられない傾向のようである。

6. Chlormadinone acetate経口剤 (ルトラールなど)

PubMed文献でヒトの黄体補充として使用した報告は2014年12月の時点で日本からの1編のみで、妊娠率はprogesterone筋注が5/20=25%だったのに対してルトラールでは4/20=20%とのことである¹⁶⁾。脂肪に蓄積し排出率が低く7日間で34%しか排出されないといわれる¹⁷⁾。また、本剤はandrogen receptorに対する親和性が、progesteroneのprogesterone receptorに対する親和性の1/10程度にあるとされる¹⁷⁾。

7. Dydrogesterone経口剤 (デュファストンなど)

有効性に関してはコクランレビューで新鮮胚移植においてprogesteroneより妊娠率が高いと報告されているが⁶⁾、一方では子宮内膜の脱落膜化が十分でないとの見方もある¹⁸⁾。ヒトの黄体補充に使われる合成黄体ホルモンの中ではPubMed文献が2014年12月までに10数件と最も多いが、すべて新鮮胚移植に使用した報告であり凍結胚移植では用いられない傾向のようである。

8. エステル型medroxyprogesterone経口剤 (プロベラなど)

体内でmedroxy基がとれることはなくprogesteroneとは異なる合成黄体ホルモンである。ARTが始まったころに報告があるだけで¹⁹⁾、有効性、安全性については不明である。Androgen receptorにchlormadinoneと同じ程度の親和性があるとされる¹⁷⁾。添付文書に「妊娠初期・中期に投与した場合、女兒胎児の外性器の男性化又は男子胎児の女性化がおこることがある」との記載がある。

3) 卵胞ホルモンと黄体ホルモンの合剤

1. 避妊用ピル経口剤 (プラノバルなど)

国外ではヒトの黄体補充に使われた報告はなく¹⁾、有効性、安全性に関しては全く不明である。

有効性、安全性、利便性、添付文書における妊娠中の取り扱いを考慮した薬剤の選択

卵胞ホルモンの有効性に関しては、estradiol, conjugated estrogen, ethynilestradiolのestrogen receptorに対する親和性など詳しく検討されており、それぞれ適切な量を使用すれば子宮内膜増殖作用に差はないことが理論的には予想されるが、conjugated estrogenについては報告が少なくethynilestradiolについては全く報告がないため実際の臨床上の有効性の比較は難しい。

安全性に関しても同様だが、conjugated estrogenはヒトにない卵胞ホルモンが含まれていること、ethynilestradiolは過剰な子宮内膜増殖作用の可能性を否定できないことが危惧される。

利便性に関して、estradiolは経皮的に吸収が可能なのが特徴である。経口剤、経皮剤は自己投与が可能であり利便性に優れている。

黄体ホルモン製剤の有効性に関して、黄体補充に適応を持つそれぞれの薬剤の薬効はprogesterone receptorに対する親和性など詳しく検討されたうえで認可されており、各薬剤の理論的な有効性には差がないことが予想されるが、世界的な視点ではARTにおける合成黄体ホルモンの報告は少なく、各薬剤の臨床的な有効性を比較することは難しい。

安全性を検討するためには有効性を検討する以上のデータが必要であり、合成黄体ホルモン製剤、自家製progesterone腔剤の安全性を保障することは困難である。

利便性に関しては、経口剤、腔剤は自己投与が可能で

利便性が高いが、筋注剤は通院が必要で利便性は低い。筋注剤を自己注射のために皮下注射すると吸収が低下して十分血中濃度を保てないことがあることが知られている。Progesteroneはestradiolと異なり皮膚から吸収され難いことが特徴である。

薬剤の選択にあたっては添付文書における妊娠中の取り扱いについても考慮しなければならない。添付文書で卵胞ホルモンはいずれの薬剤も妊娠中禁忌であり、黄体ホルモンは平成26年12月の時点では1種類しか妊娠中の使用が認められておらず、他はすべて適応外使用である。添付文書を遵守しない医療行為をして有害事象が発生すると、国内では特段の合理的理由がない限り、医師の過失とされる²⁰⁾。また、添付文書の適応量を超えた量の薬剤を処方したことが「基準から逸脱している」と追及される産科医療補償制度の事案が発生している²¹⁾。ところが適応外使用なしでARTは成立しない。多くの臨床生殖医が必要性とルールのはずみで不安を感じているのではないと思われる。しかし、そのことを解決する方法は身近なところに示されている。産婦人科診療ガイドライン産科編2014「本書を利用するにあたって」の項5.5)に「添付文書に記載されていない（厚生労働大臣に承認されていない）効能・効果を目的とした、あるいは用法・用量での薬剤の使用、すなわち適応外の使用が本書中で勧められている場合がある。それらは、内外の研究報告からその薬剤のその使用法は有用であり、患者の受ける利益が不利益を相当程度上回るとの判断から、その使用法が記載されている。しかしながら、添付文書に記載されていない使用法により健康被害が起こった場合、本邦の副作用被害救済制度が適用されない等の問題点があり、十分注意が必要である。したがって、これらの薬剤の使用にあたってはinformed consentのもとに行う必要がある」とある²²⁾。つまり適応外の薬剤を使う場合に必要なのは、第1にその薬剤が内外の研究報告からその薬剤と使用法は有用であると判断されること、第2にinformed consentを得ること、である。診療ガイドラインは法律そのものではないが、慣習的にはそれに準ずるsoft lawであるという考えがあり²³⁾、裁判では「証拠」として取り扱われることが多くなっている²⁴⁾。

結 論

—ARTにおけるホルモン補充はどうあるべきか？

過去約35年間にARTで使われた卵胞ホルモン、黄体ホルモンのほぼ100%は天然型のestradiolおよびprogesteroneであり、有効性、安全性が十分検証されて

いることから、産婦人科診療ガイドライン産科編2014の「内外の研究報告からその薬剤のその使用法は有用である」と判断できる薬剤はestradiolとprogesteroneのみと考えられる。Estradiolとprogesteroneは妊娠によって産生される唯一の天然型ステロイドホルモンであり、さらに唯一日常の外来で効果判定のための血中濃度を測定できるホルモンでもある。

したがって、ARTにおいてホルモンを補充する場合、卵胞ホルモンとしてはestradiolの経皮剤、経口剤が望ましい。これらは適応外使用なのでinformed consentを得た上で用いる必要がある。黄体ホルモンとしては、添付文書で妊娠中にも使用が認められているタイプのmicronized progesterone腔剤が望ましい。micronized progesterone腔剤が副作用などで使用できない場合にはprogesterone筋注剤が適切と考えられる。Progesterone筋注剤は適応外使用なのでinformed consentを得た上で用いなければならない。

参 考 文 献

- 1) 東口篤司：凍結胚移植におけるホルモン補充—世界の標準—。日IVF会誌，16：46-53，2013。
- 2) 東口篤司：ARTにおけるホルモン補充の現状—日本IVF学会によるアンケート調査の結果—。日IVF会誌，17：25-33，2014。
- 3) Lutjen,P., Trounson, A., Leeton, J., Findlay, J., Wood, C., Renou, P.: The establishment and maintenance of pregnancy using in vitro fertilization and embryo donation in a patient with primary ovarian failure. *Nature*, 307: 174-175, 1984.
- 4) Bhavnani, B.R.: Pharmacokinetics and pharmacodynamics of conjugated equine estrogens: chemistry and metabolism. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217:6-16, 1998.
- 5) Reel, J.R., Lamb, IV J.C., Neal, B.H.: Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 34:288-305, 1996.
- 6) Van der Linden, M., Buckingham, K., Earquhar, C., Kremer, J.A., Metwally, M.: Luteal phase support for assisted reproduction cycles (Review). *Cochrane Database Syst. Rev.*, 10:CD009154, 2011.
- 7) Practice Committee of American Society for Reproductive Medicine in collaboration with Society for Reproductive Endocrinology and Infertility. Progesterone supplementation during the luteal phase and in early pregnancy in the treatment of infertility: an educational bulletin. *Fertil. Steril.*, 90: S150-S153, 2008.
- 8) Khan, A.M., Jariwala, S., Lieman, H.J., Klapper, P.: Acute eosinophilic pneumonia with intramuscular progesterone after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*, 90: 1200.e3-1200.e6, 2008.
- 9) de Ziegler, D.: Hormonal control of endometrial receptivity. *Hum. Reprod.*, 10: 4-7, 1995.

