

厚生科学研究費補助金（厚生科学特別研究事業）

分担研究報告書

卵巢過剰刺激症候群の発症防止に関する研究

- 特に血管透過性亢進因子の制御による発症防止に関して -

（ 分担研究：生殖補助医療の安全性に関する研究 ）

分担研究者 寺尾俊彦 浜松医科大学医学部附属病院長

研究要旨；

卵巢過剰刺激症候群(OHSS)の原因因子の制御による発症防止に関して、内外の文献を検索・研究した。また動物実験により interleukin-8 (IL-8)が重要な原因因子のひとつであることを立証した。(1)文献的研究：最近 33 年間の欧米および日本における主たる医学雑誌において、原因因子とされているもののうち histamine, prostaglandin, angiotensin を制御する試みが 8 文献報告されていた。しかし有効性に関してはいまだ確立されておらず、臨床応用されるまでには至っていなかった。(2)IL-8 投与による OHSS 様卵胞腫大の惹起に関する研究：1) IL-8 腹腔内投与；23 日令の未熟 Wistar rat に対し、pregnant mare serum gonadotropin 10 unit 腹腔内投与による過剰卵胞刺激を施行し、その 48 時間後に生理食塩水(生食)、human chorionic gonadotropin(hCG) 10 unit、IL-8 0.2, 2.0, 20 μ g を各々腹腔内投与した。その結果 hCG 投与群と IL-8 20 μ g 投与群において OHSS 様の卵胞腫大が認められた。メルコックス樹脂を注入した血管構築標本でも、腫大した卵胞を取り巻く著明に拡張した密な血管網、およびそれらの血管からの樹脂の漏出が認められた。2) IL-8 局所投与；無刺激の 7 週令成熟 Wistar rat に対し、左の卵巢には生食、右の卵巢には IL-8 0.1, 1.0, 10 μ g を各々卵巢被膜下に局注した。その結果 IL-8 の 10 μ g 投与群の投与側卵巢において OHSS 様の卵胞腫大が認められた。メルコックス樹脂を注入した血管構築標本でも、卵胞の腫大と著明に拡張した密な血管網が認められた。以上 1)2)の実験結果より、IL-8 は、過剰卵胞刺激後の卵巢に対して、その後の卵胞腫大現象を惹起する重要な原因因子のひとつであることが判明した。またその卵胞液貯留現象の作用機序は、卵胞血管の拡張および透過性亢進によることが推測された。

原因因子の制御による卵巢過剰刺激症候群(OHSS)の発症防止に関する文献的研究

A. 研究目的

OHSS 発症の原因因子の制御の研究は、その発症病態生理学の研究と深い関連をもつ。

現在、OHSS の本態は血管透過性の異常亢進による高蛋白性(主に albumin)液性成分の血管外大量喪失であることが判明している。その血管透過性の異常亢進を惹起する因子は過排卵刺激(過剰卵胞刺激[hMG/FSH 刺激]+黄体化刺激[hCG/LH 刺激])によって腫大

した卵巣から産生・分泌される。現在のところ histamine、prostaglandins、renin-angiotensin system、interleukins、endothelin-1、vascular endothelial factor が注目されている。estrogen に関しては、その大量投与がOHSSを発生させ得ないことが証明されている。hCG に関しては、直接の因子というよりもむしろ上記 histamine 以下の因子の first messenger ではないかと考えられている。そこで、これらの因子の制御によるOHSS 発症防止の試みについて、文献的に研究した。

B. 研究方法

- 1) 調査期間 ; 1966 年より 1998 年まで
- 2) 調査方法 ; MEDLINE
- 3) 調査対象 ; 欧米および日本における主たる医学雑誌 .

C. 研究結果

Histamine

Knox, G. E., Dowd, A. J., Spiesel, S. A., Hong, R. (1975) Antihistamine blockade of the ovarian hyperstimulation syndrome, : possible role of antigen-antibody complexes in the pathogenesis of the syndrome. *Fertil. Steril.*, 26, 418-421. [rabbit]
: antihistamine の投与はOHSS の速やかな改善を促した。

Erlig, Y., Naot, Y., Friedman, M. et al. (1979) Histamine levels in ovarian hyperstimulation syndrome. *Obstet. Gynecol.*, 53, 580-582. [rabbit]
: OHSS と対照群間の histamine level に差なし。

Pride, J., Ho, Y. I. (1990) The ovarian hyperstimulation syndrome. *Semin. Reprod. Endocrinol.*, 8, 247-253. [rabbit]
: H1 receptor blocker は腹水産生には防止効果があったが、卵巣腫大には無効であった。
Prostaglandin

Schenker, J. G., Polishuk, W. Z. (1976) The role of prostaglandins in ovarian hyperstimulation syndrome. *Euro. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 6, 47-52. [rabbit]
: indomethacin(prostaglandin 合成阻害剤) は、OHSS における血管内から腹水・胸水への水分移動を抑制する。

