

厚生科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
「わが国における生殖補助医療の実態とその在り方」
総合研究報告書

多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）に対する最適排卵誘発法の基礎的・臨床的検討
（分担研究：生殖補助医療の安全性に関する研究）

研究協力者 伊吹令人 群馬大学医学部産科婦人科学教室教授

安藤一道 群馬大学医学部附属病院周産母子センタ - 講師

研究要旨

PCOS に対する最適排卵誘発法を検討するため、以下の基礎・臨床研究を実施した。基礎研究：卵胞発育における LH の生理的意義を解明するため、LH 活性が異なる recombinant human FSH (rhFSH)、urinary purified FSH (uFSH) 製剤、hMG 製剤および rhLH を用い、正常成熟マウスおよび多嚢胞性卵巣 (PCO) モデルマウスの卵胞発育を in vitro follicle culture system により検討した。正常マウスでは rhFSH と rhLH が協調的に卵胞発育に関与しすべての製剤で有意の卵胞発育を認めたと、PCO モデルマウスでは hMG 製剤は中卵胞の卵胞発育を抑制し早期黄体化を引き起こし、rhLH が中卵胞の卵胞発育に障害的に作用することが明らかとなった。臨床研究：PCOS に対するゴナドトロピン療法においてゴナドトロピン製剤の最適投与法を解明するため、PCOS37 例 68 周期に対して hMG 製剤を用いた fixed-dose 法、step-down 法、および low-dose step-up 法を prospective randomized study にて実施した。Low-dose step-up 法は他の二法に比べ発育卵胞数や hCG 切替日の血中 FSH・E₂ 値が有意に低値で、卵巣腫大も軽度で多胎妊娠を認めないことから最も安全な投与法であることが明らかとなった。次にゴナドトロピン製剤の投与経路を変更することが治療成績の改善につながるか否かを検討するため、PCOS11 例 19 周期に対して uFSH 製剤を用いた step-down 法による筋注法と律動的持続皮下投与法を case-control study にて実施したが、二群間で臨床的有用性に明らかな差を認めなかった。最後に排卵誘発法の工夫により多胎妊娠の発生が抑制できるか否かを明らかにするため、PCOS 妊娠例 48 例 60 周期について排卵誘発法別に多胎妊娠の発生を比較検討した。その結果、多胎妊娠はいかなる投与法でも発生し、特に hCG 切替日に 14mm 以上の発育卵胞数が 5 個以上の場合に高率に発生することが明らかとなった。以上の結果より、PCOS に対するゴナドトロピン療法においては可能な限り LH 活性の少ない製剤を用い、多胎妊娠の軽減・予防にはまず単一卵胞発育率が最も高い投与法 (low-dose step-up 法) を第一選択とすべきであるが、それでも多発排卵が予想される周期では hCG 投与を中断する必要があると結論された。

基礎研究 1：Recombinant human FSH (rhFSH)、urinary purified FSH (uFSH) 製剤、hMG 製剤の正常成熟マウスおよび多嚢胞性卵巣 (PCO) モデルマウスの卵胞発育作用に関する検討

A. 研究目的

高 LH 血症を特徴とする PCOS 症例に対するゴナドトロピン療法においては、理論的にできるだけ LH 活性を含まないゴナドトロピン製剤の使用が望まれるが、従来の薬理動態学的検討や排卵誘発の治療成績では製剤間に明らかな臨床成績上の差は認められていない。本研究は卵胞発育における製剤間の違いを明らかにするため、LH 活性が異なる rhFSH、uFSH 製剤、および hMG 製剤を用い、正常成熟マウスおよび多嚢胞性卵巣 (PCO) モデルマウスの卵胞発育作