- 10) Cicinelli, E., de Ziegler, D.: Transvaginal progesterone: evidence for a new functional 'portal system' flowing from the vagina to the uterus. *Hum. Reprod. Update.*, 5: 365-372, 1999.
- 11) Vaisbuch, E., de Ziegler, D., Leong, M., Weissman, A., Shoham, Z.: Luteal-phase support in assisted reproduction treatment: real-life practices reported worldwide by an updated website-based survey. *Reprod. Biomed. Online*, 28: 330-335, 2014.
- 12) Arafat, E.S., Hargrove, J.T., Maxson, W.S., Desiderio, D.M., Wentz, A.C., Andersen, R.N.: Sedative and hypnotic effects of oral administration of micronized progesterone may be mediated through its metabolites. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 159: 1203-1209, 1988.
- 13) Attardi, B.L., Zeleznik, A., Simhan, H., Chiao, J.P., Mattison, D.R., Caritis, S.N.: Comparison of progesterone and glucocorticoid receptor binding and stimulation of gene expression by progesterone, 17-alpha hydroxyprogesterone caproate (17-OHPC), and related progestins. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 197: 599.e1-599.e7, 2007.
- 14) Costabile, L., Gerli, S., Manna, C., Rossetti, D., Di Renzo, G.C., Unfer, V.: A prospective randomized study comparing intramuscular progesterone and 17alpha-hydroxyprogesterone caproate in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer cycles. *Fertil. Steril.*, 76: 394-396, 2001.
- 15) Satir, F., Toptas, T., Inel, M., Erman-Akar, M., Taskin, O.: Comparison of intravaginal progesterone gel and intramuscular 17-*a*-hydroxyprogesterone caproate in luteal phase support. *Exp. Ther. Med.*, 5: 1740-1744, 2013.
- 16) Iwase, A., Ando, H., Toda, S., Ishimatsu, S., Harata, T., Kurotsuchi, S., Shimomura, Y., Goto, M., Kikkawa, F.: Oral progestogen versus intramuscular progesterone for luteal support after assisted reproductive technology treatment: a prospective randomized study. *Arch. Gynecol. Obstet.*, 277: 319-324, 2008.
- 17) Schindler, A., Campagnoli, C., Druckmann, R., Huber, J., Pasqualini, J.R., Schweppe, K.W., Thijssen, J.H.H.: Classification and pharmacology of progestins. *Maturitas*, 46S1: S7-S16, 2003.
- 18) Fatemi, H.M., Bourgain, C., Donoso, P., Blockeel, C., Papanikolaou, E.G., Popovic-Todorovic, B., Devroey, P.: Effect of oral administration of dydrogestrone versus vaginal administration of natural micronized progesterone on the secretory transformation of endometrium and luteal endocrine profile in patients with premature ovarian failure: a proof of concept. *Hum. Reprod.*, 22: 1260-1263, 2007.
- 19) Yovich, J.L., Stranger, J.D., Yovich, J.M., Tuvik, A.I.: Assessment and hormonal treatment of the luteal phase of in vitro fertilization cycles. *Aust. N.Z. J. Obstet. Gynaecol.*, 24: 125-130, 1984.
- 20) 最高裁平成八年一月二三日第三小法廷判決
- 21) 産科医療保障保障制度 事例番号：230058. 原因分析報告書要約版 原因分析委員会第2部会
- 22) 日本産科婦人科学会 / 日本産婦人科医会：本書を利用するにあたって 5. 本書の構成と記載内容解釈上での留意点 5) 保険適用外の薬剤使用や検査・処置についての留意点 産婦人科診療ガイドライン-産科編 2011., 2011.
- 23) Campbell, A., Glass, K.C.: The legal status of clinical and ethics policies, codes, and guidelines in medical practice and research. *McGill Law J.*, 46: 473-489, 2001.
- 24) 福崎 博孝：医療訴訟における「カルテの記載・不記載」「診療ガイドライン」の取り扱い 第57回日本生殖医学会学術講演会, pp 20, 2012.

提供卵子を用いた ART, 当院の現状と問題点

塩谷 雅英, 松本 由紀子, 岡本 恵理, 水澤 友利, 滝口 修司,
伊原 由幸, 城 綾乃, 江夏 宜シエン, 十倉 陽子, 安 昌恵,
緒方 誠司, 山田 聡, 片山 和明, 野田 洋一, 苔口 昭次

英ウイメンズクリニック 〒650-0021 神戸市中央区三宮町 1-1-2 三宮セントラルビル7・8階

要旨: 日常臨床の場において、妊娠するためには卵子提供を受ける以外に方法の無い患者に直面することは少なくないが、これらの患者の国内での受け皿は殆ど無く、治療を求めて海外に渡航しているケースが多いのが現状である。これらの患者のなかには十分なカウンセリングを受けないまま、また生まれてくる子の出自を知る権利についても十分に話し合わないままに治療がなされているケースもあることが懸念される。JISARTでは独自のガイドラインを定め、カウンセリングおよび倫理委員会審査を通じて、生まれてくる子の福祉の確保、および生まれた子の出自を知る権利を尊重しつつ治療を行っている。また、フォローアップ部会を設けて当事者が告知や育児などで悩んだときに相談できる場所を担保している。しかし、治療を受け入れる施設は限定されており、患者の受け皿として十分に機能しているとは言えないのが現状である。また、卵子提供者となる姉妹や知人が無い多くの患者にとっては、国内で卵子提供者を探すことは極めて困難である。今後はこれらの患者も国内で安心して治療を受ける事ができるような制度整備が望まれる。

キーワード: 提供卵子, 非配偶者間生殖補助医療, JISART

緒言

日常臨床の場において、卵巣形成不全、早発卵巣機能不全、そしてがん治療後の卵巣機能低下などが原因で自己卵子での妊娠を望めなくなり、妊娠するためには卵子提供を受ける以外に方法の無い患者に直面することは少なくない。しかし、1983年の日本産科婦人科学会の倫理に関する見解¹⁾では、体外受精・胚移植の被実施者は婚姻関係にある挙児を希望する夫婦、と限定されており、また2014年の見解²⁾でも被実施者は、挙児を強く希望する夫婦、とされていることから卵子提供による治療を希望する患者の国内での受け皿は殆ど無いのが現状である。一方で、2003年の非配偶者間生殖補助医療に関する厚生科学審議会報告では、生まれた子の出自を知る権利を保証した上で非配偶者間生殖補助医療を容認するとしているものの、制度整備がなされるまでは実施すべきではない、としている。また、この報告では匿名の卵子提供者に限り治療を容認し、姉妹間や友人からの卵子提供治療は当面認めないとしている。この報告がなされてからすでに11年が経過しようとしているが、いまだ制度整備がなされないまま今日に至っており、治療を望む患者にとっては、貴重な機会が失われて行く状況が続いている。患者の中には海外での卵子提供治療を求め

