

博士論文

経口避妊薬の長期投与の効果の検討と加齢性の
卵巣の形態学的変化の観察

磯野 渉

目次

要旨	4
序文	5
本研究の論理展開、各実験および統計の目的と着眼点	10
方法	11
1 倫理規定	11
2 使用動物	11
3 排卵抑制モデルマウス・連続妊娠モデルマウスの作成	12
4 排卵抑制の確認手順	13
5 各月齢群と投与期間によるグループ分け	14
6 採卵、卵巣・血清採取	16
7 排卵数のカウント、体外発生の評価	17
8 高齢マウスにおける自然妊娠率、子宮内の胎児数の比較	17
9 卵胞数の計測と泡沫状組織の卵巣内占有面積の計測	18
10 染色方法(ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫染色)	19
11 特殊染色(膠原線維、鉄)	21
12 ヒト卵巣における陳旧性白体の卵巣内占有面積の計測と免疫染色	22
13 東京大学医学部附属病院での不妊治療についてのデータ収集と解析	23
結果	25
1 排卵抑制モデルの最適 OC 用量の決定	25
2 加齢性の排卵数減少と経口避妊薬長期投与による効果の判定	28
3 卵子の質の比較:体外受精での受精率・発生率の比較、自然妊娠後の子宮内の生存胎児数・産仔数の比較	31
4 マウス卵巣の加齢性の形態学的変化と OC 投与群・非投与群での比較	33
5 高齢マウスの卵巣組織に見られた泡沫状組織の特徴についての検討	38

6 ヒトの卵巣の陳旧性白体の特徴の検討とマウスの泡沫状組織との比較	42
7 ヒト不妊治療の成績から推測した生殖能力の加齢性低下とマウスとの比較 ...	45
8 マウスにおける経口避妊薬の最適投与期間の検討	46
考察.....	48
結論.....	57
謝辞.....	58
参考文献.....	59

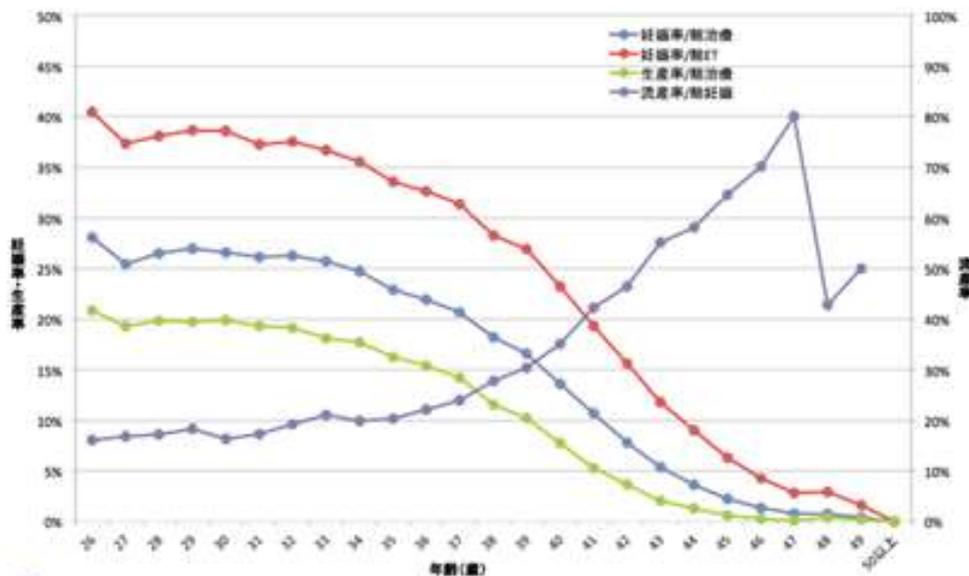
要旨

加齢性の卵巣機能低下は排卵周期に伴う貯蔵卵胞の減少と卵巣組織の損傷が主たる原因であり、加齢に伴う女性の生殖能力低下の要因となっている。従って、生殖医療の治療成績を上げる目的で、経口避妊薬(OC)による長期間の排卵抑制を行うことで生殖能力の温存が可能であるという仮説をたて、OC投与モデルマウスを作成して検討した。マウスに2ヶ月齢から生殖年齢のほぼ全期間OCを投与したところ、ヒトの40歳前後に相当すると考えられる12ヶ月齢マウスにおいて、排卵数が有意に増加するという結果を得た。また、卵巣組織切片を使用した形態学的解析から、OC投与で卵巣の加齢性の線維化を抑制できる可能性が高く、それは酸化ストレス蓄積の減少に応用できる可能性を指摘できた。

序文

キャリア化に伴う晩婚化が世界的に社会現象となる中で、日本でもおよそ10組のうち1組が不妊治療を必要としている¹⁻⁵。過去の研究結果から、女性の生殖能力は未経産婦の場合に30歳から低下を始め、35歳から急落することがわかっている⁶⁻⁸(図1)。一方で、20歳代や30歳代前半であることや、経産婦であることは生殖能力が相対的にみても高いため、不妊治療が不要である可能性が高い。

図1：補助生殖医療を指標にした妊娠能力の加齢性低下



ART妊娠率・出生率・流産率 2012

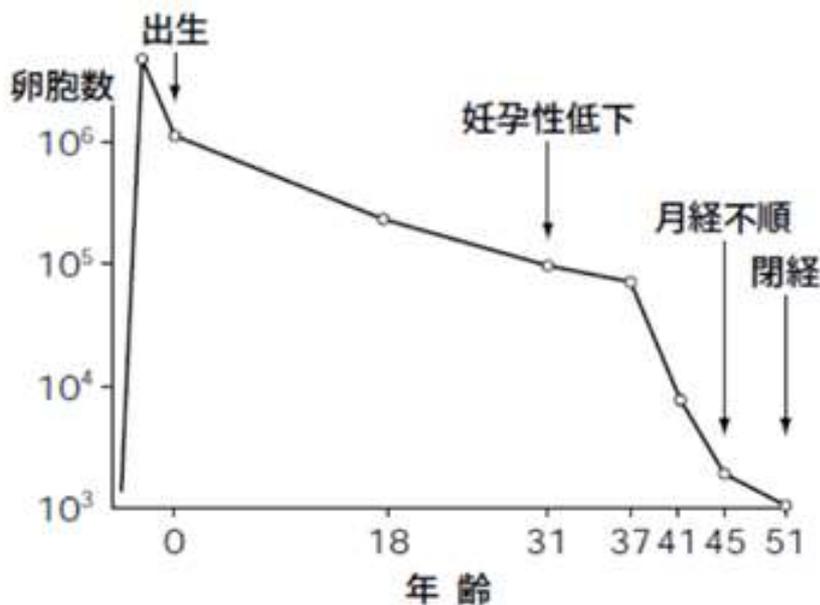
妊娠率・出生率ともに加齢性減少が見られ、それは35-42歳の年齢で急落する

出展：日本産婦人科学会ARTデータブック2012 (<http://plaza.umin.ac.jp/~jsog-art/data.htm>)

以上から、今日の産婦人科領域では、生殖能力上高齢と分類される35歳以降の女性の妊孕能の保存や不妊治療の成績が大きな関心の的となっている。女性の生殖能力に関係する因子には卵巣、子宮、中枢神経系その他様々なものが存在するが、最も直接的に関係

する因子はヒトでは卵胞数の低下として現れる卵巣機能の低下である⁹⁻¹²(図2)。ヒトの卵胞数は胎生18週頃が最大であり、出生後から指数関数的に減少していくが、その卵胞が消滅していく事象は細胞死機序によるものが中心とされている。近年では分子細胞生物学の飛躍的な発展により iPS 細胞を用いた卵子の創出がマウスレベルにおいても可能になっているが、倫理的側面からヒトにおいて体細胞から卵子を創出することは困難であることを考えると、加齢においても卵巣機能を如何にして温存するかということが焦眉の課題となっている。

図2：加齢に伴う卵胞数の変化

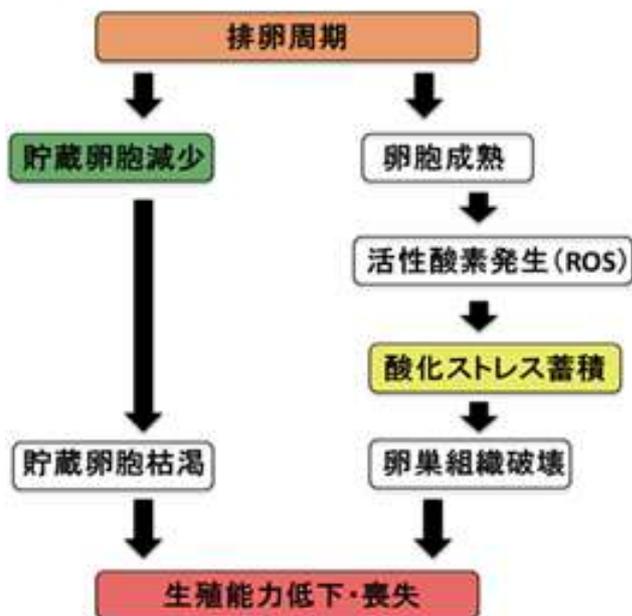


ヒトの卵胞数は胎生18週をピークに一方向的に低下しそれに比例するように妊娠率が急落するが、流産率は反比例するように急増する。それは37-38歳を境とすることがわかっていて、この現象が、35歳前後から著明に妊娠率（出生率）が低下することの原因となっている。
 出典：3. クリニカルカンファランス「境界領域へのチャレンジ」4) 高齢不妊婦人の問題点 ② 卵巣機能不全 日産婦誌 52巻9号 金沢大学医学部産科婦人科学講座助教授 小池浩司

妊孕能を補助する技術は卵巣や卵子を対象とするものが中心であり、体外受精/顕微授精を含む生殖補助医療(ART)を基盤とした受精卵、卵子、卵巣組織などの凍結保存であり、若年対象としては主に悪法性腫瘍治療前に行われるものが一般的になっている。近年では

採卵が困難な高齢女性に対して原始卵胞体外活性化法(IVA)なども施行されるようになってきたが、これら技術は概して侵襲的な技術である¹³⁻¹⁷。一方、排卵周期に伴う卵胞成熟、排卵などで発生される活性酸素を介して、卵巣組織破壊が進行する機序が近年明らかになっており^{18,19}、コエンザイム Q10、ビタミン E やビタミン C、メホルミンなどの抗酸化的な見地からの卵巣保護や漢方などの比較的マイルドな方法論までが有効であるかどうかという様々な議論がある²⁰⁻²²。本研究では卵巣機能の加齢性低下を阻止できる、比較的容易な工夫がないかどうかを出発点とした検討を行うことにした。加齢性の卵巣機能低下を進行させる原因としては、過去の報告で排卵周期に伴う貯蔵卵胞数の減少と卵巣組織破壊という2つの過程が深く関係していることがわかっている⁹⁻¹²(図3)。

図3：加齢性卵巣機能低下の概念図



卵巣機能低下は貯蔵卵胞の減少と排卵周期に伴う活性酸素発生を介した卵巣組織の破壊という二つの経路を介している。

ヒトにおいては平均的にみて、20歳から40歳程度までの20年以上の長期間にわたる排卵周期が卵巣機能低下にかかわっていることとなる。従って、長期間にわたって排卵を抑制した場合に卵巣機能を温存できるという可能性を考え、経口避妊薬を使用し長期間排卵を抑制したモデルマウスを作成し、高齢マウスの生殖能力を比較することにした。

経口避妊薬(通称ピル)は古典的薬剤であり、1960年から避妊薬としてエストロゲン・プロゲステロン合剤が使用され、発売当時は血栓塞栓症発生などのリスクが指摘されてきたが、1970年代から使用されている低用量ピルは比較的副作用も低く、安全性が確立されてきた。現在は極低用量ピルが開発され、催吐作用なども大きく軽減されている²³。元来性生活的な意味での活動性が高く若い生殖可能年齢である女性を標的とし設計された薬剤であったため、子宮内膜症の予防や月経困難症、月経前症候群/月経前不快気分障害などの治療に用いられることはあるが、主に未婚かつ未産の30歳台以降の女性をターゲットとして継続的・予防的に使用するという点は考慮されておらず盲点となっていた。日本では使用率が全女性の数%程度であるが、欧米では経口避妊薬の使用経験者は人口の八割以上に達するため、主に欧米で一定の使用歴をもつ女性を対象に、閉経時期や中止後の妊娠についての大規模な統計学的検討が行われた結果、生殖能力の温存という観点でいうと有効ではないと結論されている^{24,25}。しかし、純粹に未産婦のみを対象にし、かつ年齢も生殖的に高齢の女性に限定した統計をとった報告は皆無であり²⁶、現実的に30~40歳の期間に内服す

るヒト対象の前向き試験を実行することは困難であるため、今回我々は、ヒトへの応用を最終的な目標として生殖年齢のほぼ全期間を通して長期間の経口避妊薬による排卵抑制を行ったマウスの生殖能力について検討した。

本研究の論理展開、各実験および統計の目的と着眼点

1: 経口避妊薬を連日投与した長期間の排卵抑制モデルマウスを作成した。ヒトの体重比で対応させた用量を決定し、排卵が抑制されていることを確認した。

2: 非介入のマウスとモデルマウスを月齢ごとに比較して、未経産マウスにおいて経口避妊薬の効果が発揮される月齢を指摘した。同時に自然交配においても有意に胎児数が増加することも確認した。

3: 加齢したマウスの卵巣組織を形態学的に解析することで、排卵抑制による保護効果が発揮される作用機序を検討した。同時に病理学的に正常な卵巣の組織切片を使用し、ヒトにおける加齢性の形態学的変化を比較検討した。

4: ヒト未経産婦の不妊治療成績と比較して、臨床応用の際に対象とする年齢を推測した。

Key words

- ・経口避妊薬 (OC = oral contraceptive)
- ・排卵抑制
- ・卵巣機能の保護効果
- ・未経産(婦)
- ・加齢性の生殖能力低下
- ・卵巣の加齢性ストレス蓄積

方法

(1) 倫理規定

動物実験については、東京大学大学院医学系研究科の倫理委員会の承認された方法を通して行い、子宮頸癌・子宮体癌患者の卵巣組織検体を使用した組織学的解析、生殖医療の結果を使用した統計学的解析についてはインフォームドコンセントを得た患者のものを使用し、東京大学医学部附属病院倫理委員会の承認を通して研究を行った。

(2) 使用動物

動物は C57BL/6N メスマウス (Charles River Laboratories Japan Inc.) を使用し、6-7 週齢で同日に購入したマウス、もしくは同系統オスとの交配によって産まれた第一世代のマウスを使用した。そして、可能な限り同腹個体をコントロール群とおいた。飼育環境条件は 23 ± 2 °C、湿度 50-60%、餌・水へはフリーアクセスの換気状態のよい環境で、12 時間ごとの明暗条件とした。自然妊娠を検査するために途中で同系統の若年オスマウス (2-6 ヶ月齢) を追加した実験を除いて、原則的にケージ収容数はメスマウス 5 匹で統一した。その際に使用するオス個体も同様に可能な限り同腹個体を使用した。