用を in vitro follicle culture system にて比較検討した。

B. 研究方法

8 週齢の BDF-1 正常成熟マウスおよび PCO モデルマウスの卵巣から small preantral follicle (直径;100-120 μm) および tertiary follicle (直径;260-300 μm) を機械的に分離し、無添加群を control として rhFSH (オルガノン社)、uFSH 製剤 (フェルチノ - ム P; セロ - ノジャパン)、hMG 製剤 (パ - ゴナル; 帝国臓器) を添加し 4 日間培養した。連日卵胞径を計測し、培養 4 日目の培養液中の immunoreactive (IR) -inhibin、estradiol (E₂)、progesterone (P) 値を RIA にて測定した。PCO モデルマウス (androgen-sterilized mice) は 6 日齢の BDF-1 幼弱雌マウスに testosterone propionate (持田製薬) 1mg を

投与して作成した。なおマウスの飼育は the principles of Animal Care and Experimentation Committee, Gunma University に準じておこなった。

C. 研究結果

正常成熟マウスの small preantral follicle および tertiary follicle では rhFSH、uFSH 製剤、hMG 製剤共に卵胞発育促進作用を示し、hMG 製剤で最も卵胞径の増大作用を認めた。また卵胞発育が開始する濃度 (FSH の閾値) は、rhFSH に比べ hMG 製剤では 1/10 ~ 1/100 低濃度であった。一方 PCO モデルマウスでも small preantral follicle に対して rhFSH、uFSH 製剤、hMG 製剤共に卵胞発育促進作用を示し、FSH の閾値は rhFSH 製剤に比べ hMG 製剤で 1/1000 低濃度であったが、tertiary follicle に対しては hMG 製剤では卵胞径の有意の増大作用を認めず、P 産生が有意に高値を示した。

D. 考察

正常マウスにおいてはすべての製剤が卵胞発育を促進するが、hMG 製剤は PCO モデルマウスの small preantral follicle への過剰刺激と tertiary follicle の早期黄体化を引き起こし、卵胞発育に障害的に作用する可能性が示唆された。

E. 結論

hMG 製剤は正常卵巣の卵胞発育に促進的に作用するが、PCO モデル卵巣では卵胞発育を障害する。

基礎研究 2 : rhFSH および rhLH の正常成熟マウスと PCO モデルマウスの卵胞発育作用に関する検討

A. 研究目的

基礎研究 1 より、正常卵巣においては LH と FSH が協調的に卵胞発育に関与するが PCO 卵巣では LH が障害的に作用する可能性が示唆された。本研究では卵胞発育における LH の生理的意義を明らかにするため、rhFSH および rhLH を用い、正常成熟マウスおよび PCO モデルマウスの卵胞発育作用を in vitro follicle culture system にて検討した。

B. 研究方法

基礎研究 1 と同様な方法で正常成熟マウスおよび PCO モデルマウスの卵巣から卵胞を機械的に分離し、無添加群を control とし、rhFSH および rhLH (セローノ社) を単独または同時添加し 4 日間培養した。連日卵胞径を計測し、培養 4 日目の培養液中の

IR-inhibin、E₂、P 値を RIA にて測定した。

C. 研究結果

正常成熟マウスの small preantral follicle および tertiary follicle に対して、rhFSH は濃度依存的に有意の卵胞発育促進作用を示すが、rhLH は PCO モデルマウスの tertiary follicle に対して卵胞発育作用を示さなかった。また rhFSH と rhLH の協同作用をみると、正常成熟マウスでは有意の協同作用を認めたが、PCO モデルマウスの tertiary follicle では rhLH の同時添加により逆に卵胞発育は抑制され、また正常成熟マウスに比べ PCO モデルマウスで有意の P 産生を認めた。

D. 考察

rhLH と rhFSH は正常卵巣の卵胞発育に協調的に作用するが、PCO モデル卵巣では rhLH が早期黄体化を引き起こし、卵胞発育を障害することが明らかとなり、PCOS 症例に対するゴナドトロピン療法においては可能な限り LH 活性の少ない製剤を用いるべきであると思われる。