て渡航するケースも少なくない(図1)。しかし、これらの患者のなかには十分なカウンセリングを受けないまま、また、生まれてくる子の出自を知る権利についても十分に話し合わないままに治療がなされているケースもあることが懸念される。

そのような中、2006年、JISART(日本生殖補助医療標準化機構)倫理委員会は、JISARTに所属する施設

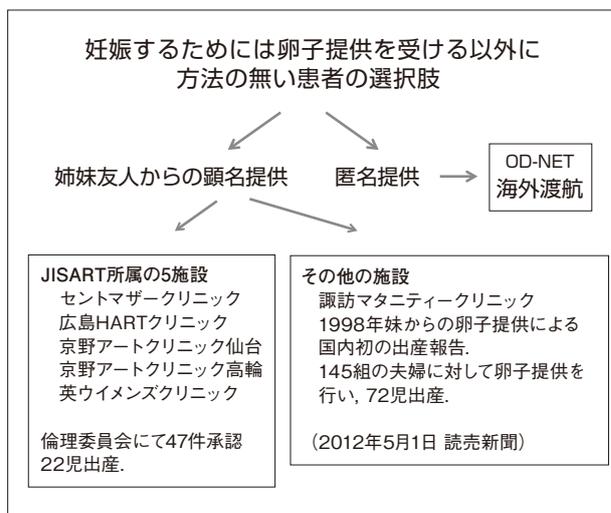


図1 妊娠するためには卵子提供を受ける以外に方法の無い患者の選択肢

受付 2014年12月23日/受理 2015年1月5日

責任著者: 塩谷 雅英 e-mail [shiotani@hanabusaclinic.com]

から申請された顕名の卵子提供による非配偶者間生殖補助医療の2ケースについて、9回におよぶ審議を重ねた上で、翌年これら2ケースの治療実施を承認した。1例は知人からの卵子提供のケース、もう1例は姉妹からの卵子提供のケースであった。この結果を受けてJISARTに所属する2施設では2007年にそれぞれ治療を実施し、幸い2例ともに出産に至っている。これらの一連の動きを受けて、JISARTでは精子・卵子の提供による非配偶者間体外受精に関するJISARTガイドラインを策定し公表した。図2にその要点を抜粋した。詳細はJISARTホームページで参照することができる(<http://www.jisart.jp/about/external/guideline/>)。現在、JISARTに所属する5施設では、このガイドラインに基づき顕名の提供卵子による生殖補助医療を実施している。現在までに48件の申請、そのうち47件が承認され、47周期の採卵、44周期の移植、41周期の妊娠、22児の出産を得ている。本稿ではJISARTガイドラインに基づいて実施している当院の非配偶者間生殖補助医療の現状と問題点について考察する。

対象と方法

1. 卵子提供治療に対する意識を調査する目的でアンケートを実施した。アンケート実施期間は、2014年5月の1ヶ月間であった。アンケートの対象は、この期間に当院に挙児希望で通院している患者141名と、同時期に自然妊娠の結果、妊婦健診あるいは産後の健診を目的として上田病院に通院中の妊婦・褥婦82名である。
2. 顕名の卵子提供による非配偶者間生殖補助医療について、当院からJISART倫理委員会に実施を申請した症例についてその詳細を検討した。対象は2009年か

【被提供者】	【提供者】
① 卵子が存在しない	① 35歳未満の成人で既に子供を有している(35歳から40歳未満は倫理委員会の条件付き承認)
② 6回以上の体外受精によっても妊娠しない	② 同一提供者の採卵回数は3回まで
③ 重篤な遺伝疾患の保因者で妊娠中絶を望まない	③ 提供治療で生まれた子供の人数5人に達していない
➢ 妻の年齢は50歳程度を目安	④ 感染症検査や遺伝的疾患の有無が確認できている
➢ 夫婦とも健康、精神的に安定、経済的に安定している法律上の夫婦	

図2 精子・卵子の提供による非配偶者間生殖補助医療に関するJISARTガイドライン(抜粋)

ら2014年の6年の間に、当院からJISART倫理委員会に実施を申請した10例である。

結果 1.

卵子提供による生殖補助医療を日本でも積極的に認めるべきかどうか、という設問に対する回答結果を図3に示した。現在不妊症に対して治療中の当院患者141名の回答では、69%(97名)が認めるべきであると回答した一方、認めるべきではないと回答したのは13%(19名)であった。自然妊娠の結果、妊婦健診あるいは産後の健診を目的として上田病院に通院中の妊婦・褥婦82名の回答では、66%(54名)が認めるべきであると回答した一方、認めるべきではないと回答したのは12%(10名)であった。

結果 2.

表1に顕名の卵子提供による非配偶者間生殖補助医療について、当院からJISART倫理委員会に実施を申請した10症例についてその詳細をまとめた。治療申請理由としては、早発卵巣不全(premature ovarian insufficiency:POI)が最も多く、10例中7例を占めていた。他には、ターナー症候群に伴う卵巣機能不全の2例、白血病治療のために受けた骨髄移植治療後の卵巣機能不全が1例であった。10例中9例は、姉妹間の卵子提供であり、妹から姉への提供が5例、姉から妹への提供が4例、友人からの提供が1例であった。JISART倫理委員会での治療の実施に関する審査では、承認が4例、条件付き承認1例、非承認1例、倫理委員会申請中が3例であった。非承認の一例は、白血病治療のために受けた骨髄移植治療後の卵巣機能不全となった例であり友人からの卵子提供を希望していたが、審査の過程で

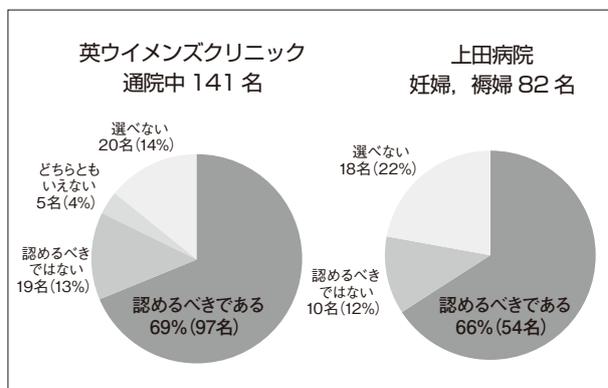


図3 卵子提供について日本でも積極的に認められるべきか?

ナー本人がマルファン症候群であることが判明し、児への遺伝リスクを考慮した結果、治療実施非承認となった。条件付き承認となった1例は、自身が早発卵巣不全で妹からの卵子提供による治療を希望していた。実際の治療の実施にあたって倫理委員会から付与された条件は、卵子提供者である妹が同居している夫の両親に提供の事実を告知すること、というものであった。その後、当院心理カウンセラーによって複数回の心理カウンセリングを実施したが、同居している夫の両親への告知はできず、その結果治療実施には至らなかった。実際に治療を開始したのは姉から卵子提供を受けた(表1症例1)症例と、妹から卵子提供を受けた(表1症例5)の合計2例であり、この2例ともが出産に至っている。

ンセリングを行う。心理カウンセリングは心理カウンセラーが実施し、対象は、被提供者夫婦および提供者夫婦である。提供者が独身の場合には提供者のみがカウンセリングの対象となる。カウンセリングは通常それぞれが3～6回行い、そして合同心理カウンセリングを1回行う。心理カウンセリングでは、主に生まれた子の福祉の確保、および生まれた子の出自を知る権利の尊重に焦点を当てて実施している。非配偶者間生殖補助医療を予定している患者の心理カウンセリングは容易ではないが、心理カウンセリングを担当する心理カウンセラーはJISARTが定期的開催する非配偶者間生殖補助医療カウンセラー講習会に出席して研鑽を重ねている。遺伝