Pride, S. M., Yuen, B. H., Moon, Y. S., Leung, P. C. S. (1986) Relationship of gonadotropin-releasing hormone, danazol and prostaglandin blockade to ovarian enlargement and ascites formation of the ovarian hyperstimulation syndrome in the rabbit. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 154, 1155-1160. [rabbit]
: indomethacin はOHSS における腹水産生を抑制しなかった。

Katz, Z., Lancet, M., Borenstein, R., Chemke, J. (1984) Absence of teratogenicity of indomethacin in ovarian hyperstimulation syndrome. *Int. J. Fertil.*, 29, 186-188. [human]
: indomethacin はOHSS における腹水産生を抑制した。

Borenstein, R., Elchalal, U., Lunenfeld, B. et al. (1989) Severe ovarian hyperstimulation syndrome : a reevaluated therapeutic approach. *Fertil. Steril.*, 51, 791-795. [human]

： indomethacin は重症 OHSS における腹水産生を抑制しなかった。

Renin-angiotensin system

Morris, R. S., Wong, I. L., Kirkman, E. et al. (1995) Inhibition of ovarian-derived prorenin to angiotensin cascade in the treatment of ovarian hyperstimulation syndrome. Hum. Reprod., 10, 1355-1358. [rabbit]

： angiotensin converting enzyme 阻害剤投与は OHSS の発生頻度を 40% 減少させた。

Interleukins

試みられている治療法なし。

Endothelin-1

試みられている治療法なし。

Vascular endothelial growth factor

試みられている治療法なし。

D. 考察

生殖補助医療を行なうにあたって、その副作用として最も問題となるのは多胎の発生と OHSS である。特に OHSS は過排卵刺激（過剰卵胞刺激[hMG/FSH 刺激] + 黄体化刺激[hCG/LH 刺激]）をした場合には高頻度に発生し、重症の場合には生命の危険さえ伴う。ただし過剰卵胞刺激あるいは黄体化刺激のどちらか一方が欠ければ発症しないことが判明しているため、通常の排卵誘発の場合は対策を立てることが可能である。たとえば、卵胞刺激法を工夫して過剰な卵胞をつくらないようにすることや、過剰になった場合には hCG 投与を中止するという対策である。しかし体外受精・胚移植(IVF - ET)の場合の対策は容易ではない。なぜなら IVF - ET にとって過剰卵胞刺激と黄体化刺激は、良質の卵を複数個

得るためにはどちらも欠くことができないからである。よって IVF - ET の際、発生が予測される周期の OHSS 予防策としては、過剰卵胞刺激完了後すぐに hCG 投与をせずに血中 estradiol 値が 3,000 pg/ml 以下に低下してから投与する (Coasting 法)、その周期での妊娠を避ける全胚凍結保存法、採卵時に予防的に albumin を投与する方法、等が試みられている。しかし、に関しては卵の質が低下しないかという点でさらなる臨床的検討が必要であるし、は OHSS の重症化をある程度防止できるが発生自体は防止できない、

は albumin の喪失は連日大量におこるため、採卵時だけの予防的投与だけでは有効性は期待できない。そこで、IVF - ET の際の OHSS を防止するためには、OHSS を引き起こす原因因子を抑えることが必要となってくる。原因因子としては前記のとおり histamine、prostaglandins、renin-angiotensin system、interleukins、endothelin-1、vascular endothelial factor が報告されている。しかし、それらを阻害する方法はあまり研究されていないのが現状であった。

E. 結論

現在のところ OHSS 原因因子の制御療法として研究されているものとして、antihistamine、H1 receptor blocker、indomethacin、angiotensin converting enzyme 阻害剤があった。しかし有効性に関してはいまだ確立されておらず、臨床応用されるまでには至っていない。

interleukin-8 (IL-8) 投与による OHSS 様卵胞腫大の惹起に関する研究

A. 研究目的

通常排卵時の卵胞では、以下の 3 つの生理学的反応が局所で起こる。つまり (1) 類炎症反応に引き続く血管透過性の亢進、(2) 蛋白分解酵素の活性化、(3) 神経活性物質による平滑筋の収縮作用、である。(1)により血管内血液から卵胞腔内に血清成分が急速に流入し、それにより卵胞は急速に膨張しようとする。(2)により血管壁の collagen 等の構成成分が融解され壁は非薄化する。(3)により卵胞は収縮し卵胞内圧は急激に高まる。そしてその結果、卵胞は破裂し卵は卵胞外に排出される。通常 OHSS における腫大した卵胞は、非破裂黄体嚢胞であり、(1)の反応のみ進行し、(2)(3)の反応が起こらなかったものと考えられる。そこで我々は、類炎症反応に基づく血管透過性の亢進に関与する因子に注目した。

IL-8 は炎症反応における重要なメディエーターであり、近年毛細血管壁の構築を変化させることにより直接的に血管透過性亢進作用を表すことが示唆されている¹⁾。また、過排卵刺激後の顆粒膜黄体細胞や hCG を添加された卵巣間質細胞において、IL-8 の mRNA が発現し IL-8 が産生されることも報告されている²⁾。かつ OHSS の患者腹水中に高濃度の IL-8 が存在することも判明している³⁾。以上より OHSS の発症への IL-8 の関与が強く示唆されている。そこで今回我々は、IL-8 が OHSS 様卵胞腫大を惹起させうるかどうかを動物実験にて検討した。