(3) 排卵抑制モデルマウス・連続妊娠モデルマウスの作成

同日購入された C57BL/6N メスマウス、もしくは同系統の交配で生まれた第一世代の同腹マウスをランダムに介入群とコントロール群に分けてモデルを作成した。経産・妊娠中のマウスの解析以外で使用するマウスは全て未経産マウスを使用した。

経口避妊薬(OC)は 150 μ g デソゲステレル(DSG) / 20 μ g エチニルエストラジオール(EE)を含有する 66 mg 錠剤である低用量経口避妊薬のマーベロン 21 (Merck Sharp and Dohme, Tokyo, Japan)を使用し、30%ブドウ糖溶液に混和した状態(OC 混和液)で投与した。毎日 1 回以上、原則として 24 時間以上投与期間が空かないように注意して、ピペットを用いて経口的に投与した。同時に 5 匹については 30%ブドウ糖液のみを投与した群を作成し、有害事象の有無や生殖機能に対して影響がないかをモニターした。

排卵抑制のモデルマウス作成のために、まず投与量について以下の 5 グループに分けて検討した。(A)コントロール群(非介入)、(B)ブドウ糖溶液投与群(30%ブドウ糖液 20 μ l/日を投与)、(C)等用量 OC 投与群(2.6 mg/kg 体重比の OC 混和液を 20 μ l 毎日投与)、(D) 2 倍量 OC 投与群(5.2 mg/kg 体重比の OC 混和液を 20 μ l 毎日投与)、(E) 10 倍量 OC 投与群(26 mg/kg 体重比の OC 混和液を 20 μ l 毎日投与)

定期的に妊娠を繰り返させたモデルマウスを作成し、各月齢での平均出産数を観察した。

3-4 匹の 2 ヶ月齢のメスマウスを 1 匹の若いオスマウスを同居させて交配し、胸部・腹部など

で明らかな妊娠所見が見られた場合にオスの居ない別ケージで飼育するという方法をとった。繰り返す妊娠・出産・飼育による体力低下の問題を起こさないために、それを2ヶ月に一回行い16ヶ月齢まで観察した。

(4) 排卵抑制の確認手順

7-12 週齢のマウスを使用して、OC 投与による排卵抑制効果を検証した。本研究では若年を2-4ヶ月齢と設定したため、十分なOC投与期間を含めて3ヶ月齢までになるようにした。その際にも、可能な限り同腹個体を使用した。観察方法としては、(A)卵管膨大部の肉眼的観察による確認(図4)、(B)自然妊娠・出産を観察、(C)膣分泌物の観察、を採用した。

図4：卵管の排卵所見



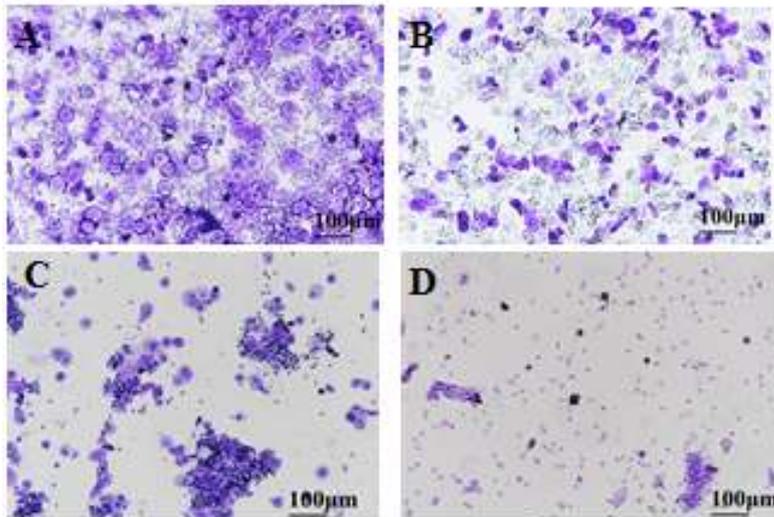
排卵を卵管の膨隆所見によって確認した。矢印は膨隆所見。

(A) ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル; Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) 50 mg/kg 体重比を使用した麻酔下の状態で、背側からの切開によって卵管を肉眼的に観察して判定した(必要に応じて切除した)。本実験全ての麻酔は同様の方法を用いた。

(B)3-5 匹のメスマウスと 3-6 ヶ月齢のオスマウスを同一ケージに入れて飼育し、OC 投与群については同様の投与方法を継続しながら、自然妊娠・出産について観察した。

(C) 毎日膈内を 20 μ l の水で洗浄して膈内容物のスミアを作成し、室温で十分に乾燥させた後、クリスタルバイオレット染色した。バーミーM1 液 (MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD., Tokyo, Japan) で 30 秒間染色し、十分に水洗して、室温で乾燥させた後に光学顕微鏡で観察した。40 倍・100 倍の倍率で観察して、発情前期・発情期・発情後期・発情間期 4 つのマウスの性周期に分類した(図 5)。

図5：マウスの性周期別の膈分泌物所見



(A)発情前期、(B)発情期、(C)発情後期、(D)発情間期
クリスタルバイオレット染色で細胞の量、形状を比較して分類したサンプル画像。円状の有核細胞が発情前期（排卵期）、扁平状の無核細胞が発情期に主に見られる。

(5) 各月齢群と投与期間によるグループ分け

SPF (Specific Pathogen Free)グレードのメスマウスを月齢と OC 投与期間で分類した。コント

ロール群として 2・4・6・8・10・12・14 月齢の非投与マウスを解析し、投与群として前述の 2 倍量 OC 投与マウスを以下の 6 グループに分けて評価した(図 6)。

図6：OC投与・非投与モデルマウスの月齢ごとの分類

A

グループ名		2	3	4	6	8	10	12	14
OO投与群	14m 投与群		毎日OC経口投与						IVF
	12m 投与群		毎日OC経口投与						IVF
	10m 投与群		毎日OC経口投与					IVF	
	3m 投与群		IVF						
非投与群	14m								IVF
	12m							IVF	
	10m						IVF		
	8m					IVF			
	6m				IVF				
	young (2-4m)	IVF							

B

グループ名	投与期間	2	4	6	8	10	12
非投与	NO						IVF
1w OC投与	1 week						IVF
10m OC投与	10 month		毎日OC経口投与				IVF
2m OC投与	2 month						IVF

(A)OC投与群、非投与群につき各月齢で生殖能力を評価するモデルマウスを作成した。
 (B)12ヶ月齢マウスについて、OC投与期間を1週間、2ヶ月間、10ヶ月間の3つにわけてモデルを作成した。

- (A) 12m OC 群:2~12ヶ月齢の期間に OC 投与を行って 12ヶ月齢で解析した群
- (B) 12m 2mOC 群:10~12ヶ月齢の期間に OC 投与を行って 12ヶ月齢で解析した群
- (C) 12m 1wOC 群:排卵誘発直前の 1 週間 OC 投与を行って 12ヶ月齢で解析した群
- (D) 10m OC 群:2~10ヶ月齢の期間に OC 投与を行って 10ヶ月齢で解析した群
- (E) 14m OC 群:2~14ヶ月齢の期間に OC 投与を行って 14ヶ月齢で解析した群
- (F) 3m OC 群:排卵誘発直前の 20 日間 OC 投与を行って 3ヶ月齢で解析した群

(6)採卵、卵巣・血清採取

図7：モデルマウスの検体採取スケジュール

day	0	1	2	3	4
schedule	腹腔内投与 PMSG 7.5IU		腹腔内投与 hCG 7.5IU	麻酔下卵管切除 採卵 IVF	麻酔下 卵巣・血清採取

モデルマウスの生殖能力を評価するために、PMSG-hCGの腹腔内投与後の採卵、卵管、卵巣、血清の採取を予定されたスケジュールで行った。

妊馬血清由来性腺刺激ホルモン(PMSG; ASKA Animal Health Co., Ltd., Tokyo, Japan)・ヒ

ト絨毛性ゴナドトロピン(hCG; ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan)を腹腔内投与

にして排卵誘発を行った。PMSG注射後47-49時間後にhCGを投与し、その13-18時間後

に麻酔下で背側から切開して両側卵管を切除して採取した。ミネラルオイルで覆われた60

μlのドロップをヒト卵管液(human tubal fluid (HTF)) (MR-070-D EmbryoMax® Human

Tubal Fluid (HTF) 1X, Merck Millipore, Darmstadt, Germany)で作成し、卵管膨大部を確認

して実体顕微鏡下で卵子卵丘細胞複合体(Cumulus-oocyte-complexes (COCs))を25ゲ

ージ注射針で採取した。本実験で卵子を用いた解析のために使用するドロップは全て5%

CO₂を含む加湿された37度管理のインキュベーターを用い、実験前に予め1時間静置して

使用した。その後背側の切開部位をクリップで閉鎖して翌日まで待機させた。再度麻酔下で、

腹側を切開して27ゲージ注射針を用いて、心臓採血により血液を500-1000 μl程度採取し、

採取後必要あれば頸椎脱臼によってサクリファイスして両側卵巣を採取した。右卵巣は採取

後直ちに中性緩衝ホルマリン液(Midiform® 10N, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.,

Osaka, Japan)で固定、左卵巣は液体窒素を使用して-80度保存された(図7)。

(7) 排卵数のカウント、体外発生の評価

卵丘細胞を除去した卵子数のカウントと体外発生の観察を目的として、前述の COC を採取した際と同様の HTF を用いて体外受精を行った。頸椎脱臼した 3-6 ヶ月齢の同系統のオスマウスの精巣上体から 25 ゲージ注射針を用いて 200 μ l ドロップの中に用手的に精液を採取し、1 時間インキュベーター内で静置した。6-7 $\times 10^5$ 匹/ml 程度と思われる混濁液を、COC を採取したドロップ内に 2 μ l 程度注入し体外受精を行った。インキュベーター内で 24 時間後培養した後、8 μ l の KSOM ドロップに移してさらに培養した。その際に正常卵子の合計数(フラグメント化した卵子は別にカウントした)と 2 細胞期となった卵子数をカウントした。3 日後に KSOM 培地内の胚盤胞期となった卵子数をカウントした。全てのプロトコールは各メスマウスに 1 ドロップを割り当てて、個体ごとにカウントされた。

(8) 高齢マウスにおける自然妊娠率、子宮内の胎児数の比較

10・12 ヶ月齢メスマウスを対象にして自然妊娠について OC 投与・非投与群で比較した。10・12 ヶ月齢に到達した時点で実験開始前に体重を測定した上で、3-6 ヶ月齢のオスを飼育していた 5 匹ケージの中に同居させて自然交配を目指した。OC 投与も採卵するモデルと同様に前日まで行った。期間中はストレスとならない程度の頻度で適宜体重測定をしながら観察した。胸部・腹部の所見、8g 程度の体重増加(妊娠 14 日目の平均増加量)を確認して、

帝王切開術で子宮内の生存する胎児数をカウントした。観察期間は 2 ヶ月間とし、それまでに帝王切開術とならなかったものは解剖して子宮を採取し、硫酸アンモニウムで染色して着床の癒痕を調べた。

(9) 卵胞数の計測と泡沫状組織の卵巣内占有面積の計測

採取した卵巣で 10 μm 厚の連続パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を施行し、倍率 40・100・200 倍の光学顕微鏡を使用して卵胞数を計測した。5 枚おき 1 枚 (50 μm ごとに 1 枚) のスライドについて形状・大きさを分類した以下の 3 種類の卵胞ごとに、卵子の核が明確に認識できる物のみについてカウントし、1 個体・卵巣 1 個について大体 40-60 枚のスライドを使用することになった。(A) 一次卵胞: 単一の顆粒膜細胞層をもつ、(B) 二次卵胞: 2 層以上の顆粒膜細胞層をもつ、(C) 成熟卵胞: 卵胞腔をもつ、というように分類した (図 8)²⁷。

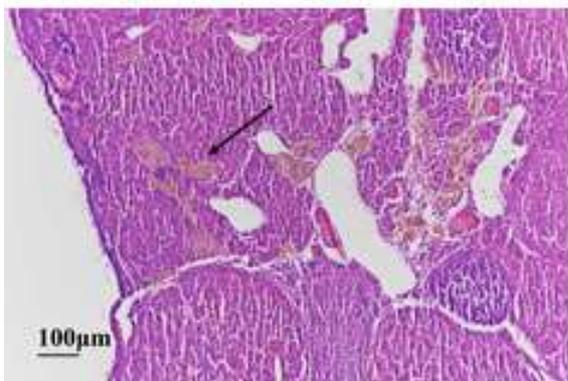
図 8 : 代表的な卵胞の形態



(A) 顆粒膜細胞層が一層の一次卵胞 (左) と卵胞腔をもつ成熟卵胞 (右)。
(B) 顆粒膜細胞層が多層となっている二次卵胞。

同様に 25 枚おきに 1 枚 (250 μm ごとに 1 枚) のスライドについて泡沫状組織の卵巣における占有面積を計測した (図 9)。40・100 倍の光学顕微鏡下で卵巣の各スライドを撮影し、HE 染色で茶褐色・巨大・多核・泡沫状の細胞を形状から判定した。面積の計測には Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>) ソフトを使用し、卵巣全体は 40 倍像を、対象となる組織面積の計測には 100 倍像を使用した。解析の際には、異常高値・低値を除外する目的で、基本的に各群の最大値と最小値を対象とせずに計算した。

図9：代表的な泡沫状組織の形態



10ヶ月齢OC非投与マウスの卵巣組織切片を使用し、光学顕微鏡で100倍の倍率の解析をした。茶褐色・泡沫状・多核の細胞で、黄色線で囲まれた部分を対象とした (矢印)。

(10) 染色方法 (ヘマトキシリン・エオジン染色、免疫染色)

卵巣は採取直後に前述の中性緩衝ホルマリン液を用いて、室温で 8 時間程度固定した。

脱水・パラフィン置換・薄切の工程を経て、厚さ 10 μm の切片を含むスライドを作成した。形態学的解析のために HE 染色 (Carrazzi's Hematoxylin, 1% Eosin Alcohol Solution, MUTO

PURE CHEMICALS CO., LTD.)を推奨されるプロトコールで行い、特定の抗原の有無を調べるために以下の手順で免疫染色を行った。(A)脱パラフィン・再水和の作業をキシレン、エタノール、水洗作業を経て行った。(B)抗原賦活化の作業を専用の溶液を使用し(Target Retrieval Solution, pH 9, Dako Japan Ltd., Tokyo, Japan)、数秒間煮沸した後に 30 分間室温に静置して行った。(C)内因性ペルオキシダーゼ不活性化の作業を 0.3%過酸化水素水含有のリン酸緩衝生理食塩水(phosphate buffered saline = PBS)に室温 30 分静置、ペルオキシダーゼブロッキング液製剤(Peroxidase-Blocking Solution, Dako REAL, Dako Japan Ltd., Tokyo, Japan)に室温 1 時間静置、という方法で行った。(D)ブロッキングの作業を 5%ヤギ血清(Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA)含有 PBS に室温 1 時間静置して行った。(E)一次抗体の添加作業を 100 倍希釈した溶液を使用して、4 度環境に 8 時間以上静置して行った。抗体の希釈液は既製品を使用した(Antibody Diluent, Dako REAL, Dako Japan Ltd., Tokyo, Japan)。(F)二次抗体の添加作業を 200 倍希釈した溶液を使用して、4 度環境に 8 時間以上静置して行った(抗体希釈液)。(G)アビジン・ビオチンを介したペルオキシダーゼ反応の発色の補助として ABC kit(AEC Staining Kit, Sigma-Aldrich co., Missouri, Tokyo, Japan)を利用した。PBS で 100 倍希釈した溶液を使用して室温で 1 時間静置した。(H)発色は、茶褐色となる DAB 発色を数秒程度の時間で(DAB+ liquid in EnVision+ Kits, Dako Japan Ltd., Tokyo, Japan)、赤色となる AEC 発色を 5-10 分程度の時間で行うプロトコ