JISART における非配偶者間卵子提供による生殖補助医療の実際

2007年に顕名の卵子提供による非配偶者間生殖補助医療の2ケースの治療を実施して以来、JISART倫理委員会で審査された非配偶者間卵子提供による生殖補助医療のケースは合計47例となり、そのうち46例において実施が承認された。図4にJISART非配偶者間卵子提供による治療実施までの流れを示した。患者から治療の申し出があれば、まず精子・卵子の提供による非配偶者間生殖補助医療に関するJISARTガイドライン(図2)に適合するかどうか、そして医学的適応があるかどうか診断を行う。次に、心理カウンセリングおよび遺伝カウ

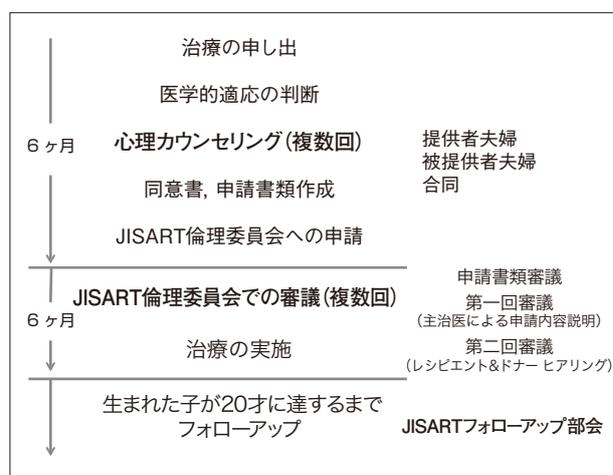


図4 JISART 非配偶者間卵子提供による治療実施までの流れ

表1 英ウイメンズクリニックの現状 (2014年8月現在)

申請年度	申請理由	審査結果	レシピエント年齢	ドナー年齢	関係	現状	
1	2009	POI	承認	34	35	実姉	2010年第一子(男児)出産。第二子治療中。
2	2010	骨髄移植後無月経	非承認	30	31	友人	ドナー・マルファン症候群の為
3	2011	POI	条件付き承認	40	37	実妹	ドナー・同居の両親への告知難しい為治療保留
4	2011	ターナーS	承認	35	37	実姉	3P1SA2CSA GS(+のみOD-NET登録、カウンセリング中DM発症の為、現在内科主治医に確認中
5	2012	POI	承認	31	29	実妹	2013年12月8日女児出産
6	2014	POI	申請中止	30	35	実姉	カウンセリング終了後、自然妊娠
7	2014	POI	承認	25	31	実姉	治療準備中
8	2014	ターナーS	申請中	34	30	実妹	同意書作成、申請済。倫理審査開始
9	2014	POI	申請予定	40	39	実妹	他院よりご紹介。申請書類準備中
10	2014	POI	申請予定	29	35	実姉	他院よりご紹介。カウンセリング開始予定

1. 人間の尊厳及び自由意思の尊重
2. 十分な説明とその明確な同意, 手続きの適正の確保
3. 施術の安全性, 医学的妥当性の確保
4. 生まれた子の福祉の確保
5. 生まれた子の出自を知る権利の尊重
6. 個人情報保護
7. 商業主義排除

図5 JISART 倫理委員会での審議方針

カウンセリングは通常被提供者夫婦および提供者夫婦にそれぞれ1回ずつ実施している。遺伝カウンセリングは生まれてくる児の遺伝的リスクに焦点をあててカウンセリングを実施している。カウンセリングが終了した後に、JISART倫理委員会での審議が行われる。患者から治療の申し出があってから心理カウンセリング、遺伝カウンセリングが終了し倫理委員会での審議が始まるまで通常6ヶ月程度を要する。JISART倫理委員会での審議は通常3回行われる。JISART倫理委員会での審議方針を図5に示した。3回目の倫理審議では、提供者夫婦、被提供者夫婦の個別面談も実施する。JISART倫理委員会での審議にて承認された後に実際の治療が始まるが、通常患者の初診から治療開始まで1年近くを要している。JISARTでは、フォローアップ部会を設けて非配偶者間生殖補助医療の当事者が告知や育児などで悩んだときに相談できる場所を担保している。このフォローアップ部会では、表2に示した時期に予後調査を実施し、非配偶者間生殖医療が家族の幸福に結びついているかどうかを検証し、またこの予後調査を通じて今後のより良い方向性、指標となるものを探ることとしている。

症例提示 (心理カウンセリング記録から)

〔患者A〕30歳代半ば、原発性無月経であり自力での妊娠は難しいことを自覚していた。結婚にも躊躇していたが、現在の夫Bから子供が出来なくても二人で歩む人生を、と言われ結婚した。挙児はあきらめていたが卵子提供を題材に取り上げたテレビ番組をみて、治療を受けようと思われ当院を受診した。当院での心理カウンセリングでは、夫Bは「妻がお腹を痛めて生んだ子であれば妻の子だと思ふ。でもそう思うこと自体すでに妻を傷つけていることになるかも知れない。」と妻Aを労る発言があった。卵子提供者は30歳代の実妹Cである。現在離婚して二人の子供を育てている。「妹の自分の方が先に結婚して子供を作って、Aには悪いなと思っていた。母も

表2 JISART フォローアップ部会による予後調査の対象と時期

	被提供者夫婦 生まれた子ども	提供者夫婦
第一期 (～5年)	6ヶ月 2歳	2歳
第二期 (6年～12年)	6歳 10歳	10歳
第三期 (13年～20年)	13歳 16歳 20歳	20歳

病気がちで、家族を助けるために自分は健康でいなければと思っていた。結婚を前提に交際している男性Dには卵子提供のことを打ち明けるかどうか悩んだ。Dが反対するかもしれないので打ち明けずDと別れることも考えた」と、Aのために自分を犠牲にしても卵子提供をしたいという気持ちがうかがえた。その後CはDから結婚を申し込まれた事をきっかけにAへの卵子提供についてDに打ち明けたところ、Dから「お前にしかできないことや、自分よりお姉さんの方が苦しいはず」と言われ、卵子提供と再婚を決意した。倫理委員会の審査でも治療の承認があり、現在治療準備中である。

考 察

不妊症治療の臨床現場では、妊娠するためには卵子提供を受ける以外に方法の無い患者に直面することは少なくない。1985年、我が国では45歳以上の母親から245人の出生が報告されている。一方、2011年にはその数は843人と3倍以上となっている。45歳以上になると自己卵子での妊娠は容易ではないことを考慮すると、この増加の大部分は若年時の凍結胚を利用したものと考えられるが、海外での卵子提供治療による出生数の増加も背景にあるものと推察される。卵子提供治療に関する意識調査を目的として実施したアンケート調査では、不妊治療の経験の有無を問わず、生殖年齢の女性のおよそ7割が我が国でも積極的に実施されるべきであると回答した。このことから、不妊患者のみならず一般女性も卵子提供治療を容認する傾向があることが示唆された。しかし、わが国では卵子提供を受ける以外に方法の無い患者の受け皿は限定されている。国内での治療の門戸が閉ざされた状況下、卵子提供を希望する多くの夫婦は海外渡航をせざるを得ない状況が続いている。これら患者の中には十分なカウンセリングを受ける事無く、また生まれてくる子の福祉に対する十分な配慮がなされていないケースもあることが懸念される。そのよ

うな状況のなかで、JISARTでは独自に非配偶者間生殖補助医療実施ガイドラインを作成し、適応を厳密に定め、カウンセリングおよび倫理委員会での審査を通して、生まれた子の福祉の確保、生まれた子の出自を知る権利の尊重を担保しつつ治療を実施してきた。その結果、すでに22児が出産に至っている。しかし、JISARTに所属する27施設のうち、非配偶者間生殖補助医療を行っている施設は5施設に過ぎず、妊娠するためには卵子提供を受ける以外に方法の無い患者の受け皿として十分に機能しているとは言えないのが現状である。JISARTのプログラムでは、カウンセリングおよび複数回の倫理委員会での審査に時間を要し、患者初診から実際の治療実施までにおよそ1年を必要とする。高齢の患者にとってはこの事も負担となっている。また、卵子提供者となる姉妹や知人が無い多くの患者にとっては、国内で卵子提供者を探すことは極めて困難である。今後はこれらの患者も国内で安心して治療を受ける事ができるような制度整備が望まれる。

参考文献

- 1) 「体外受精・胚移植」に関する見解に対する考え方(解説). 日産婦誌, 36:1131-1133, 1983.
- 2) 体外受精・胚移植に関する見解. 日産婦誌, 66:1872, 2014.

