

多能性幹細胞からの生殖細胞作成研究：意義と展望



齋藤 通紀

京都大学大学院医学研究科
生体構造医学講座
機能微細形態学分野 教授

略 歴

1995年 3月 京都大学医学部卒業
1996年 4月 日本学術振興会特別研究員(DC1)
1999年 3月 京都大学大学院医学研究科博士課程修了(医学博士)
4月 日本学術振興会特別研究員(PD)
2000年 1月 Wellcome Travelling Research Fellow
2003年 4月 Wellcome Senior Research Associate
4月 理化学研究所発生・再生科学総合研究センターチームリーダー
2009年 4月 京都大学大学院医学研究科教授(現在に至る)
2011年 8月 科学技術振興機構ERATO研究総括

生殖細胞は、精子および卵子に最終分化し、新しい個体をつくり、新しい世代に遺伝情報を伝える細胞系譜である。生殖細胞は、その発生過程において、ゲノムワイドなエピゲノム修飾を巧みに変換し、またゲノム情報の組換えを行い、細胞としての全能性・多様性を獲得する細胞で、その分子基盤の解明および再構成は、生殖医学のみならず、幹細胞生物学および再生医学一般の発展に貢献すると期待される。

我々はこれまでマウスをモデル動物として生殖細胞の形成機構を研究してきた。その成果に基づき、我々は、培養ディッシュ上で、多能性幹細胞であるES細胞およびiPS細胞から始原生殖細胞(Primordial Germ Cells: PGCs)様細胞を誘導することに成功した。誘導されたPGC様細胞は、生殖細胞を欠損するマウス新生仔の精巣に移植すると、精子に分化し、それら精子は健全なマウスの産出に寄与した(Hayashi *et al.*, Cell, 2011) (図1)。さらに、メスES/iPS細胞由来のPGC様細胞と胎児卵巣体細胞の凝集培養塊(再構成卵巣)をマウスに移植すると、PGC様細胞は成熟卵子に分化し、それら卵子は健全なマウスに寄与することを示した(Hayashi *et al.*, Science, 2012) (図1)。これらの成果は、これまで不可能であったPGCsの大量誘導(〜10⁶)を可能とし、また培養ディッシュ上で生殖細胞の全発生過程を再現する基盤を築く成果である。

本講演では、マウスES/iPS細胞から生殖細胞を試験管内で誘導する技術の現状と展望に関して紹介し、その技術を用いたエピゲノム研究や幹細胞増殖研究への応用の可能性を議論する。また、これらの研究に基づき、ヒト生殖細胞発生過程の試験管内再構成研究の可能性と問題点を議論したい。

参考文献

- 1) Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., and Saitou, M.: Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. Science, 338, 971-975, 2012.

- 2) Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., and Saitou, M.: Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. Cell, 146, 519-532, 2011.

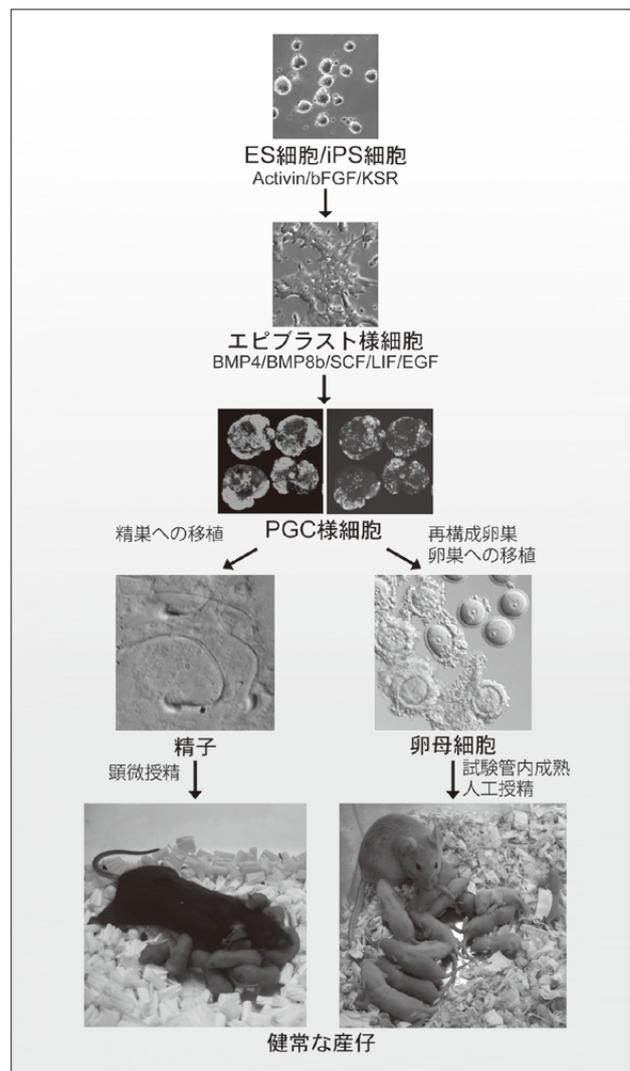


図1 ES/iPS細胞からのPGC様細胞誘導と、PGC様細胞から精子、卵子、産仔を得る実験系の概要

高年齢化に伴う卵子の染色体異常



笠島 道子

永井クリニック
京野アートクリニック
認定遺伝カウンセラー

略歴

1971年 群馬大学医学部付属衛生検査技師学校(現・群馬大学医学部保健学科)卒業
1971～1995年 北里大学病院臨床検査部染色体検査室
1991年 北里大学衛生学部にてPh.D.取得
1995～1997年 メルボルン大学(Reproductive Biology Unit)客員研究員
1997～2002年 中央クリニック併設高度医療技術研究所
2007年～現在 永井クリニックおよび京野アートクリニック 認定遺伝カウンセラー

日本人類遺伝学会臨床細胞遺伝学認定士・指導士, 人類遺伝学会・遺伝カウンセリング学会共同認定遺伝カウンセラー, 日本不妊カウンセリング学会認定不妊カウンセラー

はじめに

日本では、女性の第1子出産平均年齢が年々上昇し、2011年には30.1歳と初めて30歳を超えた。この傾向は不妊治療を希望する女性の高年齢化にも反映され、妊孕性の低下が課題となっている。高年齢化に伴い妊孕性が低下する要因は、卵母細胞数の減少と卵子の質の低下によるが、その実態は解明されていない。ここでは、従来から指摘されている卵子の染色体異常と高年齢化との関係について述べてみたい。

トリソミー児の親起源と発生時期

21トリソミーの出生頻度と母体年齢の関係については、古くから多くの研究がなされ、詳細が明らかにされてきた。Atlanta and National Down Syndrome Projectでは長期にわたる過剰21番染色体の親起源と母体年齢との関連を調査し、過剰21番の92.0%が母由来で、父由来(4.9%)や受精後の体細胞分裂(3.2%)はわずかであることが判明した。さらに、母体年齢35～39歳群は20～24歳群と比べ第1減数分裂(MI)の不分離が4倍、第2減数分裂(MII)の不分離は5倍と高く、40歳以上ではさらに上昇すると報告している¹⁾。

21トリソミーのおよそ70%は流産に終わる。胎児の染色体数的異常は初期流産の原因の約50%を占め、1番を除くすべての常染色体にトリソミーが認められる。Hassoldら²⁾は流産胎児のDNA多型解析を行い、過剰染色体の大部分は卵子の減数分裂の分配異常が原因であることと、過剰染色体の親起源や発生時期は染色体の種類により相違があることを指摘した。流産の中で最も頻度の高い16トリソミーは100%が卵子MIでの分配異常が原因で起こり、21や22トリソミーも70～80%が卵子MIの分配異常により起きている。しかし、18トリソミーでは卵子MIの分配異常は30%と少なく、60%が卵子MIIでの分配異常が原因となっている。また、XXYなど性染色体の過剰Xは精子由来が50.9%と卵子由来の40.6%より多く認められている。

流産胎児の中には2種類の染色体にトリソミーを持

つダブルトリソミーが0.2～2.8%に認められ、2つの過剰染色体のほとんどが卵子に由来することも報告されている³⁾。ダブルトリソミーの母体年齢はシングルトリソミーより高い傾向にあり、高年齢化に伴う卵子の分配異常は複数の染色体で起きていることが推測される。

未受精卵の染色体分析

生殖補助医療の導入により、未受精卵を用いた卵子の染色体分析が報告されるようになり、Angellら⁴⁾はMII卵の中に姉妹染色分体の過剰や染色体が離れている状態を観察し、MIでセントロメアが離れる早期解離(predivision)と呼ばれる現象が数的異常の原因となることを指摘した。西野ら⁵⁾も未受精卵の分析不能中には早期解離が多数出現している卵子も存在し、分析可能な卵子の中にも15.4%に早期解離が認められたことを報告している。特に、早期解離は30～34歳群(11.3%)より35～39歳群(27.7%)で高頻度に見られることから、年齢との相関が指摘された。また、Pellestorら⁶⁾は未受精卵1,397卵を分析し、10.8%の数的異常のうち早期解離(55.0%)が不分離(32.5%)より多いことを報告している。以来、卵子の染色体分配異常には、従来の不分離と早期解離のいずれもが関わっていることが支持されるようになった(図1)。

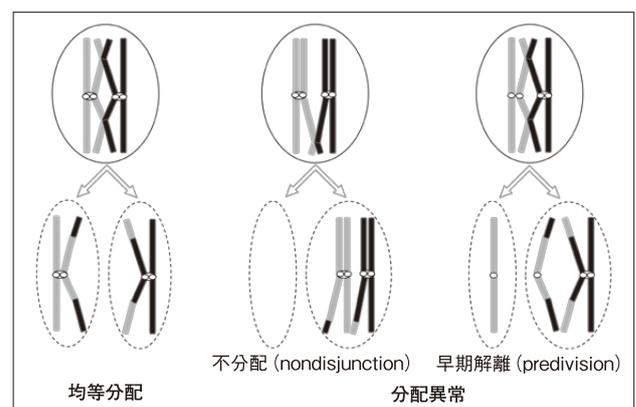


図1 染色体の不分離と早期解離

極体の染色体分析

卵子を侵襲することなく染色体を観察する方法として、極体の分析が行われるようになると、Gianaroliら⁷⁾は3,816細胞をFISH(6種類)法で解析し、早期解離(36%)が不分離(9%)より高頻度で起きていることを報告した。年齢と数的異常の関係では、30代で48%の出現頻度は、40歳から上昇し43歳以上では56%と高頻度で出現している。さらに、Array CGHを導入した解析が報告されるようになり、Geraedtsら⁸⁾は高齢を理由とした着床前スクリーニング(PGS)として41名(平均年齢±SDは40.0±2.9歳)226卵の極体を解析した。数的異常は第1極体の58%、第2極体の69%、移植しない胚の76%に認められ、複数の染色体の分配異常を持つ卵子が多いことも明らかにした。また、Christopikouら⁹⁾も20名(平均年齢±SDは39±3歳)54卵の極体を解析し、72%に数的異常を認め、MIでは不分離による分配異常は3%と少なく、大部分は早期解離により起きていることを報告した。高年齢化に伴い早期解離する染色体が複数に及んでくることは、受精や着床能力の著しい低下につながるものと考えられる。

高年齢化と分配異常の関係

卵子形成過程における染色体の分配異常が起こるメカニズムには、多くの要素が関わっている。その中で、年齢と相関する分配異常のメカニズムのひとつに姉妹染色分体にあるコヒーシンの減少がある。コヒーシンは胎生期に複製された姉妹染色分体の接着に中心的な役割を果たすタンパク質複合体で、細胞分裂において染色体を正確に分配するために必須である。セントロメアにあるコヒーシンの減少が早期解離を起し、染色体端部にあるコヒーシンの減少が不分離につながると考えられている。Watanabe¹⁰⁾は、セントロメアにあるコヒーシン(Rec8)の接着が離れないように保護するシュゴシン(Sgo1)を発見し、胎生期に形成されたこれらのタンパク質が姉妹染色分体を接着しているため、高年齢化に伴い、この接着が減弱化することから分配異常が起こると考えている。さらに、MIで姉妹染色分体が同方向に運ばれるために、セントロメアタンパク質(Moa1)が接着を維持し一方向性を規定していることも報告している。今後、染色体の分配を制御するさまざまなタンパク質の発現や機能など、分子レベルの解析が進むことにより卵子の老化のメカニズムも明らかになるものと期待される。

おわりに

高年齢化に伴い妊孕性が低下する事実は、それを知らなかったために悔いることがないよう、世間一般の誰もが認識するようになることが望ましい。そのためには、生殖医療に携わる人々による地域社会に向けての情報提供や啓発活動が必要であり、上述の内容が情報提供する際に役立つことができれば幸いと考える。

参考文献

- 1) Allen GE, Freeman BS, Druschel C, *et al.*: Maternal age and risk for trisomy 21 assessed by the origin of chromosome nondisjunction: a report from the Atlanta and National Down Syndrome Projects. *Hum Genet*, 125 (1): 41-52, 2009.
- 2) Hassold T, Hall H, and Hunt P.: The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*, 16 (2): 203-208, 2007.
- 3) Diego-Alvarez D, Ramos-Corrales C, Garcia-Hoyos M, *et al.*: Double trisomy in spontaneous miscarriages: cytogenetic and molecular approach. *Hum Reprod*, 21 (4): 958-966, 2006.
- 4) Angell RR.: Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. *Hum Genet*, 86 (4): 383-387, 1991.
- 5) 西野共子, 上口勇次郎, 立野裕幸ら: 体外受精における未受精卵の細胞遺伝学的検. *日本産科婦人科学会雑誌*, 46 (2): 95-101, 1994.
- 6) Pellestor F, Andreo B, Arnal F, *et al.*: Mechanisms of non-disjunction in human female meiosis: the co-existence of two modes of malsegregation evidenced by the karyotyping of 1397 in-vitro unfertilized oocytes. *Hum Reprod*, 17 (8): 2134-2145, 2002.
- 7) Gianaroli L, Magli MC, Cavallini G, *et al.*: Predicting aneuploidy in human oocytes: key factors which affect the meiotic process. *Hum Reprod*, 25 (9): 2374-2386, 2010.
- 8) Geraedts J, Montag M, Magli C, *et al.*: Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod*, 26 (11): 3173-3180, 2011.
- 9) Christopikou D, Tsorva E, Economou K, *et al.*: Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavage stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum Reprod*, 28 (5): 1426-1434, 2013.
- 10) Watanabe Y.: Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16; 13 (6): 370-382, 2012.

卵細胞質置換研究の現状



青野 文仁

藪内 晶子, 加藤 恵

加藤レディスクリニック
生殖医療オーガナイザー

略 歴

- 1984年 3月 東京農業大学農学部畜産学科卒業
- 4月 協同飼料株式会社入社, ウシの体外受精ならびに受精卵クローン研究に従事
- 1999年 9月 加藤レディスクリニック入職, 研究開発部に所属し, 雄性生殖細胞の鑑別, 卵細胞質置換による卵子若返り研究等に従事
- 2013年 6月 生殖医療オーガナイザー

所属学会

日本生殖医学会, 日本受精着床学会, 日本卵子学会, A-PART 日本支部, ASRM

卵子の成熟, 受精後の胚発生において, 卵細胞質内のミトコンドリア, 微小管を始めとする細胞内小器官などが重要な役割を担っている. しかしながら, 加齢によりこれらの機能が低下することはよく知られている. ミトコンドリアはATPを産生し, 胚発生にエネルギーを供給するが, 加齢によりミトコンドリア活性の低下ならびにミトコンドリアDNAの変異が発生し, 胚発生能を低下させることが推察されている. また, 卵子の減数分裂時の染色体不分離の頻度は加齢とともに上昇するが, その発生機序として, 染色体分配をコントロールする紡錘体の形成異常が挙げられる. これらの要素は, 加齢による卵細胞質の機能不全に原因している. その治療方法として, マイクロマニピュレーション技術を用いて, 加齢性不妊患者由来卵子の卵細胞質と若年由来卵子の正常な卵細胞質を置換する方法, すなわち卵細胞質置換技術が有効であると提唱されている. また, 同法は, ミトコンドリア病患者の変異ミトコンドリアDNAを持つ卵細胞質を正常なミトコンドリアを持つ卵細胞質に置換し, ミトコンドリア病の次世代への発症を予防する方法としても有効であると考えられている.

卵細胞質置換の最近の研究成果としては, Tachibanaら (Nature, 2009) によって, アカゲザルの成熟卵子を用いた卵細胞質置換により正常な産仔を得たこと, ならびにCravenら (Nature, 2010) により, 生殖補助治療を受けた患者の前核期胚(異常受精による廃棄胚)の卵細胞質置換で胚盤胞を得たことなどが挙げられる. また, Cravenらのグループの研究は, ミトコンドリア病の次世代への発症防止の目的で英国の受精胚研究機構 (The Human Fertilization and Embryology Authority; HFEA) が認可しており, 卵細胞質置換研究の重要性を認めたものと考ええる.

これらの研究成果を鑑みると, 卵細胞質置換技術のARTへの可能性が期待されるが, 臨床応用化へは, 安全性の問題, 特に, 卵細胞質置換した卵子の卵細胞質における, ミトコンドリアDNAヘテロプラスミーの問題を解決する必要があると考えられる. 本発表では, 卵細

胞置換技術に関する, 国内外の基礎研究の紹介と共に, 臨床応用へ向けての今後の課題について考察したい.