B. 研究方法

使用した試薬：

pregnant mare serum gonadotropin(PMSG)
[Sigma 社]

human chorionic gonadotropin(hCG)
[持田製薬]

interleukin-8 (IL-8)
[東レ株式会社]

卵巣組織標本 : 1) 腹腔内投与群 ; 23 日令の未熟 Wistar rat に PMSG 10 unit を腹腔内投与し過剰卵胞刺激をした後、その 48 時間後に生理食塩水(生食)、hCG 10 unit, IL-8 0.2, 2.0, 20 μ g を各々腹腔内投与した。さらにその 6, 12 および 24 時間後の卵巣を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し連続切片を作成した。2) 局所投与群 ; 7 週令成熟 Wistar rat の背を 1 cm ほど切開し、左の卵巣には生食、右の卵巣には IL-8 0.1, 1.0, 10 μ g を卵巣被膜下に局注した。各々の卵巣を 6 および 24 時間後に摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定し切片を作成した。

卵巣血管構築 : 1) 腹腔内投与群 ; 卵巣腫大標本の 1)と同じ手法で、23 日令未熟 Wistar rat を、未刺激、過剰卵胞刺激(PMSG 10 unit)のみ、過剰卵胞刺激+黄体化刺激(hCG 10 unit)、過剰卵胞刺激+IL-8 20 μ g 投与の 4 群に分けた。2) 局所投与群 ; 卵巣腫大標本の 2)と同じ手法で、7 週令成熟 Wistar rat に、左の卵巣には生食、右の卵巣には IL-8 10 μ g を被膜下に局注した。腹腔内投与群の rat には、PMSG のみ投与群では投与 48 時間後、hCG または IL-8 投与群ではそれらの投与 6 時間後に、以下の処置を加えた。また局所投与群の rat には、hCG または IL-8 投与の 24 時間後

に以下の処置を加えた。まず、ネンブタール麻酔下でヘパリンを投与し、動脈に注入用チューブを挿入した。チューブより生食を注入し、卵巣に流入することを確認後、重合加速剤を加えたメルコックス樹脂を注入し血管部分を硬化させた。硬化した卵巣を切り取り10N NaOH中で軟組織を腐食させた。標本を洗浄、乾燥後、金のスパッタコーティングをし、5-15 kVの低加速電圧でSEM観察した。

卵の成熟度 : 卵胞腫大標本の1)と同じ手法で23日令の未熟 Wistar rat を、過剰卵胞刺激(PMSG 10 unit)+黄体化刺激(hCG 10 unit), 過剰卵胞刺激+IL-8 20 µg 投与の2群に分け、hCG 又は IL-8 投与直後および10時間後に卵巣を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。それぞれ卵巣の連続切片を作成し、HE染色後顕微鏡下で観察し、germinal vesicle break down(GVBD)をおこした卵の割合を算出した。

画像処理 : 卵胞面積は LUZEX 画像処理装置を用いて解析した。

統計処理 : データは Statview 4.0 を用いて mean ± SD を算出し、Student's ttest でそれらの値の有意差を検定した。p<0.05 を有意差ありと判定した。

C. 研究結果

結果は以下のごとくであった。

卵巣組織標本

1) 腹腔内投与群：過剰卵胞刺激をした未熟 Wistar rat では、6, 12, 24 すべての時間後において、hCG 投与群と IL-8 20 µg 投与群両者にて OHSS 様の卵胞腫大が認められた

(Fig. 1 : 投与 6 時間後)。IL-8 0.2 µg および 2.0 µg 投与群においても、すべての時間後において用量依存性の軽度の卵胞腫大が認められた。

2) 局所投与群：卵胞刺激のない成熟 Wistar rat では、6 および 24 時間後ともに、IL-8 の 10 µg 投与群において、投与側にのみ OHSS 様の卵胞腫大が認められた。IL-8 0.1 µg および 1.0 µg 投与群においても、投与側に用量依存性の軽度の卵胞腫大が認められた。

卵胞面積

1) 腹腔内投与群の卵胞 1 個あたりの平均面積($\times 10^{-2} \text{ mm}^2$) [mean ± SD] [投与 6 時間後] 生食投与群は 5.9 ± 1.1 、hCG 投与群は 13.8 ± 0.9 、IL-8 0.2 µg 投与群は 4.6 ± 0.4 、IL-8 2.0 µg 投与群は 7.3 ± 0.7 、IL-8 20 µg 投与群は 13.6 ± 1.3 、[投与 24 時間後]；生食投与群は 3.6 ± 0.9 、hCG 投与群は 14.3 ± 0.9 、IL-8 0.2 µg 投与群は 5.9 ± 0.9 、IL-8 2.0 µg 投与群は 8.2 ± 1.5 、IL-8 20 µg 投与群は 15.0 ± 0.8 、であり、数字的にも IL-8 20 µg 投与群において、hCG 投与群と同様の卵胞面積の顕著な増大が証明された (Fig. 2)。投与 12 時間後においても、ほぼ同様の結果であった。

2) 局所投与群の卵胞 1 個あたりの平均面積($\times 10^{-2} \text{ mm}^2$) [mean ± SD] [投与 6 時間後]；IL-8 0.1 µg 投与群：生食投与側 2.7 ± 0.8 、IL-8 投与側 2.8 ± 1.2 、IL-8 1.0 µg 投与群：生食投与側 3.7 ± 0.5 、IL-8 投与側 3.9 ± 0.9 、IL-8 10 µg 投与群：生食投与側 3.4 ± 0.8 、IL-8 投与側 6.1 ± 1.5 、[投与 24 時間後]；IL-8 10 µg 投与群：生食投与側 3.7 ± 0.9 、IL-8 投与側 7.2 ± 0.6 であった。数字的にも IL-8 10 µg 投与群において、有意な卵胞面積

の増大が証明され、かつそれは時間がたつにつれてさらに高度となる傾向にあった (Fig. 3)。

卵巢血管構築

1) 腹腔内投与群：未刺激群；卵胞腫大や血管拡張は認められなかった。過剰卵胞刺激 (PMSG 10 unit 投与) のみ群；投与 48 時間後に軽度の卵胞腫大が認められ血管網は多層化していた。過剰卵胞刺激+黄体化刺激 (hCG 10 unit 投与) 群；hCG 投与 6 時間後に卵胞はさらに著明に腫大し、周囲の多層化した血管網はさらに密となり各々の血管も著明に拡張していた。血管から樹脂の漏出も認められた。過剰卵胞刺激+IL-8 20 μ g 投与群；IL-8 投与 6 時間後に hCG 投与群と同様の卵胞の腫大とそれらを取り巻く著明に拡張した密な血管網が認められた。血管からの樹脂の漏出も同様に認められた。

(Fig. 4；倍率 $\times 40$ ，Fig. 5；倍率 $\times 70$)

2) 局所投与群：同一個体のため、同一の注入圧での左右卵巢の血管拡張の比較が可能であった。投与 24 時間後に、生食投与側に比し、IL-8 投与側の卵巢は腫大し、かつそれらを取り巻く著明に拡張した密な血管網が認められた (Fig. 6)。

卵の成熟度

過剰卵胞刺激を施した未熟 Wistar rat に、hCG 10 unit、IL-8 20 μ g を各々投与した実験結果は下記のごとくであった。

[GVBD 卵の個数/全観察卵の個数；GVBD 卵の割合(%)]

hCG 10 unit 投与群；投与直後 [1/51；2.0%]、投与 10 時間後 [52/63；82.5%]

IL-8 20 μ g 投与群；投与直後 [1/51；

2.0%]、投与 10 時間後 [14/54；25.9%]

D. 考察

今回の我々の実験により、過剰卵胞刺激+黄体化刺激 (hCG 投与) 時と同様の OHSS 様腫大を、過剰卵胞刺激+IL-8 投与においても惹起させることが可能なことが判明した。しかし卵の成熟においては前者に比し後者では著しく不良であった。

最近、Abramov³⁾ らは、重症 OHSS 患者の血清中の IL-8 濃度はすべて低値であったが、腹水中の濃度はすべて高値であったと報告しており、腹水中の IL-8 は卵巢からの直接の漏出であると結論づけている。また Arici²⁾ らによれば、hCG 刺激により卵巢間質細胞において IL-8 の mRNA が産生されることも確認されている。よって、OHSS においては、IL-8 は hCG (LH) の second messenger として、卵巢局所で産生され、卵胞腫大現象に関与するものと考えられた。そして卵巢血管構築標本実験では、過剰卵胞刺激+IL-8 投与群に、過剰卵胞刺激+hCG 投与群と同等の血管拡張および血管透過性亢進の推測される所見が認められている。本実験結果より、IL-8 の卵胞液貯留現象における作用機序は、卵胞血管の拡張および透過性亢進による血清成分の卵胞内移動と考えられた。この機序は腹水貯留現象においても同様と思われる。

E. 結論

IL-8 は、過剰卵胞刺激後の卵巢に対して、卵の成熟に関しては hCG 様の作用はほとんどないが、卵胞腫大現象および血管透過性亢進現象に関しては hCG と同等の作用を持つことが判明した。今後は IL-8 の抑制を中心に、卵の成熟に影響を与えることのない OHSS 予

防策を研究していく方針である。

F . 参考文献

- 1) Fukumoto, T., Matsukawa, A.,
Yoshimura, T. et al. (1998) IL-8 is an
essential mediator of the increased
delayed-phase vascular permeability in
LPS-induced rabbit pleurisy. J. Leuko.
Bio., 63, 584-590.
- 2) Arici, A., Oral, E., Bukulmez, O. et
al. (1996) Interleukin-8 expression and
modulation in human preovulatory follicles
and ovarian cells. Endocrinology, 9,
3762-3769.
- 3) Abromov, Y., Schenker, J. G., Lewin,
A. et al. (1996) Plasma inflammatory
cytokines correlate to the ovarian
hyperstimulation syndrome.
Hum. Reprod., 11, 1381-1386.

**Fig.1 過剰卵胞刺激+生食/hCG/IL-8
投与後の卵巣組織標本**

A ; 生食対照群

B ; hCG 10unit(u) 投与6時間後

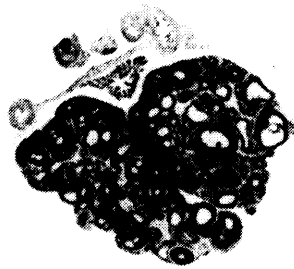
C ; IL-8 20 μ g 投与6時間後

過剰卵胞刺激をした未熟Wistar rat では、
hCG投与群とIL-8 20 μ g投与群両者に
おいて、ほぼ同様にOHSS様の卵胞腫大像
が認められる。

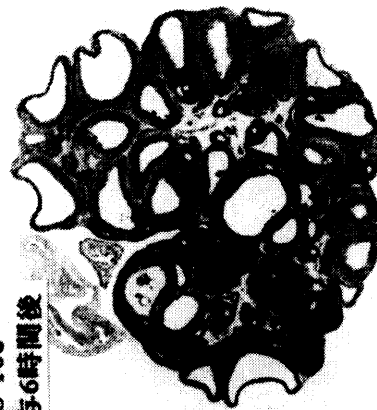
**C IL-8 20 μ g
投与6時間後**



A 生食対照群



**B hCG 10u
投与6時間後**



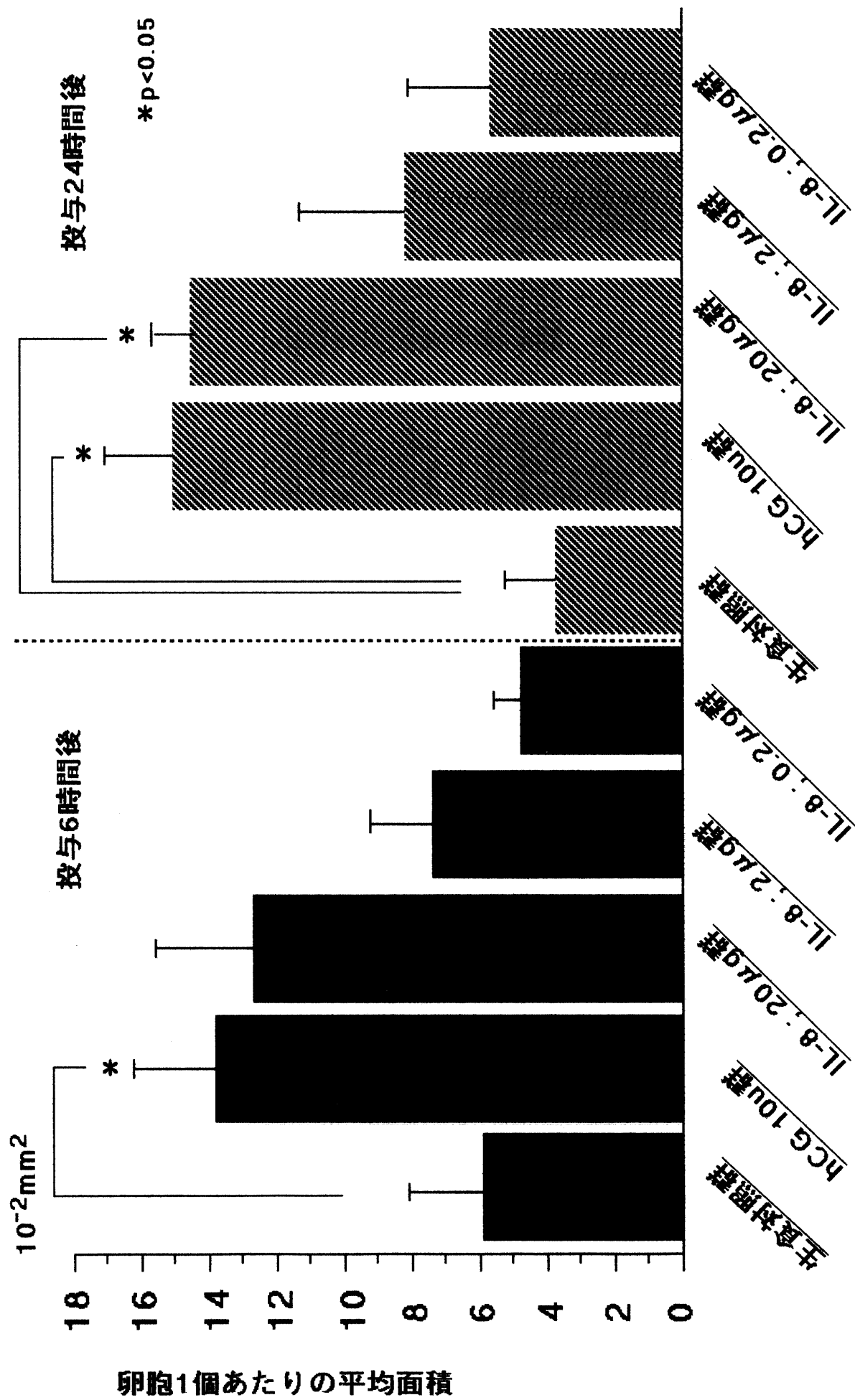


Fig.2 hCGまたはIL-8腹腔内投与群における卵胞1個あたりの平均面積比較

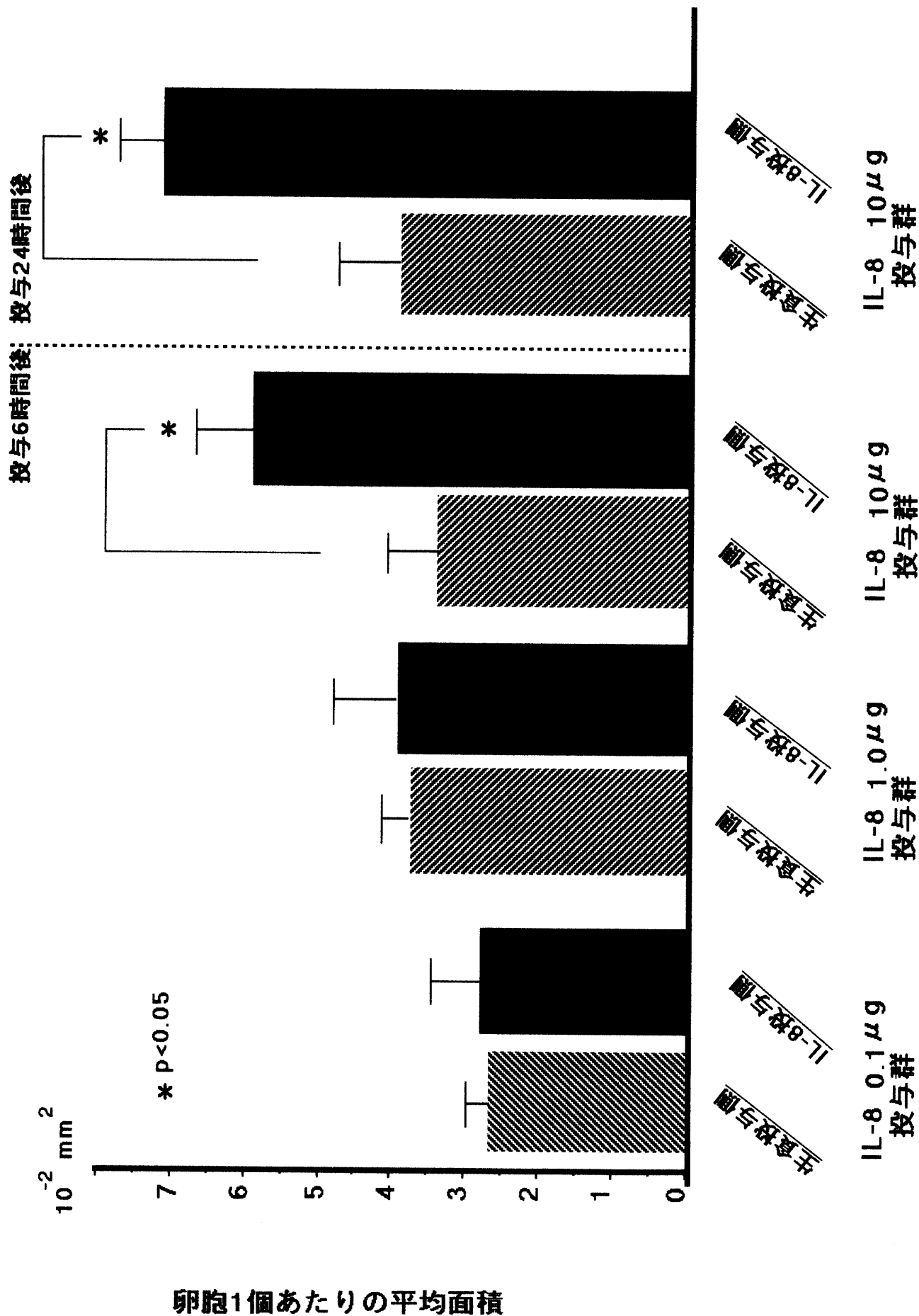
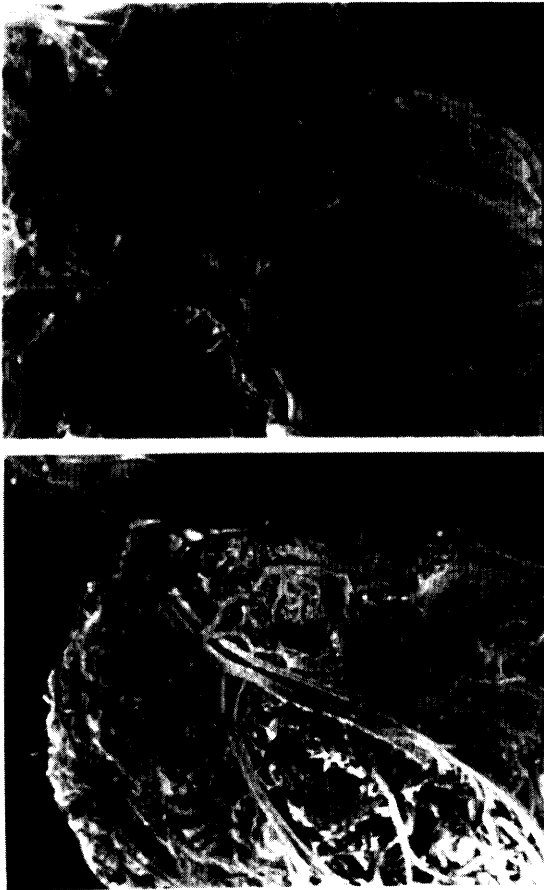


