

## II.分担研究報告書

### 3 . 呼吸活性測定によるマウス排卵後加齢卵の ミトコンドリア機能の評価に関する研究

分担研究者 高橋 俊文（山形大学医学部講師）

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）  
分担研究報告書

呼吸活性測定によるマウス排卵後加齢卵のミトコンドリア機能  
の評価に関する研究

研究分担者 高橋 俊文 山形大学講師

研究主旨

生殖補助医療の進歩にもかかわらず、その治療成績は改善していない。その最大の要因は不妊治療を受ける女性患者の高齢化であると推測されている。日本国内での生殖補助医療の治療周期に占める35歳以上の患者の割合は、実に76%に及ぶ（2011年 日本産科婦人科学会報告）。35歳以上では妊娠率が低下し、流産率は増加するため、生産率は極めて低下することが治療成績低下の要因である。一方、米国で行われている若年者ドナー卵を用いた生殖補助医療の治療成績は母体年齢に依らないことから（2003年 CDCレポート）、この患者高齢化（加齢）による治療成績の低下は卵の質の低下に起因すると考えられる。加齢卵による卵の質の低下とは何を意味するのか？ミトコンドリア機能低下と染色体異常の増加が特に重要と考えられている。筆者らはこれまで、卵の質の低下した加齢モデル卵としてマウス排卵後加齢卵（排卵後8時間以上、受精に至らず卵管内に留まった卵。以下、マウス加齢卵と略す）を用い、加齢に伴う小胞体機能とミトコンドリア機能の変化について検討を行ってきた。これまでにマウス加齢卵では小胞体機能、特にカルシウムポンプ（ $\text{Ca}^{2+}$  ATPase）機能が低下すること、ミトコンドリア機能が低下すること（ATP産生能が低下、ミトコンドリア膜電位の低下など）が明らかとなった。これらの結果を踏まえ、著者らはマウス加齢卵のミトコンドリア機能の変化を、細胞呼吸測定装置による卵の呼吸活性測定から検討を行った。本稿ではその結果を紹介する。

## 研究協力者

五十嵐秀樹 (山形大学医学部助教)

### A・研究目的

生殖補助医療の進歩にかかわらず、その治療成績は改善していない。その最大の要因は不妊治療を受ける女性患者の高齢化であると推測されている。日本国内での生殖補助医療の治療周期に占める35歳以上の患者の割合は、実に76%に及ぶ(2011年 日本産科婦人科学会報告)。35歳以上では妊娠率が低下し、流産率は増加するため、生産率は極めて低下することが治療成績低下の要因である。一方、米国で行われている若年者ドナー卵を用いた生殖補助医療の治療成績は母体年齢に依らないことから(2003年 CDCレポート) この患者高齢化(加齢)による治療成績の低下は卵の質の低下に起因すると考えられる。加齢卵による卵の質の低下とは何を意味するのか? ミトコンドリア機能低下と染色体異常の増加が、特に重要と考えられている。筆者らはこれまで、卵の質の低下した加齢モデル卵としてマウス排卵後加齢卵(排卵後8時間以上、受精に至らず卵管内に留まった卵。以下、マウス加齢卵と略す)を用い、加齢に伴う小胞体機能とミトコンドリア機能の変化について検討を行ってきた。これまでにマウス加齢卵では小胞体機能、特にカルシウムポンプ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPase)機能が低下すること、ミトコンドリア機能が低下すること(ATP産生能が低下、ミトコンドリア膜電位の低下など)が明らかとなった。クリノ(株)が開発した細胞呼吸測定装置による胚呼吸活性測定は、これまで主に畜産動物の胚において、良好胚を選別する客観的な評価法として有用であることが報告されている。今回、マウス加齢卵でも細胞呼吸測定装置による単一卵子の呼吸活性(酸素消費量)測定により、ミトコンドリア機能が評価可能であるか検討した。

### B・研究方法

当科において体外受精・胚移植(新鮮胚移植、凍結胚移植)を予定したもののうち、正マウス卵の準備した(マウス卵は排卵作用を有する hCG 投与後 12 時間で排卵される)。よって、新鮮卵(コントロール)は hCG 投与後 12-13 時間で卵管より回収し、14-15 時間で測定に供した卵とした。これまでの我々の研究から、hCG 投与後 18 時間で卵管より回収し、20 時間で測定に供した卵は受精率の低下と胚発生の悪化が認められた。よって本研究では、マウス加齢卵は hCG 投与後 18-22 時間で採取し、20-24 時間で測定に供した卵、hCG 投与 42-46 時間で採取し、44-48 時間で測定に供した卵とした。各卵は採卵後直ちに 25IU ヒアルロニダーゼにて顆粒膜細胞を除去し、測定に供した。

呼吸活性(酸素消費量)測定: 卵の呼吸活性は細胞呼吸活性測定装置(クリノ(株) CARS-1.0)により測定した。卵は HTF メディウムを満たした測定用専用チャンバーに静置して測定に用いた。

### C・研究結果

マウス卵 1 個当たりの酸素消費量は新鮮卵で  $3.3 \pm 0.05 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$ 、hCG 投与後 20~24 時間で測定に供した加齢卵では  $2.0 \pm 0.08 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$ 、44~48 時間で測定に供した加齢卵では  $0.7 \pm 0.07 \times 10^{15} / \text{mols}^{-1}$  であった(図)。平均酸素消費量は排卵後の時間に伴い有意に低下した ( $p < 0.05$ )。

### D・考察

ミトコンドリア機能と呼吸活性(酸素消費量)は相関すると考えられる。つまり、ミトコンドリア機能が良好であれば酸素消費量が多いと考えられる。マウス加齢卵での酸素消費量の減少はミトコンドリア機能の低下を示唆するもので膜電位によってもミトコンドリア機能を評価してきた。

ミトコンドリア膜電位はマウス加齢卵で有意に低下していたが、酸素消費量ほど大きな変化は認めなかった。この事は、酸素消費量の測定はより高感度でミトコンドリア機能を評価し得る可能性を示唆する。細胞呼吸測定装置による呼吸活性(酸素消費量)測定は胚だけで無く、卵(未受精卵)にも応用が可能であり、ミトコンドリア機能評価による卵の老化の解析にも有用であると考えられた。

#### E・結論

細胞呼吸測定装置による呼吸活性(酸素消費量)測定により単一卵子のミトコンドリア機能の評価が可能と考えられた。

#### F・健康危険情報

なし

#### G・研究発表

1. Igarashi H, Takahashi T, Matsuo K, Hara S, Amita M, Kurachi H. Systemic complications of premature ovarian failure patients with infertility. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. Kobe, Japan 2013.11.13-14.
2. Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Matsuo K, Amita M, Kurachi H. Brachial to ankle pulse wave velocity as an independent prognostic factor for ovulatory response to clomiphene citrate in women with polycystic ovary syndrome. The 9th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility. Kobe, Japan 2013.11.13-14.
3. 高橋俊文,五十嵐秀樹,原 周一郎,松尾幸城,倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者におけるクロミフェン抵抗性に関する予測因子の検討.

第 86 回日本内分泌学会 仙台  
2013.4.25-27

4. 松尾幸城,高橋俊文,竹原 功,池田美智,原 周一郎,五十嵐秀樹,倉智博久. 凍結融解胚移植周期における融解溶液中のトレハロース濃度が融解後の胚の生存率と臨床成績に及ぼす影響. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12
5. 小島原敬信,高橋俊文,松尾幸城,松村創平,小幡美由紀,松川 淳,倉智博久. 2 年前の膀胱癌由来と思われる腹膜偽粘液腫の 1 例. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12
6. Takahashi T, Seino M, Ohta T, Sudo T, Ishida H, Kurachi H. Evaluation of preventive methods for the symptomatic pulmonary thromboembolism by postoperative anticoagulant therapy in VTE high risk patients with gynecologic malignancy. 第 65 回日本産科婦人科学会 札幌 2013.5.10-12 (IS Poster)
7. 松尾幸城,高橋俊文,竹原 功,原 周一郎,五十嵐秀樹,倉智博久. 単一胚盤胞移植後に二卵性双胎妊娠となった一例. 第 31 回日本受精着床学会 別府 2013.8.8-9
8. 松尾幸城,高橋俊文,五十嵐秀樹,原 周一郎,長谷川歩美,倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者のクロミフェン抵抗性に関する予測因子として pulse wave velocity 測定は有用である. 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
9. 竹原 功,原 周一郎,松尾幸城,長谷川歩美,五十嵐秀樹,高橋俊文,倉智博久. 凍結融解周期における単一胚盤胞移植後の二卵性双胎の一例. 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
10. 五十嵐秀樹,高橋俊文,倉智博久. 加齢に伴う卵の質低下と酸化ストレスの関与(シンポジウム). 第 58 回日本生殖医学会 神戸 2013.11.15-16
11. 高橋俊文,五十嵐秀樹,原 周一郎,網田光善,松尾幸城,倉智博久. 脈波伝播速度(pulse wave velocity)は多嚢胞性卵巣症候群患者におけるクロミフェン

抵抗性の予測因子である．第 18 回  
日本生殖内分泌学会 東京  
2013.12.7

12. 長谷川歩美, 高橋俊文, 渡邊憲和, 山内敬子, 小幡美由紀, 小島原敬信, 倉智博久. 14 歳で発症した卵巣粘液性腺癌の一例. 第 61 回北日本産科婦人科学会 旭川 2013.9.7-8
13. 松村創平, 太田 剛, 清野 学, 須藤毅, 高橋俊文, 高橋一広, 倉智博久. 子宮腺筋症から発生したと思われる類内膜腺癌の一例. 第 61 回北日本産科婦人科学会 旭川 2013.9.7-8
14. 松尾幸城, 五十嵐秀樹, 清野 学, 山内敬子, 原 周一郎, 高橋俊文, 倉智博久. 妊娠初期の卵巣出血にて緊急手術を要した 2 例. 第 61 回北日本産科婦人科学会 旭川 2013.9.7-8
15. 高橋俊文. 卵子の老化と不妊治療. 第 2 回庄内美人いきいき女性フォーラム. 酒田 2013.9.21
16. 松尾幸城, 高橋俊文, 網田光善, 五十嵐秀樹, 倉智博久. 多嚢胞性卵巣症候群患者のクロミフェン抵抗性に関する予測因子として脈波伝播速度測定は有用である. 第 51 回東北生殖医学会 青森 2013.11.2
17. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎, 網田光善, 松尾幸城, 倉智博久. 腹腔鏡併用による卵管鏡下卵管形成術の治療成績および術後妊娠に関する予後因子の検討. 第 51 回東北生殖医学会 青森 2013.11.2

#### 論文発表

1. Ikeda M, Takahashi T, Kurachi H. Spontaneous perforation of pyometra: a report of seven cases and literature of the review. *Gynecol Obstet Invest* 2013;75(4):243-249
2. Matsumura S, Ohta T, Takahashi T, Takahashi K, Yamazaki T, Kurachi H. Non-sex cord-stromal ovarian tumors frequently produce and secrete estrogen in postmenopausal women: impact on bone metabolism and abnormal endometrial histology. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(7):2775-2782

3. Ohyagi-Hara C, Sawada K, Kamiura S, Tomita Y, Isobe A, Hashimoto K, Kinose Y, Mabuchi S, Hisamatsu T, Takahashi T, Kumasawa K, Nagata S, Morishige K, Lengyel E, Kurachi H, Kimura T. miR-92a inhibits peritoneal dissemination of ovarian cancer cells by inhibiting integrin  $\alpha 5$  expression. *Am J Pathol* 2013;182(5):1876-1889
4. Matsuo K, Takahashi T, Igarashi H, Hara S, Amita M, Kurachi H. Effects of different trehalose concentrations in a warming medium on embryo survival and clinical outcomes in vitrified human embryos. *Gynecol Obstet Invest* 2013;76(4):214-220
5. Hara S, Takahashi T, Amita M, Matsuo K, Igarashi H, Kurachi H. Pioglitazone counteracts the tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibition of follicle-stimulating hormone-induced follicular development and estradiol production in an in vitro mouse preantral follicle culture system. *J Ovarian Res* 2013;6(1):69
6. Takahashi T, Igarashi H, Amita M, Hara S, Matsuo K, Kurachi H. Molecular mechanism of poor embryo development in postovulatory aged oocytes: Mini review. *J Obstet Gynecol Res* 2013;39(10):1431-1439
7. Takehara I, Takahashi T, Hara S, Matsuo K, Igarashi H, Kurachi H. Dizygotic twin pregnancy after single embryo transfer: A case report and review of the literature. *J Assist Reprod Genet* 2014 Jan [Epub ahead of print]
8. 高橋俊文, 五十嵐秀樹, 原 周一郎, 網田光善, 松尾幸城, 倉智博久. 腹腔鏡併用による卵管鏡下卵管形成術の治療成績および術後妊娠に関する予後因子の検討. *山形医学* 2014;32(1):1-6
9. 長谷川歩美, 高橋俊文, 倉智博久. [ホルモン療法実践マニュアル] 生殖内分泌分野 高プロラクチン血症. *産科と婦人科* 2013;80:229-233
10. 高橋俊文, 倉智博久. 月経前症候群. *産科婦人科疾患最新の治療* 2013-2015 (吉川史隆, 倉智博久, 平松祐司 編) 南江堂 2013;184-185

H・知的財産権の出願・登録状況  
なし