

生殖医学における加齢の現状と診断法

研究代表者名 齊藤 英和

国立成育医療研究センター・母性医療診療部・不妊診療科

研究協力者 高橋祐司・伊藤めぐむ・齊藤隆和・石田恵理

国立成育医療研究センター・母性医療診療部・不妊診療科

研究要旨

本研究では、ヒト顆粒膜細胞において老化により強く発現亢進する GSTT1 と p38MAPK の相互作用とアポトーシス・細胞内維持機構に関与するオートファジーについて解析を行った。GSTT1 の発現は p38MAPK の活性化および細胞内局在とよく相関しており、p38MAPK が細胞質内に局在して強く活性化するとき、GSTT1 が発現亢進していることが明らかとなった。顆粒膜細胞株で RNAi により GSTT1 の発現制御を行ったところ、p38 は核で活性化していることが明らかとなった。また、GSTT1 発現制御細胞では Steroidogenic Acute Regulatory protein の発現が著しく増加しており、p38alpha 発現制御細胞でも同様の結果が得られた。GSTT1 の発現は p38 阻害剤により抑制されることから、GSTT1 は p38 シグナルの下流でホルモン制御を行っている可能性が示唆された。

また、オートファジーは卵丘顆粒膜細胞に強く発現しており、細胞の分化に対応する反応と推測された。

A. 研究目的

加齢に伴う生殖能力の低下は古くから知られてきた。特に、卵子の老化は 30 代後半から急速に進行すると考えられており、女性の晩婚化は生殖機能にとって大きなリスクとなる。

卵子は胎児卵巣で増殖した後、思春期まで活動を停止し、その後非増殖的かつ定期的に排卵を繰り返すため、卵巣内における貯蔵卵子数は年齢とともに減少する (de Bruin et al., 2004)。また、排卵過程において卵巣で酸化ストレスの源である活性酸素を産生することが報告されており (Agarwal et al., 2005)、排卵回数を重ねるに従い貯蔵された卵子もストレスを受け、卵子の機能が低下する可能性が考えられる。実際、我々はストレス遺伝子の一つである

GSTT1 が老化顆粒膜細胞において発現亢進していることをすでに報告している (Ito et al., 2008)。

本研究では、ヒト顆粒膜細胞において老化により強く発現亢進する GSTT1 と p38MAPK の相互作用について解析を行った。

また、アポトーシス・細胞内維持機構に関与するオートファジーの顆粒膜細胞での発現を解析し、卵胞発育での関与機構について検討した。

B. 研究方法

(1) 試料の作製

生殖補助医療を受けた不妊患者の医療副産物である顆粒膜細胞を、phosphatase inhibitor cocktail および protease inhibitor cocktail を添加した

TBS で3回洗浄し、一部は遠心により上清を除去して $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。また、一部は TBS による洗浄後、4%ホルムアルデヒドで固定した。

### (2) 細胞培養

ヒト顆粒膜細胞腫様細胞株 KGN を DMEM/F12 + 10% FBS で培養し、老化モデルとして  $200\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  による酸化ストレス負荷を 24 時間行った。また、KGN に GSTT1 および p38alpha の RNAi コンストラクトを導入し、安定形質発現細胞の選別を行った。これらの細胞の一部は遠心により上清を除去して $-80^{\circ}\text{C}$ に保存した。また、一部は TBS による洗浄後、4%ホルムアルデヒドで固定した。

### (3) 免疫染色

ホルムアルデヒド固定標本を 100%ブロッカーでブロッキングした後、1次抗体で染色し、洗浄後 Alexa488 結合 2次抗体で検出した。また同時に、細胞の核を Hoechst33342 で染色した。CCD カメラ 装備 の 倒立 蛍光 顕微鏡 (Olympus) または共焦点蛍光顕微鏡 (Leica) を用いて、撮影を行った。撮影した写真は MetaMorph 画像解析プログラムを用いて解析を行い、各細胞における蛍光強度および蛍光ヒストグラムの作成による細胞内局在を明らかにした。