胚の経時的解析を加味した初期胚の分類法と臨床妊娠率の相関

末永 めぐみ, 篠原 真理子, 江口 明子, 川崎 裕美, 松下 富士代,
山口 弓穂, 伊藤 正信, 松田 和洋

松田ウイメンズクリニック 〒892-0844 鹿児島県鹿児島市山之口町1-10 中央ビル3F

要 旨： タイムラプスインキュベーターの普及により胚発育の非侵襲的連続観察が可能になった。一方、初期胚のグレーディングに由来適用されてきたVeeck分類には胚の経時的変化は考慮されていない。そこで初期胚の発育に関する経時的変化を加味した新しい分類を初期胚移植に適用し、初期胚移植の臨床妊娠率の予測の可能性を検討した。一定期間、同一条件下にEmbryoScopeで培養した単一初期胚移植周期を対象とし、後方視的に同一周期胚を新分類とVeeck分類で分類し臨床妊娠率を比較・検討した。新分類ではグレード順に臨床妊娠率が低下していたが、Veeck分類ではグレードと臨床妊娠率にばらつきが見られた。従って胚発育の経時的変化を加味した新分類はVeeck分類と比較して胚の着床能を反映しており、より有効な胚選択に寄与できる可能性が示唆された。

キーワード： Time-lapse, 胚発育動態, 初期胚評価, 分割期胚移植, 臨床妊娠率

緒 言

単一胚移植では着床能の高い胚の選択が重要である。従来のインキュベーターでは胚を庫外に出して観察する必要があり、温度やpHの変化などの外的環境のストレスを避けるため、最小限の間隔・時間で顕微鏡下の観察を行ってきた。このためVeeck分類¹⁾をはじめとして主に形態を重要視した胚評価がなされてきたが、その精度には限界があり、グレーディングと実際の着床能の乖離が散見されている。一方、近年導入されてきたタイムラプスインキュベーターはインキュベーターに倒立顕微鏡レンズを内蔵しており、間歇的かつ連続的な画像撮影保存によって外的環境のストレスを与えない胚の形態観察が可能である。具体的には受精から胚発生における発育速度や割球分割時間、fragmentationの発現・吸収、多核の観察といった胚発育の経時的変化の正確な情報を得られるようになった。当院はこれまでにEmbryoScopeによる胚の経時的変化の解析により、第1分割が3細胞以上の胚および4細胞期以降での多核胚は胚盤胞到達率が低下する事、また前核消失から第1分割までの割球分割時間が早い胚は胚盤胞到達率が良好である事を報告しており²⁾、初期胚の分割形態および割球分割時間と胚盤胞への発育予後については当院と同様の報告がある³⁻⁵⁾。しかし、胚発育へ影響を及ぼすと示唆される上記の経時的変化を胚評価に反映する方法は

確立されていない。そこで今回、胚発育の経時的変化を加味した当院独自の初期胚評価(新分類)を考案し、検証した。

対象および方法

検討1・2では2013年1月から2014年4月までの期間にEmbryoScopeで培養し、2前核確認後少なくとも1回以上の分割が観察された胚2,672個を対象とした。検討1では割球分割時間と胚盤胞発育の相関を検討するため、前核消失から第1分割までの時間および2細胞期、3細胞期、4細胞期の初期の割球分割到達時間と胚盤胞到達率を受精方法別に後方視的に検討した。

検討2では細胞質の形態の影響を検討するため、(i)ICSI時点でのsmooth endoplasmic reticulum clusters (sERC) (図1-a)、(ii)ICSI時点でのcentrally located cytoplasmic granulation (CLCG) (図1-b)、(iii)受精確認時での2前核の大きさが5μm以上異なる前核不同 (図1-c)、(iv)分割期に分割後の割球が融合して割球数が減少する事象、reverse cleavage (図1-d)の4つの事象を検討項目とした。各事象が認められた群をそれぞれ対象群、認められなかった群をcontrol群として、胚盤胞到達率ならびに単一胚移植周期における臨床妊娠率を比較検討した。

検討3では2012年6月から2014年4月の期間に新

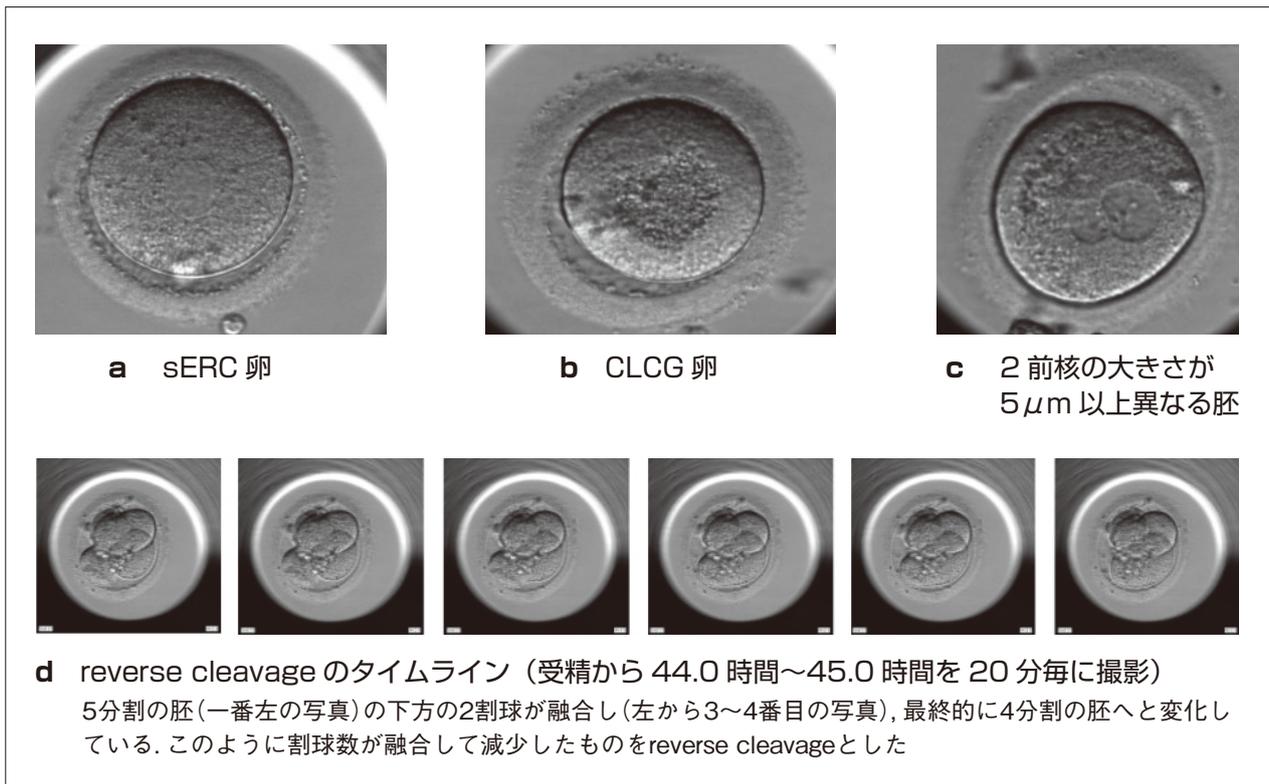


図 1

鮮胚または融解胚移植後に妊娠成立し、心拍確認に到った154症例158個の胚を対象とした。対象胚の2細胞期、4細胞期、5細胞期、6細胞期、8細胞期それぞれへの到達時間の分布を調べ、胚の分割チェックポイントを設定した。