E. 結論

LH と FSH は正常卵巣の卵胞発育に協調的に関与するが、PCO モデル卵巣では LH が障害的に作用する。

臨床研究 1 : hMG 製剤を用いた PCOS に対する fixed-dose 法、step-down 法、low-dose step-up 法の比較検討

A. 研究目的

PCOS 症例に対するゴナドトロピン療法において最適なゴナドトロピン製剤の投与方法を検討するため、hMG 製剤を用いて fixed-dose 法、step-down 法、および low-dose step-up 法の三種類の投与方法を prospective randomized study にて実施し、発育卵胞数、血中ホルモン値、卵巣過剰刺激症候群 (OHSS) 発生頻度、および臨床成績を比較検討した。

B. 研究方法

対象はクエン酸クロミフェン (CC) 療法が無効の PCOS 37 例 68 周期で、排卵誘発は hMG 製剤としてパ - ゴナルを用い、月経または消退出血開始後 3 ~ 5 日目より開始した。HMG 製剤の投与方法として fixed-dose 法は 150IU/日を連日投与し、step-down 法は初期投与量を 225IU/日として 2 日間投与しその後 150IU/日に減量し卵胞径が 11mm に達した時点で 75IU/日に減量した。また low-dose step-up 法は 75IU/日を 7 日間投与し

卵胞発育が認められない場合には7日毎に37.5IU/日づつ増量した。投与方法の選択は患者の承諾を得て封筒法で実施した。

発育卵胞数・卵胞径および卵巣径の測定は経膈超音波診断装置（SONOVISTA-If；持田製薬）を用いて連日実施し、hCG製剤（ブレグニ-ル；オルガノン）への切り替えは平均最大卵胞径が18mmに達した時点で5,000IUを投与した。またhCG切り替え後3日目に最大卵巣径が60mm以下の場合にはhCG製剤5,000IUを追加投与し、hCG切り替え後7日目にカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン（オオホルミンルテウムデポ-；帝国臓器）125mgを全症例に投与し黄体機能賦活法を実施した。

血中ホルモンはLH、FSH、 E_2 、androstenedione (A)、testosterone (T)値をhMG製剤投与開始日、hMG製剤投与後4・7・14日目、およびhCG切替日に測定し、またP値はhCG切替日、およびhCG切り替え後7日目に測定した。統計処理は平均値の多重比較にはScheffeの方法を、三法間の頻度の比較には多重性を考慮したFisherの直接確立法を使用し、 $p < 0.05$ の時に有意差があると判断した。

C．研究結果

臨床成績の比較検討：

hMG製剤の投与期間には有意差を認めないが、1日あたりの平均使用量はlow-dose step-up法で1.1アンプルとfixed-dose法、step-down法に比べ有意に少量であった。排卵率はいずれも100%で、妊娠率（化学的妊娠を含む）も有意差を認めないが、多胎妊娠率と流産率は、各々、fixed-dose法が25%と25%、step-down法が40%と0%、low-dose step-up法が0%と60%であった。なおOHSSによる入院例はstep-down法で妊娠成立した1周期に認められた。

超音波学的比較検討：

hCG切替日の11mm以上で18mm未満の発育卵胞数は、fixed-dose法に比べlow-dose step-up法で有意に少なく、またhCG切り替え後7日目の最大卵巣径も、low-dose step-up法ではfixed-dose法やstep-down法に比べ有意に小さかった。

内分泌学的比較検討：

hMG製剤投与後4日目の血中FSH値は、low-dose step-up法がfixed-dose法やstep-down法に比べ有意に低値で、血中 E_2 値もlow-dose step-up法はstep-down法に比べ有意に低値であった。またhCG切替日の

血中FSH・ E_2 値も、low-dose step-up法ではfixed-dose法に比べ有意に低値であった。これに対して、hMG製剤投与後4日目の血中T/ E_2 比・A/ E_2 比はlow-dose step-up法が他の二法に比べ有意に高値を示した。