オートファジー解析では、風乾固定した顆粒膜細胞を、0.1% Tween 20 含有 PBS で洗浄し、1% BSA 添加 0.1% Tween20 / PBS でブロッキング処理を施した。一次抗体には 500 倍希釈抗 LC3 抗体を用い  $4^{\circ}\text{C}$  で一晩反応させ洗浄した後、1000 倍希釈 Alexa546 結合 二次抗体で検出した。さらに Hoechst33342 を用いて細胞核を染色した。

蛍光染色を施した標本は、CCD カメ

ラ内蔵倒立蛍光顕微鏡で観察し、5-10 カ所の撮影をおこない、オリンパス DP コントローラーおよび DP マネージャーを用いて解析を行った。

### (4) ウェスタンブロット解析

phosphatase inhibitor cocktail および protease inhibitor cocktail を添加した TBS + 1% TX100 で $-80^{\circ}\text{C}$ に保存したサンプルを溶解した。また、NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagent kit (Thermo Scientific Co) を用いて、細胞質および核タンパク質の分離を行った。Micro BCA protein assay kit (Thermo Scientific Co) を用いて可溶画分の総タンパク質量の測定を行った。

### (5) RT-PCR

RNA 抽出試薬を用いて標本より Total RNA を精製し、これを鋳型として 1<sup>st</sup> strand cDNA を作製した。目的の遺伝子に特異的なプライマーを作製し、thermal cycler を用いて遺伝子の増幅を行った。また、内部標準として G3PDH の PCR を行い、画像解析ソフトを用いて電気泳動後増幅した遺伝子産物のバンドの濃淡を数値化した。

### (6) 統計処理

ヒト顆粒膜細胞における p38MAPK リン酸化の年齢による比較を行うため、34歳未満を Younger、36歳以上を Older と分類し、蛍光顕微鏡下で測定した細胞あたりの蛍光強度を  $t$  検定により解析した。また、リン酸化 p38MAPK の核局在は、視野内の存在する細胞のうち、核内でクラスターを形成している細胞数を測定してその割合を数値化し、Younger と Older 群の比較を  $t$  検定で解析した。KGN 細胞においても同様の測定を行い、同じく  $t$  検定により比較解析を行った。さらに、様々な処理を行った

KGN の群間比較には ANOVA 解析を行った。

#### (7) 倫理面への配慮

本研究の遂行にあたり、患者のプライバシーには十分に配慮し、個人情報の保護を遵守した。

### C. 研究結果

#### (1) 顆粒膜細胞における p38MAPK のリン酸化

ヒト顆粒膜細胞における p38MAPK の活性について解析を行ったところ、p38MAPK は Younger 群と比較して Older 群でリン酸化が強く亢進していた (Fig 1A: 免疫染色; Fig 1B: ウェスタンブロット解析)。一方、同一患者の顆粒膜細胞において、GSTT1 の発現は老化により強く亢進していることが明らかとなった (Fig 1C)。

次に、顆粒膜細胞株 KGN に過酸化水素水 200 $\mu$ M を 24 時間負荷して p38MAPK のリン酸化を検証した。酸化ストレスの負荷により p38MAPK のリン酸化は細胞質内で著しく亢進していることが確認された (Fig 2)。一方、p38MAPK 阻害剤で前処理した細胞では細胞質内での p38MAPK 活性化が抑制され、これと一致して GSTT1 の発現は抑制された (Fig 3)。

#### (2) GSTT1 発現制御細胞における p38MAPK の細胞内局在

p38MAPK 発現制御細胞および GSTT1 発現制御細胞を作製し、それぞれの細胞における GSTT1 の発現および p38 活性化を免疫染色により検討した。P38MAPK ノックダウン細胞において GSTT1 の発現は著しく抑制され、p38MAPK 阻害剤を用いた場合と同様の結果が得られた (Fig 3)。一方、GSTT1 ノックダウン細胞において、p38MAPK は核内でより強く活性化していること