検討4ではこれまでの当院の報告および検討1～3の結果を反映させた胚の経時的変化を加味した新分類の有用性を検討した。対象は2012年6月から2014年4月の期間に39歳以下採卵回数3回以内の症例で6日間の胚盤胞培養を行った243症例1,476個の胚とした。分割期の胚評価である新分類がその後の胚発育の予測となり得る可能性を検証するため、グレード別の胚盤胞到達率と良好胚盤胞（Gardnerの分類による3BB以上の胚）獲得率を検討した。さらに初期胚移植の成績をVeeck分類と比較検討するために、同一条件下の患者のうち分割期胚を実施した138症例158周期を対象とし、後方視的に新分類を適用した場合とVeeck分類を適用した場合とで臨床妊娠率を比較・検討した。

統計学的処理は χ^2 乗検定あるいはFisher's exact test, Benjamini-Hochberg法にて適宜行い、全ての検討において統計的な有意差判定に用いたp値は5%水準とした。

結 果

検討1 初期分割における割球分割時間と胚盤胞到達率

結果を表1に示した。胚盤胞到達率は前核消失から4細胞期までにおける初期の割球分割時間において媒精とICSIの受精方法の違いによる影響は認められず、検討したすべての分割期において媒精・ICSIともに同様の時間分布を示した。

胚盤胞到達率において前核消失から第1分割までの時間は3.0時間以下の3群が3.1時間以上の群と比較して有意に高い値を示し、2細胞期の長さについては2時間以上15時間未満の群が、3細胞期の長さにおいては8時間未満の群が、4細胞期の長さにおいては9時間以上20時間未満の群が有意に高い値を示した。

検討2 細胞質の特徴的形態の影響

細胞質の特徴的形態の有無と胚盤胞到達率を図2-aに示した。前核不同胚およびreverse cleavage胚はそれぞれのcontrol群と比較し、有意に低い値を示した。

ICSI時にsERCまたはCLCGを認めた群はcontrol群との差を認めなかった。

臨床妊娠率を図2-bに示した。各事象の認められた群がそれぞれcontrol群と比較して有意差は認められないものの、臨床妊娠率が低い傾向を示した。

表1 割球分割時間と胚盤胞到達率

前核消失から 第1分割までの時間	媒精 (n=469)	ICSI(n=1665)
2.2 時間以下	74.5% ^a	70.5% ^{ab}
2.3-2.6 時間以下	77.2% ^a	73.6% ^a
2.7-3.0 時間以下	74.3% ^a	64.9% ^b
3.1 時間以上	35.0% ^b	37.8% ^c

2 細胞期の時間	媒精 (n=465)	ICSI(n=1660)
なし	15.1% ^a	12.3% ^a
0.1-2 時間未満	42.3% ^b	51.6% ^b
2-10 時間未満	65.8% ^b	63.2% ^{bc}
10-15 時間未満	79.4% ^c	77.0% ^b
15 時間以上	36.4% ^{ab}	36.5% ^d

3 細胞期の時間	媒精 (n=457)	ICSI(n=1644)
なし	68.9% ^a	64.6% ^a
0.1-2 時間未満	75.6% ^a	76.1% ^b
2-4 時間未満	65.5%	65.6% ^{ab}
4-8 時間未満	55.0%	63.8% ^{ab}
8 時間以上	40.3% ^b	36.2% ^c

4 細胞期の時間	媒精 (n=445)	ICSI(n=1598)
なし	45.5% ^a	42.0% ^a
0.1-9 時間未満	50.0% ^a	50.2% ^a
9-15 時間未満	82.5% ^b	80.9% ^b
15-20 時間未満	77.6% ^b	76.1% ^b
20 時間以上	31.8% ^a	44.2% ^a

異符号間で有意差あり (p<0.05)

検討3 分割チェックポイント

妊娠継続胚における各細胞期への到達時間の分布を解析した。受精時間を0時間とした場合、2細胞期、4細胞期、5細胞期、6細胞期、8細胞期への到達時間はそれぞれ19.2時間～32.9時間、29.7時間～45.8時間、30.5時間～61.1時間、30.0時間～76.4時間、41.9時間～80.0時間となった。当院のタイムスケジュールではDay2およびDay3胚移植は早いケースでは培養40時間および64時間に実施しており、この時間までにグレードを決定する必要がある。そのため当院ではDay2、Day3でのチェックポイントを33時間まで、62時間までとし、それぞれの時間までに2細胞期以上6細胞期以内、5細胞期以上を至適分割速度と設定した。

検討4 当院における新分類(図3)

4細胞期以降における多核の有無および第1分割の正常性と胚盤胞到達率に関する当院のこれまでの報告に加え、検討1・2・3における胚の経時的変化を加味した当

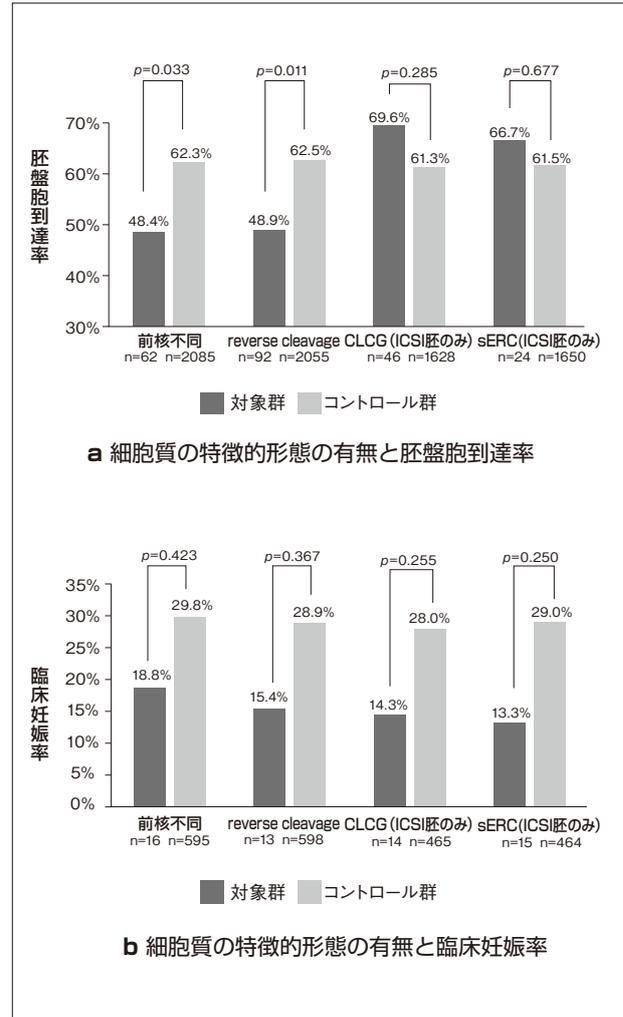


図2

院独自の胚評価法を考案した。有意に妊娠率が低下した項目に当てはまるものをグレード4に、着床能に影響の可能性のある項目をグレード3に、胚盤胞発育へ影響の可能性のある項目をグレード2へ分類されるように設定した。

