

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 磯野 渉

背景

女性の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、およそ 10 組のカップルのうち 1 組が不妊治療を必要としている日本の現状から、今日の産婦人科医にとって、生殖的に高年齢である 35 歳以上未産女性の生殖能力の維持や不妊治療の成績向上は大きな関心の的となっている。加齢性の生殖能力低下は卵巣機能低下が最も直接的に関係するが、それは排卵周期に伴うアポトーシス機序が関係する貯蔵卵胞数の減少と、細胞周期や排卵で発生する活性酸素による卵巣組織破壊という 2 つの過程が深く関係していると考えられている。従って、体外受精/顕微授精などの侵襲的な技術を基盤とした受精卵・卵子・卵巣組織などの凍結保存や、コエンザイム Q やメトホルミンなどの抗酸化的な補助薬などの比較的マイルドな方法論が、卵巣機能保護目的で議論されている。そこで我々は経口避妊薬による長期間の排卵抑制に卵巣保護効果がある可能性を推測し、マウスモデルを用いて検討した。マウスの生殖年齢のほぼ全期間（2～14 ヶ月齢）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で、生殖能力への影響について検討した。加齢性低下との比較において妊馬血清性性腺刺激ホルモン(PMSG)-ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)による排卵誘発を併用した上での排卵数を最も重要な指標とした。

結果

経口避妊薬を使用したマウス排卵抑制モデルの作成と加齢性生殖能力低下への抑制効果

加齢性の生殖能力低下のモデルとして各月齢まで飼育した C57BL/6N マウスを使用し、同時に長期間の経口避妊薬の投与モデルマウスを作成する目的で、低用量ピル（デソゲストレル(DSG)/エチニルエストラジオール (EE)）であるマーベロン 21®を使用した。体重比でヒト投与量の 2 倍量を毎日投与したところ、卵管膨大部の観察や自然交配の結果から 1/10 程度に排卵が抑制されるという効果が得られたので、2 ヶ月齢から毎日経口投与して投与群 (OC 群) を作成した。

2-4, 6, 8, 10, 12, 14 ヶ月齢の非投与群 (control) について採卵数を観察したところ 8 ヶ月齢から急速に低下し、ピークの 2-4 ヶ月齢に対して 12 ヶ月齢で 1/4、

14 ヶ月齢で 1/6 程度になった (2-4 ヶ月齢: 25.2 ± 13.2 個, 8: 13.5 ± 7.0 個, 10: 10.9 ± 5.4 個, 12: 5.9 ± 4.0 個, 14: 4.2 ± 3.3 個)。これに対して、OC 投与群では同月齢の非投与群と比較して、10 ヶ月齢で差がないものの (8.9 ± 4.2 個, $p=0.24$)、12 ヶ月齢で有意差 (8.5 ± 4.7 個, $p<0.01$) が 14 ヶ月齢で改善傾向 (6.5 ± 3.7 個, $p=0.06$) があつた。この結果より OC の効果が出現するのは 10 ヶ月齢以降であることを推測し、10 ~12 ヶ月齢の 2 ヶ月間投与した群 (2m 投与群) を 12 ヶ月齢の非投与群と比較したが、有意に増加した (9.4 ± 4.2 個, $p<0.05$)。採卵数を指標とした生殖能力の比較では、OC 投与はある程度生殖能力が低下する 10 ヶ月齢から有効であり、明らかに低下する 12 ヶ月齢で有意に増加することが示された。

排卵された卵子の質の比較

12 ヶ月齢マウスが排卵した卵子の質を比較する目的で、2-4 ヶ月齢の雄マウスの精子を使用した体外受精(IVF)での受精率・発生率を比較した。OC 非投与群・投与群で差はなかった (受精率: 61%, 63%、発生率: 44%, 48%)。また自然交配後に子宮内の生存胎児数を比較したところ、12 ヶ月齢で有意に増加した (6.1 ± 3.6 vs. 0.4 ± 1.0 , $p<0.01$)。このことから排卵数の増加は生殖能力の改善に直結している可能性が高いことが示された。

マウス卵巢の加齢性の形態学的変化と OC 投与効果の作用機序

保護効果の作用機序を解明すべく、卵巢の加齢性機能低下は貯蔵卵胞数減少と排卵周期に伴う組織破壊が原因とされていることを考慮し、卵巢を形態学的に解析した。第一に連続切片を使用して、卵胞数を比較した。形態から一次・二次・成熟卵胞の三種に分類し、採卵と同様に投与群 (2-4, 6, 8, 10, 12, 14 ヶ月齢)・非投与群 (10, 12, 14 ヶ月齢) について計測した。非投与群で加齢性卵胞数の減少は三種とも見られたものの、10, 12 月齢ともに OC 投与による有意な改善傾向はみられなかったため、貯蔵卵胞数の加齢性減少に対する改善効果は見込まれなかった。第二に加齢に伴っておよそ 8 ヶ月齢から茶色の巨大な泡沫状の線維性組織が卵巢の髄質を中心に増加してくることに注目した。この組織は、12 ヶ月齢で卵巢の 5%程度、14 ヶ月では 10%以上の面積が置換されていたが、OC 投与群では非投与群と比較して 12 ヶ月齢では 25%程度 ($3.9 \pm 2.3\%$ vs. $5.1 \pm 1.6\%$, $p<0.05$)、14 ヶ月齢では 40%程度 ($7.7 \pm 4.2\%$ vs. $13.3 \pm 4.2\%$, $p<0.05$) の有意な減少がみられた。

さらにこの組織の性質を解析する目的で、免疫染色・特殊染色を施行し、マクロファージのマーカーである F4/80 陽性、脂肪の酸化ストレスマーカーである malondialdehyde (MDA)・4-hydroxynonenal (HNE)陽性、マッソントリクローム染色陽性 (膠原線維染色)、ベルリン青染色陽性 (鉄染色) であることから、炎症と酸化ストレスの結果蓄積される組織ということがわかった。

また、ヒトの卵巢組織と比較したところ、子宮頸癌・体癌患者由来のヒト卵巢

検体においては、加齢と共に蓄積されていく白体が MDA・HNE、膠原線維で染色されたことから、高齢マウスの卵巣に見られること組織は、ヒトの陳旧性白体に類似することが示唆された。

ヒト未経産婦の生殖能力の加齢性低下との比較と最適な OC 投与期間の検討

2001-2010 年の東京大学病院での体外受精成績を解析し、未経産婦の生児獲得率の加齢性低下を比較したところ、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 30 歳以下の 1/3 程度、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。この結果をマウスの採卵数の加齢性低下と比較した場合、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ため、OC 投与が有効である年齢を 35 歳程度からと考えた。

結論

以上の研究結果から、OC 長期間投与の効果は生殖能力が著しく低下する 12 ヶ月齢から発揮されること、それは 10 ヶ月齢からの投与という生殖能力が低下し始めた月齢（年齢）からでも十分である可能性が示された。また卵巣の形態学的観察によって、卵巣について加齢性にストレスが蓄積していく可能性を明らかにした上で、OC 長期投与による卵巣機能の保護の作用機序として、卵胞貯蔵量の減少に対する保護効果よりも、排卵周期に伴う卵巣組織破壊に対する保護効果を介している可能性を示した。