が明らかとなった。

#### (3) GSTT1 の顆粒膜細胞における役割

GSTT1 が p38 シグナルの下流に位置する分子であることから、GSTT1 がホルモン産生制御に関わる可能性について検討した。GSTT1 ノックダウン細胞において、プロゲステロンなどホルモン産生の拠点となる Steroidogenic Acute regulatory protein の発現を検討したところ、著しく亢進していることが明らかとなった (Fig 4)。同様に、p38 ノックダウン細胞においても StAR の発現は亢進していることが明らかとなった。

(4)。Hoechst33342 では核の断片化による各細胞群のアポトーシス出現率は mature 1.01%, immature 0.92%, dysmature 3.44% と壁側顆粒膜細胞 1.11% であり、dysmature 群で有意に高い割合であった。

LC3 陽性率は卵丘顆粒膜細胞が 45.7% に対し、壁側顆粒膜細胞が 6.38% であり、卵丘顆粒膜細胞の方が有意に高い割合を示した ( $P < 0.01$ ) (Fig5)。さらに卵丘顆粒膜細胞の各群の内訳は、mature 44.9%, immature 43.1%, dysmature 49.4% と卵子・卵丘細胞複合体の成熟度による差は認められなかった。

### D. 考察

GSTT1 は phase II の解毒作用を担う GST のファミリー分子であり、GST 活性を有する。一方で、GST は抗酸化作用を持つ分子としても知られており、老化と密接に関係している可能性が想定される。GSTT1 は他のファミリー分子とは構造的な類似性が比較的 low、生体にとって有害なホルムアルデヒドを産生することも報告されており、その機能については不明な点が多い。

顆粒膜細胞において、老化により

GSTT1 の発現が亢進していることは酸化ストレスが GSTT1 の発現を制御していることを示唆している。実際、KGN 細胞において、酸化ストレス下で GSTT1 の発現は細胞質内で著しく増加しており、強い関連性が示された。また、p38MAPK の活性化は若齢では核に局在し、老齢では細胞質内に認められることをすでに報告したが、GSTT1 がこれらの変化とよく一致していることから、顆粒膜細胞の老化と深く関わっていることが示唆された。GSTT1 発現制御細胞では、p38MAPK の活性化が核で亢進していたことは、老化との関連性を強く支持している。一方、p38alpha ノックダウン細胞や p38 阻害剤処理細胞では GSTT1 の発現は抑制されていることから、GSTT1 は p38MAPK の下流で働く分子であることが示唆された。

顆粒膜細胞において GSTT1 がどのような役割を果たしているかについては、現在詳細な検討を進めているが、ホルモン産生能を制御している可能性が得られた。今回、ノックダウン細胞を用いて Steroidogenic Acute Regulatory protein の発現の変化を確認したところ、明らかに StAR の発現は増加していたことから、GSTT1 は顆粒膜細胞においてホルモン産生を担っているものと推測される。顆粒膜細胞におけるホルモン産生能の加齢変化を引き起こす原因である可能性が示唆された。

オートファジーは壁側顆粒膜細胞より卵丘顆粒膜細胞に高発現しており、卵子-卵丘細胞複合体の成熟度には差は認められなかった。これは、卵丘顆粒膜細胞は排卵に向かってヒアルロン酸合成を合成が盛んになり、卵子-卵丘細胞複合体を形成し排卵に備える変化のために、オートファジーを用いて、ヒアルロン酸の原料を細胞内からも調達を行っている可能性がある。また、ヒアルロン酸合成により卵子の障害を

防ぎ、老化を防止する恒常性を維持するはたらきも考えられた。

#### E. 結論

本研究から、顆粒膜細胞は老化により酸化ストレスを主因としたストレスを受け、p38MAPK シグナルにより GSTT1 の発現を誘導していることが明らかとなった。GSTT1 は顆粒膜細胞のホルモン産生制御を行う分子であると推測された。