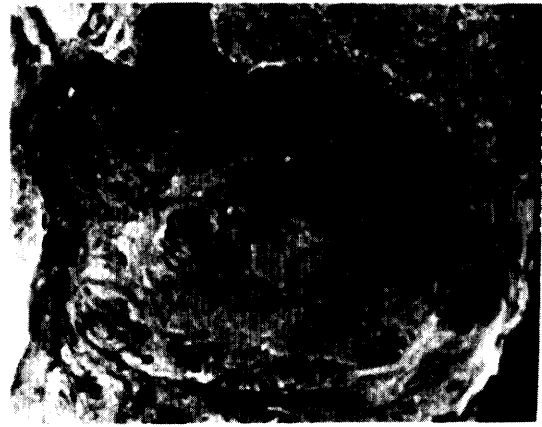
Fig.3 IL-8局所投与群における卵胞1個あたりの卵胞面積比較



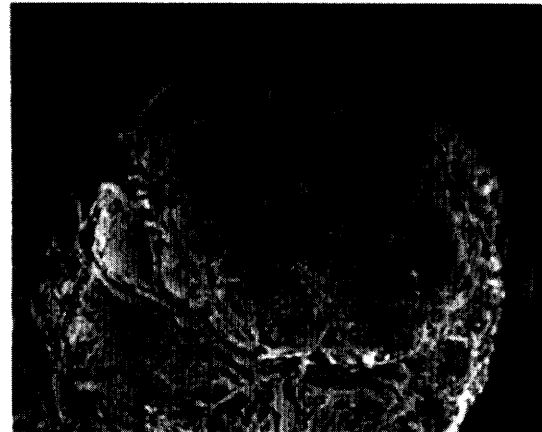
未刺激



PMSG ip



hCG ip



IL-8 ip

Fig.4 過剰卵胞刺激(PMSG投与)+hCG/IL-8腹腔内投与時の未成熟ratの卵巣血管構築(X40)

左上; 未刺激群: 卵巣腫大や血管拡張は認められない。

右上; 過剰卵胞刺激のみ群(PMSG 10u 投与後48時間)

: 卵巣腫大が認められ、周囲の血管網は未刺激群に比し多層化している。

左下; 過剰卵胞刺激+hCG 10unit投与群 (投与後6時間)

: 卵巣はさらに著明に腫大し、周囲の多層化した血管網はさらに密となり、各々の血管も著明に拡張している。

右下; 過剰卵胞刺激+IL-8 20μg投与群 (投与後6時間)

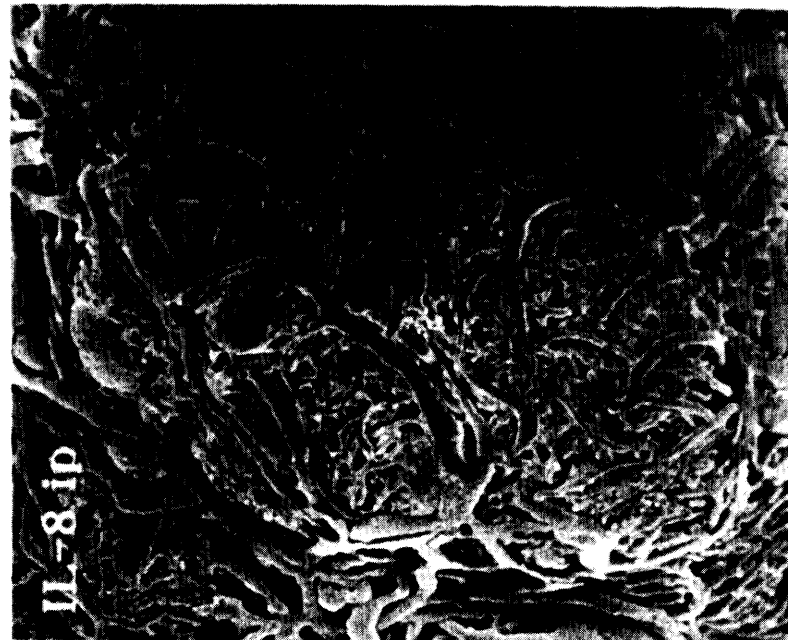
: hCG投与群と同様の卵巣腫大、およびそれを取り巻く著明に拡張した密な血管網が認められる。

