

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

- 過剰卵巢刺激時の黄体嚢胞腫大現象における局所血管構造の変化 -

（ 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
	朝比奈俊彦	浜松医科大学産婦人科
	後藤淳子	”

研究要旨；〔目的〕 卵巢過剰刺激症候群の発症を制御するポイントは、排卵後にも継続する血管透過性の異常亢進現象を抑制することであり、そのためには、これらの卵胞または黄体の血管透過性亢進現象のメカニズムを良く知ることが重要と思われる。この目的のため我々は、過剰卵巢刺激 rat の卵巢において、透過性の亢進した排卵卵胞および黄体嚢胞血管の構造変化を研究し、卵巢過剰刺激症候群発症の制御方法について検討した。〔方法〕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 20 µg、を各々腹腔内投与した。そして、（1）投与0および6時間後の、メルコックス樹脂を注入し血管部分を硬化させた卵胞血管構築標本、（2）投与0,6および24時間後の、凍結割断・オスミウムコーティングした卵胞/黄体嚢胞/存続卵胞血管内皮割断標本、を走査電子顕微鏡にて観察した。〔結果〕（1）血管構築標本の観察では、hCG 投与群と IL-8 投与群において投与6時間後に、腫大した卵胞を取り巻く、著明に拡張した密な血管群からの樹脂の漏出を認めた。生食投与群においては、それらの血管群の拡張や血管からの樹脂の漏出は認められなかった。（2）血管内皮割断標本では、hCG 投与群において投与6および24時間後に、内皮表面に直径3,000~4,000 の多数の“pore”の存在を認めた。生食投与群や IL-8 投与群においては、そのような大きさの“pore”の出現は認められなかった。以上の実験結果より、過剰卵胞刺激後の卵巢に対して hCG は、卵胞血管の拡張および卵胞/黄体嚢胞血管内皮の“pore”を開口させる作用があり、それにより血管透過性亢進現象が惹起されている可能性が強く示唆された。IL-8 による卵胞/存続卵胞腫大現象は、“pore”開口とは別の機序によると思われる。〔結論〕 卵巢過剰刺激症候群の発症防止には、これらの黄体嚢胞血管内皮の“pore”を制御することが重要と思われる。

A. 研究目的

厚生行政にとって、わが国における生殖補助医療の安全性を確保することは重要な課題である。より高い安全性の確保を目的として、卵胞刺激ホルモンと黄体化ホルモンの外来性過剰投与の結果発症する、卵巢過剰刺激症候群（OHSS）の発症防止に関する研究を行った。OHSS は医原性疾患であり、この発症を制御することは、わが国の保険行政を助けることにもなる。

OHSS は、(1) 多数の腫大した黄体嚢胞を有する卵巢、(2) 腹水・胸水など third space への血管内血清成分の shift、(3) それによる循環血漿量の減少と血液濃縮、という特徴的な病態を持ち、患者に対し時に致命的な結果を引き起こす。その本体は、卵巢および腹膜血管における血管透過性の異常亢進であることが判明している。

一方、通常排卵時にも、黄体化ホルモンの急激な上昇（lutening hormone surge; LH サージ）により、卵胞局所で類炎症反応が惹起され、それに引き続き血管透過性の亢進が急速に起こる。その結果、卵胞血管から卵胞腔内に血清成分が急速に流入し、卵胞は急速に膨張、腫大する。

つまり、OHSS の発症に深く関与する血管透過性亢進現象は、排卵時にも共通する現象であるといえる。それが排卵時期に一時的に起こるのみならば問題はないが、排卵後も長期に異常継続すると、OHSS という重篤な病態を引き起こすのである。よって OHSS の発症を防止するポイントは、排卵後も継続する血管透過性亢進現象を抑制することであり、そのためにはこれらの卵胞または黄体の血管透過性亢進現象のメカニズムを良く知ることが重要となってくる。