酸化ストレスが引き起こす卵子の障害とその対策



小林 護

木場公園クリニック
リサーチ部

略 歴

2003年 日本大学大学院生物資源科学研究科博士後期課程修了
東邦大学医学部
2005年 北里大学医療衛生学部
2006年 株式会社生物資源応用研究所
2010年 木場公園クリニックリサーチ部

はじめに

細胞内のミトコンドリアでは、酸素を消費し、細胞のエネルギーであるアデノシン三リン酸 (ATP) が合成される。この過程において、使用される酸素の約 2% は反応性の高い活性酸素に変換される。活性酸素は周囲の物質と反応し、細胞毒性の高い活性酸素種 (ROS) を形成する。通常、ROS は細胞内に存在する除去機構 (抗酸化作用) により無毒化されるが、抗酸化作用を上回る大量の ROS が発生すると細胞に障害が生じる。この現象は酸化ストレスと称され、酸化ストレスはネクロシスやアポトーシスを誘導し、結果として細胞死を引き起こす。

酸化ストレスは個体の老化や疾患との強い関連が指摘されており、不妊症の原因の一つとも考えられている。特に高齢者の生殖器では、ROS の蓄積¹⁾ や抗酸化機能の低下²⁾ により卵子や胚に酸化ストレスによる障害が生じるとされている。

酸化ストレスと ART

一般に、哺乳動物の生殖器官内酸素濃度は 2~5% であり、卵子や胚を体外にて操作することは、体内では曝されることがない高濃度 (20%) の酸素に曝することになる。また、光や温度、培養液ならびに ART における各種の操作が配偶子や胚の酸化ストレスを引き起こす要因であることが指摘されており、酸化ストレスによる受精障害や胚発生の停止、フラグメンテーション、染色体異常の増加が報告されている³⁾。配偶子や胚における酸化ストレスの予防的対策として、酸素濃度を体内に近づけた低酸素培養や培養液への抗酸化物質添加の有効性が示されている。

卵子における酸化ストレスのターゲット

卵子・胚への酸化ストレスの結果として受精・発生障害が起こるが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。演者らは、マウス排卵卵子 (MII 期卵子) に過酸化水素 (H_2O_2) を曝露した酸化ストレスモデルを作製し検討を行った。

ATP を産生するミトコンドリアは ROS の産生のもでもあり、ROS により傷害を受ける主たる細胞内小器官でもある。演者らの検討の結果、 H_2O_2 処理により MII 期卵子のミトコンドリア膜電位および細胞質内 ATP 濃度が低下することが確認でき、ミトコンドリア機能が著しく障害されることが明らかとなった。また、それらの卵子では細胞質内カルシウム濃度の上昇が認められ、酸化ストレスによりミトコンドリア膜が変性し、ミトコンドリア内のカルシウムが細胞質に流出したことが考えられた。次に MII 期紡錘体への影響を検討した結果、 H_2O_2 処理時間と濃度に依存して紡錘体が縮小し、その形態も樽型から菱形に変形した。その後、 H_2O_2 を除いた培養液で回復培養を試みたが、紡錘体の正常形態率は低く、 H_2O_2 によるダメージが不可逆的であることが示された。細胞骨格である actin について検討した結果、MII 期卵子に特異的な構造である actin cap が消失することを確認した。

Goud らは、酸化ストレスにより表層顆粒が漏出し、zona hardening が引き起こされ、結果として受精が阻害されることを報告している⁴⁾。

このように MII 期卵子における酸化ストレスのターゲットは様々な細胞内小器官にわたっており、それらに不可逆的なダメージを与え、その結果として受精や発生に障害が生じることが考えられる。

核移植による酸化ストレス障害卵子 (核) の修復

Takeuchi らはミトコンドリアに障害を与えた卵子の核を正常卵子細胞質に移植することで発生の改善が可能であることを示した⁵⁾。演者らは、 H_2O_2 にてダメージを与えた MII 期卵子の核 (紡錘体) を少量の細胞質とともに分離し、不活性化センダイウイルスを用いて除核卵子細胞質に移植することで受精・発生の改善が可能か否かを試みた。 H_2O_2 処理卵核を星状細胞質へ移植した結果、正常な形態を示す紡錘体の割合と ICSI 後の分割率が上昇し、胚盤胞への発生が認められた。これらの結果より、酸化ストレスにて障害された卵子の核を正常卵細胞質

に移植することで発生能の修復が可能であることが明らかとなった。

個体の老化と卵子の酸化ストレス

高齢者の卵子において頻発する染色体不分離は、MI期での酸化ストレスが原因である可能性が示されている⁶⁾。また最近では、高齢者の卵子では抗酸化作用に関与する遺伝子の発現が低いことが明らかとなっている⁷⁾。これらの結果は高齢者の生殖器だけでなく卵子自体も酸化ストレスによる障害を受けやすいことを示しており、高齢者の卵子と酸化ストレスの影響に関する詳細な解明や対策方法の開発が望まれる。

おわりに

酸化ストレスを引き起こす活性酸素やROSは恒常的に生産されているが、培養液への抗酸化剤の添加や培養条件の改善により、卵子や胚への障害を軽減・回避することが可能である。また、体外で卵子や胚を操作することは大量の酸化ストレス（活性酸素種や誘導因子）に卵子・胚を曝露していることにつながり、この点に留意しながら操作する必要がある。

参考文献

- 1) Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J, Alvarez JG: Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. *Fertil Steril*, 86:503-512, 2006.
- 2) Carbone MC, Tatone C, Delle Monache S, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F: Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. *Mol Hum Reprod*, 9:639-643, 2003.
- 3) Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S: The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol*, 29;10:49, 2012.
- 4) Goud AP, Anuradha P, Goud, Pravin T, Diamond, Michael P, Gonik, Bernard, Abu-Soud, Husam M: Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide, and hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med*, 44:1295-1304, 2008.
- 5) Takeuchi T, Neri QV, Katagiri Y, Rosenwaks Z, Palermo GD: Effect of treating induced mitochondrial damage on embryonic development and epigenesis. *Biol Reprod* 72: 584-592, 2005.
- 6) Chao HT, Lee SY, Lee HM, Liao TL, Wei YH, Kao SH: Repeated ovarian stimulations induce oxidative damage and mitochondrial DNA mutations in mouse ovaries. *Ann N Y Acad Sci*. 1042:148-56, 2005.
- 7) Grøndahl ML, Yding Andersen C, Bogstad J, Nielsen FC, Meinertz H, Borup R: Gene expression profiles of single human mature oocytes in relation to age. *Human reproduction*, 25:957-968, 2010.

卵子の老化に配慮した未受精卵救済の試み ～ rICSI, rAOA 実施時期早期化の効果～



沖津 摂

三宅医院 生殖医療センター
培養室長

略 歴

1992年 3月 岡山大学農学部総合科学研究科卒業
1994年 3月 岡山大学大学院農学研究科修士課程卒業
1995年 1月 三宅医院入職
2003年 7月 徳島大学医学部にて学位を取得
現職 三宅医院生殖医療センター培養室長

日本臨床エンブリオロジスト学会理事長, 日本受精着床学会理事, 日本IVF学会理事

はじめに

ARTの中でも高齢症例や低卵巣刺激周期では発育卵胞数が少なく、採取できる卵子数も少ない。そのような症例では特に、高い発生能力を維持した受精卵を効率よく獲得することが治療結果に大きく影響を及ぼす。成熟後の適切な時間内に受精が成立せず、経時的に起こる卵子の質の低下のことを“oocyte aging”という。一方、加齢により妊孕性の低下した女性の卵巣内で起こる卵子の質の低下は“ovary aging”である。本発表では特にoocyte aging (卵子の老化) に着目し、ARTラボラトリーにおいて実施可能な範囲での回避策について論じていきたい。

老化の卵子では、原形質膜microvilliの構造変化による困卵腔内への小胞の放出、表層顆粒の偏在や部分的な開裂、紡錘体の形態異常、ミトコンドリアにおける膜電位の低下やミトコンドリアマトリックスの萎縮などの形態学的、細胞生物学的な特性を呈し、その結果として受精率の低下、多精受精やdigyny (二雌核性受精)、parthenogenesis、染色体異常の増加、胚や胎児の発育異常や発育遅延など様々な機能異常を引き起こすといわれている。しかしこれらの現象はエンブリオロジストとしてARTラボ業務に携わっていると“ovary aging”の場合でも同様に見られるように思える。

ICSIにおける未受精卵の救済

卵子回収直後に第1極体放出有無による卵子成熟(MII)率を調べたところ75.2%だった。これらの卵子の*in vivo*における成熟後経過時間については極体の形態¹⁾などからある程度の予測はできるものの、正確に判断することはできない。もしも一部にTIからMIIへの移行直後の卵子が含まれていたとしても2時間程度の追加培養ではほぼ中期染色体像を有するMIIに到達すると考えられる。したがって、通常では精子注入(ICSI)は卵子回収後4～6時間程度の追加成熟培養後に行われるところ、当院では卵子の過熟への配慮として卵子回収後2時間経過時点を原則としている。受精が順調に進行すればその6時間後までには第2極体放出が完了するはずなので、そ

の頃に未だMIIに停止している卵子は結果的に未受精に終わると予測される。そこでionomycinを用い、ICSIの6時間後に未受精卵の救済を目的とした人為的活性化処理(rAOA; rescue artificial oocyte activation)を行った。その結果、50.0%において正常受精(2PN 2Pb)が確認されたものの、それら救済卵の胚盤胞形成率は低かった(20.0%)。そこでrAOAの実施時期をICSI後6時間から4～5時間に短縮したところ、胚盤胞形成率は改善されたが(55.6%)、rAOA処理に対する卵子の活性化率が低く2PN 2Pb率は33.3%程度と低率だった。つい最近、rAOAをICSI後4～5時間の間に30分間隔で3回に分けて反復施行したところ、高い胚発生能を維持したまま高率に未受精卵を救済できることを確認している(図1)。

通常媒精法(cIVF)における未受精卵の救済(rICSI)

一方、cIVFでは媒精から卵子内への精子侵入の開始までに2時間程度の時間を要することを考えると、卵子回収直後に媒精を行っても良いといえる。もしもrescue ICSI (rICSI)を行うならその実施時期は媒精6～7時間後なので、ちょうどICSIにおけるrAOAと同時刻に該当する。ところが当院でこのスケジュール通りにcIVF後のrICSIを施行したところ、正常受精率は57.0%とある程度受け入れ可能な結果であったものの、胚盤胞形成率は低率(31.9%)だった。さらにICSI周期で卵子回収後の前培養時間を2時間(hCG投与38時間後)とした場合とrICSIの実施とほぼ同じ6～7時間とした場合とで正常受精率および初期胚発生能力を比較したところ、両群間でほとんど差がないことを確認している。以上より、rICSIによって救済された受精卵の発生能力の低下には媒精中の精子もしくは卵丘細胞の関与が考えられる。Qiao TW *et al.*²⁾は、卵丘細胞存在下で卵子の老化が促進されることをマウスで確認しており、そこに可溶性の老化促進因子(aging-promoting factor)の存在を提唱しているが、ヒトにおいても同様のメカニズムが存在するのかもしれない。今後、caffeineやDTT, NOなど実験動物や家畜で卵子の老化抑制効果の確認されている

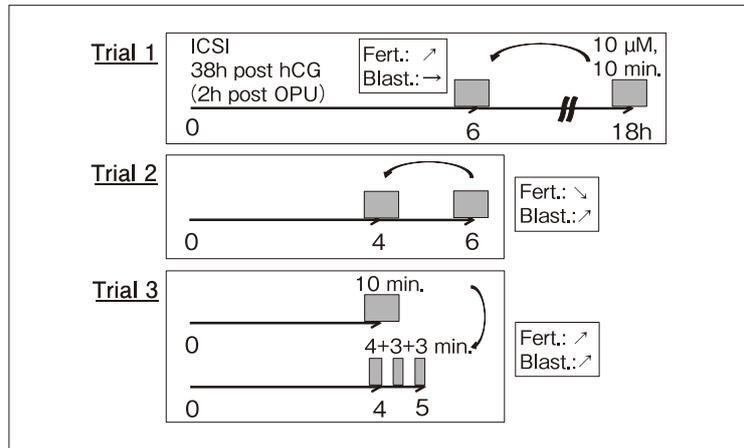


図1 rAOAのタイミングと方法

表1 卵子の過熟に影響を及ぼす化学物質

Chemicals	Effects
L-cystine	Decreases oocyte development to blastocyst stage
β -mercaptoethanol	Decreases development to blastocyst stage and decrease cellular fragmentation
Vanadate	Accelerates oocyte aging
Caffeine	Inhibits oocyte aging
NO	Delays oocyte aging
DTT	Increases fertilization rate and number of embryo cells. Prevents fragmentations and increases blastocyst development. Decreases percentage of ICM cell nuclei with DNA fragmentation
TSA	Porcine: reduces oocyte fragmentation and increases developmental capacity; Mouse: accelerate oocyte aging

Miao YL *et al.*, Hum. Reprod. Update, 2009; 15: 573-585.

chemicalsの有効性をヒトにおいても検証していくことは意義深いと思われる(表1)。

まとめ

高い発生能力を有する受精卵をより効率的に作出するためにはrICSIやrAOA実施時点での卵子の老化へ配慮した上で媒精(精子注入)時期を決定することが必要である。ICSIではrAOAの実施時期を2時間程度早め、さらに反復施行することによって本来、未受精に終わるはずの卵子から高い発生能を有する受精卵を効率的に作出することができる。一方、cIVFでは媒精時間を早めることではrICSI後に作出された胚の発生能を改善することはできなかった。近い将来、卵子の老化抑制への有効性の確認されている様々なchemicalsを加えた新たな培養液(前培養・媒精用培養液)が開発されれば、rICSIによって作出された胚の発生能が改善されるかもしれない。最後に、マウスにおいて老化卵子由来の仔には発育遅延や死産などが増加するとの報告がある³⁾。rAOAの手法や老化抑制効果を加えた培養液が用いられるようになるとすればその安全性も含め、産まれてきた児の予後について継続的に追跡調査を実施していく必要がある。

なお、本発表の詳細は「今日の不妊診療 第2版」(医歯薬出版株式会社)に掲載予定である。

参考文献

- 1) Miao Y, Ma S, Liu X, Miao D, Chang Z, Luo M, Tan J.: Fate of the first polar bodies in mouse oocytes. Mol Reprod Dev 69:66-76, 2004.
- 2) Qiao TW, Liu N, Miao DQ, Zhang X, Han D, Ge L, Tan JH.: Cumulus cells accelerate aging of mouse oocytes by secreting a soluble factor(s). Mol Reprod, 75:521-528, 2008.
- 3) Tarin JJ, Perez-Albala S, Aguilar A, Minarro J, Hermenegildo C, Cano A.: Long-term effects of postovulatory aging of mouse oocytes on offspring: a two-generational study. Biol Reprod, 61:1347-1355, 1999.

難治性不妊夫婦における心理社会的特徴と心理援助



小泉 智恵

(独) 国立成育医療研究センター
研究所 副所長室付研究員

略 歴

1998年 白百合女子大学大学院文学研究科発達心理学専攻修了
1999年 白百合女子大学大学院文学研究科博士(心理学)
1999～2001年 日本学術振興会特別研究員(PD)
2000～2010年 国立精神・神経センター精神保健研究所特別研究員/協力研究員
2001～2005年 長寿科学振興財団リサーチ・レジデント(PD)
2007～2012年 国立成育医療研究センター育児心理科心理療法士
2013年～現職

日本生殖医療心理カウンセリング学会理事, 臨床心理士, 生殖心理カウンセラー

執 筆

小泉智恵他: 不妊検査・治療における女性のストレス. 周産期医学, 35, 1377-1383, 2005.
小泉智恵: 子どもをもつこと, もたないこと 生殖医療と家族の形成 柏木恵子監修 発達家族心理学を拓く. ナカニシヤ出版, p.139-153, 2008.