卵丘顆粒膜細胞はオートファジーにより卵子-卵丘細胞複合体を形成し排卵に備えることが推測された。

#### F. 研究発表

投稿中

#### G. 知的財産権

特になし

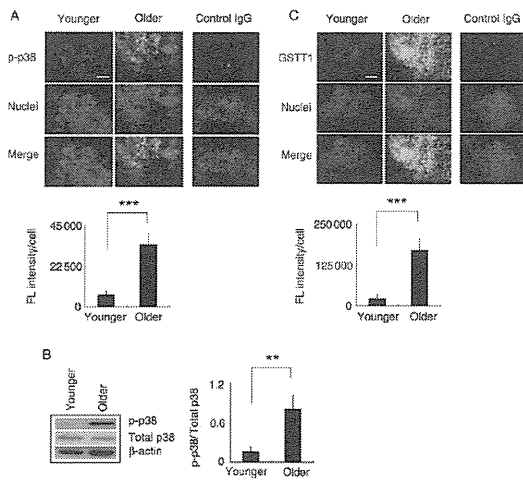


Fig 1. 顆粒膜細胞における p38MAPK のリン酸化

Green: リン酸化 p38MAPK、GSTT1  
 Blue: 核  
 Western blot には細胞質画分を使用

- A. ヒト顆粒膜細胞における p38 リン酸化の免疫染色
- B. ヒト顆粒膜細胞における p38 リン酸化のウェスタンブロット解析
- C. ヒト顆粒膜細胞における GSTT1 の免疫染色

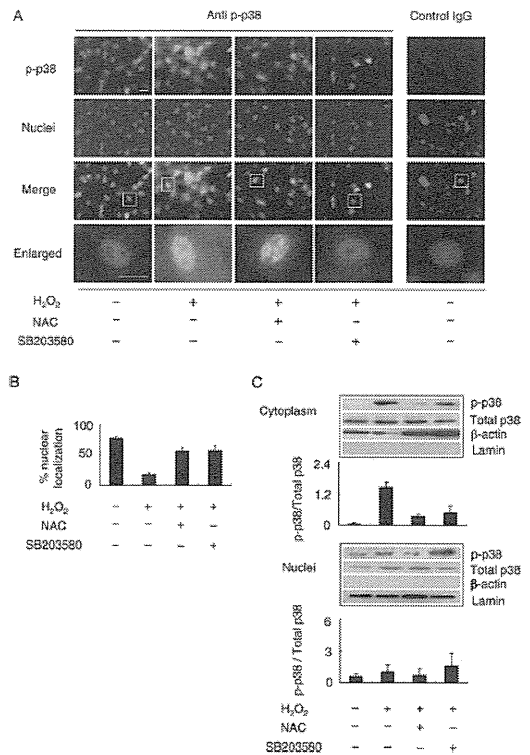


Fig 2. 顆粒膜細胞株 KGN における p38MAPK のリン酸化と局在

Green: リン酸化 p38MAPK  
 Blue: 核  
 Western blot には細胞質画分および核画分を使用

- A. 過酸化水素水処理した KGN 細胞における p38 リン酸化の免疫染色 (核内のリン酸化を拡大図で示す)
- B. 核内でのみ p38 リン酸化が見られる細胞の比率
- C. KGN細胞における p38 リン酸化のウェスタンブロット解析