検討4-① 新分類での胚盤胞到達率および良好胚盤胞獲得率の結果(図4)

胚盤胞到達率および良好胚盤胞獲得率はグレード1が他の3群より有意に高い値を示した。また、グレード2、3はグレード4に対し、胚盤胞到達率および良好胚盤胞獲得率ともに有意に高い値を示した。

検討4-② 分割期単一新鮮胚移植の結果(図5)

新分類ではグレード1がグレード4に対し有意に高い臨床妊娠率を示し、グレード3および4は有意差は認められないものの、グレード2と比較して臨床妊娠率は低下傾向であった。一方、Veck分類を適用した場合はグレードと臨床妊娠率にばらつきが見られた。

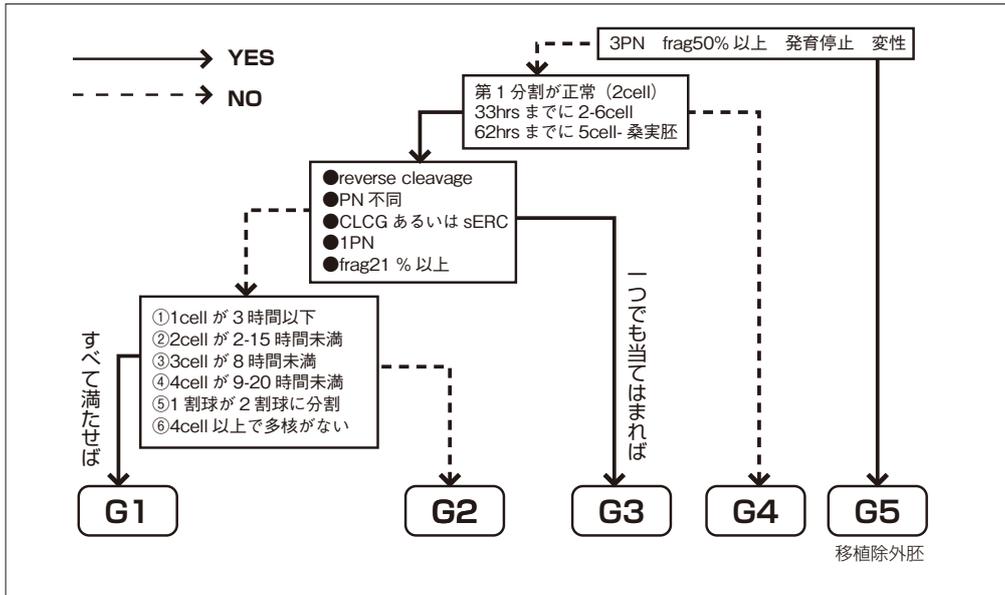


図3 当院における新分類

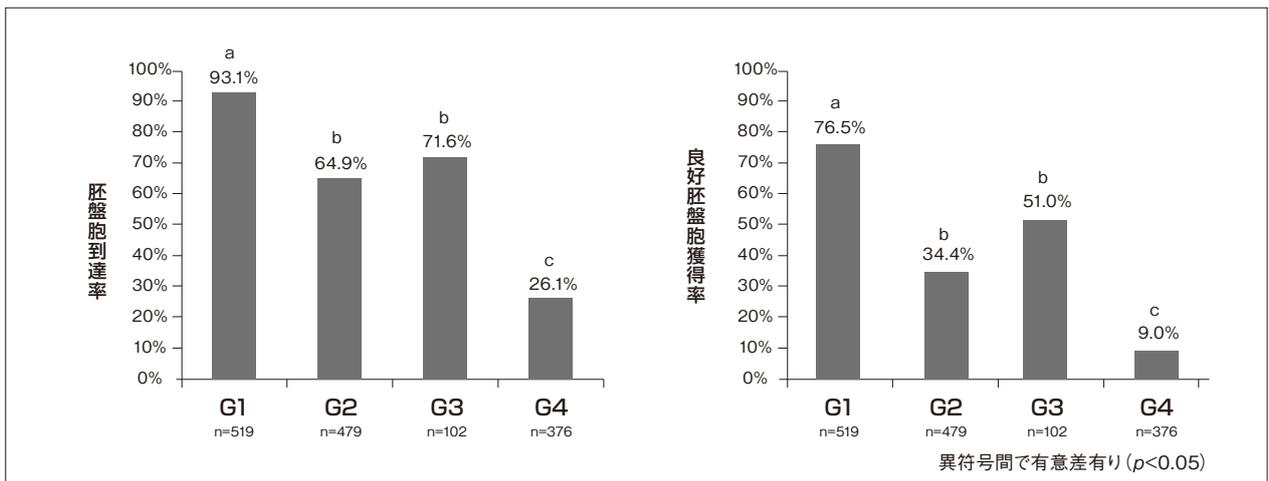


図4 新分類グレードと胚盤胞到達率, 良好胚盤胞獲得率

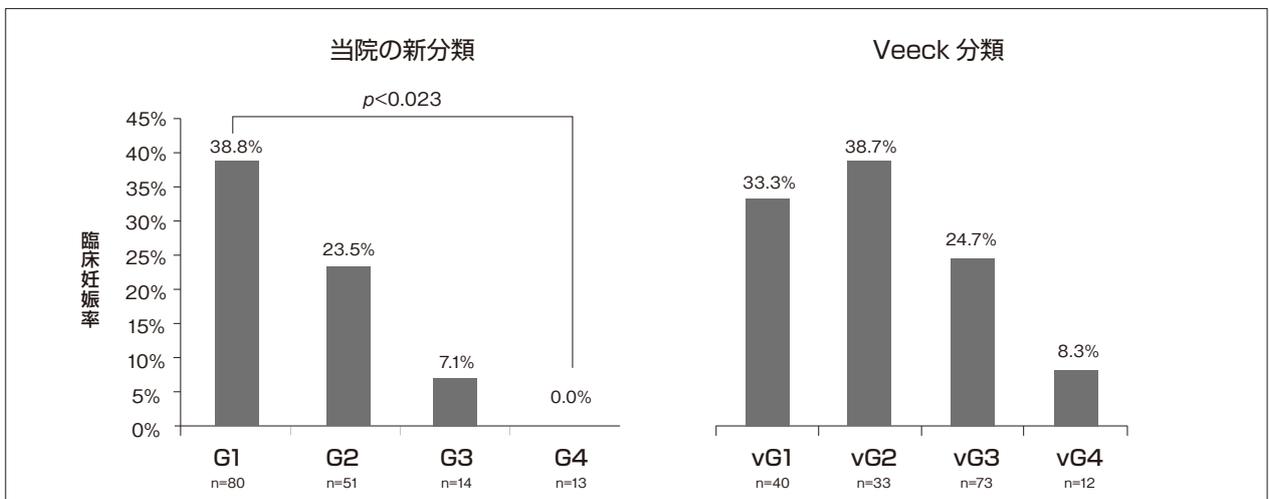


図5 同一周期での臨床妊娠率の比較

考 察

胚の経時的变化を加味した新分類を用いた初期胚移植ではグレードの低下とともに臨床妊娠率が低下した。Veck分類と比較して新分類はより胚の着床能を反映し、妊娠率の改善に寄与できる可能性が示唆された。当院では受精卵数が少なく、胚盤胞への発育不全による移植キャンセルを避けたい場合や、離島等のため長期滞在が難しい症例などに初期胚移植を主に実施している。新鮮胚移植では初期胚移植または胚盤胞移植のどちらを選択するかは議論のわかれるところである⁶⁾。胚盤胞へ発育した胚は異数性である可能性が低く、胚盤胞移植あたりの妊娠率は初期胚と比較して高くなる⁷⁾。しかし、胚盤胞培養では培養期間の長期化によるインプリティング異常またはエピジェネティクス異常との関連性^{8,9)}や、必ずしも胚が胚盤胞まで到達する訳ではないため、特に高齢症例や受精卵が少数しか得られなかった症例では移植キャンセルになりやすいといった問題点がある。また、胚盤胞に成長しても強い収縮を繰り返す胚は着床能が低いことがヒトやマウスで報告されており^{10,11)}、良好な胚盤胞であっても収縮を繰り返す胚を移植すべきか判断の難しいケースがある。一方、初期胚移植ではほとんどの受精卵が少なくとも第1分割まで到達するため移植キャンセル率が低く、胚移植まで完結できないという患者の心理的ダメージを回避できる。今回考察した胚の経時的变化を加味した新分類は分割期のグレードと胚盤胞発育に相関を認めたため、着床能だけでなく、胚盤胞への発育能をある程度予測可能であり、初期胚ならびに胚盤胞どちらの移植でも新鮮胚移植を予定している患者に新分類は有益と考えられた。

タイムラプスインキュベーターの使用によって、細胞形態、割球数の観察やfragmentationの発生・吸収の観察が容易となり、また記録画像によるretrospectiveな観察も可能なため観察者間の個人差を少なくし¹²⁾、より高次元な胚評価が可能となった。今回はこのretrospectiveな観察により、細胞質内の形態についても見落とすことが無く、正しい評価が可能であった。細胞質内にCLCGを観察した卵は継続妊娠率が低く、高率な異数体率により流産率が上昇すると報告されている¹³⁾。また、sERCを観察した卵は妊娠率の低下傾向があるものの、生産児の奇形との関連については不明な点が多い¹⁴⁾。今回の検討でも同様にCLCGおよびsERC卵は胚盤胞への発育には影響を認めなかったものの、臨床妊娠率が低下傾向であった。従って、移植の際にはこれらの胚を避けるのではなく移植の優先順位を下げることを考慮すべきである。また、reverse cleavageは卵

巣刺激法や精子の運動性とも関連し、多核の発生に関与するため着床能が低いと報告されている¹⁵⁾が、その機構には不明な点も多く、今後さらなる検討が必要である。

これまでタイムラプスインキュベーターによる経時的变化を加味した分類法はMeseguerらの報告がある¹⁶⁾が、その分類法を自施設に適用しても必ずしも満足した結果は得られていない¹⁷⁾。Meseguerらの分類では5細胞となる第4分割の時間が大きく着床能を反映する要因であり、この第4分割の時間がグレードに最も影響すると報告している。しかし、EmbryoScopeでの観察では分割形態によって割球かfragmentationか判別の難しい胚があり、この判別如何によって第4分割の時間は大きく異なる結果を示す。我々は判別の難解な胚に対応するため、特定の細胞期の時間ではなく、チェックポイント時間までの割球数を分類基準とした。施設により卵巣刺激法、酸素濃度や培養液といった培養環境、割球判別の基準など様々な要因によって生じる違いは十分考えられ、より有効な胚選択に繋げるためその環境に適した分類法の考案が必要である。

参 考 文 献

- 1) Veck LL.:Oocyte Assessment and Biological Performance. Ann. NY Acad. Sci., 541: 259-295,1988.
- 2) 末永めぐみ, 篠原真理子, 江口明子, 川崎裕美, 松下富士代, 山口弓穂, 伊藤正信, 松田和洋: 胚の初期動態は胚盤胞への発育と関連するのか? 日生殖医学会誌 (学会抄録), 58:O-010, 2013.
- 3) Athayde Wirka K, Chen AA, Conaghan J, Ivani K, Gvakharia M, Behr B, Suraj V, Tan L, Shen S.:Atypical embryo phenotypes identified by time-lapse microscopy: high prevalence and association with embryo development. Fertil Steril., 101:1637-1648, 2014.