D．考察

PCOS症例に対するゴナドトロピン療法において、low-dose step-up法はfixed-dose法とstep-down法に比べ発育卵胞数やhCG切替日の血中FSH・ E_2 値が有意に低値で、卵巣腫大も軽度で多胎妊娠を認めないことから安全な投与方法で、現時点ではPCOS症例に対するゴナドトロピン療法に際して第一選択の投与方法とすべきである。しかし（化学的）流産率が高い問題点も明らかとなり、治療成績の向上のためには更なる検討が必要であると思われる。

E．結論

PCOS症例に対するゴナドトロピン療法に際しては、low-dose step-up法を第一選択の投与方法とすべきである。

臨床研究2：PCOS症例に対するFSH製剤を用いたstep-down法による筋注法と律動的持続皮下投与法の比較検討

A．研究目的

PCOS症例に対するゴナドトロピン療法に際して、ゴナドトロピン製剤の投与経路を変更することが治療成績の改善につながるか否かを検討するため、uFSH製剤を用いstep-down法による筋注法と律動的持続皮下投与法をcase control studyにて実施し、発育卵胞数、ホルモン値、OHSS発症頻度および臨床成績を比較検討した。

B．研究方法

対象はCC療法が無効のPCOS11例19周期で、排卵誘発はuFSH製剤としてフェルチノ-ムPを用い、月経または消退出血開始後3~5日目より開始し、step-down法は初期投与量を225IU/日として2日間投与し、投与後3日目より75IU/日に減量した。なお減量後7日間投与後も卵胞発育が認められない場合には、投与開始後10日目より再び150IU/日に増量した。投与経路について、筋注法（IM法）は左右の臀部に連日交互にone shotで筋肉内投与した。律動的持続皮下投与法（Pulse法）は、携帯用ミニポンプ（SP-3I；ニプロ社）を使用し、投与間隔を120分、1回投与量を $0.175 \mu\text{l}$ （18.75IUまたは6.25IU）に設定し、下腹部皮下より持続投与した。投与経路は患者の承諾を得て、

まず IM 法を実施し、妊娠成立に至らない場合には Pulse 法を実施した。

発育卵胞数・卵胞径および卵巣径の測定は経膈超音波診断装置を用いて連日実施し、hCG 製剤への切り替えは平均主席卵胞径が 18mm に達した時点で 5,000IU を投与した。また hCG 切り替え後 3 日目に最大卵巣径が 60mm 以下の場合には hCG 製剤 5,000IU を追加投与し、hCG 切り替え後 7 日目にカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン 125mg を全症例に投与し黄体機能賦活法を実施した。

血中ホルモンは LH、FSH、E₂、A、T 値を hCG 切替日まで連日測定し、また P 値は hCG 切替日、および hCG 切り替え後 7 日目に測定した。統計処理は平均値の差の検定には Mann-Whitney U test、頻度の比較には Fisher の直接確立法を使用し、 $p < 0.05$ の時に有意差があると判断した。

C . 研究結果

臨床成績の検討：

IM 法を 11 周期、Pulse 法を 8 周期に実施した。なお IM 法の 2 周期に妊娠成立（1 例は双胎妊娠）を認めし、Pulse 法の 1 例がストレスにより治療を中断したため除外した。排卵率は共に 100% で、二群間で uFSH 製剤の投与量・投与期間に有意差を認めず、80mm 以上の卵巣腫大頻度は IM 法が 55%、Pulse 法が 75% であったが、OHSS 入院例は認められなかった。

内分泌学的・超音波学的検討：

投与開始後 3 日目の血中 FSH 値は Pulse 法で有意($p < 0.01$)に高値を示したが、hCG 切替日までの血中 LH、E₂、A、T 値には二群間で有意差を認めなかった。また hCG 切替日の最大卵巣径、発育卵胞数に有意差を認めず、hCG 切り替え後 7 日目の最大卵巣径、子宮内膜厚、血中 P・E₂ 値にも有意差を認めなかった。