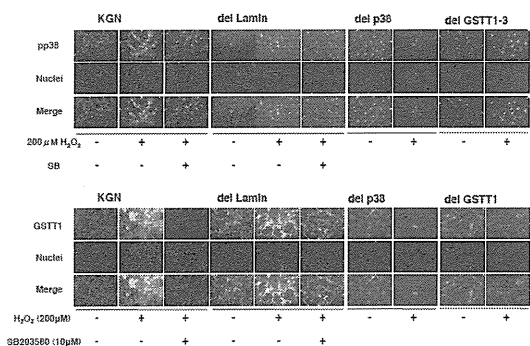


Fig 3. GSTT1 ノックダウン細胞、p38alpha ノックダウン細胞における p38、GSTT1 の発現

Green: リン酸化 p38MAPK、GSTT1  
Blue: 核

- A. 過酸化水素水処理した細胞における p38 リン酸化の免疫染色
- B. 過酸化水素水処理した KGN 細胞に

### おける GSTT1 の免疫染色

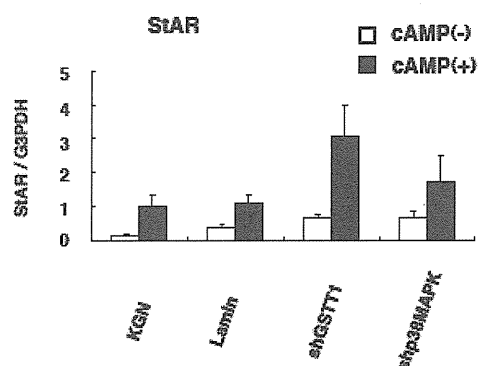


Fig 4. RT-PCRによる StAR の発現解析 GSTT1、p38alpha ノックダウン細胞において、cAMP 刺激下における StAR の発現変化を比較解析した

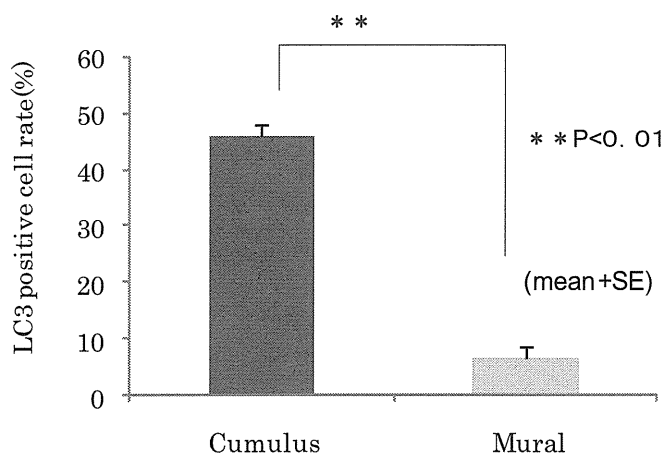


Fig.5. 顆粒膜細胞のオートファジー陽性率 壁側顆粒膜細胞よりも卵丘顆粒膜細胞の陽性率が有意に高い。

ライフスタイルの変化に伴うPCOS婦人に対する生殖医療対策

分担研究者 苛原 稔

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 発生発達医学 教授

研究協力者 桑原 章 徳島大学産科婦人科 講師

研究要旨

女性のライフスタイルの変化により医学的、社会的側面を考慮した生殖医療が求められている。多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）に特異的な安全性の高い治療法が近年注目されており、PCOSの診断を明確にし、治療成績を検討することにより、女性の晩婚化に伴い卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する必要がある。まず、我が国のPCOS診断基準と国際的基準の乖離を解消し、FSH療法の副作用を解消し、患者個人のライフスタイルに合わせたリスク管理に明確な指針を示すことを目的とした。

診断基準作成のため多施設アンケート調査により症状、検査法を検討した。治療方針検討のため、クロミフェン（CC）療法、メトフォルミン+CC療法、低用量FSH療法、腹腔鏡下多孔法（LOD）および生殖補助医療（ART）の成績を検討した。PCOSの診断基準として①月経異常（希発月経、第1度無月経、無排卵周期症）、②卵巣所見（小卵胞10個以上）、③内分泌所見（LH値、男性ホルモン）を提唱した。特に検査を行う時期、採血測定系（特に男性ホルモン検査）の標準化に関し詳細にデータを示した。治療基準作成に関しては一般排卵誘発とくに低用量FSH治療法成績、メトフォルミン+CC併用療法の特徴を示した。非ART累積妊娠率は70%で、70%以上は治療6周期までに妊娠が成立していた。ART治療では非PCOS症例と概ね差が無いがOHSS発症率が有意に高いこと、LOD実施後ARTはOHSSのリスク低下、採卵数減少を示した。PCOSの診断基準として国際的にも整合性のとれた①月経異常、②卵巣所見、③内分泌所見を提唱した。また、PCOSに対する低刺激排卵誘発治療の結果は良好であったが、治療には約2週間を要し、6周期以降に妊娠する症例は限られるので、社会的リスクが高い症例は、より早くからARTや腹腔鏡手術の選択肢を考慮する必要があると考えられた。LODは多胎妊娠、OHSSがなく自然妊娠が期待でき、積極的に実施すべき治療法である。LOD手術後のARTで卵巣予備能の低下が懸念されるため、LOD手術では卵巣予備能を考慮した慎重な手術が必要と考えられた。

