

クリニカルカンファレンス4 内分泌学の進歩

1) 生殖機能調節における活性酸素の役割

座長：千葉大学
生水真紀夫山口大学
杉野 法広旭川医科大学
千石 一雄

はじめに

卵巣や子宮内膜の機能調節における活性酸素やその消去酵素の役割について、これまで多くの基礎的研究を行ってきた。卵巣では、卵胞の発育の後、排卵現象がおこるが、活性酸素がこの卵胞破裂に関与している^{1)~3)}。排卵後は、黄体が形成されプロゲステロンが分泌されるが、妊娠が成立しなければ、次周期の卵胞発育のため速やかにプロゲステロン分泌が低下する必要がある、この機能的黄体退縮に活性酸素が促進的な役割を果たしている¹⁾⁴⁾⁵⁾。このように、卵巣機能の恒常性の維持に活性酸素が働いているのであるが、消去酵素とのバランスが崩れ、活性酸素が過剰(酸化ストレス)になると異常を引き起こされ疾患に結びつく。たとえば、排卵時期における過剰な活性酸素は卵の質を低下させ受精障害を引き起こす⁶⁾。黄体期中期に何らかの原因で活性酸素が過剰になれば黄体機能不全となり、その原因のひとつに黄体血流の減少がある⁷⁾。このような内分泌学の研究成果を臨床応用に発展させ、新たな治療法を導入しているので紹介する。

1. 卵の質の改善を目的としたメラトニンの有用性

LH サージをシグナルとして排卵現象が開始する。卵胞では基底膜をはさんで外側に内夾膜細胞、内側に顆粒膜細胞がある。LH サージを契機に基底膜は融解し、内夾膜細胞層の血管が顆粒膜細胞層に新生し始める⁸⁾⁹⁾。血管内皮細胞から活性酸素が産生されるほか、白血球遊走因子も産生され、マクロファージや好中球が遊走してくる^{1)10)~13)}。これら白血球は活性酸素を大量に産生するほか、サイトカインも産生する。このサイトカインはパラクリン・オートクリン作用で白血球を刺激し活性酸素やサイトカインをさらに放出させる。このようなことから、排卵現象は炎症にたとえられている。すなわち、排卵過程では、卵は活性酸素に容易に曝される環境におかれる。一方、この活性酸素を消去する消去酵素や抗酸化物質が卵胞内には存在し、卵を保護している^{14)~16)}。したがって、活性酸素と消去

Reactive Oxygen Species and Reproductive Function

Norihiro SUGINO

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University Graduate School of Medicine, Yamaguchi

Key words : Superoxide radical · Oocyte · Melatonin · Corpus luteum · Blood flow

系とのバランスが崩れ活性酸素が過剰になれば、卵は酸化ストレスにより障害を受け、質の低下をきたし、受精障害が引き起こされる⁶⁾。

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^{17)~19)}。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ク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⁶⁾。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^{20)~22)}。

排卵過程にある卵胞内で酸化ストレスが卵の質の低下に関与すること、メラトニンが酸化ストレスを抑制し、卵の保護に働いているという基礎的研究を示し、この成果に基づいて、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という臨床成績を紹介する。

1) 卵についての基礎的な研究

(1) 体外受精胚移植を施行した56症例56周期において、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)を用いた。変性卵率(変性卵数/採卵数)が30%以上の症例では、30%未満の症例に比較し、卵胞液中の8-OHdG濃度が有意に高値を示した。すなわち、卵の質が不良な症例では卵胞液中の酸化ストレスが高いことが示された⁶⁾。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) 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 を投与し、48時間後に卵巣を摘出し卵を採取した。酸化ストレスとして、H₂O₂(100~500 μ M)を培養液中に添加し卵を培養した。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時間培養後の卵の第一極体放出の割合を観察した。さらに、H₂O₂で引き起こされる卵の成熟障害をメラトニンが阻止できるかどうかを検討するため、300 μ MのH₂O₂と同時にメラトニン(0.1, 1, 10ng/ml)を添加し卵を培養し、12時間後における第一極体放出の割合を観察した。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成熟卵子は92.9%であったのに対し、H₂O₂ 100 μ Mの添加では87.2%、H₂O₂ 200 μ Mでは63.4%、H₂O₂ 300 μ Mでは17.1%、400 μ Mと500 μ Mでは0%であり、H₂O₂ 200 μ M以上で第一極体の放出が有意に抑制された。さらに、このH₂O₂(300 μ M)による第一極体放出抑制作用は、メラトニン添加により有意に阻止された。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衛することが明らかとなった⁶⁾。

2) メラトニンを用いた臨床的研究

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(3mg/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。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、卵胞液中の8-OHdG濃度とHEL濃度は有意に低下した。したがって、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⁶⁾。そこで次に、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

