

平成9年度厚生省心身障害研究
「不妊治療の在り方に関する研究」

顆粒膜細胞のアポトーシスからみた体外受精時の最適排卵誘発法の検討
(分担研究：多胎妊娠の予防に関する研究)

分担研究報告書

研究協力者 広井正彦
齊藤英和
金子智子
齊藤隆和
中原健次
太田信彦
高橋俊文
伊藤真理子
戸屋真由美

要約

卵を発育させる能力は個人個人異なると考えられるため、同一人に2つの排卵誘発法を用いて、ある一定期間の間をあけて体外受精を行いその際に得られる顆粒膜細胞中のアポトーシスを起こした顆粒膜細胞の出現率を測定し、排卵誘発法が卵に及ぼす影響について検討した。体外受精の排卵誘発法として1つは自然周期、もう一つはGnRHα +hMG +hCG周期を用いた。顆粒膜細胞は卵丘細胞と壁側顆粒膜細胞に分けて検討した。

卵丘細胞、壁側顆粒膜細胞の両方とも自然周期の方がGnRHα +hMG +hCG周期よりアポトーシスを起こした顆粒膜細胞の出現率は低値を示した。このことは、自然周期のほうが質の高い卵が排卵している可能性があり、刺激周期は採卵数は多くなるが、卵の質からみて、さらに改善の余地があると考えられた。

見出し語：体外受精、排卵誘発法、アポトーシス

はじめに

自然周期では、月経周期初期の第1日から3日ぐらいまではその周期に排卵できる卵胞が複数個存在する。しかし、卵胞中期までに卵胞の選択が行われ一個の卵胞のみが正常の発育をし、他の卵胞が全て閉鎖卵胞になる。この選択の過程で多くの因子により顆粒膜細胞にアポトーシスがおこっている¹。最終的に各月経周期に1個の卵胞が発育し1個の卵が排卵することになる。よって体外受精の排卵誘発は卵巣におけるアポトーシスによって閉鎖に陥る卵胞をすくい上げ、月経初期にその周期に発育する可能性があった卵胞を排卵まで至らしめる方法と考えることができる。

体外受精・胚移植においては、良い卵胞を発育させ良い卵を得ることがこの治療の成功をにぎる鍵となる。どのような卵胞が発育したかについては卵胞内の卵胞液のステロイド濃度が検討されたり、また卵一卵丘塊の性状よりその善し悪しが検討されてきた。しかし最近、卵胞の発育に関してアポトーシスが強く関与することが指摘されており、われわれもこの点からさらに卵胞の発育を考察した。

FSHはその名の通り卵胞を刺激し発育させるホルモンであり、顆粒膜細胞がアポトーシスを起こすのを抑制し卵胞の発育を促進する²。またGnRHアゴニストは排卵誘発時のestradiolによるLHサージを誘起するpositive feedback機構を抑えるために使用している薬剤であるが、これはまた、卵巣において直接作用がありアポトーシスを促進し卵胞を閉鎖に陥らせる可能性がある³。よってこれら薬剤の量は大きく卵の質に影響を及ぼすことになり、もう一度注意深く検討されなければならない。

われわれは体外受精の際に採取される顆粒膜細胞のアポトーシスを評価することによって症例ごとの卵巣の卵胞発育能力について検討した。我々はGnRHアゴニスト+hMG/FSHにて排卵誘発をして発育してきた卵胞にも種々の頻度でアポトーシス小体の出現を認めた。採卵数の多い症例の卵巣では顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率は採卵数が少ない症例のアポトーシス小体の出現率よりも低いことより、卵巣で

はアポトーシス小体の出現率が低い環境のほうが多数の卵胞を発育させるに良い環境であることがわかった。また妊娠群と非妊娠群との比較では、やはり妊娠した症例のほうが顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率は低値を示した⁴。このことはアポトーシス小体の出現の少ない卵巣からの卵は妊娠を生じることができくらい質の良い卵であることがわかった。このことから排卵誘発においてはいかにアポトーシスを起こさないようにGnRHアゴニストやhMG/FSHを使用していかなければならないかが示されたと思われる。