PCOSの診断基準を月経異常、卵巣所見、内分泌所見の3つを満たすものとし、治療方針としてクロミフェン、メトフォルミン、低用量FSH療法、LOD、ARTとして総合的に治療に当たる基準を示し、その各々の特徴を明らかとすることができた。ライフスタイルの変化や社会的要因に基づき個別化して治療に当たる有用な知見を得られたことは、今後のPCOS治療にとり重要と考えられる。

A. 研究目的

多嚢胞性卵巣症候群（PCOS）は生殖医療において排卵誘発治療が必須であるが、卵巣過剰刺激症候群（OHSS）や多

胎妊娠の高リスク群であり、事実、ゴナドトロピン製剤による排卵誘発治療で排卵数をコントロールすることが難しく3胎以上の超多胎が毎年報告されて

いる。一方、近年の女性のライフスタイルの変化は顕著であり、加齢に伴う生殖能力の低下は既知の事実であるにも関わらず、30歳代後半から複数回の妊娠を期待することが少なくない。高齢化を前提に短期集中して効率的治療が求められている一方、有職女性が増加し、治療、通院の負担、副作用への受容性が低く、成功率のみを重要視した治療が受け入れがたくなっていることも事実である。

PCOSにはゴナドトロピン製剤を用いずに排卵を促し、多胎妊娠、OHSSを予防しうる特異的な治療法（メトホルミンや腹腔鏡下卵巣多孔術）が有効で、他の排卵障害患者とは異なる治療戦略が存在する。従って正確なPCOS診断基準と患者背景に基づき治療方針を個別化することは、価値観が多様化し、卵の質低下に対応した治療を短期集中して実施する場合に最も重要と言える。しかし、我が国におけるPCOS診断基準には国際的基準の間に乖離が見られるため、改めて国際的に受け入れられ、かつ正確な診断に有用な基準を検討し、それに従い治療方針を個別化できることを本研究の目的とした。

さらに生殖医療のなかでも、とりわけ進歩がめざましく、成功率も高い生殖補助医療（ART）では単一胚移植が普及し多胎率は5%以下、3胎はほぼ0%となり、多胎リスクの面でもARTの利点が注目されている。OHSSについても低量ゴナドトロピン投与により少数の成熟卵子しか得ずとも、安定した妊娠成績を残せるようになったことから、PCOSに対するART成績の再評価も本研究の目的の一つとした。

このように、本研究は本邦におけるPCOSの診断基準に加えて、PCOSに対する治療と利点、問題点を明らかにし、多彩なライフスタイルや患者の高齢化を前提としている現在のPCOS患者に対す

る治療方針を検討し、有用な知見を得ることを目的とした。

## B. 研究方法

全国の生殖補助医療登録施設から得られたアンケート調査結果を基にPCOSの診断の感度、特異度を検討し本研究における診断基準を検討した。さらに当施設で治療を行った診断基準に該当するPCOS症例に対し、現在までに有用性が示唆されている内服治療および副作用軽減を主たる目的とする低刺激ゴナドトロピン療法を行い、その臨床結果、治療に必要な日数、症例あたりの累計妊娠率などを検討した。加えてPCOS症例のARTに至るまでの治療経過およびART治療成績を同時期に実施した非PCOS症例と比較検討した。

倫理面への配慮：調査においては患者および治療施設が特定されないようアンケート回答、および治療調査においては患者名や生年月日など患者が特定されうる情報を匿名化したうえで実施しており、問題ないと判断した。