- 4) Kirkegaard K, KesmodelU.S , Hindkjær J.J, Ingerslev H.J.:Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. Hum. Reprod., 28: 2643-2651, 2013.
- 5) Desai N, Ploskonka S, Goodman LR, Austin C, Goldberg J, Falcone T.: Analysis of embryo morphokinetics, multinucleation and cleavage anomalies using continuous time-lapse monitoring in blastocyst transfer cycles..Reprod. Biol. Endocrinol.,20:12;54, 2014.
- 6) Glujovsky D, Blake D, Bardach A, Farquhar C.: Cleavage stage versus blastocyst stage embryo transfer in assisted reproductive technology. Cochrane Database Syst. Rev., 11:7, 2012.
- 7) Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Sereni E, Sciajno R, Flamigni C, Coticchio G.: Predictive factors for embryo implantation potential. Reprod. Biomed. Online, 10:653-668, 2005.

- 8) Nimliz EL, Feinberg AP. : Epigenetics and Assisted Reproductive Technology: A Call for Investigation. *Am. J. Hum. Genet.*, 74: 599-609, 2004.
- 9) Manipalviratn S, DeCherney A, Segars J.: Imprinting disorders and assisted reproductive technology. *Fertil. Steril.*, 91:305-315, 2009.
- 10) 渡辺真一, 上畑みな子, 永川恵介, 見田渉, 三浦恵, 小林勇毅, 宮田佳苗, 田中豊美, 松永利恵, 山中奈保子, 与那覇斉, 桑波田暁子, 越知正憲, 堀内俊孝: ヒト胚盤胞の収縮が凍結融解胚移植成績に及ぼす影響: タイムラプス動画を用いた解析. *日受精着床会誌*, 32:45-48, 2015.
- 11) Niimura S.: Time-lapse videomicrographic analyses of contractions in mouse blastocysts. *J. Reprod. Dev.*, 49:413-423, 2003.
- 12) Sundvall L, Ingerslev HJ, Breth Knudsen U, Kirkegaard K.: Inter- and intra-observer variability of time-lapse annotations. *Hum. Reprod.*, 28:3215-3221, 2013.
- 13) Kahraman S, Yakin K, Dönmez E, Samli H, Bahçe M, Cengiz G, Sertyel S, Samli M, Imirzalioglu N.: Relationship between granular cytoplasm of oocytes and pregnancy outcome following intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, 15:2390-2393, 2000.
- 14) Shaw-Jackson, C., Van Beirs, N., Thomas, A.-L., Rozenberg, S. & Autin, C. Can healthy babies originate from oocytes with smooth endoplasmic reticulum aggregates? *Hum. Reprod.*, 2:1380-1386, 2014.
- 15) Liu Y, Chapple V, Roberts P, Matson P.: Prevalence, consequence, and significance of reverse cleavage by human embryos viewed with the use of the Embryoscope time-lapse video system. *Fertil. Steril.*, 102:1295-1300, 2014.
- 16) Meseguer M, Herrero J, Tejera A, Hiligsoe KM, Ramsing NB, Remohi J.: The use of morphokinetics as a predictor of embryo implantation. *Hum. Reprod.*, 26: 2658-2671, 2011.
- 17) Yalçinkaya , Ergin , Çalışkan , Oztel Z, Ozay A, Ozörnek H.: Reproducibility of a time-lapse embryo selection model based on morphokinetic data in a sequential culture media setting. *J. Turk. Ger. Gynecol. Assoc.*, 8:156-160, 2014.