個人ごとの卵胞発育能に加えて、次に個々の卵胞の状態を顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率で評価を試みた。すると卵が採取できた卵胞の顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率は卵が採取できなかった卵胞の顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率に比較し低値を示した。また採卵できた卵胞のうち、受精した卵を含む卵胞の顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率は受精しなかった卵を含む卵胞の顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率に比較し低値を示した。また受精した卵を含む卵胞のうち、発育してgood胚となった胚を含んでいた卵胞の顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率は発育してpoor胚となった胚を含んでいた卵胞の顆粒膜細胞のアポトーシス小体の出現率より低値を示した⁵。これらのことより卵の予後はすでに卵胞内での発育の時点で決まっており、採卵時の卵胞の顆粒膜細胞のアポトーシスを評価することにより推測できることがわかった。そこで今回の研究はこの顆粒膜細胞のアポトーシスを評価することにより体外受精時の最適排卵誘発法を検討することにした。

方法

我々が体外受精に通常用いているGnRHa+hMG+hCG療法と自然周期との相違を検討した。図1のように自然周期は月経8日目より超音波断層法にて卵胞発育をモニターし、最大卵胞の平均直径が16mm以上になった時点で尿中LHが陽性でないことを確認しhCGを投与し35時間後に採卵した。またGnRHa+hMG+hCG療法は前の黄体

中期よりGnRH α (600 μ g/日) を投与し、月経第3日目よりhMG (Day3、4:300IU、Day5~:225IU) を開始した。最大卵胞の平均直径が16mm以上になった時点でhCGを投与し、35時間後に採卵した。症例は同一患者で、まず自然周期にて治療し、2周期あけてGnRH α +hMG+hCG療法にて治療した。

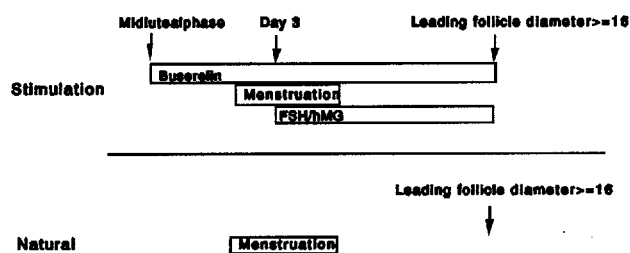


図1. 卵胞発育刺激法

採取された卵胞液より卵丘細胞と壁側顆粒膜細胞を分離し、ヒアルロニダーゼにて処理しスライドガラス上にホルマリンにて固定した。さらにHoechst33258にて染色後蛍光顕微鏡にて顆粒膜細胞を観察し、顆粒膜細胞1000個中に出現するアポトーシスを起こした顆粒膜細胞の数を記録し、アポトーシス出現率を算出した。