## C. 研究結果

アンケートで集められた症例をPCOS、PCOS疑い、その他の3群に分類しその患者背景を表1に、初診時の主訴および症状を表2に示す。症状では、月経不順がほぼ全例に認められた。月経異常の程度は希発月経、第1度無月経が多く、無排卵周期症を含めた3種類の月経異常が大半を占めていた（表3）。卵巣所見項目ではPCOSのほぼ全例、PCOS疑い群の多数がPCOパターンを示しており、PCOS疑い群は内分泌所見（LH基礎値高値）を満たさないためにPCOSと診断されていないものが多いと考えられた（表4）。超音波所見における客観的基準としては小卵胞の数と小卵胞のサイズを採用することが有用と思われた。数える卵胞のサイズを諸外国での基準との整合性を考え2-9mmとしたとこ



ろ、2-9mmの卵胞10個以上は感度86%、特異度90%に該当し、検討した中でも最大の感度が得られた判定基準であった。内分泌検査項目で注目すべきことは、診断時にLH基礎値高値によりPCOSと診断された症例でも、管理中にLHが継続的に高値を示したのは68.2%と再現性が高くなかったこと、またPCOS疑い例ではLH基礎値高値例が37.7%にとどまっていたことである(表5)。血中LH基礎値の高値を判定するのに使用する指標としては、LH値かつLH/FSH比が有用と考えられた。男性ホルモンに関しては過半数で総テストステロンを測定していた。男性ホルモンについては、遊離テストステロン、アンドロステンジオンはそれぞれPCOS、PCOS疑いの過半数の症例において高値を示し、LHで診断しきれないPCOS疑い例でも診断上有用であることが示唆された。測定値が高値を示す症例の割合を検討した結果、LH高値単独よりも、LHまたは男性ホルモン高値例とすれば陽性率は顕著に高くなった(表6)。LH、テストステロン、アンドロステンジオンの3項目の測定値が全て揃っている症例に限り、陽性率を検討したところ、LHが測定時に正常であった症例のうちで男性ホルモン(テストステロンまたはアンドロステンジオン)が高値であった症例の割合は、PCOSで37.3%(50/134)、PCOS疑いで40.6%(28/69)であった(表7)。尚、各施設で採用されていた各ホルモン測定系は表8のように種々のものが含まれていた。これらの検討から本研究で提唱されるPCOSの診断基準を表9に示すように定めた。

表9の診断基準に基づき治療成績を検討できたPCOS症例(表10)は74症例、治療周期数は410周期、妊娠数は44例あった。排卵率は73.4%、周期あたり妊娠率は10.7%、流産率は25.0%(11/44)であった。患者の負担として最も影響を与えるのは治療に要した日

数と副作用の発生率であるが、今回の検討では刺激開始から排卵に至るまでの治療に要した日数は $14.0 \pm 5.3$ 日、多胎率は9.1%(44/410)、卵巢過剰刺激症候群(OHSS)の発生は認めなかった。

治療は図2に示すように、まずクロミフェン単独療法を行うこととし、クロミフェン無効症例に対してはメトフォルミン+クロミフェン併用療法あるいは低用量FSH療法を行った。一部同意が得られた症例に対してはFSH-GnRH pulse療法を行っている。メトフォルミン+クロミフェン併用療法では排卵率、妊娠率は低いものの100%が単一卵胞発育であった。排卵に要した日数は最も長い、実際に通院を要する日数はクロミフェン療法と同等であった。低用量FSH療法はクロミフェン単独療法と同等の排卵率、妊娠率が得られた。治療に要した日数も同等であった。多胎率が高くさらに改善が必要と考えられた。FSH-GnRH pulse療法は最も治療に要した日数が短く、妊娠率も高く、多胎妊娠も認める事は少ないため有用性は高い。

治療周期の大半を占めているクロミフェン単独および低用量FSH治療経過中の累積妊娠率を図1に示す。クロミフェン単独(32.0%)に比べて低用量FSHでの累積妊娠率は48.9%と高い傾向にある。いずれの治療でも治療5回目までは周期ごとの追加妊娠例を認めているが、6周期以降の妊娠例は少なく、特にクロミフェン単独療法では6周期以降の妊娠例を認めなかった。低用量FSH療法において妊娠した症例と妊娠しなかった症例の患者背景を検討したところ、年齢、BMI、男性ホルモン値に明らかな差を認めた(表11)。