近年、難治性不妊患者が増加していると言われている。本論文では、難治性不妊とは、元来、妊娠が難しい無精子症や卵巣機能不全(POI)を含め、原因を問わず不妊治療2年以上で妊娠しない症例と定義する。

治療期間から見た難治性不妊患者の心理社会的特徴と心理援助

難治性不妊患者は、子どもを授かりたいという希望がなかなか叶わず、月経が来る度に今回も妊娠できなかったという失敗経験を積み重ねている。心理学や精神医学では、一般に失敗経験を繰り返すことにより、学習性無力感が獲得され、前向きに進むエネルギーが萎え、些細なことでも傷つきやすくなり、悪い方向へ考えやすくなる。学習性無力感とはうつ病や神経症の発症メカニズムの1つとしても知られている。

まず、不妊原因を問わず治療期間と心理社会的状況との関連については、治療期間が長い方が短い方に比べてストレスが深刻で、無力感が強かったが、ストレスへの対処行動は治療期間の長短で有意差が認められなかった。つまり、治療期間が長くなると精神的エネルギーが低下してくるが、そうした渦中でも問題を解決しようと努力しようしたり、少しでも苦しさを逃しつつ日々を送ろうとしたりしていることがわかる。

では、夫婦としてみたときに、夫婦が共同して何かストレス対処を講じているのだろうか、またそれは夫婦関係にどのような影響を及ぼしているのだろうか。筆者らは、生殖補助医療専門の医療施設、特定不妊治療費助成事業窓口、一般向け不妊雑誌にて調査協力者募集を案内し、希望者はインターネットホームページから登録をしてもらった。登録された夫婦に対して、説明と同意を文書にて行ったうえで、郵送法により調査票の配布・回収を行った¹⁾。その結果を夫、妻別に紹介する。夫の場合、治療期間が23カ月以下の群の方が24カ月以上の群より妻へのサポートをより多く行っていて、夫婦の親密性を強く感じていた。妻からのサポート、葛藤には有意差が見られなかった(図1)。これに対して妻の場合は、治療

期間が23カ月以下の群の方が24カ月以上の群より夫からのサポートを多く感じていた。夫へのサポート、親密性、葛藤は有意差が見られなかった(図2)。こうした結果から、治療期間が長くなると夫婦でサポートしあうことは困難になってくる様子が認められた。夫婦がお互いに適度な距離感をもつサポートを表出することが心理援助のポイントになる。

加えて、この調査参加者の中から対面調査を実施し、夫婦間コミュニケーションの行動分析を行った。行動分析の指標はSocial Support Interaction Coding System5で、夫婦の一方が相談者役割、他方が援助者役割をとり、家庭のことについて相談-援助対話を行う。それをシステムに則り符号化し、肯定的、否定的、中立的、課題外に分類した。上述した夫婦関係の調査と実際のコミュニケーションの関係について発表で紹介し、具体的な支援を紹介する。

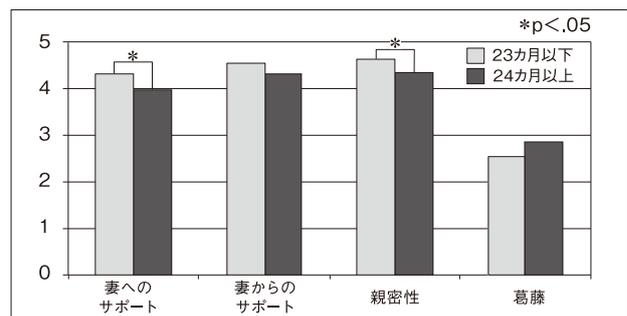


図1 治療期間別・夫から見た夫婦関係

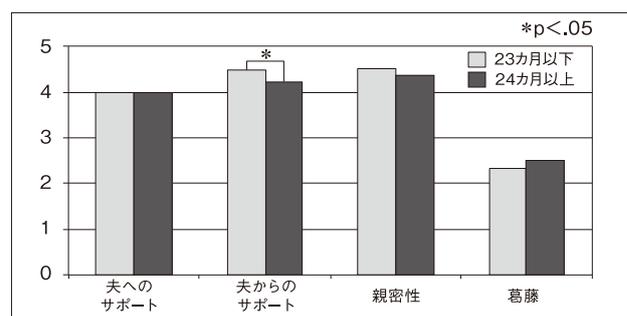


図2 治療期間別・妻から見た夫婦関係

早発卵巣機能不全 (POI) 女性における 心理社会的状況と心理援助

国内外の研究をレビューしたところ、POI女性の心理状態は良好でないという報告が非常に多い。抑うつ、不安、自尊心1、幸福感2、QOL 3、ソーシャルサポート4、性的満足感5など様々な指標で測定しても、POI女性は卵巣機能が健康な女性と比較して良好でなかった。こうした傾向はPOIの原因に関わらず、広く認められた。

国内の研究の大規模データとしては、POIで挙児希望女性160人を対象とした調査で、精神症状はHADSのカットオフ以上で軽度以上の割合は54.9%、そのうち重度は17.0%であった(図3)。また、抑うつをK6で測定したところ、K6のカットオフ以上で軽度うつ以上の割合は65.0%、そのうち軽度うつは32.5%、中度うつは18.5%、重度うつは14.0%であった(図4)。いずれも先行研究と比較して、POI女性の抑うつと不安は、一般人口中の頻度より約3倍強とかなり多いことがわかった。

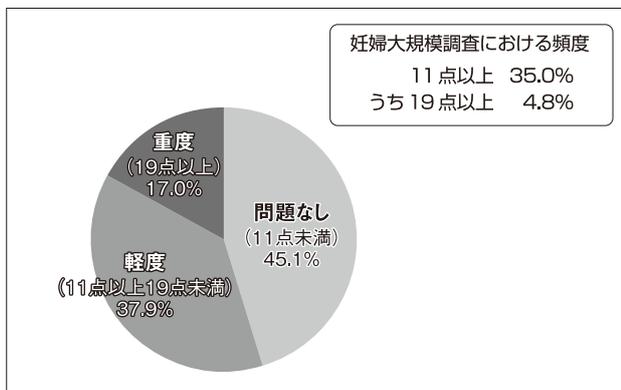


図3 HADSによる重篤度の分布 (POI症例 n=160)

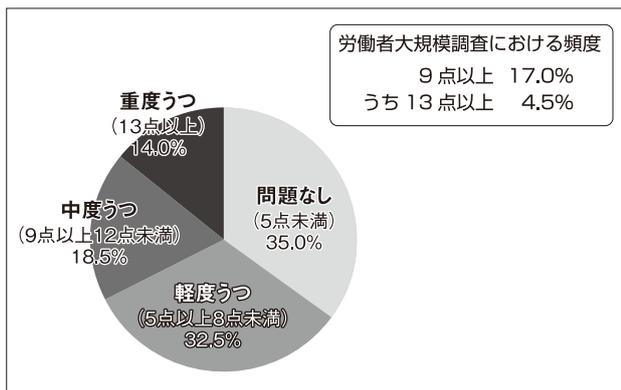


図4 K6による重篤度の分布 (POI症例 n=160)

長期的な観点からPOIの心理面について考えるとき、人生や生涯発達における妊娠・出産する能力や子ども、子孫といった大切なものを“喪失”するという視点から理解することができる。POI患者が自分自身の妊孕力を予期せず突然喪失することに対する情緒的反応は、愛するものを突然亡くした時のグリーフ反応と同様であると報告されている。しかし近年、一時は絶望の淵をさま

よっていたPOI女性が、時間をかけて子どもを産む人生設計を改め、子育てに関係しないゴールを追求すること(ゴール再設定)と自分の人生に意味があると思いつけることより、肯定的感情が高まっていたことも報告されている。つまり、POI女性は妊娠するゴールをあきらめる“喪失”の過程を経て、子育てに関係しない新しいゴールを設定し、前向きに進んでいくという、不妊の受容から成長へとといった心理過程が考えられる。

そこで筆者らは、POI女性を対象として「不妊の受容」による人格発達とその関連要因の検討を行った。不妊の受容とは、不妊によって引き起こされた否定的感情経験を乗り越えて心理的に発達すると定義された。キューブラー・ロスの死の受容モデルやソルデンの疾患の受容モデルを参考にして不妊の受容尺度を作成した。因子分析の結果、理論と同様に6因子(安堵、否定、怒り、取引き、抑うつ、受容)であった。信頼性妥当性ともに十分であった。

POI女性を対象とした調査で、この6因子のクラスター分析により不妊の受容の類型化を行ったところ、下記の3群が抽出された(小泉2012): A群) 否認と取引きが多い群: 不妊・早発閉経を受け入れられず、治療すれば治るという心理。B群) 怒りと落込みが多い群: 治療をしてもうまくいかず、辛さと腹立たしさを痛感するという心理。C群) 受容が多い群: 治療経験で感情が振り回されず、良いところを見て過ごすという心理。

3群間で成長に差異があるか分散分析で検討した。早発閉経とわかってから現在までの治療を通しての人格的成長は、B群よりA群・C群が良好で、物事の長所短所両面を見ながら柔軟に考え対処できる傾向が見られた(図5)。A群は危機を感じていないことによる安定状態、B群は精神的危機状態、C群は危機を経験して人格発達した精神的成長状態であることがわかった。心理援助では、長期的な視野から患者の心理を受け止め、傾聴することも重要である。

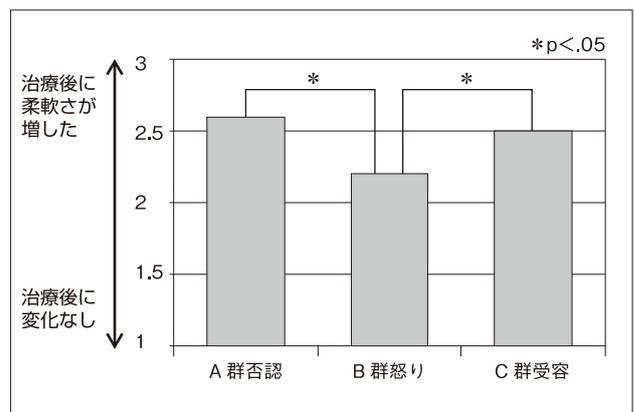


図5 POIの受容群別・POIによる人格発達(柔軟さ)の程度 (n=160)

参考文献

- 1) 小泉智恵, 菅沼真樹, 高江正道, 杉下陽堂, 吉岡伸人, 西島千絵, 河下由記, 河村和弘, 田中守, 鈴木直, 石塚文平: 卵巣機能不全女性における不妊の受容と成長. 日本生殖医学会雑誌, 57: 463, 2012.

アンチエイジングと妊娠力の維持



米井 嘉一

同志社大学大学院
生命医学研究科
アンチエイジングリサーチセンター
教授

略 歴

1982年 慶應義塾大学医学部卒業
1986年 慶應義塾大学大学院医学研究科修了(1988年学位取得)
1986～1989年 Center for Ulcer Research & Education, UCLA客員研究員
1989～2005年 日本鋼管病院内科
2005年 4月～現在 同志社大学教授(2008年組織改編を経て)

日本抗加齢医学会理事, 日本消化器病学会専門医, 日本肝臓学会専門医

著 書

2004年「アンチエイジングのすすめ」(新潮社), 2011年「抗加齢医学入門」(慶應義塾大学出版会), 2012年「なまけ者でも無理なく続く77の健康習慣」(ソフトバンク新書), 「抗糖化」で何歳からでも美肌は甦る」(メディアファクトリー), 2013年「糖質ダウン」で、あなたは一生病気にならない」(日本文芸社)

はじめに

抗加齢医学(アンチエイジング医学)は健康増進と健康長寿を目的とする予防医学である。医療としてのアンチエイジングは機能年齢の老化予防であり若返りを目的としている。卵巣局所に専門特化するだけでなく、抗加齢医学の一環として全身の見地から考えることで、医療の質をさらに高めることが可能である。

若年者への教育を

晩婚化, 高齢出産化の時代であるが, 20から40歳代までに卵巣機能および妊娠力が低下し, 生殖医療の現場では大きな問題となる。アンチエイジングの科目では学生向けには妊娠力を保つための講義を行う。女子学生に卵巣機能が低下する原因を教え, それを防ぐための生活習慣を指導することは極めて重要である。卵巣機能の劣化の背景因子として, メラトニン, 成長ホルモン/IGF-I(insulin-like growth factor-I), DHEA-s (dehydroepiandrosterone-sulfate) などのホルモン分泌の低下(ホルモン年齢の老化), 心身ストレス, 酸化ストレス, 糖化ストレスがあげられる。

ホルモン年齢

ホルモン年齢とは内分泌機能を機能年齢として表したものである。アンチエイジングを機能年齢の老化予防と若返りと考えると理解しやすい。メラトニン, 成長ホルモン/IGF-I, DHEA-sの分泌低下は卵巣機能に悪影響を及ぼし, 妊娠力およびIVF(In Vitro Fertilization)の成績が低下する。睡眠不足はメラトニン分泌を下げるので避ける。適度な運動はIGF-I, DHEA-s分泌を15～20%促進する。不足しているホルモンを知り, それを補充することによりIVF成績は向上する。

心身ストレス

心身ストレスは卵巣機能を低下させる。ストレス負荷によりエストロゲン分泌は低下し, 無月経に至る場合もある。血中DHEA-s/コルチゾール比が不均衡(13未満)の例では, ストレス対策によりホルモンバランスを適正(16以上)に保つよう努める。

酸化ストレス

酸化ストレスにより卵巣は障害を受ける。喫煙, 紫外線曝露, 大量飲酒, 食品添加物, 腸内異常発酵, 汚染物質は体内にフリーラジカルを発生させ, 酸化ストレスの原因となる。①これらの要因を避ける, ②適度な運動により抗酸化能を高める, ③抗酸化物質の摂取, ④体内浄化の指導を行う。体内浄化とは身体に食品添加物, 汚染物質をできるだけ入れないこと, そして腸内細菌叢を整え, 便秘, 腸内異常発酵を避けることである。

糖化ストレス

糖化ストレスとは, インスリン抵抗性が増加し高血糖状態が長く続くことにより, 糖化最終生成物(AGEs)の蓄積, RAGE(Receptor for AGE)シグナルの活性化が生じることである。食育として①よく噛み, ゆっくり食べる, ②低GI食材を選ぶ, ③食べる順序(線維→蛋白質系→炭水化物), ④異性化糖(果糖ブドウ糖液糖)を減らす, ⑤抗糖化物質の摂取を指導する。近年, 正常血糖型糖化ストレスが問題となっている。果糖, アルコール, 中性脂肪もAGEs生成の原因となるので過剰摂取に注意し, 喫煙, 飲酒, 睡眠不足といった生活習慣を是正する。

結語

不妊にならないためには, 20から40歳にかけてできるだけ妊娠力を保つ生活を送ることである。卵巣機能の劣化要因は個人によって差異がある。医療現場では, それぞれにおける最も大きな問題点を見つけ, それを是正することが肝要である。Poor responder症例であっても, メラトニンやDHEA投与, 糖化ストレス改善療法の導入によりIVF成績を向上させることができる。IVFなど高度な生殖医療を行う際には, 卵巣機能の若返りと妊娠力を保つための生活指導を同時に行うべきである。

参考文献

- 1) 米井嘉一: アンチエイジング医学への期待～卵巣のアンチエイジングを考える～. 日本受精着床学会雑誌, 28:1-8, 2011.
- 2) Jinno M, Tamura H, Yonei Y: Anti-aging medicine and reproductive health. Anti-Aging Medicine, 9:6-13, 2012.

早発卵巣不全挙児希望患者に対する ホルモン療法における当院の工夫



杉下 陽堂¹⁾

河村 和弘¹⁾, 田中 守¹⁾,
鈴木 直¹⁾, 石塚 文平²⁾
1) 聖マリアンナ医科大学産婦人科学
2) 聖マリアンナ医科大学
高度生殖医療技術開発講座

略 歴

2004年 聖マリアンナ医科大学医学部卒業, 同大学院 (医学研究科産婦人科学専攻) 入学
2007～2008年 IVFなんばクリニックならびにIVF大阪クリニックに国内留学
2011年～ 聖マリアンナ医科大学産婦人科学助教 (医長)

日本産科婦人科学会専門医, 日本卵子学会 (生殖補助医療胚培養士), 日本がん・生殖医療研究会理事, 日本IVF学会評議員, 日本生殖医療心理カウンセリング学会評議員

はじめに

現在, 早発卵巣不全症例に対する不妊治療は一般的に不可能と言われてきた. 日本産科婦人科学会の定義によれば, 早発卵巣不全 (POI: primary ovarian insufficiency) は40歳未満で発症し, FSH値40mIU/mL以上が2回測定され, 半年以上の無月経となっている. 文献上の自然妊娠率は1～5%との報告もあり, FSH値が40mIU/mLを超えた場合, 妊娠に至るには非常に困難である¹⁾. 当科では, 不可能といわれた早発卵巣不全に対する不妊治療を試みてきた結果, 卵胞形成率は改善しつつある.

触れない旨, ご了承いただきたい

参考文献

1) Lawrence M. Nelson MD.: Primary Ovarian Insufficiency. New England Journal of Medicine, 360: 606-614, 2009.

方法と結果

2009年1月より2011年12月までの間に, 当院早発卵巣不全外来に通院中の挙児希望患者に対し卵巣血流改善を目的としたL-アルギニン製剤7g/日, ビタミンE製剤600mg/日を併用し, カウフマン療法を開始した. カウフマン療法中は, 特にFSH値のコントロールを重視し, 2～3周期ホルモンコントロールを実施後, 卵巣刺激を開始し, 卵巣刺激開始時FSH値を10 IU/L以下とし, エストロゲン製剤投与下におけるrFSH製剤による排卵誘発を実施した. 2009年1月より2011年12月における受診症例の内訳は, ①染色体異常(13%), ②自己免疫異常(33%), ③医原性(15%), ④炎症性(2%) ⑤原因不明・その他(37%)であり, 採卵周期が207周期(137症例), 卵子確認が109周期(77症例), 獲得卵子数が138個, 凍結胚が67個(48症例)であった.

考察

早発卵巣不全と診断された場合, 挙児希望に対する不妊治療は, 非常に厳しい成績ではあるものの, 卵子獲得周期が我々の施設では増加してきている. これにはFSH値のコントロールが重要であると考えられる. 我々は2012年より新規早発卵巣不全治療 (IVA: *in vitro* activation) を開始し, さらに新規ホルモン療法の導入も検討している.

(本講演では, IVA治療ならびに新規ホルモン療法には

がん・生殖医療の実際—本邦における取り組み



鈴木 直

聖マリアンナ医科大学
産婦人科学 教授 (講座代表)

略 歴

1990年 3月 慶應義塾大学医学部卒業
 4月 慶應義塾大学医学部産婦人科入局研修医
 1993年 4月 慶應義塾大学大学院(医学研究科外科系専攻)入学(指導:野澤志朗教授)
 1996年 4月~1998年 9月
 米国カリフォルニア州バーナム研究所 postdoctoral fellow
 2000年12月 慶應義塾大学助手(医学部産婦人科学), 同産婦人科診療医長を兼ねる
 2005年 8月 聖マリアンナ医科大学講師, 産婦人科医長を兼ねる
 2009年 8月 聖マリアンナ医科大学准教授
 2011年 4月 聖マリアンナ医科大学教授, 婦人科部長を兼ねる
 2012年 4月 聖マリアンナ医科大学教授, 講座代表を兼ねる
 6月 聖マリアンナ医科大学腫瘍センター副センター長(緩和医療部会長を兼ねる)

近年, がんに対する集学的治療の進歩によって, 多くの患者がこの病気を乗り切ることができるようになってきた. 一方, 若年患者に対するがん治療は, 性腺機能不全や妊孕性の消失, そして早発閉経などを引き起こす場合がある. 現在, 若年がん患者が妊孕性温存の診療を選択する機会が増加していることから, 治療寛解後のQOL向上を目指して, 的確な「がん・生殖医療」の実践が重要である. がんと診断された患者は同時に多発する問題の自己解決が求められ, 短期間にいくつもの選択を余儀なくされる. 原疾患の治療開始までの時間が限られている中で, いかに正確な情報を患者に伝えるか, そしていかに早期に産婦人科医(特に生殖医療医)と密に連携をとるかが「がん・生殖医療」の実践には必須となる. そして本医療を実践するにあたっては, 医師のみならず看護師, 臨床心理士, 薬剤師そしてソーシャルワーカーなどからなる医療チームの存在が不可欠である. がん・生殖医療と一般不妊症との最も大きな相違は, なによりも原疾患の治療が最優先となる点である. 患者は生殖医療施行中にも常に原疾患の再発・再燃のリスクを負っていて, 限られた時間の中での治療が求められる. 診断時の患者の病状によっては, 主治医は妊孕性温存を断念せざるを得ない事実を正確に患者に伝えるべきであり, 不要ながん治療の延期や中止は避けるべきである. 一方, 本来であれば可能であったはずの妊孕性温存の診療をがん患者に提供できないことがないよう, がん治療医は妊孕性温存の診療である「がん・生殖医療」を十分に理解すべきである. 我々は, 本邦におけるがん・生殖医療に関する医療連携の再構築ならびに的確ながん・生殖医療の実践と啓発を志向して, 特定非営利活動法人日本がん・生殖医療研究会(Japan Society for Fertility Preservation: JSFP)を設立した. がんと生殖の医療に携わる多くの職種の医療従事者の間で, 古くて新しくもあるこのがん患者に対する妊孕性温存の診療の問題点を改めて共有する必要性がある. 本講演では, 7年ぶりに改訂されたASCOガイドライン等海外の現況も併せて, 本邦におけるがん・生殖医療の取り組みに関して概説させていただく.