結果

図2に示すように壁側顆粒膜細胞、卵丘細胞共に自然周期のほうが刺激周期よりも有意に低い値を示した。

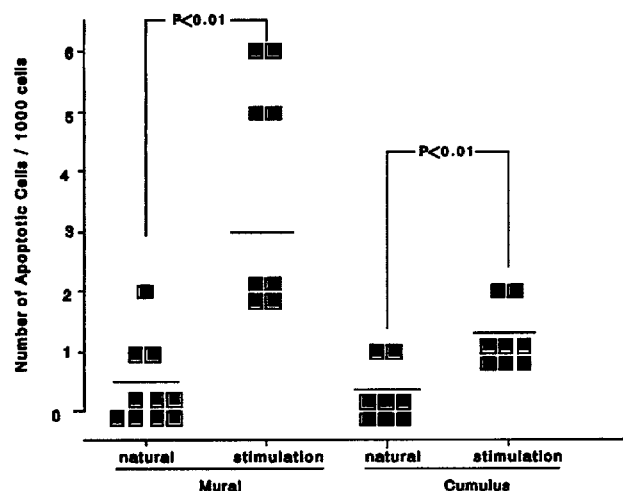


図2. 卵丘細胞、壁側顆粒膜細胞におけるアポトーシス出現率。自然周期は刺激周期に比較し低いアポトーシス出現率を示した。

また刺激周期では種々の大きさの卵胞から採卵を行うので卵胞の大きさの影響を観察するために吸引卵胞液量とアポトーシス出現率を検討したが、図3 (卵丘細胞) 図4 (壁側顆粒膜細胞) のように吸引卵胞液量とアポトーシス出現率のあいだに有為な相関は認めなかった。

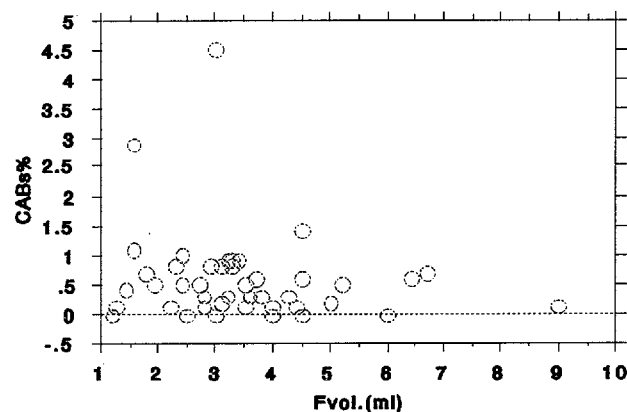


図3. 卵丘細胞におけるアポトーシス出現率と卵胞液量との関係。アポトーシス出現率と卵胞液量に相関は認めない。

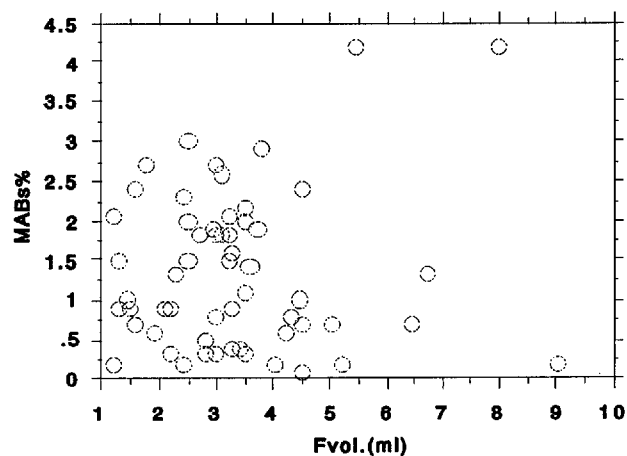


図4. 壁側顆粒膜細胞におけるアポトーシス出現率と卵胞液量との関係。アポトーシス出現率と卵胞液量に相関は認めない。

考察

多くの哺乳動物の卵巣では、卵胞の発育閉鎖にアポトーシスが関与しており、人においても同様である。人では1月経周期をみると、自然の場合には1個の卵胞が発育して他の卵胞はほとんどの場合が閉鎖に陥っている。

卵胞の発育閉鎖に一般的に良く知られたホルモンでもFSHやLH (hCG)², estradiolはアポトーシスを抑制し、GnRH、testosteroneはアポトーシスを誘導する⁶とされている。体外受精ではこれらのホルモンを外的に投与したり、内因性のホルモンの抑制したり放出させたりして、卵胞の発育を誘導している。よって、これらの調節を良好にすることが良い卵を発育させることになる。逆に、これらの調節に失敗すると、アポトーシスが著しく誘導され卵・卵胞が発育せず閉鎖に陥ったり、また発育しても質の悪い卵が採取されることになる。