D . 考察

初期投与量を 225IU/日と設定する step-down 法では、卵胞期中・後期血中 FSH 値が高値となり多発卵胞発育が引き起こされ、Pulse 法でもこれを改善することはできなかった。

E . 結論

PCOS に対する step-down 法による IM 法と Pulse 法で臨床的有用性に明らかな差は認められなかった。

臨床研究 3：ゴナドトロピン療法後の多胎妊娠発生からみた最適排卵誘発法とその限

界

A . 研究目的

ゴナドトロピン療法において多発卵胞発育を抑制し多胎妊娠を予防するために、step-down 法や low-dose step-up 法など様々な排卵誘発法が試行されてきた。本研究の目的はこれらの排卵誘発法の工夫により果たして多胎妊娠の発生が抑制できたか否か、また抑制できなかったとすればどのような原因によるのかを明らかにすることである。

B . 研究方法

1989 年 1 月から 1999 年 9 月までに、群馬大学医学部附属病院産婦人科不妊外来にてゴナドトロピン療法を実施した 207 例 805 周期中、妊娠成立した 97 例 112 周期を対象に、後方視的に多胎妊娠発生の有無と基礎疾患、及び PCOS 症例についてはゴナドトロピン製剤の投与方法（排卵誘発法）と発育卵胞数を調査・検討した。

C . 研究結果

治療周期あたりの排卵率・妊娠率・多胎妊娠率は 95.5%・14.0%・17.9% で、多胎妊娠の内訳は双胎妊娠が 15 例、品胎妊娠が 5 例であった。基礎疾患別にみた多胎妊娠率には有意差を認めなかった。

PCOS 症例に対しては、ゴナドトロピン製剤の投与量を一定（150IU/日）にした conventional 法、初期投与量を 225IU/日として 2 日間投与しその後 75IU/日の減量する step-down 法、初期投与量を 75IU/日として 7~14 日間投与し、その後卵胞発育が認められない場合には 37.5IU/日を増量する low-dose step-up 法、及び GnRH agonist（酢酸ブセレリン；スプレキュア点鼻液）900 μ g/日にて少なくとも 2 週間前処置後、投与量を一定（150IU/日）にしてゴナドトロピン製剤を投与する GnRH agonist 併用 conventional 法の 4 つの投与方法を実施した。尚、主席卵胞径が 18mm 以上に達した時点で hCG 製剤 5000~10,000IU を筋注し、多発卵胞発育周期でも hCG 投与を中断しなかった。

PCOS 症例に対する治療法別にみた排卵率・妊娠率には有意差を認めないが、OHSS による入院頻度は conventional 法が 4.2%、step-down 法が 2.3% で、low-dose step-up 法と GnRH agonist 併用 conventional 法では 0% であった。多胎妊娠はすべての投与方法で発生したが、投与方法別の多胎妊娠率には有意差を認めなかった。投与方法別に hCG 切替日の 14mm 以上の発育卵胞数と多胎妊娠発生

との関連をみると、投与法に関係なく発育卵胞数が5個以上の時に有意に多胎妊娠が多く発生した。

D. 考察

現時点で完全に単一卵胞発育を引き起こすゴナドトロピン療法は未だ確立されていない。従っていかなる投与法を実施しても多発卵胞発育が引き起こされる可能性があり、本研究はそのような多発卵胞発育周期に多胎妊娠が発生していることを示している。PCOS に対するゴナドトロピン療法においては、多発卵胞発育が最も少ない low-dose step-up 法を第一選択の投与法とすべきであるが、更に多胎妊娠を軽減・予防するためには現在おこなわれている投与法の工夫だけでは限界があり、多発排卵を防止するため hCG 切替日に 14mm 以上の発育卵胞数が5個以上の周期には hCG 投与を中断する必要があると思われる。