ール(AEC Staining Kit, Sigma-Aldrich co., Missouri, Tokyo, Japan)を使用した。各手順の間で PBS での十分な洗浄を行い、また一次抗体・二次抗体は下記のものを使用した(希釈倍率は統一した)。

(11) 特殊染色(膠原線維、鉄)

膠原線維の染色としてアザン染色(Azan stain)を試行した。上述のパラフィン切片を使用し、脱パラフィン後に手順としては web (<http://www.mutokagaku.com/products/reagent/pathology/azan/>, 1/29 アクセス)上に公表された武藤化学株式会社の製品・プロトコールを使用した(表 1-A)。また組織内の鉄の染色として、脱パラフィン後にプルシアンブルー染色(Prussian Blue stain)を染色キットのプロトコールに従い試行した(Iron Stain Kit, ScyTek Laboratories, Inc., Logan, UT, USA) (<http://www.scytek.com/productPDF/Specsheet/IRN-1-IFUrev3.pdf>, 1/29 アクセス)(表 1-B)。

表1：特殊染色（膠原線維・鉄）の手順

A	
手順	時間
媒染剤	10～20分
水洗	
アゾカルミンG液(56～60℃)	30～60分
水洗	
アニリン-アルコール	10～30秒
酢酸アルコール	30秒～1分
水洗	
5%リンタングステン酸液	1時間
水洗	
B	
マロリー-アニリン青オレンジG液	30～60分
手順	
Potassium Ferrocyanide SolutionとHydrochloric Acid Solutionを等量混ぜる	
混合液で染色	3～5分
水洗	
Nuclear Fast Red Solutionで染色	1分
水洗	

(A)アザン染色（膠原線維）

(B)プルシアンブルー染色（鉄）

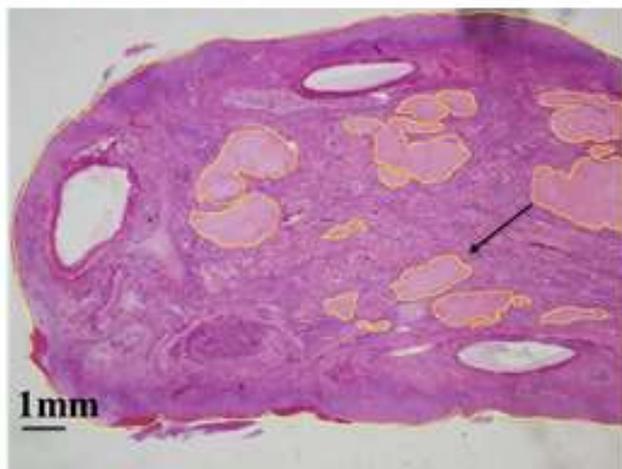
それぞれ染色キットを使用し、公開されているプロトコールに従って染色した。

(12)ヒト卵巣における陳旧性白体の卵巣内占有面積の計測と免疫染色

当院で2006～2014年に子宮頸癌・子宮体癌で卵巣切除をした28-42歳の患者の中で、病理学的に転移の所見がないものを検討対象にした。その中には21人の未経産患者と13人の経産患者が含まれていた。転移箇所の検索として作成された摘出卵巣の検体であり、各患者について卵巣組織が最大半径となる断面を5 μmの厚みのパラフィン組織切片として、HE染色したものを観察した。陳旧性白体の占有面積(図10)を比較する目的で、光学顕微鏡で12.5倍の倍率で撮影し、Image Jソフトを使用して切片中の卵巣の面積と占有面積を計測した。この際に、未経産婦においての比較では、異常値を除外する目的で、最大

値と最小値を原則的に各群から除いて結果を計算した。また、典型的な形態をした陳旧性白体を組織切片の中に含んでいる 38 歳経産婦の卵巢組織切片について、マウス検体を対象にしたプロトコールを使用して免疫染色を施行した。

図10：代表的な陳旧性白体の形態



40歳未経産婦の卵巢組織切片を使用し、光学顕微鏡で12.5倍の倍率の解析をした。黄色線で囲まれた、ピンク色の白体組織を解析の対象とした（矢印）。

(13) 東京大学医学部附属病院での不妊治療についてのデータ収集と解析

2001年1月1日から2010年8月31日までの期間に東京大学医学部附属病院女性診療科・産科不妊外来を初診し、不妊治療を行った1947人を対象にした。そのうち128人は、89人が追跡不可能、39人が不育症合併の理由で除外され、1819人の解析となった。比較基準は、生児獲得とし、それぞれのグループごとに全体数で除した生児獲得率とした。妊娠予後については原則的に分娩に至るまで追跡することで確認したが、転院症例など追跡困難な場合には妊娠14週まで到達したものを生児獲得と定義した。追跡は2011年2月28

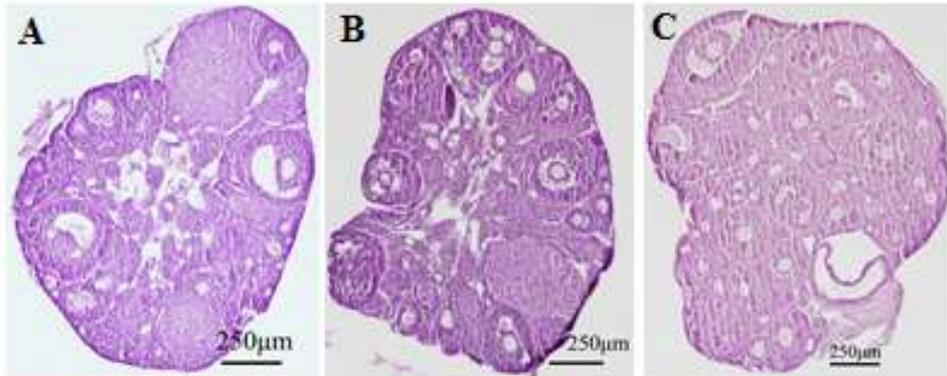
日まで行い、それぞれの患者について最初の生児獲得を確認するために最短でも6ヶ月間行った。不妊治療については、生殖補助医療(ART:体外受精/顕微授精・胚移植)と一般不妊治療(non-ART:人工授精、排卵誘発など ART 以外の不妊治療全て)に分類し、hCG(もしくは LH 製剤)使用の有無にかかわらずタイミング療法は両方から除外した。その中で590人がARTを施行されていたが、年齢によって以下の8個のサブグループに分類した。すなわち、(A)29歳以下、(B)30-31歳、(C)32-33歳、(D)34-35歳、(E)36-37歳、(F)38-39歳、(G)40-41歳、(H)42歳以上、の合計8群の生児獲得率を計算した。

結果

(1) 排卵抑制モデルの最適 OC 用量の決定

10 ヶ月間 30%ブドウ糖液のみを投与した 12 ヶ月齢のマウスについて有害事象がないこと、PMSG-hCG での排卵誘発における採卵数が非介入群と差が無いことを確認した上で (6.2 ± 2.5 個 $n=5$)、適切な濃度を検討した。体重比用量を換算し、ヒトの等用量・2 倍量・10 倍量の 3 群にわけた。等用量群についてはオスマウスとの自然交配を観察したところ、5 匹全てが自然妊娠・出産となったため排卵が抑制されていないものとみなした。10 倍量群では、(A) 卵巣組織切片のヘマトキシリンエオジン (HE) 染色を使用した観察で、卵巣が多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS: polycystic ovary syndrome) 様の形態学的変化が見られたこと (図 11-C、表 2)、(B) 膣スメアのクリスタルバイオレット染色を使用した観察で 90%以上の確率で発情期となっていたこと (非投与群 56%, 2 倍量群 71%, 10 倍量群 93%) (図 5-B、表 3)、(C) 有害事象の検索目的で投与した 8 ヶ月齢マウス 4 匹のうち 1 匹が、投与 2 ヶ月で片麻痺の症状が出現したこと、という 3 点の結果を理由にして採用しなかった。自然交配の実験は試行しなかったが、卵管の観察によって全 12 匹が排卵していないことは確認できた (表 4)。

図11：OC投与量別での卵巣組織切片の所見



(A)非投与群、(B)ヒト体重比2倍量投与群、(C)10倍量投与群
特に10倍量投与群で、明らかにある程度以上の大きさの卵胞が増加している。

表2：OC投与量別の卵巣内卵胞数比較

	非投与 (n=7)	2倍量 (n=5)	10倍量 (n=7)
成熟卵胞	17.3 ± 6.5***	20.8 ± 6.7	27.0 ± 7.2***
二次卵胞	75.2 ± 11.6***	92.6 ± 10.8*	112.4 ± 32.0**

平均値±標準偏差で表示した。*, **, ***p<0.05

表3：OC投与量別の性周期比較

	非投与	2倍量	10倍量
発情前期	16% (77/494)	12% (52/430)	3% (9/270)
発情期	56% (275/494)	71% (304/430)	93% (252/270)
発情後期	20% (99/494)	13% (55/430)	3% (7/270)
発情間期	9% (43/494)	4% (19/430)	1% (2/270)

各マウスについて1日1回腔分泌物を採取して分類した。カッコ内は、該当する腔分泌物の採取回数/合計採取回数。平均値±標準偏差で表示した。

表4：OC投与量別の排卵したマウスの割合

	非投与	2倍量	10倍量
排卵陽性/観察マウス数	39% (13/33)	4% (1/23)	0% (0/12)
排卵陽性/観察卵管数	29% (19/66)	2% (1/46)	0% (0/24)

卵管の膨隆所見(図4)によって排卵を判断し、片側の場合でも排卵したマウスに含めた。

2倍量群では、(A)自然交配の実験で全6匹が妊娠・出産したが、実験開始(オスとの混合飼育開始)から出産までの期間は非投与群と比較して延長したこと(96.0 ± 45.0日, n=6 vs. 28.0 ± 4.4日, n=11)(表5)、(B)卵管の観察で排卵している個体は非投与群が13/33匹で

あったのに対して、1/23 匹であったこと(片側のみ排卵した)(表 4)、(C) 卵巣組織切片で非投与群と比較して形態学的変化は二次卵胞でみられたものの(図 11-B、表 2)、10 倍量群より小さかったこと、の 3 点から完全な排卵抑制効果はないが十分に排卵抑制が得られる用量と判断した。自然交配・出産については、マウスの妊娠期間が 20 日前後であることを考慮すると観察開始から妊娠までの期間が 10 倍程度に延長していることが推測され(76.0 日 vs. 8.0 日)、排卵した個体数の検討でも 10 分の 1 程度の頻度(4% 1/23 匹 vs. 39% 13/33 匹)となっていることが示された。また有意差の比較検討はできなかったが、2 倍量群では非投与群より母体あたりの平均出産数は少ない傾向にあった(4.8 匹 n=5 vs. 7.8 匹 n=11)(表 5)。

表 5：自然交配による出産についての検討

	投与群	非投与群
出産までの平均期間	96.0 ± 45.0 days (n=6)	28.0 ± 4.4 days (n=11)
平均産仔数	4.8 (n=5)	7.8 (n=11)

オスと混合した飼育を開始した時点と出産までの日数を計測して比較した(平均値±標準偏差で表示した)。産仔数については、同日出産のマウスが存在したため標準偏差は計算できなかった。

血清黄体形成ホルモン(Luteinizing hormone = LH) 値について ELISA kit での測定では、有意差はないものの、OC 投与量が多いほど小さい傾向となった(非投与群: 1.02 ± 0.98 ng/ml, n = 13, 2 倍量群: 0.75 ± 0.49 ng/ml, n = 13, p = 0.37, 10 倍量群: 0.69 ± 0.09 ng/ml, n = 12, p = 0.26)。異常の結果から本実験ではヒトの体重換算で 2 倍量の OC を投与したマウスを OC 投与マウスモデルとした(OC 投与群)。

(2) 加齢性の排卵数減少と経口避妊薬長期投与による効果の判定

(A) 加齢性生殖能力低下の限界を推測する一つの参考として、定期的に妊娠を繰り返させたモデルマウス(連続妊娠モデル)の出産数と分娩したマウス数の加齢性減少を 11 匹の平均値から算出した(表 6)。6~7 ヶ月の間に 1 匹死亡したマウスを除き、10 匹が 16 ヶ月齢まで観察できた。平均数のピークは 3-4 ヶ月齢の 7.8 匹であったが、11-12 ヶ月齢で 5.5 匹、13-14 ヶ月齢で 4.5 匹、15-16 ヶ月齢で 0 匹となった。また、11-12 ヶ月齢で 9/10 匹が出産したが、13-14 ヶ月齢では 4/10 匹、15-16 ヶ月齢で出産できなくなった。よって、経産マウスにおいても 14 ヶ月齢前後で生殖能力が限界となることが示された。この結果から未経産マウスについて 14 ヶ月齢まで PMSG-hCG 刺激での採卵数(排卵数)を観察することにした。

表 6：連続妊娠モデルマウスでの月齢ごとの出産状況

月齢	出産マウス/全マウス	平均産仔数
3 - 4 m	11/11	7.8
5 - 6 m	11/11	8.5
7 - 8 m	10/10	8.4
9 - 10 m	10/10	6.4
11 - 12 m	9/10	5.5
13 - 14 m	4/10	4.5
15 - 16 m	0/10	0

6~7 ヶ月齢の期間に 1 匹死亡した。平均産仔数については、同日出産のマウスが存在したため、標準偏差は計算できなかった。

(B) 排卵誘発を使用した採卵を行った結果、まず非投与群(コントロール群)における加齢性の排卵数減少がみられた(図 12)。2-4 ヶ月齢をピークとして(25.2 ± 13.2 個)、8 ヶ月齢で明らかな減少を始め(13.5 ± 7.0 個)、12 ヶ月齢でピークの 25% 以下(5.9 ± 4.0 個)、14 ヶ

月齢で 1/6 程度となった (4.2 ± 3.3 個)。OC 投与群については 10、12、14 ヶ月齢について計測したが、非投与群と比較して 12 ヶ月齢のみ有意に排卵数が増加した (投与群: 8.4 ± 4.7 個 vs. 非投与群: 5.9 ± 4.0 個, $p < 0.01$)。しかし、10 ヶ月齢 (8.9 ± 4.2 個 vs. 10.9 ± 5.4 個, $p = 0.24$)、14 ヶ月齢 (6.5 ± 3.7 個 vs. 4.2 ± 3.3 個, $p = 0.06$) では有意差はなかった。若年で 20 日間の OC 投与で有意な採卵数の差がないことも確認した (29.3 ± 15.0 個 vs. 25.2 ± 13.2 個, $p = 0.58$)。一般的な C57BL/6N 若年マウスの産仔が 6-10 程度であることを参考にすると、10 ヶ月齢では自然状態でも 10 個前後排卵できる程度の生殖能力を維持していることが原因で OC での効果がでないことが推測され、14 ヶ月齢では貯蔵された卵子数の明らかな減少によって排卵能力が著しく低下していることが原因で差がでない、と推測した。

図12：月齢ごとの排卵誘発による採卵数（折れ線グラフ）

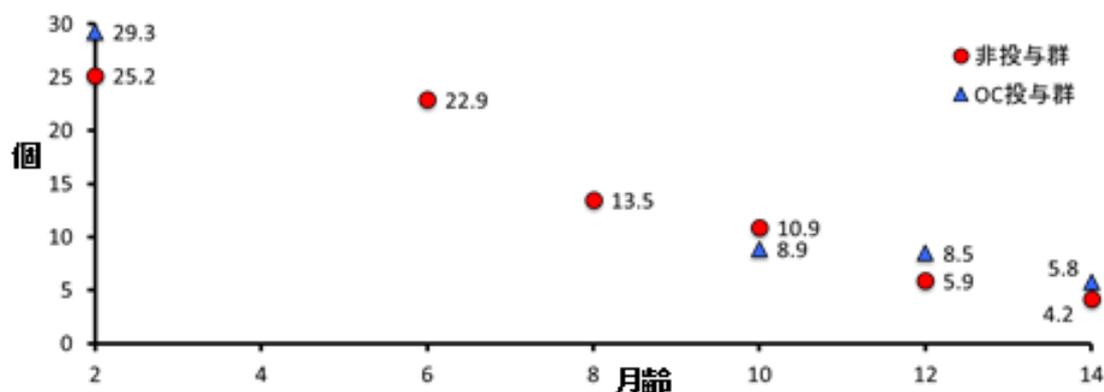


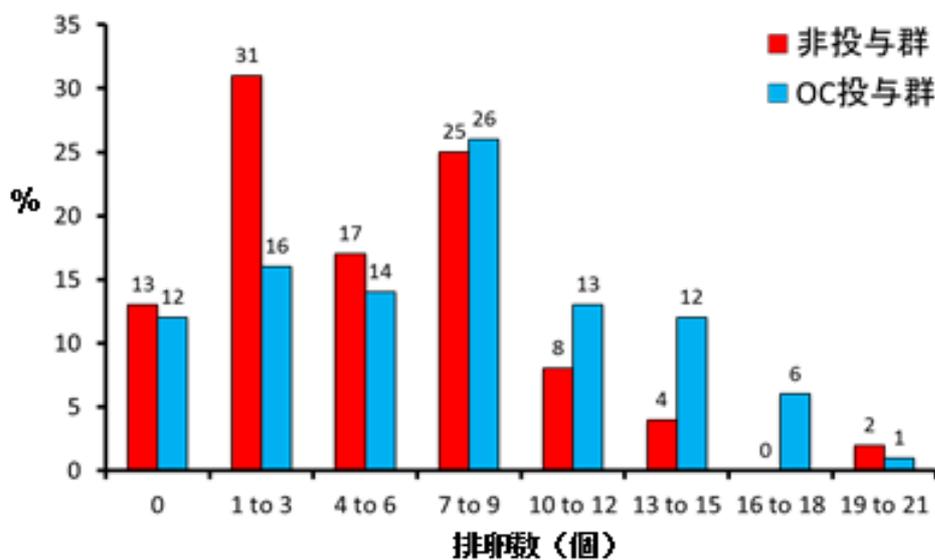
表7：月齢ごとの排卵誘発による採卵数（表）

月齢	2 to 4m	6m	8m	10m	12m	14m
非投与群 (採卵個体/全個体)	25.2 ± 13.2 (40/45)	22.9 ± 10.5 (15/17)	13.5 ± 7.0 (15/18)	10.9 ± 5.4 (20/22)	5.9 ± 4.0 (45/52)	4.2 ± 3.3 (22/27)
OC投与群 (採卵個体/全個体)	29.3 ± 15.0 (4/5)			8.9 ± 4.2 (16/18)	8.5 ± 4.7 (61/69)	6.5 ± 3.7 (15/20)
P	0.58			0.24	0.004	0.06

月齢とOC投与の有無で分けたグループ内で排卵個体のみを対象として、平均値±標準偏差という形で表示した（表7）。排卵しなかった個体は排卵誘発剤（PMSG-hCG）による排卵周期の調節に問題があった可能性があるため、一律に除外。12ヶ月齢でのみOC投与群は有意に排卵数が増加し、14ヶ月齢で増加傾向があった。

(C) 有意に排卵数が増加する 12ヶ月齢マウスについては、さらなる詳細な解析を行う目的で排卵数を指標にして分類した個体数も、全匹数での%表示として計算した(図 13)。OC 投与群と非投与群で、排卵数が 0, 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18, 19-21 個の 8 サブグループ、0-6(少数群), 7-9(中等量群), 10-21 個(大量群)の 3 グループに分類した(表 8)。

図 13：12ヶ月齢における8分類の排卵数別での匹数 (%)



12ヶ月齢におけるOC投与群と非投与群で、排卵数別に該当するマウス匹数をパーセント表示した。排卵数は0, 1-3, 4-6, 7-9, 10-12, 13-15, 16-18, 19-21個で8群に分類した。

8 サブグループの比較では、OC 投与群では排卵数が多い群で非投与群より割合が増加していることが示された。3 グループでの比較では、少数群で OC 投与群は有意に少なく(投与群:42% n = 29/69 vs. 非投与群:62%, n = 32/52, p < 0.05, 表 8)、大量群で有意に多かった(32% n = 22/69 vs. 13% n = 7/52, p < 0.05, 表 8)。前述の連続妊娠モデルでの 11-12ヶ月齢における平均産仔数(5.5 匹)を考慮して、7 個以上の排卵数を十分な生殖能力と見なした場合、OC 投与群で有意に生殖機能を温存しているといえ(58% n=40/69 vs. 38%

n=20/52 P < 0.05, 表 8)、自然妊娠を目的に考えた場合は 20% (=58-38%)程度つまり 5 個

体に 1 体程度のマウスに効果的となっていると推測できた。

表 8：12ヶ月齢における3分類の排卵数別での匹数 (%)

排卵数	非投与群(対象数/全個体数)	OC投与群(対象数/全個体数)	P値
0 - 6	62% (32/52)	42% (29/69)	<0.05
7 - 9	25% (13/52)	26% (18/69)	0.89
< 10	13% (7/52)	32% (22/69)	<0.05

12ヶ月齢におけるOC投与群と非投与群で、排卵数別に該当するマウス匹数をパーセント表示した。排卵数は0-6, 7-9, 10以上の個数で3群に分類した。

(3) 卵子の質の比較: 体外受精での受精率・発生率の比較、自然妊娠後の子宮内の生存

胎児数の比較

排卵数での差が、実際の生児獲得に対して有効かどうかを調査する目的で、発生過程を

追跡する以下の実験をプログラムした。

(A) in vitro の受精率・発生率を比較したところ、2-3, 12, 14ヶ月齢で加齢性の低下は見ら

れるものの、全てで OC 投与群と非投与群には差がなかった(表 9)。

表 9：高齢マウスにおける体外受精 (IVF) 成績の比較

	受精率 (受精卵/全卵子数)	発生率 (胚盤胞/全卵子数)
2-3 m 非投与 (n=5)	88% (127/145)	83% (121/145)
2-3 m OC投与 (n=4)	79% (92/117)	74% (86/117)
12m 非投与 (n=16)	61% (54/89)	44% (39/89)
12m OC投与 (n=20)	63% (98/155)	48% (75/155)
14m 非投与 (n=17)	41% (29/70)	33% (23/70)
14m OC投与 (n=3)	52% (11/21)	29% (6/21)

各群のマウス(カッコ内の匹数)から採卵した全卵子について体外受精を行った。2cellを受精、胚盤胞を発生として、各々を受精卵の数および胚盤胞の数を採取した全卵子の数で割って受精率、発生率を計算した。加齢性に受精率・発生率は低下するが、各月齢で比較した場合にはOC投与・非投与群間で差がなかった。

(B) 自然交配後の妊娠・出産の状況を比較する目的で、10, 12 ヶ月齢について妊娠 14

日目程度の妊娠状態をターゲットとして、子宮内の生存する胎児数を比較した(図 14)。

図14：生存胎児の所見



帝王切開術 (CS) で採取した子宮内の生存胎児所見

観察期間はオスとの同室の飼育を開始してから 2 ヶ月間とした。27 匹の高齢マウス(10 ヶ月齢非投与群 5 匹、投与群 4 匹、12 ヶ月齢非投与群 9 匹、投与群 9 匹)において、1 匹の 12 ヶ月齢 OC 非投与マウス以外全てが、硫酸アンモニウムでの子宮染色を含めて最終的に妊娠が確認された。帝王切開術によって確認された群内の個体ごとの平均生存胎児数については、12 ヶ月齢で投与群が非投与群に比べて増加し、10 ヶ月齢では有意差はなかった(10 ヶ月齢: 4.3 ± 3.0 vs. 6.6 ± 1.9 , $p=0.19$, 12 ヶ月齢: 6.1 ± 3.6 vs. 0.4 ± 1.0 , $p<0.01$, 表 10)。12 ヶ月齢においては、非投与群では 2 匹しか胎児が確認できなかったが、投与群では 8 匹で確認できた。

表10：10,12ヶ月齢における平均生存胎児数の比較

	妊娠率 (妊娠個体/全個体)	CSごとの平均生存胎児数 (CS数)	妊娠ごとの平均生存胎児数 (CS数/妊娠個体)
12m 非投与	89% (8/9)	3.0 (1)	0.3 ± 1.0 (9) *
12m OC投与	100% (9/9)	6.8 ± 2.9 (8)	6.1 ± 3.6 (9) *
10m 非投与	100% (5/5)	6.6 ± 1.9 (5)	6.6 ± 1.9 (5)
10m OC投与	100% (4/4)	5.7 ± 1.2 (3)	4.3 ± 3.0 (4)

身体的所見、体重から妊娠を判定し、帝王切開術（CS）で子宮内の生存胎児数を計測した。体重増加はおよそ8gの増加をもって（特に中期以降となった状態であることを）判断した。妊娠は最終的には硫酸アンモニウムでの着床痕を染色して確認し、12ヶ月齢の1匹以外は全て妊娠していた。最終的にCS施行にいたらなかった場合は、生存胎児0匹とみなし、平均値±標準偏差という形で表示した。*P<0.01

以上の結果から、IVF での発生率・受精率が同様の卵子の排卵数が増加することで、12ヶ月齢でのPMSG-hCG刺激での排卵数の差は胎児数まで影響力をもつ差である可能性が高いことが示された。同時にそれは、OC の長期間投与が発生過程で少なくとも悪影響を与えないということも示していた。

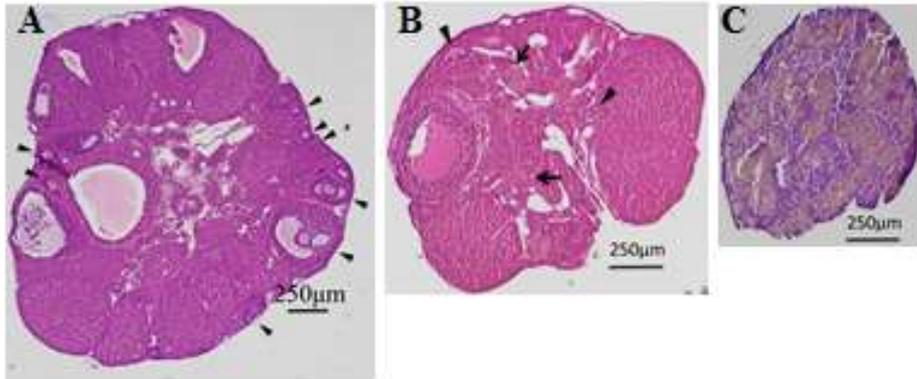
(4) マウス卵巢の加齢性の形態学的変化とOC投与群・非投与群での比較

OC の長期間投与が卵巢機能温存に対して効果的であることと、特にそれは12ヶ月齢で顕著なように期間が限定されることが示されたため、その効果発揮の作用機序を解明するために、卵巢の加齢性の形態学的変化を比較した。3ヶ月齢(若年)、12ヶ月齢、24ヶ月齢の卵巢組織切片を光学顕微鏡で観察した場合に、加齢性に卵胞(図15、矢印頭)が減少し、茶褐色・泡沫状の線維性の組織への置換(図15、矢印)が進行していく所見がみられた。

(A) 従って、卵巢組織切片を使用した解析の始めとして、卵巢内の卵胞数を比較した(図8)。顆粒膜細胞が一層、二層、卵胞腔の有無で、一次・二次・成熟卵胞を判断して、各マウ

スの卵巢連続切片についてカウントしたところ、OC非投与群で加齢性の卵胞数減少が観察された。その際には50 μ mにつき1枚のスライドを使用した。

図15：マウス卵巢の加齢性の卵胞減少と線維化



3ヶ月齢(A)、12ヶ月齢(B)、24ヶ月齢(C)の卵巢組織所見では、加齢性に卵胞(矢印頭)の減少と茶褐色・泡沫状の線維化(矢印)の進行が見られる。

2-4ヶ月齢を若年齢群と定義して、それを基準にして考察したところ、12ヶ月齢では一次・二次卵胞ともに25%程度まで低下し(一次:25.2 \pm 11.4個 vs. 100.1 \pm 28.6個, 二次:20.6 \pm 11.7個 vs. 88.5 \pm 19.7個)、14ヶ月齢で15%程度まで低下した(一次:15.3 \pm 6.6個 vs. 100.1 \pm 28.6個, 二次:11.8 \pm 6.2個 vs. 88.5 \pm 19.7個)(図16、表11)。

図16：マウス卵巣組織の加齢性卵胞数減少（折れ線グラフ）

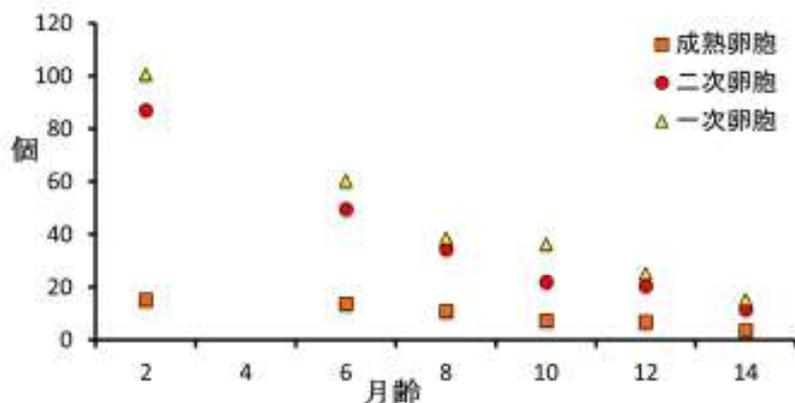


表11：マウス卵巣組織の加齢性卵胞数減少（表）

	2-4m (18)	6m (16)	8m (7)	10m (12)	12m (29)	14m (12)
成熟卵胞	15.3 ± 5.3	13.8 ± 7.6	11.1 ± 4.1	7.5 ± 3.5	7.0 ± 3.6	4.0 ± 3.0
二次卵胞	87.1 ± 22.3	49.8 ± 12.9	34.7 ± 10.0	22.2 ± 7.8	20.6 ± 11.7	11.3 ± 5.6
一次卵胞	100.6 ± 28.3	60.4 ± 19.3	38.6 ± 11.4	36.3 ± 14.1	25.2 ± 11.4	14.6 ± 7.2