今回の結果では自然周期のほうが刺激周期よりも有意に低い値を示したが、これは刺激周期のほうが卵の質が悪かったことを示す。しかし、一般には特に原因不明の不妊症の症例に排卵誘発を行うと妊孕性が増すといわれており⁷、これから考えると排卵誘発は卵の質をあげ、妊娠しやすくするものと考えるのが妥当であり、単に排卵する卵の数だけに起因するものでないと考えられる。また、性腺刺激ホルモンがアポトーシスを抑制するとするデータと一致するものである。

また、刺激周期は種々な大きさの卵胞が発育するので卵胞の大きさの影響を検討したが、卵胞の大きさからはアポトーシス出現に影響を及ぼさなかった。すると刺激周期でアポトーシス出現率が高い原因として次のことが考えられることになる。その1つは自然周期だと閉鎖に陥る卵胞を刺激周期で刺激することによって、発育を促すため、閉鎖に陥るはずだった卵胞の顆粒膜細胞に閉鎖に陥る影響がすでに起こっており、

それがアポトーシス出現率として現われたためである。もう1つの原因は排卵誘発のGnRHaを使用している点である。in vitroの実験ではGnRHが細胞内Ca²⁺濃度を上昇させ、プロテインカイネースC系を介してアポトーシス出現を誘発しているとの報告がある⁵。よって排卵誘発に用いているGnRHaが顆粒膜細胞のアポトーシスを上昇させている可能性もある。また、もう一つの原因は、GnRHaの長期使用により内因性の性腺刺激ホルモン値が低下し外的に投与した合計の値でも、発育を開始した全ての卵胞を健康に発育させるに十分な値に達していない可能性があることである。今後、これらの点をさらに研究し、最適排卵誘発法を報告したい。

文献

1. Hsueh, AJW et al : Endocrine Rev. , 15: 707-724, 1994
2. Chun, SY et al: Endocrinology, 135: 1845-1853, 1994
3. Billig . et al : Endocrinology, 134 : 245-252, 1994
4. Nakahara K et al : Fertil Steril, 67 : 302-308, 1997
5. Nakahara K et al : Fertil Steril, 68: 312-317, 1997
6. Billig H et al : Endocrinology, 133 : 2204-2212, 1993
7. Aboulghar MA et al: Fertil Steril 60 : 303-6, 1993

Abstract

Study of the optimal ovarian hyperstimulation in an in vitro fertilization and embryo transfer in point of the incidence of apoptotic granulosa cells

In order to examine the effects of ovarian hyperstimulation on the quality of oocytes , the incidence of apoptotic cells in the granulosa cells obtained in an in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program , were measured. IVFs were performed in natural menstrual cycles and in the cycles with gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) + human menopausal gonadotropin (hMG) + human chorionic gonadotropin (hCG). The natural cycle indicated lower incidence of the apoptotic cells in both cumulus cells and mural granulosa cells than the GnRHa+hMG +hCG cycle . This phenomenon means that the stimulation could make the more number of oocytes obtained and that it made the quality of oocyte worse in point of apoptosis compared with the natural cycle. We should take more attention to the ovulation induction in the respect of apoptosis in granulosa cells.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約

卵を発育させる能力は個人個人異なると考えられるため、同一人に 2 つの排卵誘発法を用いて、ある一定期間の間をあけて体外受精を行いその際に得られる顆粒膜細胞中のアポトーシスを起こした顆粒膜細胞の出現率を測定し、排卵誘発法が卵に及ぼす影響について検討した。体外受精の排卵誘発法として 1 つは自然周期、もう一つは GnBH_a +hMG +hCG 周期を用いた。顆粒膜細胞は卵丘細胞と壁側顆粒膜細胞に分けて検討した。

卵丘細胞、壁側顆粒膜細胞の両方とも自然周期の方が GnBH_a +hMG +hCG 周期よりアポトーシスを起こした顆粒膜細胞の出現率は低値を示した。このことは、自然周期のほうが質の高い卵が排卵している可能性があり、刺激周期は採卵数は多くなるが、卵の質からみて、さらに改善の余地があると考えられた。