

平成8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』

卵の質の向上

(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 山形大学医学部

広井正彦 齊藤英和
中原健次 齊藤隆和
伊藤真理子 太田信彦
高橋俊文

要約：体外受精・胚移植法において、採卵される卵の質はその後の体外受精・胚移植の成績に大きく影響する因子である。そのため採卵時の卵の質を評価し、さらに質の良い卵を採取することができる排卵誘発法を検討することは非常に大切なことである。一方アポトーシスが卵胞の発育に大きく関与してことが最近報告されており、このアポトーシスが卵の質へ影響を与えることも充分考えられる。そこで今回、顆粒膜細胞のアポトーシスを指標とし卵巣または卵胞、卵の質の評価を試みた。Gn-RHアナログ+hMGにて排卵誘発を行い卵胞を発育させた。十分卵胞が発育した時点でhCGを投与しさらに35時間後に超音波下に採卵を試行した。卵と顆粒膜細胞を採取し、卵は体外受精の用に、顆粒膜細胞はアポトーシスの測定に用い、体外受精の成績とアポトーシ小体の出現率について検討した。卵胞壁顆粒膜細胞のアポトーシ小体出現率は、卵丘の顆粒膜細胞のアポトーシ小体出現率に比べ、頻度が高値を示した ($p<0.01$)。不妊原因別に卵管因子、子宮内膜症、男性因子、原因不明に分けて検討すると、子宮内膜症の卵丘細胞にアポトーシ小体の出現を多く認めた ($p<0.05$)。卵が多く採取された症例のアポトーシ小体出現率は卵が少なく採取された症例よりも低い値を示した ($p<0.05$)。妊娠群と非妊娠群の顆粒膜細胞のアポトーシ小体出現率は妊娠群で低い傾向を認めたが、とくに、壁側の顆粒膜細胞で有意の差であった ($p<0.05$)。以上より、アポトーシ小体出現率は卵の質を良く反映する指標であることが明らかとなり、かつ、卵が採取され、受精、分割し、胚移植されても、その卵の採取された卵巣の顆粒膜細胞の状態が卵の予後を既定していると考えられ、卵胞をいかに健康に発育させることが、妊娠を得る重要な因子であることが明らかとなった。

見出し語：アポトーシス、顆粒膜細胞、卵の質

研究方法：

Gn-RHアナログ+hMGにて排卵誘発を行い卵胞を发育させる。Gn-RHアナログの使用法は黄体中期からプセリン600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を連日使用するlong法を用いた。hMGは月経第3日目より投与を開始し、月経第3、4日は300IUを用い、第5日より225IUを投与した。最大卵胞直径の2方向の平均が16mm以上となった時点でhCG10000IUを投与しさらに35時間後に超音波下に採卵を試行した。個々の症例ごとに卵胞液を一括的に吸引し、実体顕微鏡下に卵一卵丘塊を探し別の培養液に移した。また卵胞液中にある壁側の顆粒膜細胞を採取した。卵の周囲の卵丘細胞は26Gの針にて機械的に切り離し採取した。顆粒膜細胞は洗浄後スライドグラス上に固定した。スライドグラスはリン酸緩衝液にて3回洗浄後Hoechst 33258で染色した後、1000個の顆粒膜細胞を観察しその中に出現するアポトーシス小体の数を測定し出現率を算出した。不妊原因、母体年齢、最大卵胞直径、採卵まで要した日数、直径15mm以上の卵胞数、採卵数、妊娠の有無とアポトーシス小体出現率との関連について検討した。

成績：

全129症例の卵胞壁顆粒膜細胞のアポトーシス小体出現率は、卵丘の顆粒膜細胞のアポトーシス小体出現率に比べ、頻度が高値を示した ($p<0.01$)。そこで、以下の検討は顆粒膜細胞を壁側顆粒膜細胞と卵丘細胞に分けて検討した。不妊原因別に卵管因子、子宮内膜症、男性因子、原因不明に分けて検討すると、子宮内膜症の卵丘細胞にアポトーシス小体の出現を多く認めた ($p<0.05$)。

年齢、最大卵胞直径、採卵日、发育卵胞数別のアポトーシス小体出現率には差を認めなかった。しかし、採卵数について検討してみると、5個以下の卵採取群と6個以上の卵採取群を比較すると、多数の卵が採取された群のアポトーシス小体出現率が低

下していた。また、男性因子を除いた77症例における妊娠は9症例に認められたが、この妊娠群と非妊娠群の顆粒膜細胞のアポトーシス小体出現率は妊娠群で低い傾向を認めたが、とくに、壁側の顆粒膜細胞で有意の差であった ($p<0.05$) (表1)。

考案：

今日卵胞の发育閉鎖にはアポトーシスが関与していると言われている。アポトーシスはネクローシスと異なり細胞核の変化が優先し、細胞が自ら死に至る現象と考えられている¹。肝臓や腸の上皮においても、その細胞の再生にアポトーシスは関与しており、それらの組織のホメオスタシスの維持に重要な役割を持っている²。月経の初期にはその周期に发育しようとする卵胞が複数個存在するが、自然の場合はこのうち1個の卵胞が发育する。このメカニズムにアポトーシスが関与しているものと考えられている³。

また体外受精ではこのように自然ではアポトーシスにより、1個の发育卵胞になるところを、卵胞刺激ホルモンを用いて、アポトーシスを抑制し、複数個の卵が发育するようにし、複数個の胚を移植することにより、妊娠率を高めようとしている。しかし、この卵胞刺激ホルモンに対する反応性は個々の卵巣の状態によって異なると考えられる。

不妊原因別に分けて検討したところ、子宮内膜症での顆粒膜細胞のアポトーシスが最も多く認められたが、これは、子宮内膜症では他の不妊原因に比較し卵巣での卵胞の发育に障害があることが考えられる^{4,5}。また、この障害は卵巣刺激ホルモンである程度改善される可能性はあるものの、他の不妊因子に比較し、卵への影響が高いと考えられる。また、内膜症症例では、体外受精に入る前に内膜症を十分に治療すると、妊娠率が他の不妊因子と同じくらい高くなると言われており、充分治療することで、内膜症の卵胞发育への影響を軽減できるか

らとも考えられている^{6,7,8}。

また、卵巣の機能を考えたときに、年齢の要因は大きな影響を与えることが予想されるが⁹、今回の検討では顆粒膜細胞のアポトーシス小体出現率には差を認めなかった。このことは高年齢になると卵胞刺激ホルモンを投与しても発育する卵胞が少ないことがよく認められるが、この原因はもともと卵胞刺激ホルモンによって、発育可能な卵胞数が少なくなっているのであって、発育の途中で卵胞が発育するのに不利な環境が高齢のために生じるわけではないことを示している。

発育卵胞数に関しては、発育卵胞数が多いほどアポトーシス小体出現率が低くなる傾向は認められるが、有意な差ではなかった。しかし、採卵された卵の数にて検討してみると、採卵された卵の数が多い程アポトーシス小体出現率は有意に低値を示した。このことは卵胞が必ずしもすべて卵を含むとは限らず、ある卵胞は卵を含まないことが考えられる。そのため、この相違が生じるものと考えられるが、少なくとも多数の卵を発育させることができる卵巣はアポトーシスも低く抑えられ、卵胞を発育させるのに良い環境であったことが推測される。

受精には男性因子は大きな影響を与える因子であるため¹⁰、男性因子を除いた症例にて、胚移植後の妊娠に有無とその卵を含んでいた卵巣の顆粒膜細胞のアポトーシス小体出現率を検討した。すると、壁側、卵丘どちらの顆粒膜細胞とも、妊娠群の方が低い値を示したが、とくに壁側顆粒膜細胞ではその差は有意であった。このことは、卵が採取され、受精、分割し、胚移植されても、その卵の採取された卵巣の顆粒膜細胞の状態が卵の予後を既定していると考えられ、卵胞をいかに健康に発育させることが、妊娠を得る重要な因子であることが考えられた。

今後、我々はこの指標を用いて卵巣の質を評価するとともに、質の高い卵を発育さ

せる卵胞発育刺激法を検討していきたい。

文献：

1. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26,239-57.
2. Bursch W, Taper HS, Lauer B, Schulte-Hermann R. (1985) Quantitative histological and histochemical studies on the occurrence and stages of controlled cell death (apoptosis) during regression of rat liver hyperplasia. *Virchows Arch [Cell Pathol]* 50,153-66.
3. Tilly JL, Kowalski KIN, Johnson AL, Hsueh AD. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian follicle atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 129, 2799-801.
4. Simon, C., Gutierrez, A., Vidal, A., de los Santos, M.J., tarin, J.J., Remohi, J., Pellicer, A. (1994). Outcome of patients with endometriosis in assisted reproduction ;results from in vitro fertilization and oocyte donation. *Hum. Reprod.* 9, 725-729
5. Matson, P.L., Yovich, J.L. (1986). The treatment of infertility associated with endometriosis by in vitro fertilization. *Fertil. Steril* 46, 432-434
6. Oehninger, S., Brzski, R.G., Muasher, S.J., Acosta, A.A., Jones, G.S. (1989). In-vitro fertilization and embryo transfer in patients with endometriosis: impact of a gonadotropin releasing hormone agonist. *Hum. Reprod.* 4, 541-544
7. Dicker, D., Goldman, J.A., Levy, T., Feldberg, D., Ashkennazi, J. (1992).

The impact of long-term gonadotropin-releasing hormone analogue treatment on preclinical abortions in patients with severe endometriosis undergoing in vitro fertilization-embryo transfer. Fertil. Steril. 57, 597-600

8. Dicker, D., Goldman, G.A., Ashkenazi, J., Feldberg, D., Voliovitz, I., Goldman, J.A. (1990). The value of pre-treatment with gonadotropin releasing hormone(GnRH) analogue in IVF-ET therapy of severe endometriosis. Hum. Reprod. 5, 418-420
- 9 Kim SH. (1995) .Female aging and superovulation induction for IVF. J. Obstet. Gynaecol. 21, 75-82.
10. Borini A. Bafaro MG. Bianchi L. Violini F. Bonu MA. Flamigni C. (1996)Oocyte donation programme: results obtained with intracytoplasmic sperm injection in cases of severe male factor infertility or previous failed fertilization. Hum. Reprod. 11, 548-50

表 1。種々な因子と顆粒膜細胞のアポトーシス小体出現率

因子 1	因子 2	症例数	壁側顆粒膜細胞***		卵丘細胞	
			平均	SEM	平均	SEM
全症例		129	0.93	0.06	0.22	0.02
不妊原因	卵管因子	39	0.79	0.10	0.17	0.02
	子宮内膜症	15	1.21	0.23	0.32*	0.03
	男性因子	38	1.11	0.17	0.22	0.04
	原因不明	37	0.79	0.11	0.22	0.04
年齢	<35	55	0.92	0.12	0.25	0.04
	35 ≤ <40	59	0.97	0.10	0.21	0.03
	40 ≤	15	0.85	0.16	0.16	0.05
最大卵胞直径	≤17	36	0.76	0.09	0.19	0.02
	17<、≤18	46	1.10	0.14	0.24	0.04
	18<	47	0.90	0.12	0.21	0.03
採卵日	≤11	39	1.11	0.17	0.27	0.04
	12 ≤ ≤15	76	0.88	0.08	0.19	0.02
	16 ≤	14	0.72	0.15	0.19	0.05
発育卵胞数 (≥15mm)	≤2	56	1.09	0.11	0.23	0.03
	3 ≤ ≤6	64	0.81	0.10	0.21	0.03
	7 ≤	9	0.78	0.33	0.14	0.06
採卵数	≤5	79	1.05*	0.10	0.25**	0.03
	6 ≤	50	0.75	0.11	0.15	0.02
予後	非妊娠	68	0.93*	0.09	0.21	0.02
	妊娠	9	0.43	0.08	0.16	0.06

* : 因子 2 の中の他因子との間にの有意の差 (p<0.05) を認める。

** : 因子 2 の中の他因子との間にの有意の差 (p<0.01) を認める。

*** : 全ての因子の壁側顆粒膜細胞と卵丘細胞との間にの有意の差 (p<0.01) を認める。

Abstract

Improvement of oocyte quality

Masahiko Hiroi, Hidekazu Saito
Kenji Nakahara, Takakazu Saito
Mariko Ito, Nobuhiko Ohta
Toshifumi Takahashi

In an in vitro fertilization and embryo transfer (IVF-ET) program, oocyte quality is one of essential factors which have effects on IVF-ET success rate. Estimation of oocyte quality is also important to choose a follicle stimulation method. Recent years, there are several reports that apoptosis has effects on follicle growth. An oocyte in a follicle is probably considered to be affected by apoptosis. The relations between the incidence of an apoptotic body (Apo%) in granulosa cells and parameters of IVF-ET were examined. The Apo% of cumulus cells are lower than that of mural granulosa cells ($p < 0.01$). The Apo% of endometriosis patients are higher than that of the other infertility causes ($p < 0.05$). The patients who got more oocytes, showed lower Apo% than the patients with less oocytes. The pregnant patients showed lower Apo% than the non pregnant patients ($p < 0.05$). Thus, Apo% in granulosa cells can estimate the oocyte quality and Apo% can predict oocyte prognosis.



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:体外受精・胚移植法において、採卵される卵の質はその後の体外受精・胚移植の成績に大きく影響する因子である。そのため採卵時の卵の質を評価し、さらに質の良い卵を採取することができる排卵誘発法を検討することは非常に大切なことである。一方アポトーシスが卵胞の発育に大きく関与してことが最近報告されており、このアポトーシスが卵の質へ影響を与えることも充分考えられる。そこで今回、顆粒膜細胞のアポトーシスを指標とし卵巣または卵胞、卵の質の評価を試みた。Gn-RH アナログ+hMG にて排卵誘発を行い卵胞を発育させた。十分卵胞が発育した時点で hCG を投与しさらに 35 時間後に超音波下に採卵を試行した。卵と顆粒膜細胞を採取し、卵は体外受精の用に、顆粒膜細胞はアポトーシスの測定に用い、体外受精の成績とアポトーシ小体の出現率について検討した。卵胞壁顆粒膜細胞のアポトーシ小体出現率は、卵丘の顆粒膜細胞のアポトーシ小体出現率に比べ、頻度が高値を示した($p<0.01$)。不妊原因別に卵管因子、子宮内膜症、男性因子、原因不明に分けて検討すると、子宮内膜症の卵丘細胞にアポトーシ小体の出現を多く認めた($p<0.05$)。卵が多く採取された症例のアポトーシ小体出現率は卵が少なく採取された症例よりも低い値を示した($p<0.05$)。妊娠群と非妊娠群の顆粒膜細胞のアポトーシ小体出現率は妊娠群で低い傾向を認めたが、とくに、壁側の顆粒膜細胞で有意の差であった($p<0.05$)。以上より、アポトーシ小体出現率は卵の質を良く反映する指標であることが明らかとなり、かつ、卵が採取され、受精、分割し、胚移植されても、その卵の採取された卵巣の顆粒膜細胞の状態が卵の予後を既定していると考えられ、卵胞をいかに健康に発育させることが、妊娠を得る重要な因子であることが明らかとなった。