各月齢のマウスの卵巣について、50μmごとに1枚の連続組織切片を使用して、一次、二次、成熟卵胞のカウントを行った（平均値±標準偏差）。一次・二次卵胞については、2-4ヶ月齢と比較して、6ヶ月齢から有意に減少し、成熟卵胞も10ヶ月齢から有意に減少した。

加齢性減少は OC 投与群でも見られたが、非投与群との比較では 12ヶ月齢（一次:27.6 ± 12.0 個 vs. 25.2 ± 11.4 個 P=0.069, 二次:18.2 ± 10.1 個 vs. 20.6 ± 11.7 個 P=0.63）、14ヶ月齢（一次:18.2 ± 6.8 個 vs. 15.3 ± 6.6 個 P=0.27, 二次:13.9 ± 5.3 個 vs. 11.8 ± 6.2 個 P=0.36）でもともに一次・二次卵胞数に有意差はなかった（表 12）。

表12：高齢マウスのOC投与群の卵胞数比較

	12m 非投与群 (n=29)	12m OC投与群 (n=34)	
成熟卵胞	7.0 ± 3.6	6.3 ± 2.9	0.62
二次卵胞	20.6 ± 11.7	18.2 ± 10.1	0.63
一次卵胞	25.2 ± 11.4	27.6 ± 12.0	0.069
	14m 非投与群 (n=12)	14m OC投与群 (n=9)	
成熟卵胞	3.8 ± 2.8	5.0 ± 2.5	0.27
二次卵胞	11.8 ± 6.2	13.9 ± 5.3	0.36
一次卵胞	15.3 ± 6.6	18.2 ± 6.8	0.27

12・14ヶ月齢の両方において、OC投与群・非投与群での比較で卵胞数に有意差はなく（平均値±標準偏差）、OC投与による卵胞の増加効果はないことが示された。

技術的問題により、原始卵胞数での比較はできなかったが、ヒトの卵胞貯蔵量のある程度の大きさの成熟卵胞のカウントで推定することを考慮すると²⁸⁻³⁰、一次・二次・成熟卵胞数の個数に有意差がないことから、OC 投与によって貯蔵卵胞数が保存されるという効果はないことが推測された。特に最も原始卵胞に近い大きさといえる、一次卵胞数も各月齢で有意差はなかった。

(B) 次にマウス卵巣組織における加齢性の線維性の茶褐色・泡沫状組織への置換を各月齢で定量化し、その変化とOC 投与との関係性を解析する事にした。それは、一般的に組織の加齢性の線維化はストレスの蓄積と関係している可能性が高く、マウス卵巣においても過去に報告されているからである^{31,32}。そこで、8 ヶ月齢以上のマウス卵巣において、この泡沫状組織(図 9)の面積の占有率を計算することにした。非投与群を使用して解析したところ6 ヶ月齢以下のマウスではこの組織構造がほとんど指摘できなかったために8 ヶ月齢以上と設定したが、8 ヶ月齢以降には加齢とともに増加していく傾向が示された(表 13)。各個体につき卵巣組織切片で最大面積のものについて、占有率を計算したところ、2 ヶ月間でおおよそ指数関数的に増加し、8 ヶ月齢の平均占有率と比較して10 ヶ月齢で2倍、12 ヶ月齢で4倍、14 ヶ月齢では8倍程度の占有率となった(1.5 ± 0.7% n=6 vs. 3.3 ± 3.3% n=11 vs. 5.5 ± 2.0% n=23 vs. 13.7 ± 4.1% n=10)。

表13：マウス卵巣での泡沫状組織の加齢性増加

	非投与群 % (最小 - 最大 匹数)
8m	1.5 ± 0.7 (0.7 - 2.7 n=6)
10m	3.3 ± 3.3 (0.4 - 9.8 n=11)
12m	5.5 ± 2.0 (2.7 - 9.6 n=23)
14m	13.7 ± 4.1 (6.8 - 18.9 n=10)

8ヶ月齢以降の非投与群について、各卵巣について面積が最大となる切片を使用して、茶褐色の泡沫状組織が卵巣全体に占める占有率を計算した（泡沫状組織が卵巣内に占める合計の面積／卵巣全体の面積）。その際には、外れ値を除去する目的で、最大値と最小値を除外して、平均値±標準偏差という形で表示した。6ヶ月齢以前には見られない泡沫状組織が、8ヶ月齢より2ヶ月ごとに乗数的に増加した。

OC 投与での排卵数に差が出る 12・14 ヶ月齢については連続切片を使用した詳細な比較検討も行った(表 14)。250 μ m に 1 枚のスライドを使用し、各卵巣組織について 10-15 枚程度が計測の対象となった。卵巣髄質を中心に存在するため泡沫状組織の解析に連続切片を使用して卵巣全体に近似することを目指した。その結果、12 ヶ月齢では投与群で約 25% 程度の (5.1 ± 1.6% n=23 vs. 3.9 ± 2.3% n=22 P < 0.05)、14 ヶ月齢では投与群で約 40% 程度の有意な減少が見られた (13.3 ± 4.2% n=10 vs. 7.7 ± 4.2% n=14 P < 0.01)。

表14：OC投与での泡沫状組織の占有率の減少

月齢	非投与群 % (最小 - 最大 匹数)	投与群 % (最小 - 最大 匹数)	P値
12m	5.1 ± 1.6 (2.3 - 7.3, n=23)	3.9 ± 2.3 (1.0 - 8.7, n=22)	<0.05
14m	13.3 ± 4.2 (7.1 - 19.7, n=10)	7.7 ± 4.2 (1.6 - 16.6, n=12)	<0.01

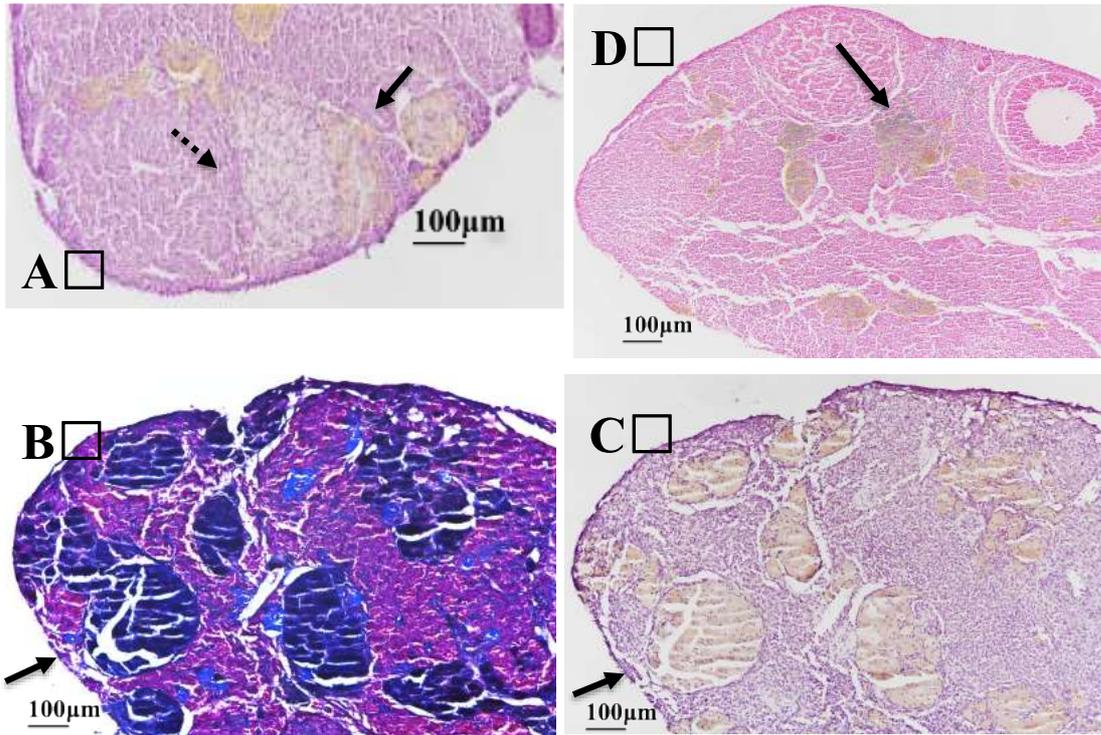
各卵巣について250μmにつき1枚の連続切片を使用して、茶褐色の泡沫状組織の占有率を計算した（泡沫状組織が卵巣内に占める合計の面積／卵巣全体の面積）。それぞれおよそ10-15枚程度のスライドを解析することになった。12ヶ月齢・14ヶ月齢で占有率は有意に減少した。外れ値を除去する目的で、最大値と最小値を除外し、平均値±標準偏差という形で表示した。

この結果から、長期間の OC 投与群においては 12 ヶ月齢以降に何らかの作用機序があって、卵巣の線維化を軽減させている可能性が示された。

(5) 高齢マウスの卵巣組織に見られた泡沫状組織の特徴についての検討

卵巣内の卵胞数についての検討の次に、HE 染色の検体を使用して、主に 10 ヶ月齢以降のマウス卵巣組織内にみられた、卵巣髄質を中心にして存在する明るい茶色で多核の巨大な泡沫状細胞の集団で形成される組織について解析した(図 9)。HE 染色切片の観察と解析から、卵巣組織において加齢性に指数関数的に増加していくことが示されたため、過去に巨大なマクロファージとして報告されたものであったことなどを参考にして^{31,32}、ストレスや線維化などに関連しているであろうことの予測や、黄体組織に隣接する像からの(図 17-A)、形態学的に白体に近い組織であることの予想をもとにして解析を進めた。実際に後述のように本研究でもマクロファージの性質は指摘された(図 18-C)。10 ヶ月齢以降に加齢性に増加するこの組織の特徴を、特殊染色・免疫染色を用いて解析した。

図17：マウスの泡沫状組織の特徴（特殊染色）

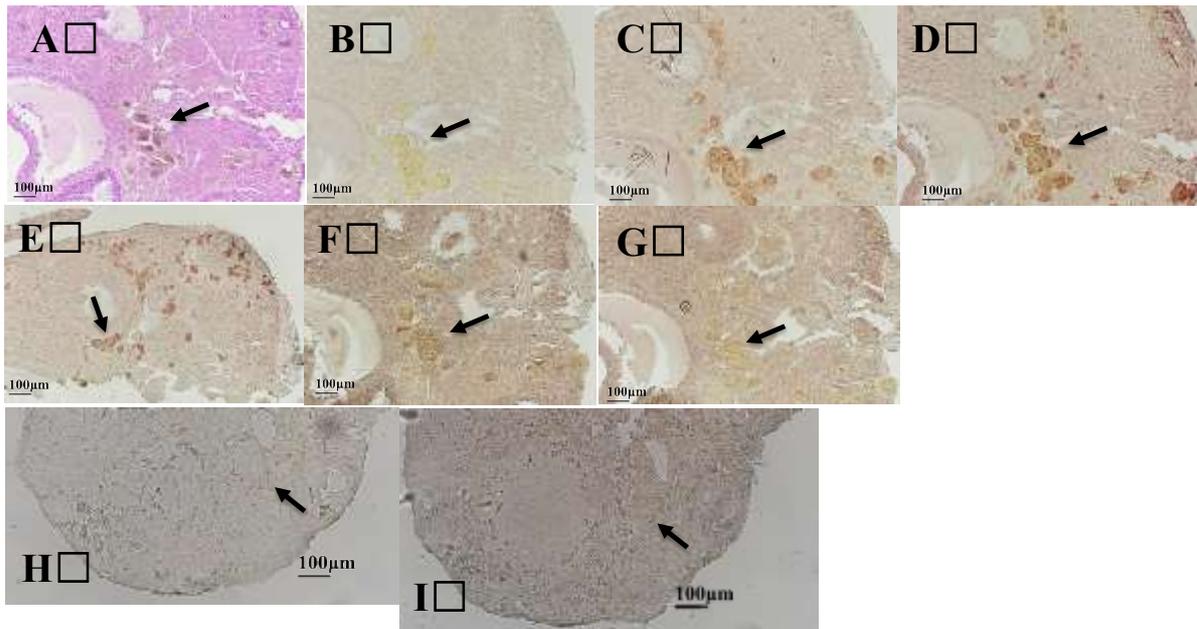


(A) 12ヶ月齢OC投与マウスの卵巣組織HE染色で、白色の黄体（点線矢印）と泡沫状組織（矢印）が共存している。(B) 18ヶ月齢マウスの卵巣組織でアザン染色を施行。青色部位が膠原線維を示す。(C) コントロール（ヘマトキシリン染色のみ）。(D) 12ヶ月齢非投与マウスの卵巣組織でベルリンブルー染色を施行した。水色部分が鉄分を含有している。スケールバーは100µmで統一した。□

(A) 第一に、(1) 膠原線維(アザン染色、青色発色) (図 17-B)、(2) 鉄染色(ベルリンブルー染色、水色発色) (図 17-D)、(3) 抗マロンジアルデヒド(MDA)抗体(過酸化脂質分解物、AECキットでの発色のため赤色発色) (図 18-D)、(4) 抗4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)抗体(過酸化脂質分解物、赤色発色)で陽性であることから(図 18-E)、酸化ストレス産物である可能性が高いことが示唆された。また、一方過去の報告と同様に 12ヶ月齢マウスの卵巣組織では、(5) 抗 F4/80 抗体(マクロファージ、赤色発色)で免疫染色が陽性となった(図 18-

C)。しかし、さらに高齢のマウス群(18ヶ月齢など)では陽性とならなかった(図 19-B)。その際に、MDA では陽性であったため(図 19-C)、泡沫状組織内にストレスの蓄積は存在するが、加齢性に卵巣組織で免疫学的変化が起こっている可能性を示唆していた。