(表 1) メラトニン投与の臨床成績

	メラトニン投与 (56 周期)	補助療法なし (59 周期)
前周期の受精率	20.2 + 19.0%	20.9 + 16.5%
今回の受精率	50.0 + 38.0%	22.8 + 19.0%
妊娠率	11/56 (19.6%)	6/59 (10.2%)

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、次回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。表1に示すように、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、受精率は有意に上昇した(20.2±19.0% vs 50.0±38.0%)⁶⁾。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±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。

3) まとめ

排卵過程において、酸化ストレスが生ずると卵の成熟障害が引き起こされる。一方、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、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ことが期待される。

2. 黄体機能不全に対するビタミンEの有用性

黄体はプロゲステロンを分泌し妊娠の成立・維持には不可欠である²³⁾。しかし、妊娠が成立しなければ、次周期の卵胞発育のため速やかにプロゲステロン分泌が低下する必要があり、この機能的黄体退縮に活性酸素が促進的な役割を果たしている¹⁾⁴⁾⁵⁾。実際、退縮期にある黄体では酸化ストレスの指標である過酸化脂質の増加がみられる^{24)~26)}。活性酸素は黄体細胞のプロゲステロン分泌を低下させる²⁶⁾²⁷⁾。この退縮期の黄体における活性酸素の増加には、黄体細胞内の活性酸素消去酵素の低下^{24)~26)28)}、マクロファージの増加¹³⁾、プロスタグランジンF2αの増加²⁵⁾、卵巣血流の低下^{8)9)29)~33)}が関与している。特に黄体血流は黄体機能と密接な関係があることが知られている。ラットの卵巣血流を実験的に低下させると活性酸素の増加とともに血中プロゲステロン値は低下するが、抗酸化剤の投与で阻止することができる³³⁾³⁴⁾。すなわち、卵巣血流の低下により酸化ストレスが引き起こされ黄体機能が抑制される。実際に、黄体機能不全の患者では高率に黄体血流が低下していることが明らかになっている⁷⁾。そこで、上述した基礎的研究成果に基づいて、ビタミンEなどの抗酸化剤や血流改善を目的とした一酸化窒素誘導剤の投与が酸化ストレスや黄体

血流を改善するか、という臨床応用の成績を紹介する。

1) 黄体血流の測定

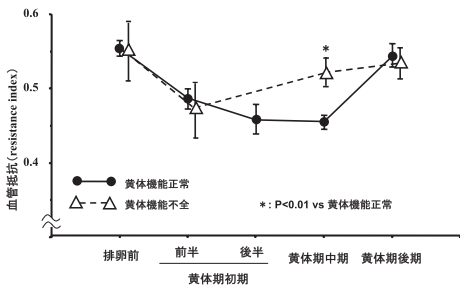
実際に黄体血流と黄体機能との関連を調べるため、黄体血流を経腔超音波カラーパルスドップラを用い、黄体の血管抵抗を測定することにより評価した。まず、正常月経周期を有する黄体機能が正常の症例については、黄体の血管抵抗は黄体期初期の前半から後半にかけて低下し、黄体期中期は初期後半と同じレベルであるが、後期には上昇した(図1)⁷⁾。すなわち、黄体血流は黄体期初期の前半から後半にかけて増加し、黄体期中期は初期後半と同じレベルを維持し、後期には減少する。一方、黄体期中期の血中プロゲステロン値が10ng/ml未満の黄体機能不全症例では、正常に比し、黄体血流は有意に低下していた(図1)⁷⁾。さらに、黄体血流と血中プロゲステロン値の間には有意の負の相関がみられた⁷⁾。すなわち、黄体機能と黄体血流は密接な関係にあることが明らかとなった。

2) 黄体血流の改善

(1) 黄体機能不全の症例では黄体血流が低下している症例が高率であることがわかった。そこで、抗酸化作用を持ち血流改善作用があるビタミンE(600mg/day)を排卵後より投与したところ、14例中13例(93%)で黄体血流が改善され、血中プロゲステロン値も14例中9例(64%)が10ng/ml以上に増加した(表2)。血流改善の有無は、ROC曲線から黄体血管の抵抗値のcut-off値を0.51に設定して評価した。なお、治療介入せず、自然に経過をみた黄体機能不全症例では、8例中1例(13%)で黄体血流が改善し、血中プロゲステロン値は8例中2例(25%)が10ng/ml以上に増加したのみであった(表2)。

(2) 黄体血流低下が活性酸素を介し黄体機能抑制に作用している可能性を検討するため、抗酸化剤としてメラトニン錠(3mg/日、22:00服用)を排卵後より投与したところ、9例中2例(22%)で黄体血流が改善され、血中プロゲステロン値も9例中2例(22%)が10ng/ml以上に増加した程度であり、有意な効果はみられなかった(表2)。