血管透過性の亢進とは、本来血管内にとどまり血管内膠質浸透圧の維持に働く高分子蛋白質（主にアルブミン）が、血管外に漏出する現象をいう。しかし実際にその時、卵胞や黄体嚢胞周囲の血管にどのような変化が起きているかを論じた報告はない。

rat 腔の毛細血管に関しては、1965 年に Carsten らが、発情期や実験的に estrogen が投与された時に、この部位の普段は閉じている血管内皮構造が、窓あき型に変化すると報告している¹⁾。

そこで今回我々は、過剰卵巢刺激 rat の卵巢において、透過性の亢進した排卵卵胞および黄体嚢胞血管の構造変化を研究し、OHSS 発症の制御方法について考察した。

また我々は昨年度の報告で、類炎症反応の主たるメディエーターとしての働きをするサイトカイン、interleukin-8 (IL-8) が、卵胞刺激ホルモンによる過剰刺激で priming した未熟 Wistar rat 卵巢に対し、黄体化ホルモン投与時の黄体嚢胞腫大と同様の、OHSS 様の存続卵胞腫大を惹起すること、黄体化ホルモン投与時の黄体嚢胞血管の拡張と同様の、存続卵胞血管の拡張を惹起することを証明した²⁾。今回はこの IL-8 の、存続卵胞血管の構造変化への影響についても研究した。

なお通常 rat の排卵は、血中 LH サージまたは human chorionic gonadotropin (hCG) 投与の 10~15 (平均 12) 時間後におこる。よって本論文においては、hCG 投与後 12 時間以内のものを“卵胞”、それ以降のものを“黄体嚢胞”と区別して表現した。また hCG の代わりに生理食塩水（生食）または IL-8 を投与し、12 時間以上経過したものは“存続卵胞”と表現した。

また通常は、卵胞刺激ホルモンのみの過剰

投与ではOHSSは発症しない。よって本論文では、2種類の外来性 gonadotropin, 卵巣刺激ホルモンと黄体化ホルモンが過剰投与されている場合にのみ“過剰卵巣刺激”と表現することとした。なお過剰投与とは一般に、未熟 rat の場合、PMSG 10~30 単位以上、hCG 10 単位以上と定義される。

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]

抗 rat IL-8 抗体

[和光純薬]

卵巣血管構築：23日令の未熟 Wistar rat に PMSG 10 unit を腹腔内投与し、その 48 時間後に、それらを、 対照群 [n = 2]; 生食腹腔内投与、 過剰卵巣刺激群 [n = 4]; hCG 10 unit 腹腔内投与、 IL-8 群 [n = 2]; IL-8 20 µg 腹腔内投与、の 3 群に分けた。

その 0 および 6 時間後に、以下の処置を加えた。ネ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 の低加速電圧で走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察した。

卵巣/黄体嚢胞または存続卵巣血管内皮構造：23日令の未熟 Wistar rat に PMSG 10 unit を腹腔内投与し、その 48 時間後に、それらを、 対照群 [n = 2]; 生食腹腔内投与、 過剰卵巣刺激群 [n = 3]; hCG 10 unit 腹腔内投与、 IL-8 群 [n = 2]; IL-8 20 µg 腹腔内投与、の 3 群に分けた。さらにその 0, 6 および 24 時間後、卵巣を 2%のグルタルアルデヒドで灌流固定したのち、摘出した。それを 1%オスミウムで 2 時間固定後、エタノール脱水し凍結割断・オスミウムコーティングし、SEM 観察した。

(倫理面への配慮)

実験動物に対する愛護上の配慮のため、処置は完全な麻酔下で、素早く人道的な方法で行った。

C. 研究結果

卵巣血管構築：

対照群；腫大卵巣周囲の血管網は多層化していたが、それらの血管の拡張は軽度であった。 過剰卵巣刺激群；投与 6 時間後において、さらに腫大した卵巣の周囲の、多層化した血管網は非常に密となり、各々の血管も著明に拡張していた。血管から樹脂の漏出様像も認められた。 IL-8 20 µg 投与群；過剰卵巣刺激群と同様、投与 6 時間後において、腫大卵巣を取り巻く、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様像も同様に認められた。(平成 10 年度厚生科学研究報告書²⁾：Fig. 5 参照)

以上より、過剰卵巣刺激した卵巣、あるいは過剰卵巣刺激後 IL-8 20 µg を投与した卵巣では、卵巣血管は拡張し、その血管透過性も亢進していることが判明した。

卵胞/黄体嚢胞または存続卵胞血管内皮構造 :

対照群: 腫大した存続卵胞周囲の血管内皮には, 特に変化は認められなかった。

過剰卵巣刺激群: 対照群に比しさらに腫大した卵胞/黄体嚢胞周囲の, 拡張した血管内皮には, 投与 6 および 24 時間後に直径 3,000 ~ 4,000 (0.3 ~ 0.4 μm) の多数の “pore” の出現が認められた。

(Fig. 1; 投与 0 時間後, Fig. 2; 投与 6 時間後: 倍率 左; $\times 7,000$, 右; $\times 20,000$)

IL-8 20 μg 投与群: 対照群に比しさらに腫大した卵胞/存続卵胞周囲の, 拡張した血管内皮には, 過剰卵巣刺激群ほどの明確な “pore” の出現は認められなかった。

preliminary study

さらに我々は, OHSS における黄体嚢胞の腫大を制御する研究のために, 過剰卵巣刺激 rat において, 卵巣局所に, 実際に IL-8 がどの程度発現しているかを, 以下の実験にて確認した。

腹水中 IL-8 濃度 : Abramov³⁾ らによれば, 重症 OHSS 患者の血清中の IL-8 濃度はすべて低値にも関わらず, 腹水中の濃度はすべて高値であり, 腹水中の IL-8 は卵巣からの直接の漏出であると報告している。よって腹水中 IL-8 量は卵巣内の IL-8 量を反映すると思われる。

方法 ; 23 日令の未熟 Wistar rat に PMSG 10 unit を腹腔内投与し, その 48 時間後, それらを, 対照群 [n = 5]; 生食腹腔内投与,

過剰卵巣刺激群 [n = 5]; hCG 10 unit 腹腔内投与, の 2 群に分けた。その 0, 3, 6, および 24 時間後に腹腔内を 5 ml の生食で洗浄し, 回収した洗浄液中の IL-8 濃度を EIA 法 (パナテスト・ラット IL-8 kit; パナファームラボラトリーズ) にて測定した。

結果; 対照群; IL-8 濃度の増加は, どの時間帯においても認められなかった。

過剰卵巣刺激群 (pg/mg \cdot protein); 0 時間後 2.2 \pm 0.9, 3 時間後 21.2 \pm 5.2, 6 時間後 5.2 \pm 3.6, 24 時間後 10.2 \pm 7.2, と黄体化ホルモン投与後に上昇を認めた。黄体嚢胞化後には 5 倍程度の上昇を認めた。

卵巣組織 IL-8 免疫染色 :

方法 ; 23 日令の未熟 Wistar rat に PMSG 10 unit を腹腔内投与し, その 48 時間後, それらを, 対照群 [n = 5]; 生食腹腔内投与, 過剰卵巣刺激群 [n = 5]; hCG 10 unit, の 2 群に分けた。その 0, 3, 6, 24 および 48 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, 抗 rat IL-8 抗体による免疫染色を施行した。酵素抗体染色法は ABC 法を用いた。

結果 ; 対照群; 夾膜細胞層 (T) では染色陽性 (+) 所見が認められたが, 顆粒膜細胞層 (G) に染色陰性 (-) であった。 過剰卵巣刺激群; 0 時間後 T (+) / G (-), 3 時間後 T (+) / G (+, partially -), 6 時間後 T (+) / G (-), 24 時間後 T (+) / G (+), 48 時間後 T (+) / G (+), であった。夾膜細胞層においては, 卵巣刺激ホルモン刺激のみで陽性所見が認められたが, 顆粒膜細胞層では, さらに黄体化ホルモン刺激が加わった場合にのみ, IL-8 の局在が認められるようになった。

D. 考察

卵胞あるいは黄体嚢胞血管における透過性亢進時の血管内皮の変化については、言及されている論文はほとんどない。わずかに1980年にOkudaらは、rabbit 卵巣においてhCG投与10時間後に、血管内皮細胞間にgapが認められたと報告している⁴⁾。

今回の我々の実験では、過剰卵巣刺激時の卵胞/黄体嚢胞血管において血管内皮に多数の“pore”が認められ、それが卵胞/黄体嚢胞血管透過性亢進現象の本体である可能性が強く示唆された。通常ヒト血清アルブミンは楕円体をしており、その長径は150、短径は38である⁵⁾。よって、この直径3,000~4,000の“pore”よりアルブミンが血管外に漏出しているという可能性はきわめて高い。おそらくこの現象は、直接的にはnitric oxide等の物質により惹起されるのであろう。hCGにはこういった作用があることが証明できたが、IL-8がこの作用を持つかどうかは今回は証明できなかった。

以上より、OHSSにおける異常卵巣(黄体嚢胞)腫大を制御するためには、黄体血管におけるこれらの“pore”を制御することが重要であると思われる。また腹水産生時も、腹膜血管において同様の構造変化が起きている可能性もあるため、腹水制御にも“pore”の制御が有効であることも考えられる。これはおそらく、hCGの刺激が引き金となり、卵巣よりsecond messenger X, Y, Z, …が産生され、最終的にはnitric oxide等の物質により惹起されるものと思われる。“pore”を発現させないためには、hCGから“pore”発現までの一連のカスケードのどこかをブロックすれば良いと考えられる。

IL-8は近年、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るようになった⁶⁾。また前述の如く、重症OHSS患者の腹水中において非常に高濃度のIL-8が検出されることがAbramovらにより証明され、hCGを添加された卵巣間質細胞や過剰卵巣刺激後の顆粒膜黄体細胞において、IL-8のmRNA発現と、IL-8自体の産生がAriciらにより確認されている⁷⁾。我々の今回の実験結果からは、血管内皮に“pore”の出現こそ証明できなかったが、やはりhCGのsecond messengerとして、何らかの機序でこうした現象をサポートしている可能性は十分考えられた。

その他の関与物質としては、近年vascular endothelial growth factor (VEGF)が注目を集めている。1995年Koosは、equine chorionic gonadotropin(8単位)/hCG(5単位)刺激rat 卵巣におけるVEGFのmessenger RNA(mRNA)局所levelは、hCG投与後1~4時間で投与前の約8倍に上昇し、その高値は10時間後と18時間後でも保たれていたと報告している⁸⁾。そしてhCG投与1~4時間後のmRNAの増加は、顆粒膜細胞と夾膜細胞、間質細胞の3者において認められたという。一方、1988年にAbisogunらは、rat 卵巣における血管透過性亢進がhCG投与後6時間で最大となると報告している⁹⁾。Koosはこれらのことより、排卵直前の卵胞における卵胞血管透過性の亢進はVEGFの増加と密接に関与していると結論づけ、VEGFはそれを介して、排卵現象と黄体の血管構築に重要な役割を担っていると推測している。その時彼は血管内皮の観察はしていないが、なされていれば、我々の実験のような“pore”が観察されたと思われる。

以上より VEGF の抑制も ,OHSS の発症防止に有力と思われるが ,hCG から “ pore ” 発現までの一連のカスケードは ,IL-8 を抑制することによって ,ブロックされうる可能性もある。その際には ,我々が示した preliminary study の腹水中 IL-8 濃度や ,卵巣の IL-8 免疫染色結果がひとつの指標となると思われる。

E . 結論

過剰卵巣刺激 rat の排卵卵胞および黄体嚢胞における血管構築を観察し , 以下のごとき所見が得られた。

卵巣刺激ホルモン投与により卵巣周囲には血管新生が起こり , 周囲の血管網は多層化する。引き続き ,hCG 投与によりそれらの血管は拡張し , 血管透過性は急速に亢進する。この現象は黄体嚢胞化しても持続する。その時血管内皮には 直径 3,000 ~ 4,000 の “ pore ” の出現が多数認められ , これが排卵卵胞および黄体嚢胞における血管透過性亢進の本体と思われた。これらの “ pore ” を制御することが OHSS 発症防止のポイントと考えられる。

867.

- 5) 古賀俊逸 (1979) アルブミンおよびブ
レアルブミン 構造と機能 . 平山千里 ,
右田俊介編 , 血漿タンパク質 . 医歯薬出
版 , 東京 , 134-147.
- 6) Fukumoto, T. *et al.* (1998)
J. Leuko. Bio., 63, 584-590.
- 7) Arici, A. *et al.* (1996)
Endocrinology, 9, 3762-3769.
- 8) Koos, R.D. (1995)
Biol. Reprod., 52, 1426-1435.
- 9) Abisogun, A.O. *et al.* (1988)
Biol. Reprod., 38, 756-762.

参考文献

- 1) Carsten, P.M. and Merker H.J. (1965)
Archiv. für Gynäkologie, 200, 285-
298.
- 2) 寺尾俊彦 (1999) 厚生科学研究 『わが
国における生殖補助医療の実態とその在
り方に関する研究 (主任研究者 : 矢内原
巧)』平成 10 年度報告書, 61-73.
- 3) Abramov, Y. *et al.* (1996)
Hum. Reprod., 11, 1381-1386.
- 4) Okuda, Y. *et al.* (1980)
Acta Obstet. Gynaecol. Jpn., 32, 859-

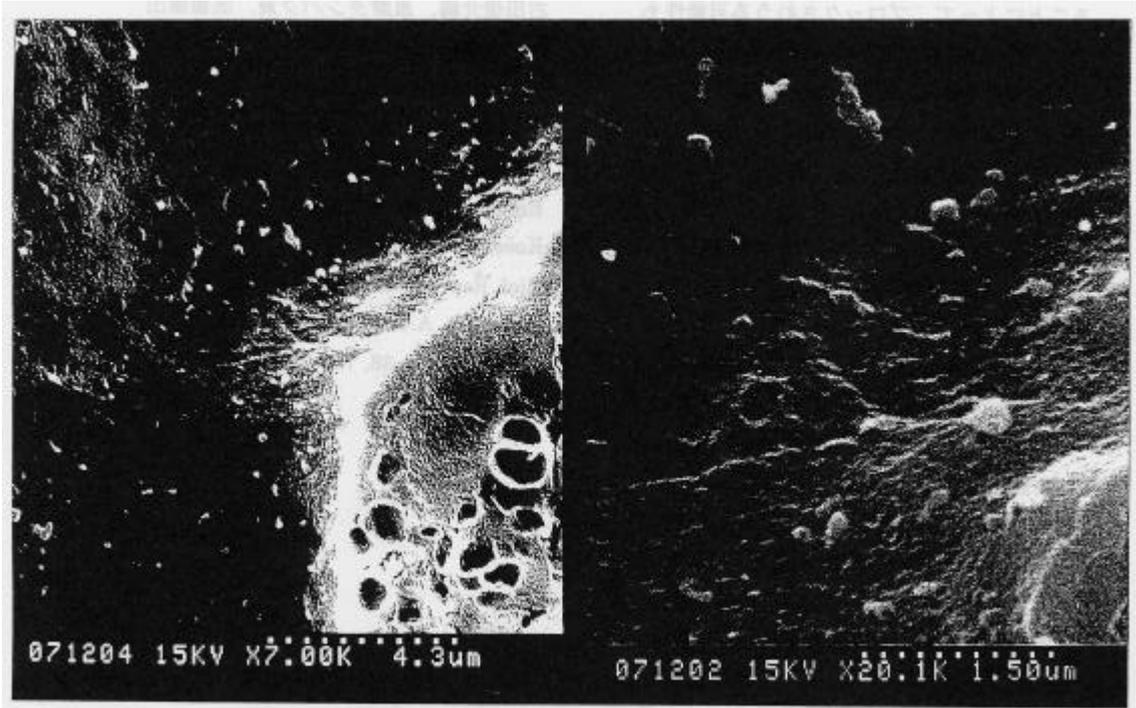


Fig. 1 過剰卵巢刺激群における投与 0 時間後 (= PMSG 投与 48 時間後) の卵胞血管内皮構造〔左図 / 左側 3/4 部分が血管割断面 : 倍率 $\times 7,000$, 右図 / その拡大図 : 倍率 $\times 20,000$ 〕 ; 血管内皮割断面には, 特に “ pore ” などの存在は認められない。

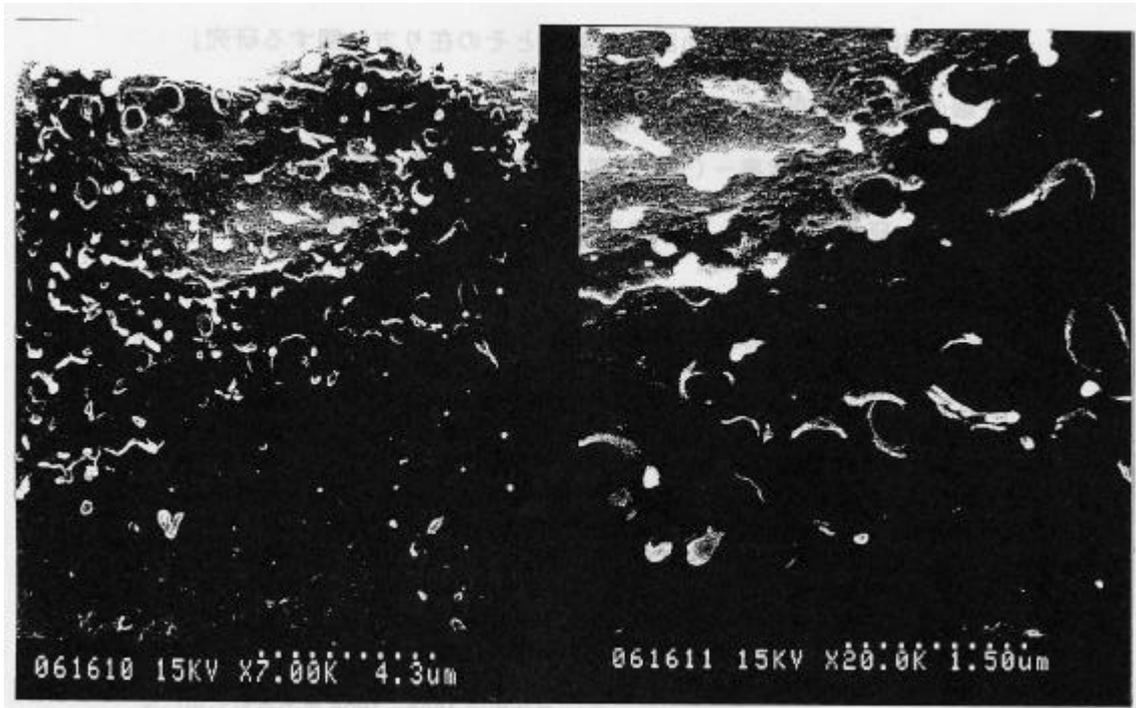


Fig. 2 過剰卵巢刺激群における投与6時間後の卵胞血管内皮構造〔左図／全て血管断面：倍率 $\times 7,000$ ，右図／その拡大図：倍率 $\times 20,000$ 〕；血管内皮断面に，直径 $3,000 \sim 4,000$ ($0.3 \sim 0.4 \mu\text{m}$) の多数の“pore”の出現が観察できる。