図18：マウスの泡沫状組織の特徴（免疫染色） □

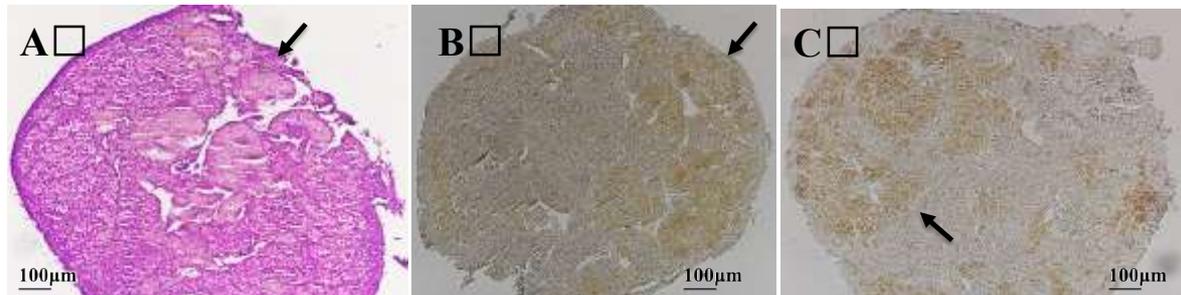


(A-I) 12ヶ月齢非投与マウスの卵巣組織の免疫染色所見（泡沫状組織は矢印）。HE染色（A）、一次抗体なし（B）をコントロール群として、AECキットを使用して赤色部分が陽性の組織となった。それぞれ抗体は、（C）F4/80、（D）MDA、（E）HNE、（F）GDF9、（G）DDX4。（H, I）12ヶ月齢非投与マウスの卵巣組織に対する抗LHCGR抗体での免疫染色（I）で陰性を確認。（H）は一次抗体なしのコントロール。スケールバーは100 μ mで統一した。□

一方で、(6) 抗黄体形成ホルモン・絨毛膜性性腺刺激ホルモンレセプター (LHCGR) 抗体(顆粒膜細胞・莖膜細胞・黄体、赤色発色) (図 18-I)、(7) 抗 growth differentiation factor 9 (GDF9) 抗体(生殖細胞、赤色発色) (図 18-F)、(8) 抗 DEAD-Box Helicase 4 (DDX4) 抗体(生殖細胞、赤色発色) では染色されなかった(図 18-G)。従って、生殖細胞系や LHレセプターをもつ機能的な顆粒膜細胞由来の細胞(顆粒膜・莖膜細胞、黄体)ではないことが示

された。以上の結果から、黄体の退縮後の白体組織に近いが、長時間が経過した陳旧性のものである可能性が高いことを推測した。

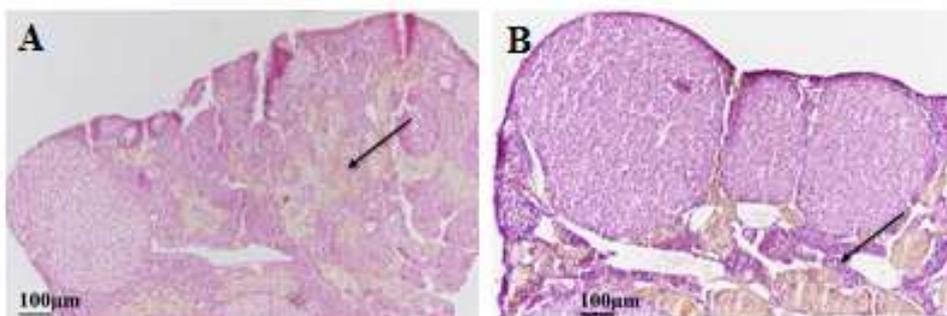
図19：マウスの泡沫状組織の特徴（18ヶ月齢） □



(A-C) 18ヶ月齢マウスにおける卵巣内の泡沫状組織（矢印）が、F4/80陰性（B）、MDA陽性（C）となっていることを示している。（A）コントロールとして、HE染色。スケールバーは100µmで統一した。□

(B) 特殊染色・免疫染色からストレスに深く関係する可能性が示唆されたが、その解析と並行して、マウスにおいて出産との関係性についても観察した。顕微鏡を使用した観察から、経産マウスにおいてこの泡沫状組織が増加している傾向が観察されたので(図 20)、前述の卵巣全体の面積における占有率の比較検討を、12ヶ月齢マウスについて、未経産、経産、妊娠(中)マウスの卵巣を使用して行った。

図20：経産マウス卵巣の泡沫状組織の所見



12ヶ月齢マウスで、出産後（経産）マウス（A）、妊娠中マウス（B）の卵巣組織所見では、茶褐色・泡沫状組織（矢印）の増加が見られる。スケールバーは100µmとした。

その際には前述の 12 ヶ月齢における自然交配実験で解析されたマウスの卵巣を使用して、各卵巣の最大面積となる組織切片を使用して占有率を計算したところ、未経産マウスと比較して後二者がどちらも多かった(未経産:5.5 ± 2.4% n=25, 経産:6.8 ± 4.3% n=7 P = 0.29, 妊娠:14.1 ± 10.4% n=5 P < 0.01)(表 15)。このことは、妊娠経過によって卵巣機能が使用されることも泡沫状組織の増加に関係している可能性を示し、未経産・経産マウスの卵巣を区別して解析の対象として扱うことの必要性を示していた。

表15：経産マウス卵巣の泡沫状組織の増加傾向

	% (最小 - 最大 匹数)	P値
未経産マウス	5.5 ± 2.4 (2.0 - 9.6 n=25)	
経産マウス	6.8 ± 4.3 (1.2 - 12.9 n=7)	0.29
妊娠マウス	14.1 ± 10.4 (5.3 - 31.1 n=5)	<0.001

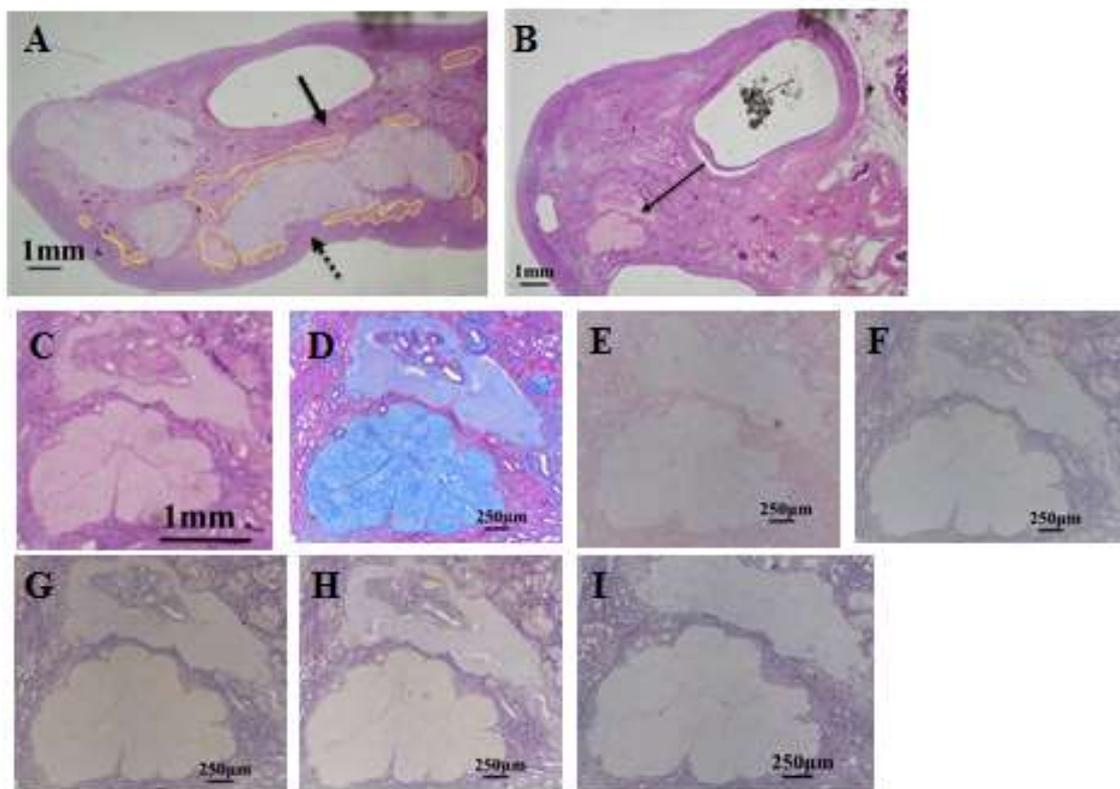
12ヶ月齢マウスについて、未経産・経産・妊娠マウスの各卵巣について面積が最大となる切片を使用して、茶褐色の泡沫状組織が卵巣全体に占める占有率を計算した(泡沫状組織が卵巣内に占める合計の面積/卵巣全体の面積)。経産マウスでの増加傾向と、妊娠マウスでの有意な増加があった。平均値±標準差という形で表示。

(6)ヒトの卵巣の陳旧性白体の特徴の検討とマウスの泡沫状組織との比較

生殖的に見て高齢のマウスにみられた組織と類似して、過去の報告でヒト卵巣組織において、加齢とともに排卵周期とは別に蓄積されていく線維化を伴った白体が報告されているため³³、マウスの組織との類似点を検索する目的で、同様の解析を行った(図 10)。

(A)ヒト卵巣における HE 染色の組織切片ではピンク色の組織がみられ、マウスと同様に白銀色の黄体組織と共存している像がみられる組織検体も存在した(図 17-A、21-A)。

図21：ヒト卵巣の陳旧性白体の所見



(A) 40歳未経産婦卵巣組織における、白体(矢印)と黄体(点線矢印)の共存像。38歳経産婦の典型的な所見をもつ陳旧性白体を利用した特殊染色・免疫染色。HE染色弱拡大(A)、強拡大(B)。特殊染色として、マッソントリクローム染色(膠原線維染色=青色)陽性(C)、ベルリンブルー染色(鉄染色=水色)陰性(D)。鉄染色については、血管内に見られる血球は染色されていた。免疫染色として、一次抗体なし(E)、抗MDA抗体陽性(F)、抗HNE抗体陽性(G)、抗LHCGR抗体陰性(H)。DABキットで発光したため、免疫染色は茶色発色としている。

(B)次に典型的な形態をしているという理由から、38歳1産子宮頸癌患者の病理学的に異常のない卵巣組織切片を使用して、特殊染色・免疫染色で解析した。(1)膠原線維(青色発色)(図21-D)、(2)抗マロンジアルデヒド(MDA)抗体(DABキットでの発色のため茶色発色)(図21-G)、(3)抗4-ヒドロキシ-2-ノネナール(HNE)抗体(茶色発色)で陽性であることから、酸化ストレス産物である可能性が高いことが示された(図21-H)。しかし、マウスと比較して、(4)鉄染色(水色発色)では染色されなかった(図21-E)。また、抗LHCGR抗体(茶色

発色)ではマウスと同様に染色されなかった(図 21-I)。以上から、線維化やストレス含有という見地からは高齢マウスに見られる泡沫状組織と近い特徴を持っていることが示された。

表16：ヒトにおける経産と陳旧性白体の占有率の増加の関係

	経産婦 (n=13) (最小 - 最大)	未経産婦 (n=21) (最小 - 最大)	P値
年齢	38.2 ± 3.6 (28 - 41)	36.0 ± 4.8 (28 - 42)	0.17
占有率	7.4 ± 7.1 % (0.0 - 24.5)	5.4 ± 5.8 % (0.3 - 28.3)	0.40

子宮頸癌・子宮体癌患者の卵巣HE染色検体を使用して、卵巣組織における陳旧性白体の占有率を計算した。平均年齢は経産婦がやや高く、有意差はないものの占有率は増加傾向があった。各卵巣について面積が最大となる組織切片を使用した(卵巣における陳旧性白体の合計面積/卵巣全体の面積)。平均値±標準変という形で表示。

(C)加えて、マウスの組織と同様の方法を用いて陳旧性白体の定量化をヒトについても行った。ヒト卵巣組織については、28-42歳の年齢で子宮頸癌・体癌のために正常卵巣を摘出した未経産婦 21人・経産婦 13人を対象として、マウスの泡沫状組織の占有率と同様の解析を行った(表 16)。卵巣組織切片は転移部位の有無を検索するために作成された HE 染色の検体であり、各患者について卵巣の最大面積となる切片を使用した。このヒトの検体を使用した解析でも、マウスと同様の(1)経産婦での増加傾向(7.4 ± 7.1% n=13 vs. 5.4 ± 5.8% n=21 P = 0.40, 表 16)、(2)加齢性の有意な陳旧性白体の増加が観察された(6.5 ± 2.0% n=8 vs. 2.7 ± 2.3% n=9 P < 0.01, 表 17)。

表17：ヒト卵巣における加齢性の陳旧性白体の占有率の増加

	28 - 37歳 (n=9) (最小 - 最大)	38 - 42歳 (n=8) (最小 - 最大)	P値
平均年齢	32.2 ± 3.8	40.3 ± 1.6	<0.01
占有率	2.7 ± 2.3 % (0.9 - 6.7)	6.5 ± 2.0 % (3.2 - 8.7)	<0.01

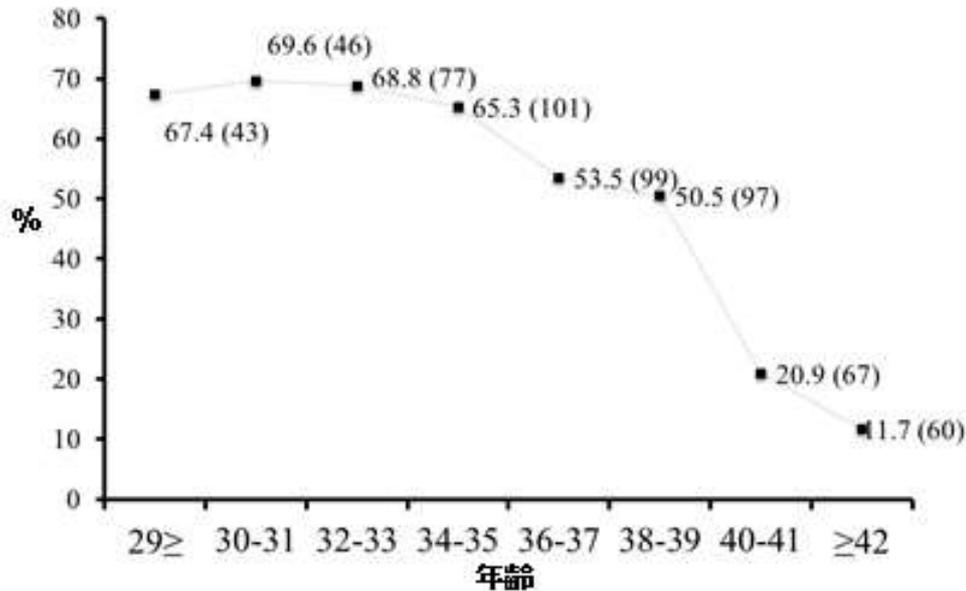
子宮頸癌・子宮体癌患者のうち未経産婦を対象に卵巣HE染色検体を使用して解析。38歳未満と38歳以上にわけて分類し、占有率を計算した(卵巣における陳旧性白体の合計面積/卵巣全体の面積)。各卵巣について面積が最大となる組織切片を使用し、外れ値を除外するために、最大値と最小値を採用しなかった。38歳以上の群で有意な増加を指摘した。平均値±標準変という形で表示。