(3) さらに、血流改善作用を持つ一酸化窒素誘導剤であるL-アルギニン(6g/day)を排卵後より投与したところ、10例中10例(100%)で黄体血流が改善され、血中プロゲステロン値も10例中7例(70%)が10ng/ml以上に増加した(表2)。



(図1) 黄体機能正常症例と黄体機能不全症例における黄体血管抵抗の変化

3) まとめ

黄体退縮における、黄体機能の可及的速や

(表2) 黄体機能不全に対する治療成績のまとめ

治療	検討項目	改善率	
		CL-RI (< 0.51)	血中P値 (> 10ng/ml)
無治療		1/8 (13%)	2/8 (25%)
ビタミンE		14/15 (93%)	10/15 (67%)
アルギニン		10/10 (100%)	7/10 (70%)
メラトニン		2/9 (22%)	2/9 (22%)

かな抑制作用に活性酸素が働き、この活性酸素の産生には卵巣血流の低下が関与している。また、黄体機能不全の症例では高率に黄体血流が低下していることが明らかとなった。これらの基礎データに基づき臨床的研究に進んだところ、黄体血流の低下による黄体機能抑制は、活性酸素以外の機序も十分考慮する必要があると思われた。臨床的には黄体血流の改善につながるビタミンEやL-アルギニンによる治療の効果が高かった。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黄体機能不全の病態の一端を解明したもので、血流改善を目的とした新たな治療法の確立に繋がることが期待される。

おわりに

内分泌学の進歩として、活性酸素と生殖機能について、特に、排卵と黄体機能に焦点をあて、当科のデータを中心に報告した。基礎的研究から導き出された研究成果を臨床研究に結びつけた結果、新たな治療法の導入に繋がる研究成果を得ることができた。

謝 辞

本研究に際し、多大な御協力を頂きました。済生会下関総合病院産婦人科の高崎彰久先生、嶋村勝典先生、森岡 均先生に深謝いたします。

《参考文献》

1. Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reprod Med Biol* 2005; 4: 31—44
2. Takiguchi S, Sugino N, Esato K, Karube-Harada A, Sakata A, Nakamura Y, Ishikawa H, Kato H. Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biol Reprod* 2004; 70: 313—318
3. Sugino N, Suzuki T, Kashida S, Karube A, Takiguchi S, Kato H. Expression of bcl-2 and bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4379—4386
4. Sugino N, Okuda K. Species-related differences in the mechanism of apoptosis during structural luteolysis. *J Reprod Dev* 2007; 53: 977—986
5. Sugino N. Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Anim Sci J* 2006; 77: 556—565
6. Tamura H, Takasaki A, Miwa I, Taniguchi K, Maekawa R, Asada H, Taketani T, Matsuoka A, Yamagata Y, Shimamura K, Morioka H, Ishikawa H, Russel JR, Sugino N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *J Pineal Res* 2008; 44: 280—287
7. Tamura H, Takasaki A, Taniguchi K, Matsuoka A, Shimamura K, Sugino N. Changes in blood flow impedance of the human corpus luteum throughout the luteal phase and during early pregnancy. *Fertil Steril* 2008(in press)
8. Sugino N, Matsuoka A, Taniguchi K, Tamura H. Angiogenesis in the human corpus luteum. *Reprod Med Biol* 2008; 7: 91—103