AMH と卵巢予備能



浅田 義正

浅田レディースクリニック
理事長

略 歴

1982年
1993～1994年

1995年
1995年 5月
2004年
2006年
2010年

名古屋大学医学部卒業
The Jones Institute for Reproductive Medicine, Eastern Virginia
Medical School (Norfolk, Virginia) 米国最初の体外受精専門施設に留學
主に顕微授精(卵細胞質内精子注入法: ICSI)の研究に従事
名古屋大学医学部附属病院分院にてICSIによる治療開始
精巣精子を用いたICSIによる日本初の妊娠例を報告
浅田レディースクリニック開院(現・浅田レディース勝川クリニック)
日本生殖医学会生殖医療専門医
浅田レディース名古屋駅前クリニック開院

著 書

「もう悩まない。赤ちゃんはきっと授かる」(現代書林), 「卵子の話」(シオン), 「おしえて先生! ありがとう先生!」(シオン), 「赤ちゃんは、待ってられない!」(現代書林)

はじめに

少子高齢化, 晩婚化, 晩産化の急激な社会の変化は, 不妊治療においても不妊患者の顕著な高齢化をもたらした。日常の外来では, 40歳を超えた患者が40%以上になり, 原因追究不妊治療から原因不明加齢要因の不妊治療に大きくシフトしてきた。こうした変化の中で, 卵巢予備能が不妊治療の限界や困難さと関わり注目され重要となってきた。

卵巢予備能

日本産科婦人科学会の用語集には卵巢予備能という言葉は収載されておらず, 卵巢予備能は正式に定義されていない。卵巢には卵子の貯蔵庫という役割と, 女性ホルモンを産生し分泌するという内分泌器官としての役割の二つの代表的な機能がある。AMH (アンチミュラーリアンホルモン) が測れるようになる前までは, FSH基礎値を卵巢予備能の目安としていたが, AMHは期待の予備能マーカーとして登場し, 現在一番信頼できるマーカーとなってきた。

AMH (アンチミュラーリアン ホルモン: 抗ミュラー管ホルモン)

AMHは原始卵胞から育ち始めた前胞状卵胞, 小胞状卵胞の顆粒膜細胞から分泌される糖タンパクダイマーで, TGFβスーパーファミリーに属し, 19番染色体上にコードされている。男性胎児で早期に分泌され, 男性ホルモンと共にミュラー管の退縮を促し, 男性生殖器の形成に重要な役割を果たしている。一方, 女性においても胎生32週ごろから発現し, 原始卵胞からの卵胞発育開始と成熟卵胞形成に関与し, 残っている原始卵胞の量と相関すると報告されている。

AMH の測定

AMHの測定はELISA法で測定し, 不安定であるため2検体測定し, その差が大きいときは再検を必要とする。溶血検体では異常高値となるので採血時の注意は欠かせ

ない。測定キットはEIA AMH / MISからAMH Gen II (MBL社) に世界的に統一され, わが国でも2011年下半期から変更になった。測定単位ピコモルpMはナノグラムng/mLに変更され, 7.14pMが1ng/mLに相当すると当初報告された。AMHの測定部位も生理活性のあるMature regionを認識し, より安定したことになっていたが, 実際に換算すると従来の値と比べ違和感があり, 単に換算して理解すればいいのではなく, データの再構築が必要であった。以前の分布と比較すると, 1ng/mLは10～11pMの印象となる。

AMH の特徴

AMH測定で最も注意すべきことはその変動係数(CV)の大きさである。通常ホルモン測定と違い, AMHの測定では旧キットで20%, 現在のキットでも15%のCVを示す。すなわち, 現キットでも30%ぐらいの変動は常時生じることを念頭に置いてAMHの測定値を判断しなければならない。妊娠中の変動, 日内変動, 卵胞期と黄体期の変動等についていろいろ報告はあるが, 本来短期的な変動の多くはCVの変化をみているだけで臨床的には意味がなく, 妊娠の予想には使えない。AMHは小さい卵胞からの分泌量が多く, 卵胞が大きく成熟するにつれその分泌量は減少するため, 臨床上好都合な月経周期に左右されないマーカーである。AMHの測定値の判断はある意味精液検査に似ていると思っている。個人差が大きく, 変動が激しく, 大まかな治療方針の決定には非常に有効であるが, すぐ結果が予想できるものではない。体外受精の調節卵巢刺激においては, AMHは採取できた卵子数とよく相関し, 逆に年齢とAMH値から適切な卵巢刺激法の選択の良い指標となる。

AMH の基準値

AMHに基準値, 平均値はあるものの正常値はない。測定結果からみると, どの年代においてもほとんどAMHが0の人が存在し, 年齢, 測定値は正規分布しない。30代では年齢とAMH測定値は統計的に相関がなく,

その標準偏差は非常に大きく、中央値(中間値)は平均を下まわる(図1, 2)。したがって、正常値を設定することができない。また、不妊患者だけでなく、妊娠した人、出産した人、不妊症でない人のAMH測定値も同様の分布を示し、AMHが非常に低くても多くの人は自然妊娠し出産もしている。

AMHの変化

AMH値は年齢とともに減少するが、何年でどのくらい減少するかはまだよくわかっておらず、今後のデータの集積を待ちたい。AMH値の高い人が低い人よりも低下の割合が大きいというのが現在までの印象である。AMH値が低いのはもともと卵巢予備能が低いのか、AMHが低いために原始卵胞が早く消費され低くなっているのかわかっていない。動物実験ではAMHをノックアウトしたマウスで早期に原始卵胞がなくなると報告されている。多嚢胞性卵巢症候群の患者ではAMHは高値を示し、子宮内膜症患者においては低い傾向がある。卵巢を手術した患者ではAMHは大きく減少し、とりわけチョコレート嚢胞の核出術でダメージが大きい。今後、手術だけでなく悪性腫瘍の化学療法や放射線療法においても、妊孕性温存についてAMHがその定量的評価の中心になると思われる。男性の場合、AMHは精巣のセルトリ細胞で作られ、無精子症患者でも測定でき、精子があるかないかの指標にはならない。

AMHが0であっても妊娠可能

AMH 0は原始卵胞が全くないことを意味している訳ではない。測定感度の問題である程度以下の卵巢予備能になったら、AMHは0になる。AMH 0あるいは測定感度以下は原始卵胞が残り少ないことを意味しているが、原始卵胞の数が0になった訳ではない。残り少ない卵子から受精卵ができれば、年齢に応じた妊娠率が得られる。AMHが0の場合、不妊治療できる期間は短いが妊娠は可能なので頑張ろうという激励に使ってほしい。

AMHから見た卵巢予備能

AMHを測り初めてわかったことは、卵巢予備能が年齢では語れず、個人により全然違うことである。「卵巢年齢」という言葉自体その根拠がなく、正常値もカットオフ値も設定できないという衝撃の事実が判明した。

おわりに

卵巢予備能の変化と卵子の老化について教育・啓蒙を進め、個人の卵巢予備能を正しく評価し、不妊治療、女性の人生設計、人生の選択等に役立ててほしいと願っている。人生を走りながら、同じ年代で自分だけ不妊治療の現場で突然足切り退場にならないために、結婚している、結婚していないにかかわらず、30歳になったら女性は誰でも一度はAMHの測定をしてほしい。

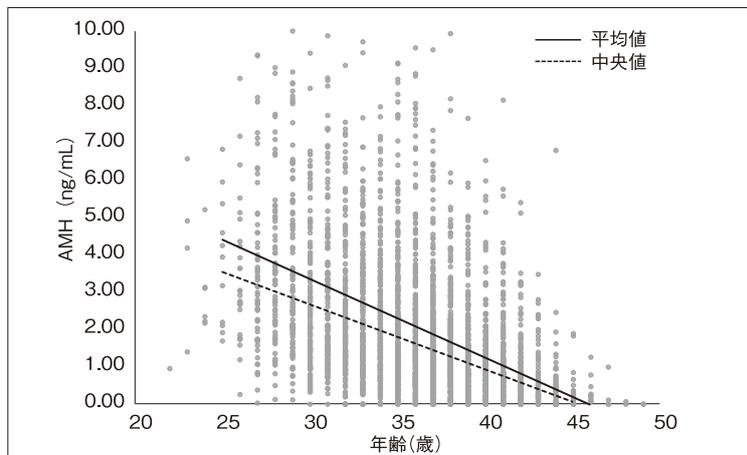


図1 AMHの平均値と中央値(Gen II)

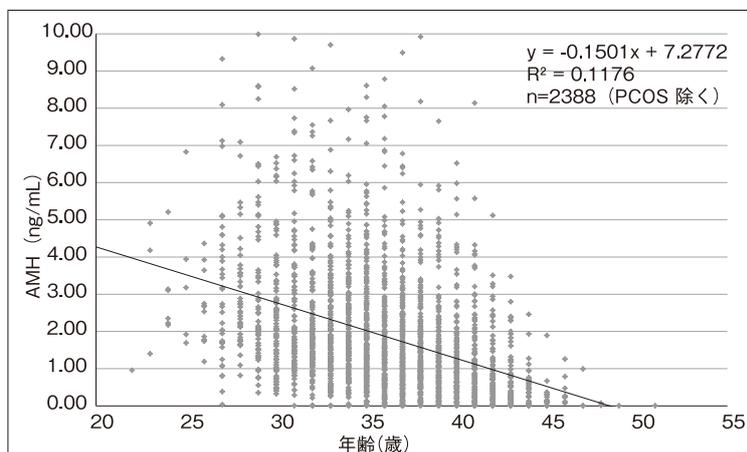


図2 AMH(Gen II) 散布図(PCOSを除く)

マウスモデルにおける雌個体の加齢による卵巣機能の低下 — 解毒作用の低下の可能性 —



島田 昌之

広島大学大学院
生物圏科学研究科
生殖内分泌学 准教授

略 歴

1998年
1999年
2003年
2004～2005年
2006年～
2013年～

広島大学大学院生物圏科学研究科博士課程前期修士(農学)
広島大学生物生産学部助手
山口大学連合大学院獣医学研究科博士(獣医学)
米国 Baylor College of Medicine 客員研究員
広島大学大学院生物圏科学研究科准教授
広島大学若手優秀研究者 (Distinguished Researcher)

はじめに

ヒトを含む哺乳類においては、出生前後にすべての卵母細胞が減数分裂に移行しているため、性成熟後に卵母細胞数が増加することはない。したがって、月経周期毎に一定数の卵母細胞(それが形成する卵胞)が発達し、多くが退行することで、加齢と共に卵巣の卵胞数は減少し、枯渇すると生殖能力が失われる。また、卵巣内に卵胞が残存している段階においても、加齢により生殖能力の減退が始まっている。マウスは、生涯にわたり卵の枯渇はないが(生涯にわたり繁殖能力を維持している)、総産子数は月齢と共に $y=ax$ の直線的な右肩上がりではなく、傾きを表す a の値が6カ月以降で小さくなる。これは、加齢による周産サイクルの延長ではなく、一腹産子数(一度のお産での産子数)の有意な低下に起因している。さらに、外因性ホルモンによる卵巣刺激時の総排卵数においても、6カ月齢以上のマウスで減少することから、加齢により卵巣機能が低下し、卵胞発育の異常や排卵された卵の質の低下を引き起こしていると考えられる。

卵胞発育期における顆粒膜細胞分化誘導因子

性腺刺激ホルモンへの感受性低下(いわゆる low responder)と加齢との関係を明らかとするため、若齢(3週齢)と加齢(6カ月齢)マウス卵巣の比較解析を行った。その結果、6カ月齢であっても形態的には正常な胞状卵胞が形成されていたが、*Fshr*や*Cyp19a1*などの顆粒膜細胞分化マーカーの発現が低値を示していたことから、顆粒膜細胞の機能性低下が加齢に伴う卵巣機能低下の原因と考えられる。卵胞発育期における顆粒膜細胞の機能性獲得に関する研究において、脳下垂体ホルモン、卵分泌因子や顆粒膜細胞オートクライン因子の重要性が、それらの遺伝子欠損マウスをモデルとして示されてきた。FSH β サブユニット遺伝子欠損マウスは、二次卵胞までの卵胞発育は認められるが、胞状卵胞が全く認められない¹⁾。卵分泌因子であるGDF9とBMP15のヘテロ欠損マウスでは、エストロゲンにより誘導されるEGF受容体の発現が抑制される²⁾。さらに、エスト

ロゲン受容体欠損マウスは、胞状卵胞におけるEGF受容体やLH受容体の発現減少により、排卵数が低下する³⁾。以上のことから、FSH依存的な胞状卵胞におけるエストロゲン合成の重要性は明らかである。

エストロゲン合成過程におけるアセトアルデヒド産生

エストロゲン合成は、いわゆる二細胞説(two-cell theory)により説明することができる。すなわち、内葉膜細胞でコレステロールからアンドロゲンが合成され、それが顆粒膜細胞で*Cyp19a1*がコードするアロマターゼによりエストロゲンへと変換される。我々は、コレステロールの側鎖が切断されアンドロゲンへと変換される過程(*CYP17a1*による反応過程)の副産物として、アセトアルデヒドが生成されることを突き止めた⁴⁾。アセトアルデヒドは、一般的にはエタノール代謝の中間産物であり、脂質、タンパク質、核酸を変成させる毒性物質として知られている⁵⁾。しかし、アンドロゲン合成過程のみでなく、 CH_3CHO が切り出されるトレオニンからグリシンへの変換過程やペントースリン酸回路のリボース形成過程でも副産物として合成されると推定され、それに関わる酵素Th1やDERAもまた卵胞で発現していた⁴⁾。すなわち、正常な卵胞発育過程において、アセトアルデヒドが必然的に合成されていることとなる。

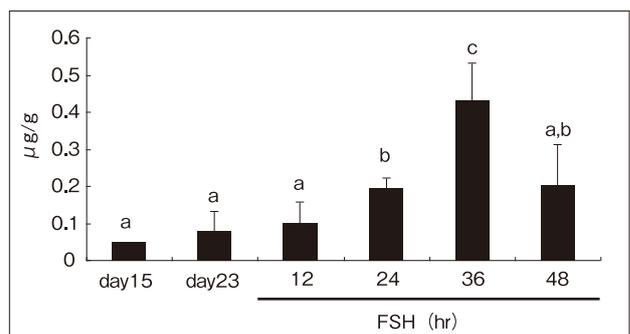


図1 FSH製剤(eCG)を投与したマウスの卵巣内アセトアルデヒド含有量の経時的変化

表 1 eCG 投与時の ALDH 抑制剤同時投与による卵成熟、受精、胚盤胞期胚への発生への影響

	排卵数 ¹	受精率(%) ²	胚盤胞期胚到達率(%) ³
eCG (n=4)	91	78.0 ± 8.1	85.9 ± 8.7
eCG+Cynamide (n=4)	64 ^a	41.4 ± 4.8 ^b	39.7 ± 12.9 ^c

^{a-c};Cynamide 投与により、有意に排卵数、受精率、胚盤胞期胚発生率が低下 ($p < 0.05$)

¹ 各処理区4匹の卵管から回収した総卵数

² 2細胞期胚数 / 排卵数

³ 胚盤胞期胚数 / 2細胞期胚数

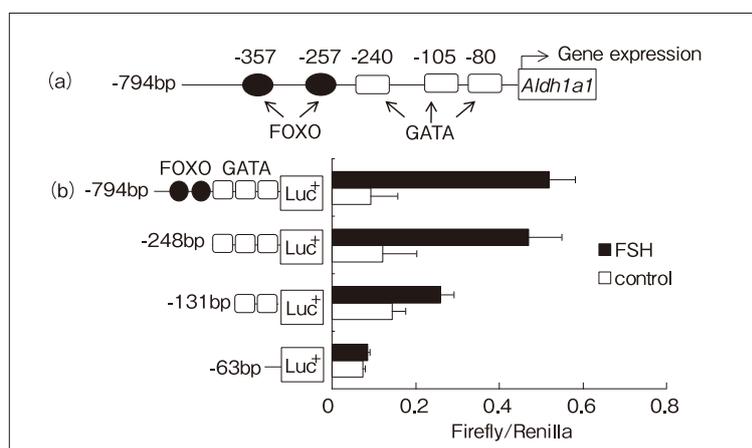


図 2 *Aldh1a1* のプロモーター領域における転写因子結合サイト(a)とプロモーター活性制御機構(b)

実際に、マウス卵巣におけるアセトアルデヒド濃度を測定すると、FSH製剤であるeCG投与後から卵巣内濃度は上昇し、36時間後に最大値に到達後、48時間にかけて低下していた(図1)。この減少は、アセトアルデヒドを無毒化するaldehyde dehydrogenaseをコードする*Aldh* family (*Aldh1a1*と*Aldh1a7*)の発現上昇と付随的であった。さらに、ALDH抑制剤をeCGと同時に投与した時、アセトアルデヒド濃度の有意な上昇が認められた。この時、卵胞の発達は認められたが、*Fshr*, *Lhcgr*, *Cyp19a1*発現が抑制剤無投与のコントロールと比較して有意に低い値であった。さらに、自然交配後に回収した卵において、排卵数の低下のみでなく受精率、胚盤胞期胚への発生率(胚盤胞期胚/2cell)も有意に低い値を示した(表1)。以上の結果から、アセトアルデヒドの代謝分解が、卵胞発育期の顆粒膜細胞の分化および成熟・受精・発生能を有する卵形成に必須であることが示された。

考察

卵胞発育期にアセトアルデヒドを代謝分解する*Aldh1a1*は、転写因子であるGATA4/6依存的に発現が制御されている(図2)。同様に*Cyp19a1*もまたGATA4/6により発現が制御されていることから、高LH/低FSHのアンドロゲン高値なPCOSでは、アセトアルデヒド濃度が上昇し、卵胞内環境を劣悪化している可能性がある。また、low responderにおいてもFSH依存的な遺伝子発現が生じない結果、卵胞内のアセトアルデヒド濃度上昇

が起こっているのかもしれない。これまで、加齢化によるミトコンドリアの呼吸代謝機構の低下に関する研究、活性酸素除去機構の低下などは報告されているが、加齢化によるアセトアルデヒドの代謝機構などの解毒作用に着眼した研究はない。今後、加齢化マウスをモデルとして、アセトアルデヒド代謝機構の加齢化に伴う変化を解明し、卵巣機能低下との関係を明らかにしていきたい。

参考文献

- 1) Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM.: Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*, 15:201-214, 1997.
- 2) Sugiura K, Su YQ, Li Q, Wigglesworth K, Matzuk MM, Eppig JJ.: Estrogen promotes the development of mouse cumulus cells in coordination with oocyte-derived GDF9 and BMP15. *Mol Endocrinol*, 24:2303-2314, 2010.
- 3) Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS.: Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology*, 146: 3247-3262, 2005.
- 4) Kawai T, Mihara T, Kawashima I, Fujita Y, Ikeda C, Negishi H, Richards JS, Shimada M.: Endogenous acetaldehyde toxicity during antral follicular development in the mouse ovary. *Reprod Toxicol*, 33: 322-330, 2012.
- 5) Klyosov AA, Rashkovetsky LG, Tahir MK, Keung WM.: Possible role of liver cytosolic and mitochondrial aldehyde dehydrogenases in acetaldehyde metabolism. *Biochemistry*, 35: 4445-4456, 1996.