この結果から、高齢マウスの卵巣組織に増加していく所見が見られる泡沫状組織は、ヒトの陳旧性白体と類似した組織であり、「陳旧性白体様の組織」と呼べるものである可能性が高いことを示唆した。年齢は、不妊治療の成績の明らかな低下とその原因である貯蔵卵胞数の低下が著明となるとされる 38 歳を境界として解析した(図 2)。

(7)ヒト不妊治療の成績から推測した生殖能力の加齢性低下とマウスとの比較

2001-2010 年に当院で不妊治療を受けた初産婦を対象に生殖補助医療 (ART) 施行患者 590 人について年齢別 (29 歳以下、30-31、32-33、34-35、36-37、38-39、40-41、42 歳以上) に累積生児獲得率 (生児数/全患者数、治療回数は考慮しない) を計算した (図 22)。35 と 36 歳の境で、明らかな獲得率の低下が開始され、40 歳でピークの 1/3 程度 (20.9% vs. 67.4%)、42 歳で生児獲得がほとんど起こらないという結果となった (11.7%)。

図22：ヒト体外受精における年齢別の累積生児獲得率



2001-2010年に受診した590人の体外受精（IVF/ICSD）の成績を解析した。該当する治療開始の年齢について累積生児獲得率（生児数/全患者数）を計算し、全体では、51.4%（303/590人）が生児獲得をした。

マウスの生殖能力の低下を調べた場合には(図 16、表 11)、8ヶ月齢で排卵数が明らかな減少を始め、12ヶ月齢で1/4程度まで急落し、14ヶ月齢で1/6程度まで減少していたため、特にヒトのART成績と対応させると、35歳と8ヶ月齢、40歳と12ヶ月齢、42歳と14ヶ月齢とみなすことができた。

(8) マウスにおける経口避妊薬の最適投与期間の検討

ヒトへの応用を検討する際に、コンプライアンスやコストの問題から可能な限り投与期間を短縮することが望ましいため、OC投与期間を短縮することを目的とした更なるモデルマウスを作成した。排卵誘発を使用した検討では、10ヶ月齢においてOC投与群と非投与群で排

卵数に差が無く(投与群:8.9 ± 4.2 個 vs. 非投与群:10.9 ± 5.4 個, p = 0.24, 表 7)、12ヶ月齢で有意差があったため(投与群:8.4 ± 4.7 個 vs. 非投与群:5.9 ± 4.0 個, p < 0.01, 表 7)、10~12ヶ月齢の2ヶ月間投与したモデル(2mOC 投与群)、また OC の短期間投与のモデルとして1週間投与したマウス(1wOC 投与群)について排卵数を計測した(どちらも PMSG 注射前日まで投与した)(図 6)。2mOC 投与群で有意に排卵数の増加が見られ(9.4 ± 4.2 個 vs. 5.9 ± 4.0 個, P < 0.05)、1wOC 投与群で効果がなかったことから(5.2 ± 3.2 個)、保護効果が発揮されるには一定の長期間の投与が必要であり、不妊治療で施行されるような排卵誘発直前数周期の投与による効果は本実験では見られないことが示された。この結果は前述のマウスとヒトにおける加齢性の生殖能力低下の比較からは、ヒトで 35 歳程度から有効である可能性を示唆していた。

表 18 : 12ヶ月齢マウスにおけるOC投与期間と排卵数の関係

群	排卵数(排卵個体数/全個体数)	P
非投与	5.9 ± 4.0 (45/52)	
1w OC投与	5.2 ± 3.2 (10/11)	0.604
2m OC投与	9.4 ± 4.2 (12/14)	<0.05
10m OC投与	8.5 ± 4.7 (61/69)	<0.01

PMSG投与直前の1週間、2ヶ月間OC投与を行ったマウスについて排卵数を比較した。排卵個体のみを対象として平均値±標準偏差を計算した。10ヶ月OC投与群は前述のOC投与群であるが、2ヶ月でも同様に有意に排卵数は増加した。一方で、1週間では効果が見られなかった。

考察

生殖能力の低下は卵巣機能の加齢性低下が最も大きく寄与するため、卵巣機能の温存が大きなテーマとなっている。その背景には、日本を含めた先進国の社会現象として、晩婚化や妊娠・出産の高齢化が進行しているため、生殖能力の加齢性低下に対する対策の必要性が大きくなっていることがある。不妊治療の発達と平行して、究極的手法として卵子・受精卵の凍結保存などが選択肢となりつつあるが、費用や制度的な問題、決断へのハードルの高さを考慮すると、効果的であっても完全に浸透する方法とは考えにくい。また、栄養状態やサプリメント、抗酸化効果を持つ内服薬での卵巣機能保護効果を示した報告も多いという産婦人科学的な研究の流れも参考にして、今回の実験系を検討した。本研究は、「生殖能力低下は卵巣機能の加齢性低下が原因し、卵巣機能の加齢性低下は無数の排卵周期に伴う卵巣の組織損傷が関係する。したがって、排卵抑制を行うことで卵巣機能の温存が可能ではないのか」というシンプルな作業仮説に基づいている。経口避妊薬(OC)投与方法もヒトに合わせて経口投与を一日一回とした。性周期に伴う貯蔵卵胞量の減少はアポトーシス機構が関係しているため、単純に排卵抑制を行った場合では防止できないことが予想されたが、排卵に伴う物理的・酸化的な卵巣組織破壊に対する保護作用は期待されることが予想された。OCは1960年代から避妊目的で使用され、現在は(極)低用量ピルとして嘔気などの副作用も軽減され、安全性も確立された薬剤であり、同時にその副次効果について

の様々な研究がなされている(表 19)³⁴⁻³⁶。

表19：OCの副次効果一覧表

疾患・病態リスト
1 不正性器出血(過多月経、不順など)
2 月経困難症
3 男性化徴候(脂漏症、多毛症、頭痛、多嚢卵性卵巣症候群など)
4 月経前症候群
5 卵巣嚢胞(単純性嚢胞)
6 子宮内膜症性/子宮線筋症
7 子宮筋腫
8 骨盤内炎症性疾患
9 関節リウマチ
10 多発性硬化症
11 月経関連片頭痛
12 骨粗鬆症
13 発声機能
14 喘息
15 子宮内膜増殖症/子宮体癌
16 良性乳腺腫瘍(乳腺線維嚢胞症、乳腺線維腺腫など)
17 卵巣悪性腫瘍
18 大腸悪性腫瘍

過去の報告をもとにしてOCの副次効果を一覧にした。

2000年より以前には実証はされていないが、OC投与での卵胞保存の効果を主張するグループも存在していた^{35,37}。しかし、OCの卵巣保護効果を明確に示した研究成果はなく^{38,39}、最近のヒトを対象とした不妊治療についての研究で主に、血清AMH値や胞状卵胞数(antral follicle count:AFC)などの指標を用いた卵巣予備能の評価において、OC投与がマイナスの効果をもっている可能性が指摘されている^{28-30,40}。過去の報告において保護効果を検討する上で一番問題となっているのは、対象を抽出するための明確な基準を設けていなかった点であり、OCの使用とは関係なく生殖能力が高い可能性がある経産婦や若年女性が含まれていることが結果を一定方向に導かない原因と考えた⁴¹。今回の結果もOC投与の保護効果は特定の年齢に限定的である可能性が高く、母集団を限定した実験が少な

いということが OC 投与による見解が各研究で割れている要因となっているという可能性を示していた。その点を考慮すると、未経産マウスに限定し、加齢性変化を生殖年齢のほぼ全域で追うことを可能にした点が、本研究の最も有意義なポイントの一つと言える。今回の OC 使用のターゲットが主に未経産婦で生殖的に高年齢の女性であるという点で、発想の転換であった。将来の挙児希望のために卵巣機能を保護するという、予防的な意味をもっていることが重要である。月経関連の疾患や一部の婦人科良性疾患の場合を除くと、本来 OC は大半の場合避妊目的で使用されてきたため、生殖年齢的には若年が中心であり、パートナーがいる・経産婦であるなどの性的アクティビティが高い群に偏りがちであったが、今まで OC を使用しないと思われた新しい使用対象層を狙っている。同時にヒトの臨床試験を行うと仮定すると、高齢マウスにとって短縮された投与期間をヒトに換算して観察期間を設定したとしても、2～5 年程度の長期間を 35 歳前後の未経産婦に対して施行することとなり、他の動物での実験結果がない場合は、現実的ではないという問題もある。本実験で使用された排卵抑制モデルマウスはわれわれが知る限りで初めての試みであるということも、寿命が 2～3 年程度・生殖可能期間が 14 ヶ月程度のマウスの実験であった場合でも、OC 投与で有意差がでるまでにも 1 年程度の長い期間が必要であったことが原因であると考えられる。よってヒトにおける約 20 年間の代わりにマウスで 10 ヶ月間投与する必要があった。未経産マウスの生殖能力の評価は PMSG-hCG 刺激による排卵数で比較し、評価基準が両種間で異なるとい

う問題はあったものの、その一方でヒト未経産婦の生殖能力の低下に対する評価も不妊治療(ART)における累積生児獲得率を使用して行った。同時にモデルマウスの観察において、卵胞数の減少と線維化の進行という加齢性変化がみられたことから、卵巣の加齢性の形態学的変化に着目して、OC 投与の効果の作用機序を検討することも試みた。卵胞貯蔵量を検討するために行った卵胞数のカウントを行った解析とは別に、本研究では生殖的高齢マウスの卵巣で見られる茶褐色の泡沫状組織に注目した。この組織は MDA や HNE といった酸化ストレスマーカーで陽性となることから、卵巣組織のストレス蓄積の増加を示している可能性があった。ある程度の高齢から加齢性に増加するこの組織に注目することで OC 投与による保護効果を判定するというアプローチも、われわれが知る限りでは初の試みであった。

OC 投与の保護効果が発揮されるヒトの年齢層についての検討

OC 投与モデルで最も重要な発見は 12 ヶ月齢で排卵数が有意に増加したということであるが(投与群:8.4 ± 4.7 個 vs. 非投与群:5.9 ± 4.0 個, P<0.01)、この効果は 10 ヶ月齢では発揮されず(8.9 ± 4.2 個 vs. 10.9 ± 5.4 個, P=0.24)、14 ヶ月齢では増加傾向のみとなった(6.5 ± 3.7 個 vs. 4.2 ± 3.3 個, P=0.06)。加齢がある程度進行した 12 ヶ月齢で初めて OC 投与の効果がでたことと、若年 C57BL/6N マウスの自然な状態での生涯産仔数が 6-10 匹程度であることを考慮すると、十分な生殖能力がある月齢では OC 効果は発揮さ

れないことが推測された。検証は困難であるが、IVF での発生率が若年でも 100%とならないことも考慮すると、10 個程度の排卵数となる状態が十分な生殖能力と考えられた。同様に 14 ヶ月齢という生殖的に限界月齢では有意差が出ないため、逆に貯蔵卵胞数の自律的な減少という根本的な生殖能力の低下に対しても OC は効果がないことが推測された。この有効期間が限定されているという現象が、OC 使用群についてのヒトの臨床研究の結果が一致した見解を得にくくしているものと推測された。10~12 ヶ月齢の 2 ヶ月間 OC 投与したモデルで排卵数を検討した場合も同様に有意に増加したことで、大幅に短縮された最適な投与期間も検討された。排卵された卵子の質については、体外受精 (IVF) による *in vitro* での発生活過程を比較することで、OC 投与群・非投与群ともに加齢性の受精率・発生率の低下はあるものの、OC 投与群でも非投与群よりも低下することはないことが示された。このことから、排卵数の増加が生殖能力の保護という点で有効であることを示している。*in vitro* と *in vivo* での発生活過程は一般的に *in vivo* の方が複雑で、必ずしも自然妊娠での成績に反映されない可能性が考えられたため、自然妊娠で比較した OC 投与効果の検討も行った^{42,43}。12 ヶ月齢で平均生存胎児数に有意な増加がみられたため (投与群: 6.1 ± 3.6 n=9 vs. 非投与群: 0.3 ± 1.0 n=9, $P < 0.01$)、生殖能力についての排卵数で比較した有意差は、実際の生児獲得までの差となる可能性が高いことが示された。

産仔数や性周期などの生殖システムの種間での差はあるが、モデルマウスの結果と不妊

治療成績から推測したヒト未経産婦の生殖能力を比較することで、同時にヒトでの応用を念頭においた検討をおこなった。非投与群(自然状態のマウスとして検討)での PMSG-hCG 刺激下の排卵数は 6-8 ヶ月齢から低下を始め、10-12 ヶ月齢で急落し、14 ヶ月齢でピーク時の 1/6 程度となっていた(25.2 ± 13.2 個 vs. 4.2 ± 3.3 個)。ヒトの ART での生児獲得率も 35-36 歳から低下を始め、40 歳を境に急落し、42 歳でピーク時の 1/6 程度となった(67.4% vs. 11.7%)。過去の報告とも一致するパターンであったため、妥当であると判断した⁴⁴。このことから、6-8 ヶ月齢を 35-36 歳、10-12 ヶ月齢を 39-40 歳、14 ヶ月齢を 42 歳程度と見なすことができた。さらに、ヒトの生殖年齢が 18 から 42 歳程度、マウスが 2 から 14 ヶ月齢程度と考えるとヒトの 24 年間でマウスの 12 ヶ月間、マウスの 1 ヶ月をヒトの 2 年とみなすことが可能であると考えた。従って、生殖能力の加齢性低下から考えるとマウスでの OC 投与が有効となる 10~12 ヶ月齢を 38 歳から 40 歳ころと見なせ、2 ヶ月間を 4-5 年程度と考えて、ヒトにおける個人差も考慮すると、実際に OC の予防的な使用を推奨する年齢を 35 歳からとした。それは、生殖能力の加齢性低下が急激に進行する前から開始することが望ましいという結果でもあった。

卵巣の加齢性の形態学的変化の検討と OC 投与による保護効果の作用機序の検討

卵巣機能の加齢性低下は貯蔵卵胞量の減少と卵巣組織破壊の二つの経路が中心となっているが、本研究では卵巣組織切片を使用した形態学的な解析によって、卵巣機能低下に対する保護作用の機序を検索した。OC 投与による排卵抑制で、無数の排卵周期による卵胞の消費や物理的・化学的な面での卵巣組織破壊の軽減がおこっているのではないかと仮説を立ててプログラムしたモデルであった。まず、貯蔵卵胞量について検討した。原始卵胞数のカウントについては、同様に生殖能力について検討したタイプの過去の報告で貯蔵量を反映しているとされているが、本実験では切片の厚さなどの技術的問題があり施行できなかった。しかし、過去の報告からある程度の大きさの卵胞の数も貯蔵量に比例するとされているため、形態的に判断して一次・二次・成熟卵胞についてのカウントは行った。OC 投与群において排卵数で増加がみられた 12・14 ヶ月齢では、3 種類の卵胞全てで有意な変化は見られなかった。同様に不妊治療を中心にして、卵巣予備能を反映しているとされる血清 AMH 値についても 12・14 ヶ月齢でともに有意な差を検出できなかった。従って、今回の評価基準の範囲では加齢性の卵胞貯蔵量の減少に対しては OC 投与による排卵抑制の効果がない可能性が高いことが示された。