E. 結論

PCOS に対するゴナドトロピン療法においては多発卵胞発育が最も少ない low-dose step-up 法を第一選択の投与法とすべきであるが、それでも多発卵胞発育が起こる場合には hCG 投与の中断を考慮すべきである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Kobayashi J, Mizunuma H, Kikuchi N, Liu X, Andoh K, Abe Y, Yokota H, Yamada K, Ibuki Y, Hagiwara H Morphological Assessment of the Effect of Growth Hormone on Preantral Follicles from 11-Day-Old Mice in an in Vitro Culture System. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 5;268:36-41

Liu X, Andoh K, Kamijo T, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. The relationship between the number of growing follicles and the occurrence of multiple pregnancies in women treated with gonadotropin. *Jpn J Fertil Steril* 1999; 44: 213-219

Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology* 1999; 140: 2480-5

Mizunuma H, Liu X, Andoh K, Abe Y, Kobayashi J, Yamada K, Yokota H, Ibuki Y, Hasegawa Y Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. *Endocrinology* 1999 140(1):37-42.

Andoh K, Mizunuma H, Liu X, Kamijo T,

Yamada K, Ibuki Y. A comparative study of fixed-dose, step-down, and low-dose step-up regimens of human menopausal gonadotropin for patients with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 1998 70(5):840-6

Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 1998 139(5):2342-7

2. 学会発表

安藤一道、王華、上条隆典、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。ゴナドトロピン療法後の品胎妊娠の検討。(第44回日本不妊学会学術講演会)

安藤一道、劉曉偉、安部由美子、小林淳郎、菊池信正、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。In vitro follicle culture system を用いた follistatin の卵胞発育作用に関する検討。(第51回日本産科婦人科学会学術講演会)

劉曉偉、安藤一道、上条隆典、安部由美子、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。Androgen-sterilized mice (PCO モデルマウス) の卵胞発育に対するゴナドトロピンの作用: In vitro follicle culture system を用いた検討。(第51回日本産科婦人科学会学術講演会)

菊池信正、小林淳郎、劉曉偉、横田秀巳、安部由美子、安藤一道、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。In vitro follicle culture system を用いた幼弱マウス未熟卵における IGF-1, activin, leptin の卵胞発育に関する基礎的研究。(第51回日本産科婦人科学会学術講演会)

菊池信正、安藤一道、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。レプチンの卵胞発育に関する研究(IGF-1-GH系を利用した細胞増殖能に対する影響)。(第44回日本不妊学会学術講演会)

王華、安藤一道、菊池信正、安部由美子、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。未熟マウスの卵胞発育に対するアンドロゲンの作用。(第44回日本不妊学会学術講演会)

上条隆典、山田清彦、水沼英樹、安藤一道、伊吹令人。マイクロラパロスコピー(細径腹腔鏡)の有用性 術後疼痛の軽減と早期回復の観点から。(第44回日本不妊学会学術講演会)

山田清彦、上条隆典、安藤一道、水沼英樹、伊吹令人。超音波凝固切開を用いた腹腔鏡下子宮筋腫核出術の経験。(第44回日本不

妊学会学術講演会)

上条隆典、安藤一道、劉曉偉、宮坂牧宏、安藤昭彦、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) の排卵誘発における fixed-dose 法、step-down 法、および low dose step-up 法の比較検討。(第 50 回日本産科婦人科学会学術講演会)

劉曉偉、山田清彦、横田英巳、小林淳郎、安部由美子、安藤一道、水沼英樹、伊吹令人。Activin および FSH の卵胞発育に対する人工的 gonadotropin-flush の影響。(第 50 回日本産科婦人科学会学術講演会)

小林淳郎、劉曉偉、横田英巳、安部由美子、山田清彦、安藤一道、水沼英樹、伊吹令人。In vitro follicle culture system における GH の胸膜細胞層形成作用についての研究。(第 50 回日本産科婦人科学会学術講演会)

劉曉偉、安藤一道、小林淳郎、菊地信正、

安部由美子、上条隆典、横田英巳、山田清彦、水沼英樹、伊吹令人。In vitro follicle culture system を用いたマウス初期卵胞発育における LH の意義。(第 43 回日本不妊学会学術講演会)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし