

シンポジウム2 中枢神経関連生理活性物質の生殖機能へのかかわり

(3) 排卵過程におけるメラトニンの防衛的役割

—メラトニンは卵胞内で卵と顆粒膜細胞を酸化ストレスから護る—

山口大学 田村博史

【目的】

排卵現象は炎症類似の現象と捉えられている。そのひとつとして、実際に排卵過程においては卵胞内で活性酸素種が発生する。一方、その防衛機構として、卵胞内には種々のラジカルスカベンジャーが存在し、酸化ストレスから卵や顆粒膜細胞を防御している。しかしながら、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につながり、受精障害の原因となっている可能性が指摘されている。

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、生体リズムに関与している。興味深いことに、メラトニンは活性酸素などに対しラジカルスカベンジャーとして働き、抗酸化作用を有することが注目されている。我々はこれまでに、卵巣においてもメラトニンが日内変動を示し、特に卵胞液中にはメラトニンが高濃度に存在し（血中濃度の2倍以上）、卵胞の発育に比例して増加することを明らかにしている。

本研究は、①排卵過程にある卵胞内で酸化ストレスが卵や顆粒膜細胞の質の低下に関与するか、②メラトニンの抗酸化作用に注目し、メラトニンが酸化ストレスを抑制し、卵や顆粒膜細胞の保護に働いているかを検討した。さらに、これらの基礎的研究に基づいて、③メラトニン投与により卵胞内の酸化ストレスを抑制することで、実際に卵の質が改善し妊娠率の向上に繋がるかという臨床成績を検討した。

なお、本研究は当施設の臨床研究倫理審査委員会の承認のもと患者からのインフォームドコンセントを得て行われた。

【方法】

1. 卵についての解析

(1) 体外受精胚移植 (GnRHa-long protocol 法) を施行した 56 症例 56 周期において、hCG 投与 34

時間後の採卵時に採取した卵胞液を用い、卵胞液中の酸化ストレスと変性卵との関係、メラトニン濃度と酸化ストレスとの関係を検討した。酸化ストレスの指標は脂質損傷マーカーとして Hexanoyl-lysine adduct (HEL), DNA 損傷マーカーとして 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) の卵胞液中濃度を測定した。

(2)-①卵に対する活性酸素種やメラトニンの作用を検討するためマウスを用いて実験を行った。3 週齢雌 ICR マウスに pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) 10 IU を投与し、48 時間後に卵巣を摘出した。卵胞より cumulus-oocyte complex を採取し、denuded oocyte を分離採取した。酸化ストレスとして、H₂O₂ (100~500μM) を培養液中に添加し、denuded oocyte を培養した。卵の成熟過程では第一減数分裂が再開し、第一極体の放出がみられるため、12 時間培養後の oocyte の第一極体放出の割合を観察した。

(2)-② H₂O₂ で引き起こされる卵の成熟障害をメラトニンが防止できるかどうかを検討するため、300 mM H₂O₂ と同時にメラトニン (0.1, 1, 10 ng/ml) を添加し denuded oocyte を培養し、12 時間後における第一極体放出の割合を観察した。

(3)-①臨床応用としてメラトニン投与により卵胞内の酸化ストレスを抑制することで実際に卵の質が改善し、妊娠率の向上に繋がるかを検討した。まず、メラトニン投与によって実際に卵胞内の酸化ストレスが抑制されるかどうかを検討した。体外受精胚移植患者に採卵前周期の月経 5 日目より採卵日の前日まで連日メラトニン錠 (3 mg/日, 22:00 服用) を内服していただき、卵胞液中のメラトニン、HEL, 8-OHdG 濃度を測定した。

(3)-②メラトニン投与の臨床成績を検討した。前回の体外受精胚移植が不成功に終わり、受精率が 50% 未満であった 56 症例に対して、採卵前周期の月経 5 日目より採卵日の前日まで連日メラトニン錠 (3 mg/日) を内服していただき体外受精を施

行し、変性卵率、受精率、妊娠率について前回の体外受精周期と比較しメラトニンの効果を検討した。また、前回の体外受精胚移植において受精率が50%未満で不成功に終わった症例で、次の体外受精胚移植もメラトニン投与を行わなかった59症例の成績を対照として比較検討した。

2. 黄体化顆粒膜細胞についての解析

(1) 体外受精胚移植を施行した36症例36周期において、採卵時に採取した卵胞液中の酸化ストレスと progesterone 濃度との関係、メラトニン濃度と progesterone 濃度との関係、メラトニン濃度と酸化ストレスとの関係を検討した。

(2) 顆粒膜細胞に対する酸化ストレスやメラトニンの作用を検討するため、採卵時に採取した黄体化顆粒膜細胞を H₂O₂ 添加で、メラトニン存在下または非存在下で12時間培養し、progesterone 分泌を検討した。

【成績】

1. 卵についての解析

(1) 変性卵率(変性卵数/採卵数)が30%以上の症例(n=10)では、30%未満の症例(n=44)と比較し、卵胞液中の8-OHdG濃度が有意に高値(16.2 ± 8.1 vs 11.5 ± 3.9 ng/ml)を示した。すなわち、卵の質が不良な症例では酸化ストレスが高いことが示された。また、卵胞液中の8-OHdG濃度とメラトニン濃度には有意の負の相関を認めた。

(2)-① H₂O₂ を添加しなかったコントロールでは、第一極体を放出した卵子は92.9%であったのに対し、H₂O₂ 100mM の添加では87.2%、H₂O₂ 200mM では63.4%、H₂O₂ 300mM では17.1%、400mM と500mM では0%であり、H₂O₂ 200mM 以上で第一極体の放出が有意に抑制された。

(2)-② 第一極体放出卵子は、コントロールでは92.3%であったのに対し、H₂O₂ 300mM では28.6%であった。H₂O₂ (300mM) +メラトニン10 ng/ml では62.5%であり、H₂O₂ で抑制された第一極体の放出はメラトニンにより有意に改善した。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ことが明らかとなった。

(3)-①メラトニン投与により卵胞液中のメラトニン濃度はメラトニン非投与周期に比較し有意に増加した(432 ± 260 vs 112 ± 51 pg/ml)。メラトニン非投与周期とメラトニン投与周期における卵胞液中の8-OHdG濃度(17.4 ± 8.8 vs 11.6 ± 0.7 ng/ml)

とHEL濃度(25.0 ± 7.2 vs 19.2 ± 2.5 nmol/L)から、メラトニン投与は実際に、卵胞液中のメラトニン濃度を上げ、酸化ストレスを抑制することが明らかとなった。

(3)-②メラトニン投与周期では前回の体外受精周期と比較して変性卵率は低下し(14.2 ± 25 vs $9.0 \pm 24\%$)、受精率は有意に上昇した(20.2 ± 19 vs $50.0 \pm 38\%$)。また56周期中11周期(19.6%)に妊娠が成立した。一方、前回の体外受精で受精率が不良であったがメラトニン投与を行わなかった59症例では、受精率は(20.9 ± 16.5 vs $22.8 \pm 19.0\%$)と改善を認めず、妊娠成立も59周期中6周期(10.2%)であった。すなわち、メラトニン投与により卵の質と受精率の改善を認め、妊娠率の向上に繋がった。

2. 黄体化顆粒膜細胞についての解析

(1) 卵胞液中の progesterone 濃度とメラトニン濃度との間には有意の正の相関を認め、メラトニン濃度と8-OHdG濃度との間、progesterone濃度と8-OHdG濃度との間には負の相関を認めた。

(2) H₂O₂ 添加により有意に progesterone 分泌は抑制されたが、この抑制作用はメラトニンの同時添加により阻止された。なお、メラトニン単独では黄体化顆粒膜細胞の progesterone 分泌に有意な影響を与えなかった。すなわち、卵胞内における酸化ストレスにより顆粒膜細胞の黄体化が抑制されるが、これをメラトニンは防御することが明らかとなった。

【結論】

本研究は、排卵過程において、松果体ホルモンであるメラトニンが卵胞内で抗酸化作用を有する生理活性物質として働き、酸化ストレスから卵を保護していることを明らかにした。また、この排卵過程に起因する病態として、酸化ストレスによる卵の成熟障害が卵の質の低下に関与していることを示した。さらに本研究は、これらのデータに基づき、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繋がるという臨床応用に発展させた。本研究は、基礎的研究と臨床的研究に基づき、不妊治療における大きな課題である卵の質の低下の病態の一端を解明したもので極めて意義が大きいと考える。さらに、体外受精をはじめとする不妊治療において、卵の質の低下を防止する新たな治療法の確立に繋がると考える。