未成熟ratの血管構築

(X70)



hCG ip



IL-8 ip

Fig.5 過剰卵胞刺激(PMSG投与)
+hCG/IL-8腹腔内投与後の
未成熟ratの卵巣血管構築
; 拡大図(X70)

左; 過剰卵胞刺激+hCG 10unit 投与群:
著明に拡張した卵胞周囲血管網が
認められ、血管からの樹脂の漏出像
が観察できる(投与後6時間)。
右; 過剰卵胞刺激+IL-8 20 μ g投与群:
hCG投与群とほぼ同様の所見を見る
ことが出来る(投与後6時間)。

血管構築の比較 (7W Rat IL8 局注)

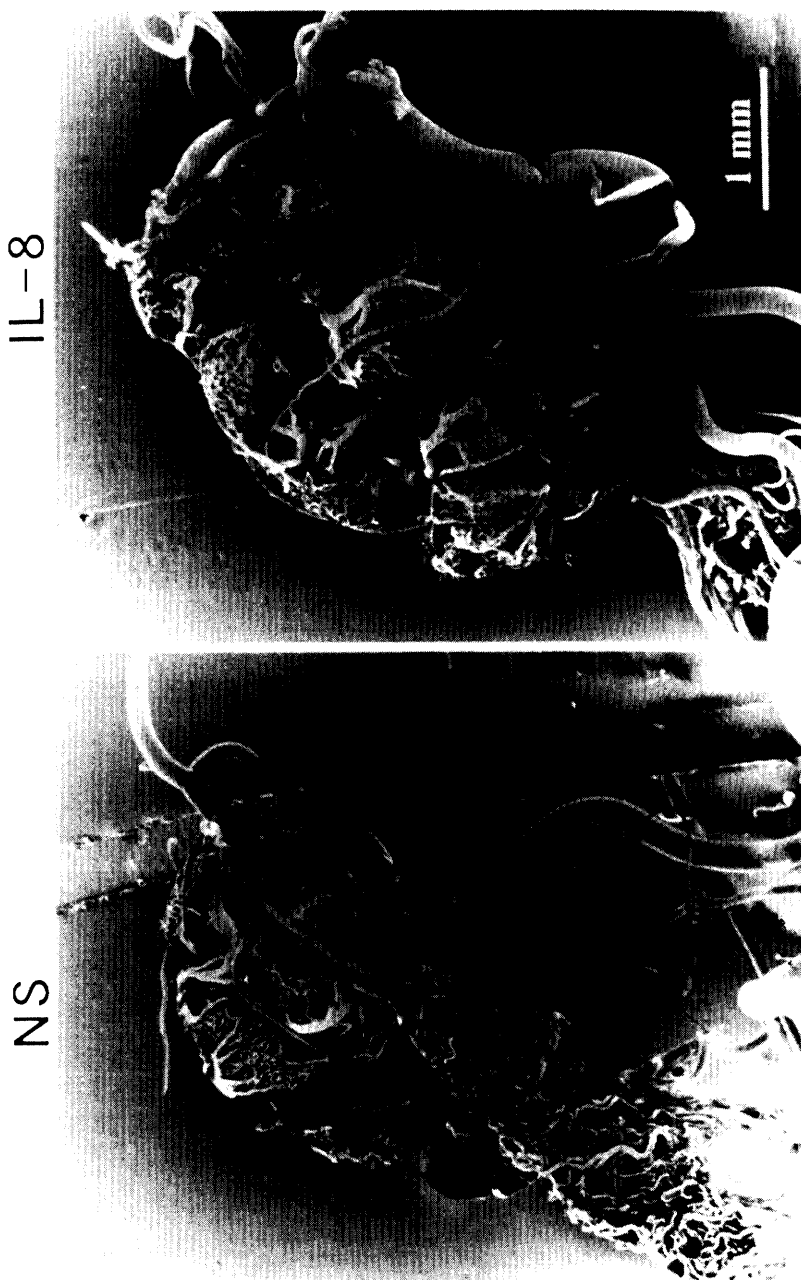


Fig.6 hCG/IL-8局所投与時の成熟ratの
卵巣血管構築

左; 生食投与側 (投与後24時間)

右; IL-8 10 μ g投与側 (同上)

生食投与側に比しIL-8投与側の卵巣は多数腫大し、かつそれらを取り巻く著明に拡張した密な血管網が認められる。