卵胞発達における卵母細胞由来の増殖因子の役割



杉浦 幸二

江森 千紘, 川崎 紅

東京大学大学院
農学生命科学研究科
応用動物科学専攻
応用遺伝学研究室 准教授

略 歴

2003年 東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了博士(農学)
アメリカ合衆国 The Jackson Laboratory 博士研究員
2006年 アメリカ合衆国 The Jackson Laboratory Associate Research Scientist
2010年 東京大学大学院農学生命科学研究科応用動物科学専攻准教授

卵母細胞の正常な発達には、多くの増殖因子やホルモンなどが関与しているが、多くの場合、これらの増殖因子・ホルモンの受容体は卵母細胞ではなく、その周囲に存在する卵丘細胞で発現している。すなわち、卵母細胞の発達を制御する多くのシグナルは卵母細胞自身ではなく、それを支持する卵丘細胞をターゲットとして、卵母細胞の発達を制御している(図1)。したがって、卵母細胞の発達制御には、卵丘細胞が重要な役割を果たす。

卵丘細胞の発達は多くの増殖因子やホルモンなどが複雑に関わって制御されるが、中でも卵母細胞が分泌する増殖因子(卵由来シグナル)は重要である¹⁻³⁾。卵母細胞は成長分化因子の一種 Growth differentiation factor 9 (GDF9) や骨形成因子の一種 Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) といった Transforming growth factor beta (TGF β) スーパーファミリーに属する増殖因子を分泌しており、これらの遺伝子を欠損したマウスでは、卵胞の発達や卵丘細胞の分化・機能制御に異常をきたして、不妊または妊孕性の低下を示す^{4,5)}。さらに、卵母細胞は Fibroblast growth factor 8 (FGF8) などの繊

維芽細胞増殖因子も分泌しており、これらの増殖因子が協調的に作用して卵由来シグナルとして働き、卵胞や卵丘細胞の発達に関与することが知られている^{6,7)}。

したがって、卵丘細胞が正常に発達し機能することが卵母細胞の発達には不可欠であり、一方で卵丘細胞の発達には卵母細胞が必要である。このように両細胞は密接に関係しながら発達するが、これは卵-卵丘細胞間の双方向コミュニケーションと呼ばれている(図1)¹⁻³⁾。

卵丘細胞の発達や機能制御には、上記の卵由来シグナルに加えて、下垂体から分泌される性腺刺激ホルモン(卵胞刺激ホルモンや黄体形成ホルモン)や卵胞の体細胞が生産するステロイドホルモン(エストロゲンやアンドロゲン)などが複雑に関与している。例えば、卵由来シグナルとエストロゲンについては、エストロゲンによる卵胞刺激ホルモンシグナルの増幅に卵由来シグナルが必要であることが報告されており⁸⁾、また、我々も最近、卵丘細胞の機能維持に両者が必要であることを報告してきた⁹⁾。

本シンポジウムでは、卵胞の発達における卵由来のシグナルの役割について、エストロゲンとの関わりを中心に、我々の最近の研究結果を用いて紹介したい。また、近年の卵子老化問題について、卵子老化が卵由来シグナルに与える影響についてマウスをモデルとした研究結果についても紹介したい。

参考文献

- 1) Sugiura K, Konuma R, Kano K, Naito K: Role of oocyte-derived factors in ovarian follicular development and ovulation. *J Mamm Ova Res*, 28:8-17, 2011.
- 2) 杉浦幸二. 卵子由来 growth differentiation factor 9 (GDF9). *卵子学*, pp251-262, 京都大学学術出版会, 2011.
- 3) Sugiura K, Eppig JJ: Control of metabolic cooperativity between oocytes and their companion granulosa cells by mouse oocytes. *Reprod Fertil Dev*, 17:667-674, 2005.
- 4) Yan C, Wang P, DeMayo J, DeMayo FJ, Elvin JA, Carino C, Prasad SV, Skinner SS, Dunbar BS, Dube JL, Celeste AJ, Matzuk MM: Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*, 15:854-866, 2001.

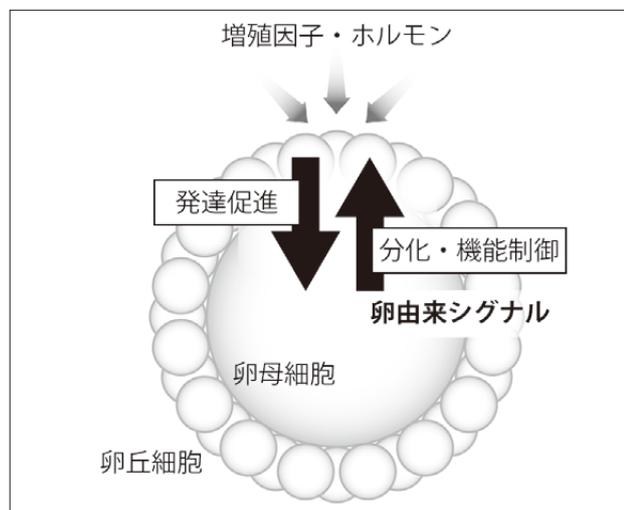


図1 卵-卵丘細胞間の双方向コミュニケーション

- 5) Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM: Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383:531-535, 1996.
- 6) Zhang M, Su YQ, Sugiura K, Eppig JJ: Granulosa cell ligand NPPC and its receptor NPR2 maintain meiotic arrest in mouse oocytes. *Science*, 330:366-369, 2010.
- 7) Sugiura K, Su YQ, Diaz FJ, Pangas SA, Sharma S, Wigglesworth K, O'Brien MJ, Matzuk MM, Shimasaki S, Eppig JJ: Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 134:2593-2603, 2007.
- 8) Otsuka F, Moore RK, Wang X, Sharma S, Miyoshi T, Shimasaki S: Essential role of the oocyte in estrogen amplification of follicle-stimulating hormone signaling in granulosa cells. *Endocrinology*, 146:3362-3367, 2005.
- 9) Sugiura K, Su YQ, Li Q, Wigglesworth K, Matzuk MM, Eppig JJ: Estrogen Promotes the Development of Mouse Cumulus Cells in Coordination with Oocyte-Derived GDF9 and BMP15. *Mol Endocrinol*, 24:2303-2314, 2010.

加齢に伴う卵巣内卵子の染色体分配異常を分子レベルで考える



星野 由美

東北大学大学院農学研究科
動物生殖科学分野 助教

略 歴

2002年
2005年
2006年

2007年～現在
2011～2012年

スウェーデン農科大学獣医学部短期留学
イタリアラキエラ大学医学部短期留学
東北大学大学院農学研究科博士課程修了
日本学術振興会特別研究員
東北大学大学院農学研究科助教
スタンフォード大学医学部客員助教

加齢などにより卵巣年齢が高まると、卵巣内で機能するホルモンに影響が生じ、その結果として卵巣内卵子の質にも影響が表れる。一般的に卵巣年齢の高い卵巣内には成熟可能な卵子は少なく、その卵子の受精・発生能力も低い。受精・発生にエラーが生じる理由としては、卵子の染色体異常などが原因であると考えられており、その詳細なメカニズムの解明が待たれている。本シンポジウムでは、卵子の染色体分配を制御する因子について、紡錘体の制御機構に着目した演者らの研究結果を紹介する。

卵成熟は、核と細胞質の成熟からなり、核の成熟では染色体の整列や紡錘体の形成などが観察される。紡錘体は染色体を正常に娘細胞に分配するための装置であり、細胞が染色体の分配を正常に行うためには、紡錘体の形成・機能を正常にコントロールする必要がある。減数分裂での紡錘体形成メカニズムは、有糸分裂のそれと大きく異なる。すなわち、中心体が紡錘体の両極となり、中心体依存的に紡錘体が形成される体細胞に対し、卵子では、微小管形成中心 (Microtubule organizing center : MTOC) が寄り集まって紡錘体極の役割を果たし、中心体非依存的に紡錘体形成がなされる。このような減数分裂特有の現象を制御する分子機構は未だ明らかになっていない。演者らは、卵成熟に関わる因子を解析する中で Akt / Protein kinase B が卵成熟過程で発現し、分裂中期では減数分裂特異的に紡錘体上に局在することを明らかにした。一般的に Akt の活性化には、Thr308 と Ser473 の 2 カ所のリン酸化が必須であると考えられているが、演者らはマウスの卵子においては 2 つのリン酸化型 Akt が異なる局在を示し、特に分裂中期においては Thr308 リン酸化型 Akt が紡錘体極および微小管形成中心に、Ser473 リン酸化型 Akt が紡錘体上に局在することを明らかにした。さらに 2 つのリン酸化型 Akt は独立して機能し、分裂中期における紡錘体維持と受精後の第 2 極体放出に関与することを明らかにした¹⁾。これらのことは、Akt が減数分裂の進行と完了に機能していることを示している。一方、減数分裂再開に着目して解析を行っ

たところ、活性型 Akt (Ser473 pAkt) は GV 期の後期から微小管と共局在していた。さらに、Akt 活性を阻害すると MTOC の出現が早まり、GVBD と MI 期への進行が早まる結果となった。このことから、Akt が減数分裂再開と紡錘体形成を調節している可能性が示された。

紡錘体形成チェックポイントの異常は、染色体の異数性の直接的な原因となる。このことから減数分裂における紡錘体形成や染色体分配の現象とメカニズムを正確に理解することは重要であり、今後の研究により解明されることが期待されている。

参考文献

- 1) Hoshino Y and Sato E. Protein kinase B (PKB/Akt) is required for the completion of meiosis in mouse oocytes. *Dev Biol.* 2008 Feb 1;314(1):215-23.

Hormonal regulation of preantral follicle growth



Aaron J.W. Hsueh¹⁾

Yuan Cheng¹⁾,

Yorino Sato¹⁾,

Kazuhiro Kawamura²⁾

1) Program of Reproductive and Stem Cell Biology, Department of Obstetrics and Gynecology, Stanford University School of Medicine

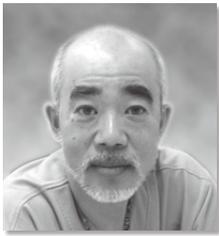
2) Department of Obstetrics and Gynecology, St. Mariana University School of Medicine

Aaron Hsueh is an ovarian physiologist and has published in the field for decades with more than 350 refereed papers. His lab has investigated the hormonal regulation of granulosa cell functions, leading to the establishment of a sensitive *in vitro* FSH bioassay and the design of a long-acting FSH analog (ELONVA) now in clinical use. His lab also contributed to the understanding of ovarian follicle growth and atresia, intraovarian mechanisms of oocyte maturation, and autocrine/paracrine regulation of early embryonic development. The Hsueh lab established and maintained the Ovarian Kaleidoscope Database (OKdb, <http://ovary.stanford.edu>) over the last decade as an online resource for ovarian researchers to search for ovarian literature and DNA microarray data. His lab also launched and maintained Human Plasma Membrane Receptome (HPMR, <http://receptome.stanford.edu>), an online database listing all human plasma membrane receptors matched to their specific ligands. Recently, his lab established an *in vitro* activation (IVA) method to activate dormant ovarian primordial follicles for the derivation of mature oocytes.

Although hormonal regulation of follicle development is an active field of research, most studies concentrate on the regulation of early antral follicle to the preovulatory stage, leading to the successful use of FSH as a therapeutic agent for infertility treatment. Recently, accumulating data indicated that preantral follicles are under stringent regulation by local ovarian hormones, thus providing new therapeutic approaches. Primordial follicles can be promoted to grow following activation of the Akt pathway. Although the exact hormonal ligand(s) involved in stimulating receptor tyrosine kinases (RTKs) for primordial follicle activation has yet to be elucidated, recent use of PTEN inhibitors and phosphatidyl-3-kinase stimulators mimicking activated RTKs promoted the activation of dormant murine and human primordial follicles *in vitro*. Following grafting into hosts, preovulatory mouse and human follicles containing mature oocytes could be generated from activated primordial follicles (Li *et al* PNAS 2010). For secondary follicles, earlier reports demonstrated the promotion of their growth following *in vivo* treatment with oocyte-derived GDF9 / BMP15. We recently demonstrated the exclusive oocyte expression of R-spondin2 in the ovary and the ability of R-spondin agonists to activate the Wnt signaling pathway and to promote secondary follicle growth to the antral stage *in vitro* and *in vivo* (Cheng *et al* FASEB J. 2013). In addition, we demonstrated that granulosa cells secrete C-type natriuretic peptide (CNP) that not only suppresses the final maturation of oocytes but also promotes preantral follicle growth to the preovulatory stage (Sato *et al* Mol Endocrinol. 2012). Of interest, part of the stimulatory effects of FSH was mediated by ovarian increases in CNP expression. Thus, further investigation on the regulation of secondary follicle development by local hormones could provide new approaches for infertility treatment. To avoid

systematic effects of ovarian paracrine / autocrine factors, future clinical applications could involve local administration of these factors to promote preantral follicle growth, followed by the traditional gonadotropin treatments to derive mature oocytes for infertility treatment.

子宮内膜症合併不妊症と ART



本庄 考

IVF 詠田クリニック 副院長

略 歴

1987年 福岡大学医学部卒業
福岡大学産婦人科学教室入局
1996年 福岡大学産婦人科学助教
2003年 IVF 詠田クリニック勤務(副院長)

はじめに

子宮内膜症は、初経年齢の低下、一方での晩婚化、出産年齢の高齢化に伴い罹患率は増加傾向にあり、生殖医療分野でも大きな問題となっている。

日本産科婦人科学会子宮内膜症取扱い規約において、子宮内膜症罹患率は妊孕能を有する女性に対して、不妊症患者では25～50%と有意に高く、子宮内膜症患者の30～50%が不妊症になると報告された。

子宮内膜症における腹腔鏡手術は妊孕能改善に有効で、累積妊娠率は10カ月で35%、50カ月で30歳以下では70%と高い一方、31歳以上では20カ月を過ぎて妊娠率はプラトーとなり、さらに36歳以上では10カ月の妊娠率は22%であった。また高度癒着症例では、術後20カ月までに十分な妊孕能回復は期待できなかった。

以上より子宮内膜症取扱い規約では基本治療方針として、30歳以下と年齢が若く、腹膜scoreが高く、癒着scoreが低く、既往妊娠歴を有する女性においては、妊孕性回復の第1選択治療として外科治療を推奨している。

一方、年齢が高く、癒着scoreが高く、手術時に卵管機能の回復が期待できないと判断した場合には臨床進行情期にかかわらずART適応となることも明言されている。

しかしながら、治療内容と予後に関するMeta-analysisによる解析結果では、子宮内膜症症例は、卵管因子症例に比較しIVF妊娠成立のオッズ比は有意に低下し、重症例は軽症例に比べてさらに低下しており、子宮内膜症性合併不妊はARTの適応であるがIVF治療も奏効しにくいことがコメントされている¹⁾。

以上のように、子宮内膜症合併不妊の取扱いには不妊診療で苦慮することが示されている。今回、当院での子宮内膜症合併不妊のARTについて検討した結果を報告する。

検討1

われわれは以前、腹腔鏡手術例のARTにおける検討で、子宮内膜症合併不妊症例では非子宮内膜症合併不妊症例に比較し卵巣周囲の癒着はfilmyよりdense癒着が多く、卵巣癒着が高度になるに従い、採卵数、受精率、

良好胚数、妊娠率が低下することを報告した²⁾。

腹腔鏡検査は有用であるが、毎回の採卵時の卵巣をオンタイムで評価できないため、ARTにおける採卵術・卵巣穿刺の際に、卵巣の可動性からRe-ASRMの卵巣癒着に従って卵巣癒着スコアリングを行った。癒着の種類をfilmyとdense、癒着範囲を1/3以下、1/3から2/3、2/3以上に分類し、左右卵巣の癒着スコアの合計から、minimal, mild, moderate, severeの4群に卵巣癒着分類を行った(図1)。

その結果癒着minimal群で62%、mild群48%、moderate群49%、severe群33%と卵巣癒着が高度になるに従い妊娠率は低下した(図2)。

また卵巣癒着と卵子の質では、癒着が強固で広範囲になるに従い不良卵子の率は上昇傾向にあり、正常受精卵数は有意に少ない結果となった(図3)。

検討2

子宮内膜症取扱い規約における薬物療法では、療法後の病巣改善や腹腔内環境改善による妊娠成立、病巣消退、消失による手術効果を高める(術前投与)との考え方があり¹⁾、ARTにおいても適応すると考えられる。

そこで、ディナゲスト(DNG)を投与した卵巣癒着を有するART患者(骨盤内手術既往例除外)でDNG投与前後の治療効果を検討した。

卵巣癒着を有する患者で、DNG療法前後でARTを行った50症例を対象とした。ART採卵術からDNG療法開始までは、平均2.6カ月、DNG療法は4カ月行い、DNG療法6カ月以内平均2.2カ月で次のART採卵術を施行した(図4)。

DNG投与前後の採卵術の際に卵巣癒着スコアリングを行い、DNG後の採卵で、少なくとも一側の卵巣で癒着スコアに改善が見られたものを改善と判定。改善率と妊娠成績を評価した。

50例の癒着改善率は36%で、妊娠率は40%で両側卵巣にdense癒着を有する12点以上の癒着重症例30例中53%で卵巣癒着スコアは改善し、40%で妊娠に至った

(図5). 年齢別の検討では30～35歳で卵巣癒着スコアは40%で改善し、妊娠率67%, 35～40歳の改善率は33%で妊娠率は24%であった(図6).