9. Sugino N, Suzuki T, Sakata A, Miwa I, Asada H, Taketani T, Yamagata Y, Tamura H. Angiogenesis in the human corpus luteum : Changes in expression of angiopoietins in the corpus luteum throughout the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005 ; 90 : 6141—6148
10. Nakamura Y, Tamura H, Takiguchi S, Kashida S, Yamagata Y, Sugino N, Kato H. Changes in interleukin-1 β mRNA expression in the rat ovary during the estrous cycle in response to lipopolysaccharide. *Endocr J* 1999 ; 46 : 293—300
11. Ono M, Nakamura Y, Tamura H, Takiguchi S, Sugino N, Kato H. Role of interleukin-1 β in superovulation in rats. *Endocr J* 1997 ; 44 : 797—804
12. Sugino N, Takiguchi S, Ono M, Tamura H, Shimamura K, Nakamura Y, Tsuruta R, Sadamitsu D, Ueda T, Maekawa T, Kato H. Nitric oxide concentrations in the follicular fluid and apoptosis of granulosa cells in human follicles. *Hum Reprod* 1996 ; 11 : 2484—2487
13. Sugino N, Shimamura K, Tamura H, Ono M, Nakamura Y, Ogino K, Kato H. Progesterone inhibits superoxide radical production by mononuclear phagocytes in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 749—754
14. Suzuki T, Sugino N, Fukaya T, Sugiyama S, Uda T, Takaya R, Yajima A, Sasano H. Superoxide dismutase in normal cycling human ovaries : immunohistochemical localization and characterization. *Fertil Steril* 1999 ; 72 : 720—726
15. Sugino N, Takamori-Hirosawa M, Zhong L, Telleria CM, Shiota K, Gibori G. Hormonal regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase mRNA in the rat corpus luteum : induction by prolactin and placental lactogens. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 599—605
16. Sugino N, Telleria CM, Gibori G. Differential regulation of copper-zinc superoxide dismutase and manganese superoxide dismutase in the rat corpus luteum : Induction of manganese superoxide dismutase mRNA by inflammatory cytokines. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 208—215
17. Tamura H, Takayama H, Nakamura Y, Russel JR, Sugino N. Fetal/placental regulation of maternal melatonin in rats. *J Pineal Res* 2008(in press)
18. Takayama H, Nakamura Y, Tamura H, Yamagata Y, Harada A, Nakata M, Sugino N, Kato H. Pineal gland(melatonin) affects the parturition time, but not luteal function and fetal growth, in pregnant rats. *Endocr J* 2003 ; 50 : 37—43
19. Nakamura Y, Tamura H, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Karube A, Sugino N, Kato H. Changes of serum melatonin level and its relationship to fetoplacental unit during pregnancy. *J Pineal Res* 2001 ; 30 : 29—33
20. Nakamura Y, Tamura H, Takayama H, Kato H. Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertil Steril* 2003 ; 80 : 1012—1016
21. Tamura H, Nakamura Y, Takiguchi S, Kashida S, Yamagata Y, Sugino N, Kato H. Melatonin directly suppresses steroid production by preovulatory follicles in the cyclic hamster. *J Pineal Res* 1998 ; 25 : 135—141
22. Tamura H, Nakamura Y, Takiguchi S, Kashida S, Yamagata Y, Sugino N, Kato

- H. Pinealectomy or melatonin implantation does not affect prolactin surge or luteal function in pseudopregnant rats. *Endocr J* 1998 ; 45 : 377—383
23. Sugino N, Telleria CM, Gibori G. Progesterone inhibits 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase expression in the rat corpus luteum through the glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 1997 ; 138 : 4497—4500
 24. Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Karube A, Nakamura Y, Kato H. Superoxide dismutase expression in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *Mol Hum Reprod* 2000 ; 6 : 19—25
 25. Shimamura K, Sugino N, Yoshida Y, Nakamura Y, Ogino K, Kato H. Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *J Reprod Fertil* 1995 ; 105 : 253—257
 26. Sugino N, Nakamura Y, Takeda O, Ishimatsu M, Kato H. Changes in activities of superoxide dismutase and lipid peroxide in corpus luteum during pregnancy in rats. *J Reprod Fertil* 1993 ; 97 : 347—351
 27. Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Suppression of intracellular superoxide dismutase activity by antisense oligonucleotides causes inhibition of progesterone production by rat luteal cells. *Biol Reprod* 1999 ; 61 : 1133—1138
 28. Takiguchi S, Sugino N, Kashida S, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Rescue of the corpus luteum and an increase in luteal superoxide dismutase expression induced by placental luteotropins in the rat : action of testosterone without conversion to estrogen. *Biol Reprod* 2000 ; 62 : 398—403
 29. Matsuoka-Sakata A, Tamura H, Asada H, Miwa I, Taketani T, Yamagata Y, Sugino N. Changes in vascular leakage and expression of angiopoietins in the corpus luteum during pregnancy in rats. *Reproduction* 2006 ; 131 : 351—360
 30. Kashida S, Sugino N, Takiguchi S, Karube A, Takayama H, Yamagata Y, Nakamura Y, Kato H. Regulation and role of vascular endothelial growth factor in the corpus luteum during mid-pregnancy in rats. *Biol Reprod* 2001 ; 64 : 317—323
 31. Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube-Harada A, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in the rat corpus luteum : regulation by oestradiol during mid-pregnancy. *Reproduction* 2001 ; 122 : 875—881
 32. Sugino N, Kashida S, Takiguchi S, Karube A, Kato H. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85 : 3919—3924
 33. Sugino N, Nakamura Y, Okuno N, Ishimatsu M, Teyama T, Kato H. Effects of ovarian ischemia-reperfusion on luteal function in pregnant rats. *Biol Reprod* 1993 ; 49 : 354—358
 34. Kato H, Sugino N, Takiguchi S, Kashida S, Nakamura Y. Roles of reactive oxygen species in the regulation of luteal function. *Rev Reprod* 1997 ; 2 : 81—83
-