一方で、文献上では 2 例の研究で報告されている卵巣内の構造物であるが、今回の実験では特にこの泡沫状組織に注目した^{31,32}。自然状態のマウスで 8 ヶ月齢から見られ始め、10 ヶ月齢以降に顕著に髄質を中心に見られる、茶褐色・泡沫状・多核の明るい細胞集団が

HE 染色の切片で観察された。過去の研究では、F4/80 が陽性となるマクロファージ由来の細胞であり、MDA、HNE などの脂肪酸化のストレスマーカーで陽性となることや、膠原線維や鉄を内部に指摘できることが報告されていたため、本研究でも同様の解析をまず行った。過去の報告との違いとして、マウスの卵巣で 14 ヶ月齢以降にみられる特に巨大な泡沫状組織は F4/80 陽性とならないという新しい発見を得た。このことは加齢性にこの組織が蓄積されていく中で、その免疫学的性質も変化していく可能性を示していた。抗 LHCGR 抗体では免疫染色が陰性となったため、活性をもった状態の顆粒膜・莢膜細胞由来の黄体や白体である可能性が低く、このことが「陳旧性」ということの根拠となっている。加えて過去の報告で示されたヒトの陳旧性白体についても同様に検索したが、マッソントリクローム染色で膠原線維が、MDA・HNE で酸化ストレスが指摘されたが、ベルリンブルー染色では鉄分は指摘されなかった。同様に LHCGR の存在は指摘されなかった。このことからマウスで指摘した組織が、既知である生殖的に高齢のヒト卵巣にみられる陳旧性白体に相当する組織である可能性を示した。この組織は未経産マウスでは主に 10 ヶ月齢、未経産婦のヒトでは 38 歳から明らかに指摘できた。

また、特殊染色・免疫染色を使用した解析から酸化ストレスマーカーそのものや酸化ストレスの結果で起こる線維化が指摘されたことから、この組織は酸化ストレスの蓄積量であると考えて、本研究では加齢性の卵巣組織破壊の程度を定量化するということを試みた。卵巣

組織切片について、卵巣全体の面積への占有率を計算するという単純な方法を使用した、この試みは知る限り、世界で初めであった。まずマウス・ヒトともに加齢性に増加していくことが示すために、各卵巣について面積が最大になる切片 1 枚についてのみの解析を行ったが、マウスにおいては 12 ヶ月齢で 8 ヶ月齢の 3 倍以上 ($5.5 \pm 2.4\%$ $n=25$ vs. 1.7 ± 1.3 $n=8$)、14 ヶ月齢で 8 倍程度 ($13.6 \pm 6.2\%$ $n=12$ vs. 1.7 ± 1.3 $n=8$) に増加し、ヒトでは 38 歳以上で 38 歳未満の 2 倍程度の増加となっていた ($5.9 \pm 2.6\%$ $n=9$ vs. 3.0 ± 2.5 $n=11$)。さらには OC 投与群では有意差はないものの、10・12・14 ヶ月齢全てに関して非投与群と比較して少ない傾向であった。その結果をふまえて、OC 投与モデルマウスで排卵数が有意に増加する 12・14 ヶ月については、卵巣全体を近似するために連続切片での比較を行った。各卵巣について最大面積の解析の場合は、髓質中心に茶褐色の泡沫状組織が存在するという性質から、実際の差が検出されにくいという傾向があったためである。連続切片でのこの組織の占有率は、12 月齢で OC 投与群は有意に少なく ($5.1 \pm 1.8\%$ $n=25$ vs. 3.5 ± 2.1 $n=22$, $p < 0.01$)、14 ヶ月齢でも減少傾向となっていた ($13.3 \pm 4.7\%$ $n=12$ vs. 8.5 ± 6.9 $n=14$, $p = 0.053$)。この結果は、OC による排卵周期の抑制が卵巣の酸化ストレスの蓄積を緩和している可能性を示していた。一方でこの組織についての解析には限界もあり、同等の月齢・年齢で比較した場合に、マウス・ヒトともに経産の場合 (妊娠中においても) に明らかにこの組織が多量に指摘されるため、未経産にのみ適応できるものであった。

しかし、以上の卵巣組織の形態学的検討によって、卵巣機能温存のメカニズムは貯蔵卵胞量の維持というよりは加齢性の酸化ストレス蓄積の緩和を介して起こっている可能性が高いことが示唆された。

結論

経口避妊薬を使用して長期間の排卵抑制モデルマウスを作成し、生殖能力の加齢性変化を比較することで、生殖年齢の大半において無数に行われる排卵周期からフリーとなった高齢マウスでは、排卵数が有意に増加することが発見された。また、各月齢での排卵数の比較と合わせて、最も効果的な投与期間は10～12ヶ月の期間であることも示された。そして同時に行われた卵巣組織の解析から線維化の減少傾向を指摘できたため、その卵巣保護の作用機序は貯蔵卵胞量の維持ではなく、酸化ストレスの加齢に伴う蓄積の緩和によるものと推測された。マウスとヒトのその組織の類似点を比較したうえで、初めてこの線維性の泡沫状組織の定量という指標を用いた。この結果から、ヒトにおいても経口避妊薬の長期間の使用の効果がある可能性が示され、それは35歳からが最も効率がよいという結論に至った。

謝辞

稿を終えるにあたり、御指導・御協力頂いた、東京大学医学部産婦人科学教室の藤井知行教授、大須賀穰教授、平池修准教授に深く感謝致します。また、実験計画・実験手技につき御指導・御協力頂いた、東京大学医学部代謝生理化学教室の栗原裕基教授、栗原由紀子講師、北沢悠美子先生、東京大学医学部病理学教室の深山正久教授、森下保幸先生に心より御礼申し上げます。

参考文献

1. Urman B, Oktem O. Food and drug supplements to improve fertility outcomes. *Semin Reprod Med.* 2014;32(4):245-252. doi:10.1055/s-0034-1375176.
2. Wennberg AL, Opdahl S, Bergh C, et al. Effect of maternal age on maternal and neonatal outcomes after assisted reproductive technology. *Fertil Steril.* 2016. doi:10.1016/j.fertnstert.2016.06.021.
3. Finer LB, Philbin JM. Trends in ages at key reproductive transitions in the united states, 1951-2010. *Women's Heal Issues.* 2014;24(3). doi:10.1016/j.whi.2014.02.002.
4. Tanaka K, Iwasawa M. Aging in rural Japan--limitations in the current social care policy. *J Aging Soc Policy.* 2010;22(4):394-406. doi:10.1080/08959420.2010.507651.
5. Asazawa K. Effects of a partnership support program for couples undergoing fertility treatment. *Japan J Nurs Sci.* 2015;12(4):354-366. doi:10.1111/jjns.12074.
6. Meczekalski B, Czyzyk A, Kunicki M, et al. Fertility in women of late reproductive age: the role of serum anti-Müllerian hormone (AMH) levels in its assessment. *Journal of Endocrinological Investigation* [online]. doi:10.1007/s40618-016-0497-6.
7. Gleicher N, Kushnir VA, Albertini DF, Barad DH. Improvements in IVF in women of advanced age. *J Endocrinol.* 2016;230(1):F1-F6. doi:10.1530/JOE-16-0105.

8. Hart RJ, Abbott D, Barnett D, et al. Physiological Aspects of Female Fertility: Role of the Environment, Modern Lifestyle, and Genetics. *Physiol Rev.* 2016;96(3):873-909. doi:10.1152/physrev.00023.2015.
9. Yuan S, Wen J, Cheng J, et al. Age-Associated Up-Regulation of EGR1 Promotes Granulosa Cell Apoptosis during Follicle Atresia in Mice through the NF- κ B Pathway. *Cell Cycle.* 2016:00-00. doi:10.1080/15384101.2016.1208873.
10. Seifer DB, Baker VL, Leader B. Age-specific serum anti-M μ llerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril.* 2011;95(2):747-750. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.10.011.
11. Lim AST, Tsakok MFH. Age-related decline in fertility: A link to degenerative oocytes? *Fertil Steril.* 1997;68(2):265-271. doi:10.1016/S0015-0282(97)81513-0.
12. Kaipia A, Hsueh AJW. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol.* 1997;59(22):349-363. doi:10.1146/annurev.physiol.59.1.349.
13. Argyle CE, Harper JC, Davies MC. Oocyte cryopreservation: Where are we now? *Hum Reprod Update.* 2016;22(4):440-449. doi:10.1093/humupd/dmw007.
14. Oktay K, Cil AP, Bang H. Efficiency of oocyte cryopreservation: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2006;86(1):70-80. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.03.017.

15. Jain JK, Paulson RJ. Oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2006;86(4 SUPPL.):1037-1046. doi:10.1016/j.fertnstert.2006.07.1478.
16. Fabbri R, Macciocca M, Vicenti R, et al. Long-term storage does not impact the quality of cryopreserved human ovarian tissue. *J Ovarian Res*. 2016;9(1):1-10. doi:10.1186/s13048-016-0261-8.
17. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17474-17479. doi:10.1073/pnas.1312830110.
18. Saller S, Merz-Lange J, Raffael S, et al. Norepinephrine, active norepinephrine transporter, and norepinephrine-metabolism are involved in the generation of reactive oxygen species in human ovarian granulosa cells. *Endocrinology*. 2012;153(3):1472-1483. doi:10.1210/en.2011-1769.
19. Zhang JQ, Shen M, Zhu CC, et al. 3-nitropropionic acid induces ovarian oxidative stress and impairs follicle in mouse. *PLoS One*. 2014;9(2). doi:10.1371/journal.pone.0086589.
20. Özcan P, Fıçıcıoğlu C, Kizilkale O, et al. Can Coenzyme Q10 supplementation protect the ovarian reserve against oxidative damage? *Journal of Assisted Reproduction and*

Genetics. 2016:1-8.

21. Fernando S, Osianlis T, Vollenhoven B, Wallace E, Rombauts L. A pilot double-blind randomised placebo-controlled dose-response trial assessing the effects of melatonin on infertility treatment (MIART): study protocol. *BMJ Open*. 2014;4(8):e005986. doi:10.1136/bmjopen-2014-005986.
22. He C, Wang J, Zhang Z, et al. Mitochondria synthesize melatonin to ameliorate its function and improve mice oocyte's quality under in vitro conditions. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060939.
23. Maguire K, Westhoff C. The state of hormonal contraception today: Established and emerging noncontraceptive health benefits. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;205(4 SUPPL.). doi:10.1016/j.ajog.2011.06.056.
24. Cronin M, Schellschmidt I, Dinger J. Rate of pregnancy after using drospirenone and other progestin-containing oral contraceptives. *Obstet Gynecol*. 2009;114(3):616-622. doi:10.1097/AOG.0b013e3181b46f54.
25. Barnhart KT, Schreiber CA. Return to fertility following discontinuation of oral contraceptives. *Fertil Steril*. 2009;91(3):659-663. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.01.003.
26. Rowen TS, Smith JF, Eisenberg ML, Breyer BN, Drey EA, Shindel AW.

- Contraceptive usage patterns in North American medical students. *Contraception*. 2011;83(5):459-465. doi:10.1016/j.contraception.2010.09.011.
27. Mochida N, Akatani-Hasegawa A, Saka K, et al. Live births from isolated primary/early secondary follicles following a multistep culture without organ culture in mice. *Reproduction*. 2013;146(1):37-47. doi:10.1530/REP-13-0020.
28. Van Den Berg MH, Van Dulmen-Den Broeder E, Overbeek A, et al. Comparison of ovarian function markers in users of hormonal contraceptives during the hormone-free interval and subsequent natural early follicular phases. *Hum Reprod*. 2010;25(6):1520-1527. doi:10.1093/humrep/deq071.
29. Birch Petersen K, Hvidman HW, Forman JL, et al. Ovarian reserve assessment in users of oral contraception seeking fertility advice on their reproductive lifespan. *Hum Reprod*. 2015;30(10):2364-2375. doi:10.1093/humrep/dev197.
30. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, et al. The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Hum Reprod Update*. 2014;20(3):370-385. doi:10.1093/humupd/dmt062.
31. Asano Y. Age-related accumulation of non-heme ferric and ferrous iron in mouse ovarian stroma visualized by sensitive non-heme iron histochemistry. *J Histochem*

- Cytochem.* 2012;60(3):229-242. doi:10.1369/0022155411431734.
32. Briley SM, Jasti S, McCracken JM, et al. Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. *Reproduction.* 2016;152(3):245-260.
doi:10.1530/REP-16-0129.
33. 卵巣の加齢性変化についての形態学的研究.pdf.
34. Schindler AE. Non-contraceptive benefits of oral hormonal contraceptives. *Int J Endocrinol Metab.* 2013;11(1):41-47. doi:10.5812/ijem.4158.
35. Williams JK. Noncontraceptive benefits of oral contraceptive use: an evidence-based approach. *Int J Fertil Womens Med.* 2000;45(3):241-247.
36. Nappi RE, Serrani M, Jensen JT. Noncontraceptive benefits of the estradiol valerate/dienogest combined oral contraceptive: a review of the literature. *Int J Womens Health.* 2014;6:711-718. doi:10.2147/IJWH.S65481.
37. Kaunitz AM. Oral contraceptive health benefits: Perception versus reality. *Contraception.* 1999;59(1 SUPPL.). doi:10.1016/S0010-7824(98)00135-8.
38. Hughes E, Brown J, Collins JJ, Farquhar C, Fedorkow DM, Vandekerckhove P. Ovulation suppression for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(3).
doi:10.1002/14651858.CD000155.pub2.

39. Barnhart K, Mirkin S, Grubb G, Constantine G. Return to fertility after cessation of a continuous oral contraceptive. *Fertil Steril*. 2009;91(5):1654-1656.
doi:10.1016/j.fertnstert.2008.02.122.
40. D'Arpe S, Di Felicianantonio M, Candelieri M, Franceschetti S, Piccioni MG, Bastianelli C. Ovarian function during hormonal contraception assessed by endocrine and sonographic markers: a systematic review. *Reprod Biomed Online*. 2016.
doi:10.1016/j.rbmo.2016.07.010.
41. Jones J, Mosher W, Daniels K. Current Contraceptive Use in the United States, 2006-2010, and Changes in Patterns of Use Since 1995. *Natl Health Stat Report*. 2012;1980(60):1-26.
42. Hino T, Muro Y, Tamura-Nakano M, Okabe M, Tateno H, Yanagimachi R. The Behavior and Acrosomal Status of Mouse Spermatozoa In Vitro, and Within the Oviduct During Fertilization After Natural Mating. *Biol Reprod*. 2016;95(July):1-11.
doi:10.1095/biolreprod.116.140400.
43. Tan K, Zhang Z, Miao K, et al. Dynamic integrated analysis of DNA methylation and gene expression profiles in in vivo and in vitro fertilized mouse post-implantation extraembryonic and placental tissues. *Mol Hum Reprod*. 2016;22(7):485-498.

doi:10.1093/molehr/gaw028.

44. Kamali M, Bahmanpour S. Protective Effects of Flax Seed (*Linum Usitatissimum*)

Hydroalcoholic Extract on Fetus Brain in Aged and Young Mice. *Iran J Med Sci.*

2016;41(3):S51.