まとめ

ART採卵術において卵巣癒着の程度を知ることは簡便で有用であると考えられた。子宮内膜症合併不妊の解剖学的変化、腹腔内環境異常に対してART治療は奏功するがARTで妊娠に至らず、その原因が子宮内膜症性卵巣癒着による卵子・胚の質の低下と考えられる例に

は、ARTを繰り返すばかりでなく、早期に子宮内膜症薬物療法を積極的に取り入れることも考慮すべきである。

参考文献

- 1) 子宮内膜症取扱い規約第2部 治療編・診療編 2010年1月【第2版】日本産科婦人科学会／編.
- 2) 本庄考, 詠田由美, 園田桃代, 他: 卵巣癒着を有する子宮内膜症と卵巣機能について—卵巣癒着スコアとIVF-ET成績からの検討—。産婦の実際, 48: 1991-1996, 1999.
- 3) 詠田由美他: 採卵術卵巣穿刺時の卵巣癒着スコアリング. 日本受精着床会誌, 27: 229-232, 2010.

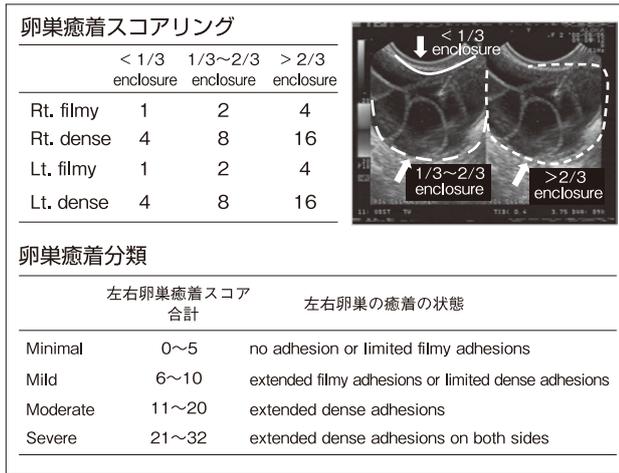


図1 採卵時卵巣癒着スコアリングと卵巣癒着分類

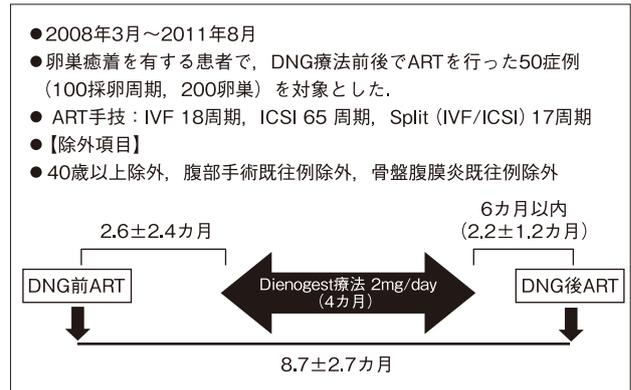


図4 子宮内膜症のARTにおけるDNG治療効果—対象と方法—

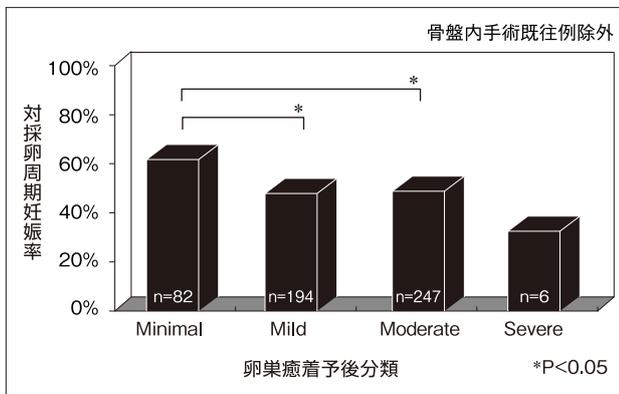


図2 卵巣癒着予後分類と妊娠率

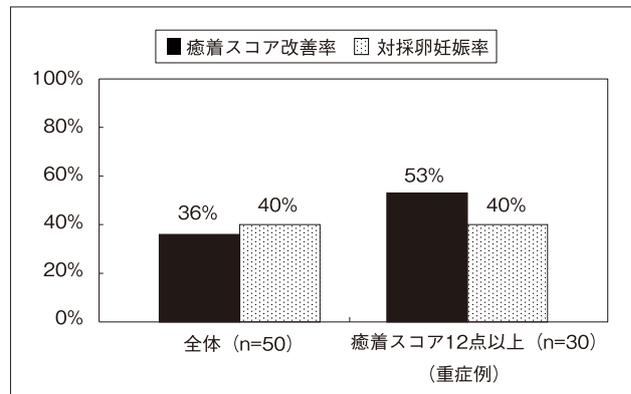


図5 DNG療法後の癒着改善率とART妊娠率

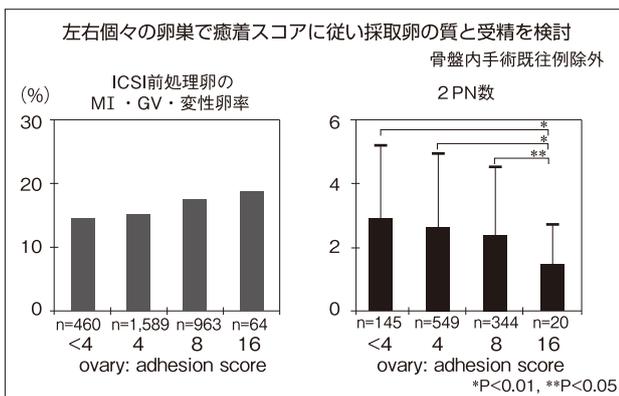


図3 卵巣癒着と卵子の質 (ICSIの検討)

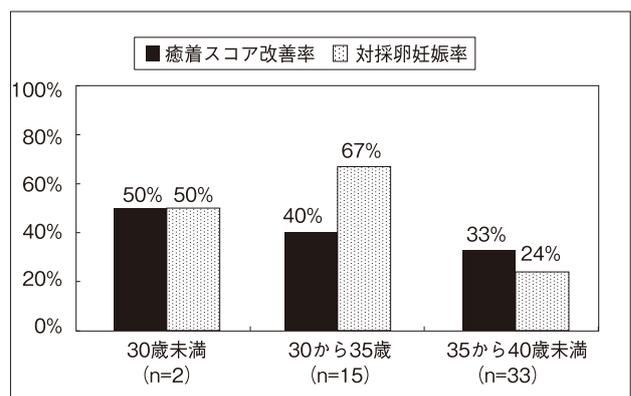


図6 年齢別DNG療法後の癒着改善率とART妊娠率

メラトニンと生殖機能



杉野 法広

山口大学大学院医学系研究科
産科婦人科学 教授

略 歴

1985年 3月 山口大学医学部卒業
1991年 3月 山口大学大学院医学研究科修士・医学博士
1994年 7月 山口大学医学部助手(産科婦人科学)
1996年 5月 米国イリノイ大学医学部生理学講座(G. Gibori 教授) 留学
2001年 4月 山口大学医学部講師(産科婦人科学)
2003年 4月 山口大学医学部教授(産科婦人科学)
2006年 4月 山口大学大学院医学系研究科教授(産科婦人科学)名称変更

日本生殖医学会生殖医療専門医, 日本内分泌学会内分泌代謝科専門医・指導医, 日本内分泌学会代議員, 日本生殖医学会理事, 日本生殖免疫学会理事, 日本生殖内分科学会理事, 日本受精着床学会理事

はじめに

松果体ホルモンであるメラトニンは、明暗刺激で分泌が調節されている中枢神経系ホルモンであり、夜間に多く分泌される日内リズムをもつ。睡眠覚醒といった生体内リズムの調節の他に、脂質代謝、糖代謝、発がん抑制や免疫調節など多様な作用も有する。メラトニンの作用は、内分泌作用(受容体を介した作用)のみならず、活性酸素を消去する抗酸化作用(受容体を介さない直接作用)を有することが証明され、酸化ストレスを抑制することで細胞を保護し、多様な生理機能や種々の疾患の発症、老化・加齢といった現象への関与も明らかとなり注目されている。

卵巣機能のなかで、特に排卵現象は炎症類似の現象と捉えられている。排卵過程においては卵胞内で多量の活性酸素種が発生する。一方、その防御機構として、卵胞内には種々の抗酸化物質が存在し酸化ストレスから卵や顆粒膜細胞を防御している。しかし、このバランスが崩れれば、卵や顆粒膜細胞は容易に酸化ストレスを受け、これが卵の質の低下や顆粒膜細胞の黄体化を障害し、受精障害や黄体機能不全など不妊の原因となる可能性がある。この卵胞内の適正な環境維持にメラトニンが抗酸化物質として貢献している。

本講演では、メラトニンが卵胞内で酸化ストレスから卵子や顆粒膜細胞を保護している役割を持つこと、さらに、メラトニン投与が実際に卵の質を改善させ、受精率や妊娠率の向上に有用であることを解説する。また、メラトニンの長期投与が卵巣の加齢変化を軽減し、不妊治療における大きな課題である加齢による卵の数や質の低下を防止する有用な治療法となりえる可能性についても言及したい。

卵胞内環境とメラトニン

メラトニンは卵胞液中中に高濃度に存在し、卵胞の発育に比例して増加する。成熟卵胞において酸化ストレスマーカー(8-OHdG)とメラトニンには、有意な負の相

関を認める。卵の質が不良な卵胞では酸化ストレスが高い。また、成熟卵胞中のプロゲステロンとメラトニン濃度との間には有意の正の相関を、プロゲステロン濃度と8-OHdG濃度との間には負の相関を認める。すなわち、卵胞内ではメラトニンが重要な抗酸化物質として働き、排卵前に増加するメラトニンは卵胞内の酸化ストレスを抑制することによって、卵の防御と黄体化顆粒膜細胞のプロゲステロン産生に貢献しているという卵胞内環境が推察される。

卵の質とメラトニン

1) 卵に対する活性酸素種とメラトニンの作用

3週雌雌ICRマウスからdenuded oocyteを採取し、酸化ストレスとして、 H_2O_2 を培養液中に添加した。卵の成熟過程では第一減数分裂が再開し、第1極体の放出がみられるため、12時間培養後のoocyteの第1極体放出の割合を観察した。 H_2O_2 添加により、第1極体の放出が抑制されたが、メラトニンを同時添加すると改善した。すなわち、酸化ストレスにより卵の成熟が障害され、これをメラトニンは防御する。

2) メラトニン投与の臨床試験

(a) まず、メラトニンの投与により、実際に卵胞内の酸化ストレスが低下するかどうかを確認した。IVF-ET症例において、前周期の月経周期5日目より採卵日の前日まで連日メラトニン錠(3mg/日、22:00服用)の内服により、卵胞液中のメラトニン濃度は増加し、酸化ストレスマーカー(8-OHdG, HEL)は低下した。

(b) メラトニンの投与によって酸化ストレスを抑制すれば卵の質が改善され、妊娠率の向上に繋がるかどうかを検討した。前回のIVF-ETで受精率が50%未満の症例(115症例)について、56症例はメラトニン錠(3mg/日)を内服後に、59症例は対照としてメラトニン投与を行わずIVF-ETを施行した。メラトニン投与群の受精率は、前回のIVF-ETの受精

率20%に比し、50%と有意に改善した。また56例中11例(19.6%)に妊娠が成立した。一方、対照の59症例では、受精率(約20%)は改善を認めず、妊娠成立も59例中6例(10.2%)であった。

3) メラトニン投与の成績

現在、我々は、ARTが不成功に終わった症例に対し、今回はメラトニン投与の上でARTを行っているので、その治療成績を報告する。対象症例は229例で、前回の不成功に終わった治療周期とメラトニン投与周期の治療成績を比較した。(a)周期あたりの平均発育卵胞数、採卵数および成熟卵胞数には差は認められなかったが、採卵率、成熟卵採卵率、受精率、良好胚率、胚盤胞到達率は、メラトニン周期で有意に高値を示し、38例(16.6%)の臨床的妊娠を認めた。(b)メラトニン投与が、どのような症例に特に有用かを検討した。採卵率<50%、成熟卵採卵率<34%、受精率<50%、良好胚率<50%の基準に該当するグループに分けて改善率をみると、それぞれ76.9%、71.1%、62.8%、31.4%であり、採卵率が悪い症例において最も効果的であった。メラトニン投与により、発育卵胞数の増加は認められなかったが、発育卵胞の卵胞内環境の改善やhCG投与後の卵胞内の卵成熟環境を改善させ卵子の質を改善させることにより、良好卵と良好胚が得られたと考えられる。体外受精不成功例においては、メラトニン投与は考慮されるべき治療法であり、特に採卵率が50%未満の症例に有用であると思われる。

顆粒膜細胞の黄体化とメラトニン

1) ヒト黄体化顆粒膜細胞に対する酸化ストレスとメラトニンの作用

採卵時に採取した黄体化顆粒膜細胞に H_2O_2 を添加するとプロゲステロン産生が抑制され、これはメラトニン添加によりブロックされた。

2) 黄体機能不全に対するメラトニン投与

黄体機能不全患者(黄体期中期の血中プロゲステロン値が10ng/mL未満)に、hCG投与後からメラトニン(3mg/日)を黄体期を通して投与したところ、黄体期中期の血中プロゲステロン値は対照群に比し有意に10ng/mL以上に改善した。

メラトニン長期投与によるマウス卵巣加齢の予防効果

卵胞数の減少や卵の質の低下といった卵巣の加齢が、高齢女性の妊孕能低下の最も重要な因子である。メラトニンの長期投与で卵巣の加齢を予防できるかどうかを検討した。10週齢雌ICRマウスをメラトニン投与群とコントロール群の2群に分け、43週まで同一条件下で飼育した。メラトニン投与群はメラトニン水(100 μ L/mL)を、コントロール群は水を飲水させ飼育した。43週齢でPMSG-hCGによる過排卵刺激を行った。排卵数は、コントロール群 6.4 ± 1.1 個に比し、メラトニン投与群 11.6 ± 3.2 個とメラトニン投与群で多かった。採取した

卵子で体外受精を行ったところ、受精率は、コントロール群21.4%に比し、メラトニン投与群50.9%とメラトニン投与群で高値であった。メラトニンの長期投与によって卵巣の加齢を軽減できる可能性がある。

まとめ

メラトニンが抗酸化作用を有する生理活性物質として働き、卵胞発育、卵成熟、黄体形成などの卵巣機能維持に貢献する。特に、卵胞内でメラトニンが酸化ストレスから卵子や顆粒膜細胞を保護していることは興味深く、メラトニン投与が実際に卵の質を改善させ、受精率や妊娠率の向上という臨床応用に繋がっている。さらに、メラトニンの長期投与は卵巣の加齢を軽減できる可能性があり、不妊治療における大きな課題である加齢による卵の数と質の低下を防止する有用な治療法となることが期待される。

参考文献

- 1) Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N: Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle. *Endocr J*, 60: 1-13, 2013.
- 2) Tamura H, Takasaki A, Taketani T, Tanabe M, Kizuka F, Lee L, Tamura I, Maekawa R, Asada H, Yamagata Y, Sugino N: The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *J Ovarian Res*, 5:5, 2012.
- 3) Taketani T, Tamura H, Takasaki A, Lee L, Kizuka F, Tamura I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Shimamura K, Reiter RJ, Sugino N: Protective role of melatonin in progesterone production by human luteal cells. *J Pineal Res*, 51: 207-213, 2011.
- 4) Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ: Melatonin and the ovary; physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril*, 92: 328-343, 2009.
- 5) Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Reiter RJ, Sugino N: Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res*, 44: 280-287, 2008.

DOR 救済の為の細胞質置換



田中 温¹⁾

田中 威づみ¹⁾, 永吉 基¹⁾,
楠 比呂志²⁾, 渡邊 誠二³⁾

- 1) セントマザー産婦人科医院
- 2) 神戸大学大学院農学研究科
動物多様性教室
- 3) 弘前大学大学院医学研究科
生体構造医科学講座

略 歴

1976年 3月	順天堂大学医学部卒業
4月	順天堂大学医学部産婦人科教室入局
1978年 4月	順天堂大学医学部産婦人科大学院入学
1982年 3月	順天堂大学医学部産婦人科大学院卒業
4月	順天堂大学医学部第一病理学教室入局
1983年 7月	越谷市立病院産婦人科医長
1990年 4月	セントマザー産婦人科医院院長
2003年 12月	臨床遺伝専門医
2005年 12月	日本生殖医学会生殖医療専門医
2006年 9月	日本受精着床学会副理事長
2010年 8月	厚生労働科学研究(成育疾患克服等次世代育成基盤研究員)

目的

老化卵子を用いたART (Assisted Reproductive Technology) では、流産率が高い。その原因の大半は体細胞のトリソミーに関する高い流産率である。この染色体異常を救済する目的で、我々は、MII期置換を報告してきた。カリオプラストの融合方法として従来電気融合法を用いてきたが、今回は核置換の確実性を高めるための直接顕微注入法およびセンダイウイルス法の開発の結果について報告する。本研究は、日本産科婦人科学会倫理委員会の承認を得ている。

(2) 胚盤胞発生率は、34.1% (14/41), 16.7% (1/6), 20% (4/20), 50% (4/8) となり、直接法が高い値を示した。

結論

対象とした卵子が体外成熟MII期卵子であり、また症例数が少ないために、正確な胚発生率の評価が出来ず、新しい直接法およびセンダイウイルス法が現在のところ電気融合よりも明らかに優れているとは言い難い。使用する器具の改良および技術の研鑽を積むことにより成功率は上昇するものと期待できる。

方法

患者の同意のもと、ARTで採卵した未成熟卵子 (GV期, MI期) の卵子を一晩培養しMII期となった卵子を使用した。ノマルスキー微分干渉装置付き倒立顕微鏡下にて、MII染色体真上の透明帯を物理的切除方法にて切開し、2.5 μg/mLまたは5 μg/mLのサイトカラシンBに5分間浸漬後、同一卵子内での核置換を施行した。その後、染色体をカリオプラストとして吸引除去する。除核した体外培養MII期卵子およびカリオプラストをHTFの中で30分間培養後、カリオプラストを直接卵細胞質内へ注入した。18 μmの先端が平坦なガラスピペットでカリオプラストを吸引 (この際大半の細胞膜は両端の一端が破れてしまう)、除核時の開口部より直接細胞質内に注入した。ピエゾのマニピュレーター (intensity 2~3, speed 1~2) で細胞膜を破り、カリオプラストを注入した。注入後、60分間HTF培養液内で培養後、ICSIを行った。センダイウイルスは5~10倍希釈し使用した。

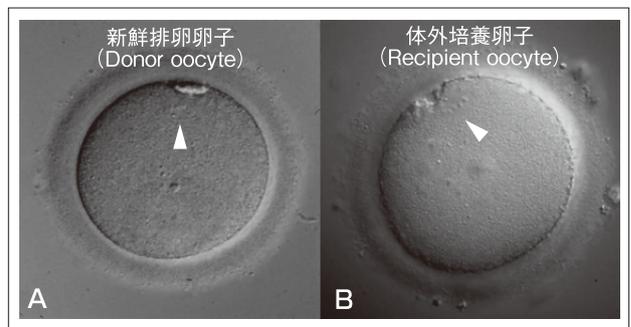


図1 提供卵子と被提供卵子

結果

(1) 電気融合法、ピエゾ法、センダイウイルス法および直接法の融合成功率は、78.8% (41/52), 60% (6/10), 100% (20/20), 80% (8/10), 受精率は78% (32/41), 50% (3/6), 80% (16/20), 75% (6/8) となり、融合成功率、受精率ともにセンダイウイルス法が高い値を示した。

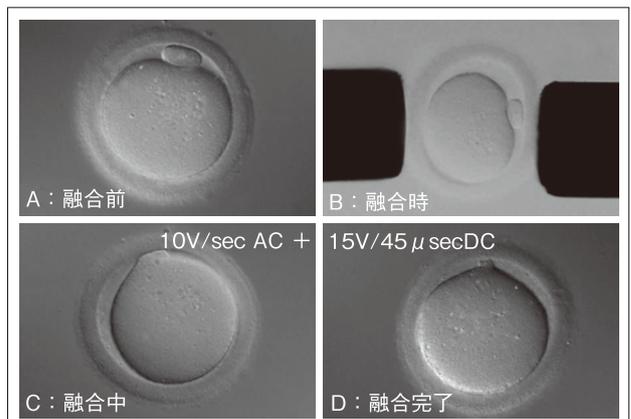


図2 電気融合 (除核した若い卵子と老化卵子のカリオプラスト)

参考文献

- 1) Masahito Tachibana *et al.*: Mitochondrial Gene Replacement in Primate Offspring and Embryonic Stem Cells. *Nature*, 461:367-372, 2009.
- 2) Daniel Paull *et al.*: Nuclear genome transfer in human oocytes eliminates mitochondrial DNA variants. *Nature*, 493:632-637, 2013.
- 3) Masahito Tachibana *et al.*: Towards germline gene therapy of inherited mitochondrial diseases. *Nature*, 493: 627-631, 2013.
- 4) Atsushi Tanaka *et al.*: Metaphase II karyoplast transfer from human in-vitro matured oocytes to enucleated mature oocytes. *RBMOnline*, 19:514-520, 2009.

DOR に対するエストロゲン補充とゴナドトロピン製剤使用



片桐 由起子

東邦大学医学部
産科婦人科学講座 准教授

略 歴

1992年 3月
1996年 4月
1999年 3月
2001年 7月

東邦大学医学部医学科卒業

東京都立荏原病院(現・財団法人東京都保健医療公社荏原病院)勤務
東邦大学医学部産科婦人科学講座助手

Center for Reproductive Medicine and Infertility
Weil Medical College, Cornell University (New York) 留学

東邦大学医学部医学科産科婦人科学講座講師

東邦大学医学部医学科産科婦人科学講座准教授

2007年 7月
2010年 7月
2010年12月～現在

東邦大学医療センター大森病院リプロダクションセンター副センター長、
臨床遺伝診療室室長兼任

日本産科婦人科学会認定産婦人科専門医、日本生殖医学会生殖医療専門医、日本人類遺伝学会、
日本遺伝カウンセリング学会臨床遺伝専門医・指導医、生殖医療に関する遺伝カウンセリング受け
入れ可能な臨床遺伝専門医、日本新生児・周産期学会(母体・胎児)専門医、日本内分泌学会専門医

はじめに

卵巣予備能のマーカーとして抗ミュラー管ホルモン (Anti-Müllerian Hormone: AMH) が注目され、臨床場面で測定されているが、不妊治療の長期化や、あるいは挙児希望で来院した際にすでにAMHが感度以下で測定不能となっている卵巣機能予備能力消失 (Diminished Ovarian Reserve: DOR) 症例は少なくない。DORの中にも、月経周期は保たれていて卵胞発育を認める症例も存在するが、自然な卵胞発育は稀である症例がほとんどで、それらの症例に対する不妊治療には苦慮することとなる。

今回我々は、受診時に卵巣機能がすでに低下していた患者および治療の長期化のために年齢を重ね卵巣機能が低下した患者へのARTを目的として、高年症例のホルモン基礎値を検討し、その結果から取り組んだエストラジオール補充療法およびゴナドトロピン製剤使用について生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology: ART) 成績を検討した。

対象と方法

2009年～2011年に当院での総採卵周期数1,941周期のうち、40歳以上の998周期(51.4%)を対象とし、ホルモン基礎値、ART成績を後方視的に検討し、さらにDOR症例に対してエストロゲン補充とゴナドトロピン製剤使用を試みART成績を検討した。

結果

採卵周期ホルモン基礎値を、卵獲得周期と非獲得周期で比較したところ、FSH値に有意差を認めなかったが、E2値は卵獲得周期において有意に高値であった ($p < 0.05$) (表1)。Day3 E2値が25pg/mL以上の周期では採卵率は96.6%と良好であった (図1)。そのことをふまえ、E2低値症例においても、E2を補充すればE2分泌症例同様の採卵率が得られることを期待し、Day3 E2値が25pg/mL未満の88周期に対してエストラジオールを補充したところ、64.8%で卵胞発育を認め、そのうちの75.4%で卵回収が可能であった (表2)。エストラジオール補充だけでは卵胞発

育を認めなかった症例に対してゴナドトロピン製剤を投与したところ、卵胞発育を認めた症例が22.7%存在した。

まとめ

Day3 FSH値が25pg/mL以上の周期では、卵獲得が高率で可能であり、DORにより治療の開始を断念していた症例でも、エストラジオール補充により卵胞発育が促され、卵獲得が可能であった。また、DORでは反応不良からゴナドトロピン製剤の使用が懸念される場面も存在するが、エストラジオール補充のみで卵胞発育を認めない症例においてゴナドトロピン製剤投与が有効な症例が存在した。

表1 卵獲得周期と非獲得周期の比較

	卵獲得周期	卵非獲得周期	
年齢(歳)	40.6 ± 5.1	41.3 ± 4.7	NS
Day3 FSH (mIU/mL)	14.0 ± 4.2	16.5 ± 11.5	NS
Day3 E2 (pg/mL)	30.2 ± 9.0	24.0 ± 17.0	$p < 0.05$

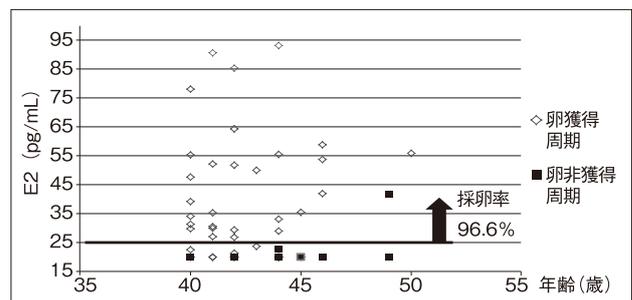


図1 採卵周期における Day3 E2 値の分布～卵獲得周期 vs. 卵非獲得周期～

表2 E2 25pg/mL 未満周期の E2 補充による ART 成績

	／卵獲得 (n=43)	／採卵 (n=57)	／周期 (n=88)
卵胞発育 (n=57)	—	—	64.8%
卵回収 (n=43)	—	75.4%	48.9%
受精 (n=35)	81.4%	61.4%	39.8%
胚移植 (n=25)	58.1%	43.9%	28.4%
妊娠率 (n=2)	4.7%	3.5%	2.3%

卵巣機能低下例に対するアプローチ



渡邊 浩彦

醍醐渡辺クリニック 院長

略 歴

1989年 滋賀医科大学卒業
京都大学婦人科産科学教室入局
1990～1994年 医局関連病院勤務
1998年 京都大学大学院医学研究科卒業
2000年 醍醐渡辺病院(醍醐渡辺クリニックの前身) 副院長
2003年～現在 醍醐渡辺クリニック院長

日本生殖医学会評議員, JISART 会員

はじめに

日本産科婦人科学会集計によるとARTの治療周期総数は増加の一途を辿り、2010年には24万を超え世界最多と目されている。しかし、技術の進歩にも関わらず臨床妊娠率は逆に低下する傾向にある。その主な理由は、受療者の高齢化と反復不成功例の増加と考えられるが、この両者に共通する大きな要因として卵巣予備能の低下がある。2011年にESHREが卵巣予備能低下 (poor ovarian response : POR) の診断基準をBologna criteriaとして公表、警鐘を鳴らした。これによると①患者の高齢や②既往歴 (卵巣刺激を行っても採卵数が3個以下) と③卵巣予備能の異常の3条項のうち少なくとも2条項を満たすこととなっている。卵巣予備能については、FSH基礎値などを検討していたが、AMH値と胞状卵胞数を指標としている。胞状卵胞数と異なりAMHは月経周期のいずれでも測定可能であることから、卵巣予備能の評価法として今日一般的であり、当院でもAMH値を治療前に、ほぼすべての患者で測定している。ところで、AMH値が患者の卵巣予備能の総括的指標であるのに対して、FSH値と胞状卵胞数を卵巣刺激法の選定上どのように考慮すべきか必ずしも明確化されていない。FSHの基礎値はしばしば、変動があるので卵巣予備能の指標として信

頼性に乏しいと言われるが、卵巣予備能の指標としてではなくcd2や3の周期初めのFSH値は「その周期の卵巣の反応性を示す指標」とするのが妥当と演者は考えている。また、周期初めの小さな (5～8mm位の) 基礎 (baseline) 胞状卵胞数は、前周期の黄体期中期に発育を開始しその周期に排卵に向う卵胞数を反映している。今回これら3つの指標、すなわちAMH値、周期初めのFSH値と胞状卵胞数をもとに、症例ごとだけではなく「周期ごと」にも戦略を立て、丁寧に対応することによってPOR症例でも妊娠、出産に至る例を多く経験した。本シンポジウムでは、PORに対し演者が行っているアプローチ法 (図1) を述べ、今後さらなる改善を期すにはどうすべきか考察したい。

対象と方法

2010年1月より2013年3月までの間に当院を受診した症例のうち、AMH値が低値 (0.5ng/mLまたは5.0pmol/L以下) であったが出産または妊娠継続に至った93症例 (うち19例は測定感度以下) の卵巣刺激法をGnRHaのショート法A (cd1よりGnRHa, cd2 or 3よりhMG)、ショート法B (cd2 or 3よりGnRHa, 同日よりhMG)、ショート法C (cd2 or 3よりGnRHa, GnRHa開始3日目よりhMGを少量から開始し漸増)、アロマターゼ阻害剤 (AI) +hMG法、クロミフェン (CC) +hMG法、GnRHaのロング法、hMG+hCG法、自然周期、その他の方法、に分類し後方視的に調べた。

結果

卵巣刺激法の内訳は、GnRHaのショート法全体が50例 (53%) で、そのうちショート法Aが13例 (14%)、ショート法Bが17例 (18%)、ショート法Cが20例 (21%)、AI+hMG法18例 (19%)、CC+hMG法13例 (14%)、GnRHaのロング法4 (4%)、hMG+hCG法2例 (2%)、自然周期2例 (2%) その他の方法7例 (7%) であった (図2)。さらにAMH値が測定感度以下の19症例に限って見ると、GnRHaのショート法全体が6例 (32%) で、そのうちショート法Aが1例 (5%)、ショート法Bが2例 (11%)、

- ・ 症例ごとでなく周期ごとの対応が原則
- ・ AMHは残りの原始卵胞数を反映するが、FSHはその周期の卵巣の反応性を示すと考える
- ・ 周期初め (cd 2, 3) の小さな (5～8mm) の胞状卵胞を数える
- ・ FSHが比較的安く小さな卵胞も3～4個以上ある時はshort法で一気に育てる
- ・ FSHが高く小さな卵胞も不明瞭な時は強力なカウフマン療法で卵巣を休ませる
- ・ FSHが中程度で小さな卵胞が1～3個の時はクロミフェンやレトロゾールなどが良いかも
- ・ 高すぎるFSH/LHを下げるために、GnRHアゴニストやエストロゲンの錠剤・貼付剤を用いることもある
- ・ 同じ誘発法ばかりでなく、違った方法を試してみる

図1 卵巣予備能が低い症例に対する私の戦略

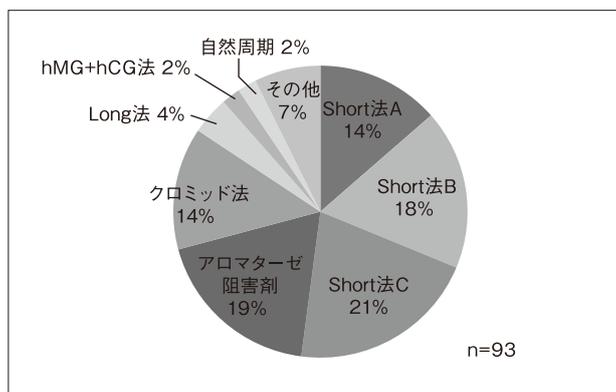


図2 排卵誘発法の内訳

表1 AMH 低値症例における排卵誘発法の目安

胞状卵胞数	FSH 値 (mIU/mL)	排卵誘発
0～1 (個)	25 以上	カウフマン療法 (ペラニンデボン+プラノバルなど)
1～3 (個)	15～25	クロミッド+hMG法 or アロマトーゼ阻害剤+hMG法
3～4 (個) 以上	15 以下	Short 法 A. B. C

ショート法Cが3例(16%), AI+hMG法7例(37%), CC+hMG法1例(5%), GnRHαのロング法0例(0%), hMG+hCG法1例(5%), 自然周期0例(0%)その他の方法4例(21%)であった。

考察

出産または妊娠継続に至った症例の卵巣刺激法は、バリエーションを含めたGnRHαのショート法が一番多く続いてAI+hMG法が多かったものの多岐にわたっており、一定の方法が良いという結論には至らなかった。AMH値が低く卵巣予備能(OR)が低下した症例においても、hMGやその他の薬剤に対する反応性や発育の可能性のある卵胞数は周期ごとに変化している場合が多い。あくまで後方視的検討なので、治療成績において画一的な排卵誘発法との比較は行っていないが、AMHの値をもとに排卵誘発法を決めてしまい同じ方法ばかりを繰り返すのではなく、個々の患者の周期ごとの状態に合った排卵誘発法を行うことが重要であると考え。さらに細かな対応が求められるものの、これまでの検討ではFSHの基礎値と基礎胞状卵胞数から次の3群に分けて刺激法選択の要約とすることが可能であった。グループ1: 周期始め(cd2～4)のFSHが25以上と高くかつ胞状卵胞も観察できない場合は、強力なカウフマン療法によりなるべくFSHを下げ次の周期以降に期待する。グループ2: 治療経過やOR低下の程度にもよるが、FSHが15～25くらいで胞状卵胞数も1～3個程度ならAI+hMGやCC+hMG, グループ3: 胞状卵胞数が3～4個以上でFSHも15以下ならショート法で一気に育てる(表1)という戦略である。しかし、早発閉経に近

いORの極端な低下例では、上記の理論だけでは現実には無理である。そういったケースに対しては、まずは高すぎるFSH(LH)を下げることで、そして卵胞が育つのを待つことで未熟なうちに起こる早発LHサージを防止しつつ発育をサポートし、最適な時期に成熟卵を回収する。このためには、患者も主治医も焦らず辛抱強く治療を続けることである。そうすることで難治症例でも思いがけず良い結果が出ることもしばしばある。講演ではいくつかの成功例も提示したい。

卵巣予備能低下の新しい治療戦略： 糖代謝と終末糖化産物の重要性



神野 正雄

ウィメンズクリニック神野
院長

略 歴

1980年
1983年
1985年
1986～1988年
1989年
1990年
1991～2004年
1998年

2002年～現在
2011年

慶應義塾大学医学部卒業
同大学院入学、体外受精を開始
日本最初の体外受精による双胎妊娠に成功
米国 Eastern Virginia Medical School に留学
慶應義塾大学大学院医学研究科卒業
Charles Thibault Honorary Lectureship を受賞 (卵体外成熟法の研究)
杏林大学医学部産婦人科で講師そして准教授
世界体外受精会議記念賞を受賞 (レーザー子宮内膜組織血流量測定と着床能の研究)
ウィメンズクリニック神野院長
世界体外受精会議記念賞を再び受賞 (終末糖化産物に着目した卵巣機能障害の新しい治療戦略の研究)

はじめに

遺伝的素因に加齢と不良な生活習慣が加わると、insulin抵抗性 (IR) を起こし、IR症候群を生じる。IR症候群には、糖尿病や高血圧症はもちろん、多嚢胞性卵巣症候群も含まれる。IRからinsulin分泌能低下が生じると、まず食後高血糖が起きる。食後高血糖は、終末糖化産物 (advanced glycation end-products, AGE) や酸化ストレスを増加し、IRとinsulin分泌能低下をさらに増悪し、悪循環を繰り返して糖尿病へと進展する。本講演は、卵巣予備能低下における糖代謝とAGEの重要性と、それに基づく新しい治療戦略について述べることにする。

1) 卵巣予備能低下における糖代謝とAGEの意義

ART症例881人において、75g糖負荷試験 (OGTT) とlong法による初回ART成績との相関を調べた。OGTTは、正常型 (799例, 90.7%)、境界型 (74例, 8.4%)、糖尿病型 (8例, 0.9%) であった。各型における採卵数と胚発育率 (Day2胚数/卵数) は、12.3, 11.5, 9.5個, 52.1, 47.3 ($p < 0.01$ vs 正常型), 47.4%と、耐糖能の悪化とともに卵数と胚発育率が低下した。0, 30, 60, および120分の血糖およびinsulin値と、Day2胚数との相関を調べると、60分, 120分の血糖値 ($R = -0.1, -0.1; p < 0.01$) と120分のinsulin値 ($-0.1, p < 0.05$) のみが有意な負の相関を示し、空腹時値, HOMA-R, insulinogenic indexは有意な相関を示さなかった。

このように耐糖能低下は卵巣機能、卵胞発育の不良と関連し、IRから最初に生じてくる糖負荷後の血糖とinsulin値の上昇が、最も鋭敏な指標と示された。

次にART 157例で採卵時に血液、卵胞液中のtoxic AGE (TAGE), pentosidine (Pent), carboxymethyl-lysine (CML) を測定し、ART成績、術前臨床検査とAGE値との関連を解析した¹⁾。血清TAGEと卵胞液TAGE, Pent, CMLは、卵胞数, 血清E2, 採卵数, 受精卵数, 胚数, 良好胚数と、有意な負の相関を示した。年齢, BMI, Day3-FSH, 既往ART数, 卵管因子, 卵巣機能障害, 血中と卵胞液中TAGE, Pent, CMLの12因子

のうち、年齢, 血清TAGE, 卵胞液Pentの3因子のみが継続妊娠と有意に相関した (logistic regression)。

血清TAGEと年齢が採卵数と継続妊娠率に及ぼす影響を図1に示す。血清TAGEが7.24以上の女性では、7.24未満の女性に比し、採卵数も継続妊娠率も加齢とともに急激に低下した。妊娠率の低下はすでに35歳未満で認められた。同様に、血清TAGEとDay3-FSHが採卵数と継続妊娠率に及ぼす影響を調べると、血清TAGEが7.24以上であると、Day3-FSHが正常 (< 10 IU/L) であっても、採卵数も継続妊娠率も著しく不良であった (図2)。ここで重要な点は、Day3-FSHは卵巣に残存する原始卵胞数が著名に減少してからやっと異常となる指標であるのに対し、TAGEは卵胞数減少に先立ちその病因の一つとして上昇すると推察され、TAGEが上昇し始める早期に対処すれば卵胞が破壊され減少する前にそれを食い止めることが可能と考えられることである。

このように、AGEはARTの卵胞発育, 受精, 胚発育, 妊娠成否とよく相関する。AGE蓄積は、年齢, Day3-FSHと独立した新しい卵巣予備能低下の指標で、治療可能な時期での早期診断に有用である。

以上の如く、卵巣予備能低下の病因には2型糖尿病と

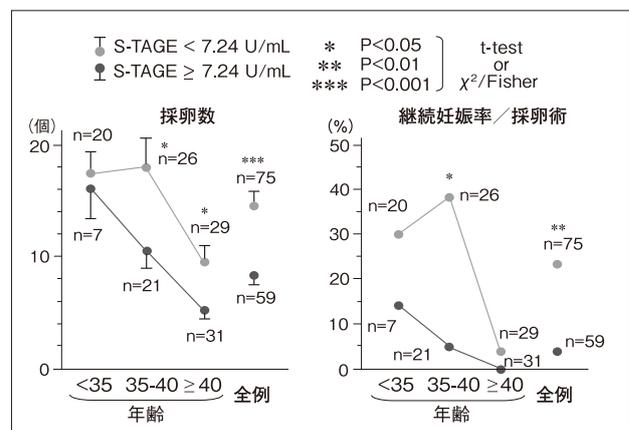


図1 血清TAGEと年齢が、採卵数と継続妊娠率に及ぼす影響 (Jinno M, et al., 2011)¹⁾より改変)

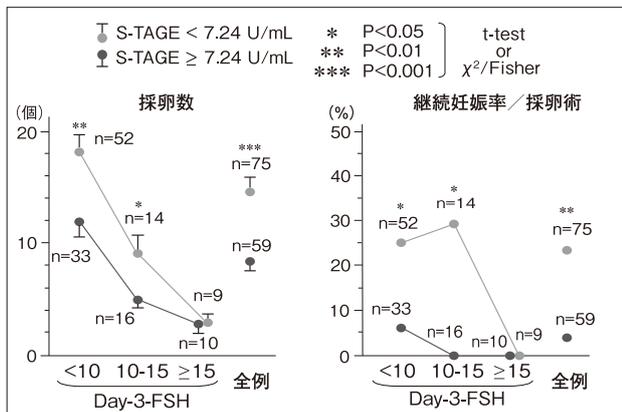


図2 血清 TAGE と Day-3-FSH が、採卵数と継続妊娠率に及ぼす影響 (Jinno M, *et al.*, 2011¹⁾より改変)

大変共通したものがある。そこで小生は卵巣予備能低下の一つの病因機序を以下の如く推察する。卵胞でのIRや、そのIRを代償するための相対的な卵胞でのinsulin不足が、卵胞でのmitochondriaのエネルギー代謝を不調とし、卵・卵胞での酸化ストレスを増加する。あるいは全身的に、IRと引き続き起きるinsulin分泌能の低下から食後血糖の上昇傾向をきたし、AGE産生が増加しAGE receptor (RAGE)を介して酸化ストレスが増加する。いずれにせよ酸化ストレスの増加が、IR、insulin分泌能低下、AGE産生のすべてを促進するため、多重の悪循環が生じる。その結果、卵胞およびその微小血管系の細胞と組織において、insulin効果不足(mitochondria機能不足)、酸化ストレス、AGE蓄積、血管内皮細胞障害、血栓形成傾向、炎症が誘発加速され、卵・卵胞の発育不良とその消失加速(卵胞閉鎖の促進)に至ると考える。卵胞でのinsulin効果不全のみで十分に不妊を起こすため、高血糖や糖尿病の他の臨床検査異常のような全身的なinsulin効果不全の徴候を必ずしも伴わない。

以上より、この病因の悪循環をどこで断ち切っても卵巣機能障害の新しい治療法へと繋がるのではないかと著者は推察した。そこで次節で述べる諸種の新しい卵巣機能障害治療法へと発展した。

2) AGE低下による新しい卵巣機能障害治療法¹⁻⁴⁾

AGEを低下すると報告されている薬物⁵⁾の中から、(1)脂溶性ビタミンB1誘導体のbenfotiamine^{1,2)}と(2)insulin増感剤のmetformin³⁾を選び、まず試みた。次に最近、(3)新しい糖尿病治療薬で、incretin分解酵素のDPP-4を阻害することによりincretinを増加し、よって主として食後高血糖を下げる sitagliptinを検討した⁴⁾。

(2-1) benfotiamine^{1,2)}

3回以上のARTで継続妊娠しなかった poor responder 7症例に、benfotiamine 75mg/日を約2カ月投与し、再びARTを施行した。benfotiamine投与は卵胞液CMLとTAGEを有意に低下し、卵あたりの良好胚数を有意に増加した(図3)。採卵術あたり臨床妊娠率は、増加傾向を示した(図3)。

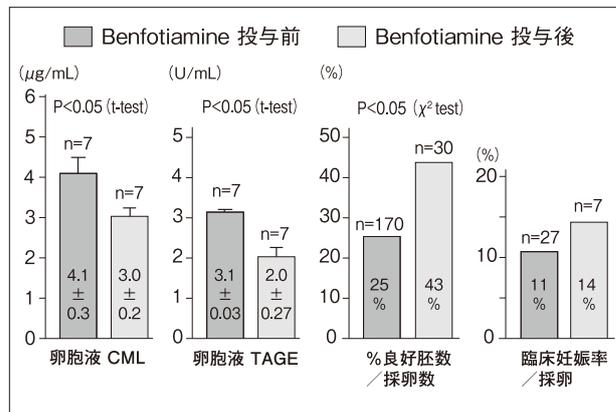


図3 Benfotiamineの卵胞液AGEとART成績への改善効果(神野正雄, 2010²⁾; Jinno M, *et al.*, 2011¹⁾より)

(2-2) metformin³⁾

IR関連の9因子(年齢、BMI、既往ART数、血糖、insulin、HOMA-R、収縮期血圧、ALP、 γ -GTP)による判別スコア³⁾(表1、判別スコアが0.6647以上のときmetformin有効と推定する)から、metformin有効と推定されたART反復不成功33例に対し、前方視的かつ無作為にmetformin(500mg/日)を投与/非投与にてARTを行った。投与(18例)vs非投与(15例)で、継続妊娠率は56%vs20%、着床率(GS数/移植胚数)は33%vs7.1%と、ともにmetformin投与群で有意に高かった³⁾(図4)。

(2-3) sitagliptin⁴⁾

前述のmetforminは一部の卵巣機能障害にのみ有効で、無効例も多い。このことは、糖尿病の機序としてinsulin分泌不全も高頻度であることを考えると、当然とも考えられる。そこで、血糖増加に応じた適量なinsulin分泌増加をインクレチン増加により引き起こすsitagliptin⁶⁾を用い、重症卵巣機能障害の新しい治療を試みた⁴⁾。

Metformin療法を含め諸種卵巣刺激法でART反復不成功(5.8±0.6回)の高齢不妊(41.0±0.5歳)44例を対象とした。月経第3日にOGTT、ホルモン、臨床検査、TAGEを測定後、sitagliptin(ジャヌビア)50mg/日を投与開始した。1カ月後の月経第3日に同じ検査を行い、さらに1カ月投与後にlong/BR法で卵巣刺激しARTを施行した。年齢、既往ART回数、Day3-FSH値を対象と合わせたsitagliptinを使っていないART症例を無作為に抽出し、matched control(対照群)とした。そしてsitagliptinの有効性、適応、作用機序を検討した⁴⁾。

発育卵胞数、採卵数、胚数、良好胚数はsitagliptinで有意に増加した。臨床および継続妊娠率は、sitagliptin群20%、14%、対照群2.3%、0%と、sitagliptin群で著しく高かった(P<0.05)。投与前検査42項目につきANOVAとlogistic回帰で解析すると、free testosterone(FT)と中性脂肪(TG)のみが、sitagliptinによる継続妊娠率と有意に相関した(odds比:2.40と1.03)。OGTTでは、sitagliptin投与により、0、30、60、120分の血糖値がすべて有意に低下した。Sitagliptin投与による各検査項目の

表1 Metformin ART の継続妊娠を予測するための判別分析：9 因子に対する係数³⁾

Metformin 投与前の因子 (単位)	係数
年齢	-0.349
Body mass index (kg/m ²)	0.064
既往 IVF 不成功回数	0.455
空腹時血糖 (mg/dL)	0.248
空腹時 insulin (μ U/mL)	1.314
HOMA-R	-6.111
収縮期血圧 (mmHg)	0.037
ALP (IU/L)	0.005
γ -GTP (IU/L)	0.052

$$\text{判別スコア} = \sum (\text{因子} \times \text{係数}) - 17.536$$

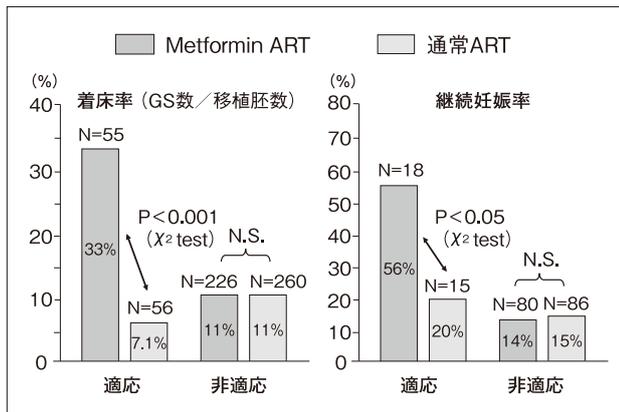


図4 Metformin 適応/非適応群における Metformin ART と通常 ART の成績

(Jinno M, et al., 2010³⁾より改変)

変化率と良好胚数の増分(対象の既往ARTと比較)との相関をspearmanと重回帰で分析すると、TAGEとDHEA-Sのみが有意に相関した(β : -0.32と0.41)⁴⁾。

本研究はsitagliptinの不妊治療での有効性を示す世界最初の報告である。Sitagliptinはmetformin無効のART反復不成功の重症高齢不妊に有効で、卵胞発育、胚発育を改善し、妊娠率を増加する。妊娠成功とFT値に有意な相関を認め、適応としてPCOSが示唆された。食後血糖とTAGEの減少、およびDHEAの増加が作用機序に関与すると考える。

おわりに

小生は、“IR syndromeの最も早く現れる症状が不妊である”と考えている。生物には2大命題がある：生き延びること(個体保存)と子孫をつくること(生殖)である。しかし優先されるのは、当然、個体保存である。つまりIR syndromeで体調が悪くなってくると、省エネモードとなり、生きるのに必要のない生殖がまず切り捨てられる。それでも節制しないでいると個体保存もままならず、病気・死が訪れるのである⁷⁾。多くの不妊患者が、生活習慣の是正や糖尿病治療薬で妊娠していくのを見るたびにこれを実感する。逆に不妊のスクリーニングは、糖尿病、高血圧、脂肪肝などを含めたIR syndrome

に対し、今以上の超早期発見・治療に貢献すると考える。

AGEは生殖医療での卵胞発育、受精、胚発育、妊娠成否とよく相関する。AGEの蓄積は、年齢、Day3-FSHと独立した卵巣機能障害の新しい指標で、その早期診断、早期治療に有用である。さらに食後血糖やAGEの低下は卵巣機能障害の新しい治療法となる。さらにsoluble RAGEやRAGE antagonistの開発によりAGEの有害作用をブロックすることも将来の有望なアプローチと考える。

参考文献

- Jinno M, Takeuchi M, Watanabe A, Teruya K, Hirohama J, Eguchi N and Miyazaki A: Advanced glycation end-products accumulation compromises embryonic development and achievement of pregnancy by assisted reproductive technology. Hum Reprod, 26:604-610, 2011.
- 神野正雄：ワークショップ7-2: 高齢不妊は戦える：終末糖化産物(AGE)に着目した新しい治療戦略。第28回日本受精着床学会講演抄録集, Page 129, 2010.
- Jinno M, Kondou K and Teruya K: Low-dose metformin improves pregnancy rate in in vitro fertilization repeaters without polycystic ovary syndrome: Prediction of effectiveness by multiple parameters related to insulin resistance. Hormones (Athens), 9: 161-170, 2010.
- Jinno M, Takeuchi M, Watanabe A, Teruya K, Hirohama J, Hatakeyama N, Hiura R, Suci N: Successful pregnancies by sitagliptin administration in very severe cases with repeated failures of assisted reproductive technology: implication of decreasing postprandial glycemic levels and advanced glycation end-products for its mechanism. J Assist Reprod Gen, 2013 (under submission).
- Thomas MC, Baynes JW, Thorpe SR and Cooper ME: The role of AGEs and AGE inhibitors in diabetic cardiovascular disease. Current Drug Targets 6:453-474, 2005.
- Choy M and Lam S: Sitagliptin, a novel drug for the treatment of type 2 diabetes. Cardiology in Review 15:264-271, 2007.
- 神野正雄. AGEsと生殖医療. AGEsと老化-糖化制御からみたウェルエイジング(太田博明, 山岸昌一), pp251-259, メディカルレビュー社, 2013.