PCOSでARTを実施した21症例と非PCOS255例の患者背景およびART治療成績を表12、13に示す。PCOSの診断基準および患者の特徴を示すようにPCOS症例ではBMIが高く、FSHが低く、LHが高い症例が有意に多いが、ART治療では排

卵刺激日数、受精卵数、移植可能胚数、妊娠率、流産率、累積妊娠率に有意差を認めなかった。一方、使用ゴナドトロピン量が有意に少ないにも関わらず採卵数は有意に多く、OHSS 発症率が有意に高いことが判った。ART 実施前に LOD を実施した症例が 5 例あり、非実施例との比較を試みたところ (表 14)、患者背景として ART 実施直前の BMI には差が無いが、FSH は有意に高く、LH は有意に低いことが明らかとなった。さらに使用ゴナドトロピン量が有意に多いにも関わらず、採卵数は有意に少ないことが明らかとなり、妊娠率には有意差を認めなかった。

#### D. 考察

PCOS の診断基準は臨床症状、内分泌検査所見、卵巢所見から構成されている。LH は再現性が低いことや肥満例では顕著でない症例が増えるため、LH/FSH も有用である。血中男性ホルモン値を PCOS 診断基準とすることは病態からみて重要であるが、欧米に比べて本邦の PCOS では男性ホルモン高値を示す症例が少なく、これを必須とすることは適当でない。しかし、病態や欧米の基準との整合性を考え、男性ホルモン高値を十分条件として用いることが妥当と考えられる。PCOS 疑い群では LH の再検査か男性ホルモン測定を併用することにより PCOS と診断できるので、男性ホルモン測定と LH 測定を補完的に用いることによりさらに正確に PCOS と診断できると考えられる。

今回、診断基準を満たす PCOS に対しクロミフェン療法、メトフォルミン+クロミフェン併用療法、低用量 FSH 療法、FSH-GnRH pulse 療法の治療日数や副作用発生率、累積妊娠率等の臨床的特徴を示し、患者のライフスタイルに合わせた治療法選択の指標とすることが可能となった。排卵率、周期あたり妊娠率ともに満足できる結果であるが、多胎率が一

般排卵障害症例より高く、PCOS に対する治療は注意が今後も必要と考えられた。治療には約 2 週間を要するため、患者への説明と、場合によっては多忙な時期や曜日に治療を避ける対策が重要と思われた。OHSS の発生が危惧される多数の卵胞発育時に hCG 投与基準を遵守し予防策を徹底したため OHSS の発生は無かった。治療開始前に hCG 投与キャンセルの可能性を十分説明し、OHSS 発生に伴う入院や治療脱落を防ぐことは患者のライフスタイルを守る観点から重要と考えた。クロミフェン療法はもっとも基本となる治療であり、妊娠率は低いもののコストを考慮し症例を選択することが重要である。メトフォルミン+クロミフェン併用療法は多胎率が低く治療要日数は長いものの通院要日数は少ないので、クロミフェン無効例に有用な選択肢である。FSH-GnRH pulse 療法は注射用ポンプを必要とし、保健診療適応外であるが治療要日数が短く、一部の症例では有用な治療となる。低用量 FSH 療法は強力な治療法であるが多胎発生の可能性があり、十分な説明が必要である。、累計妊娠をみると 6 周期を越えて妊娠する症例は限られており ART や腹腔鏡手術など、より負担の大きい選択肢を考慮し説明する必要がある。LOD は PCOS に特異的な治療法として多胎妊娠、OHSS がなく自然妊娠が期待できるため、今後積極的に実施すべき治療法である。アンドロゲン値が高く、肥満傾向にある症例ほど FSH 療法が無効であったことから、これらの症例では排卵誘発に加えて減量指導などが重要である。

PCOS 症例の 8 割は ART 実施前に妊娠すると考えられるが、長期間妊娠しない症例や高齢で治療開始した症例などで、治療継続を断念した症例があり、社会的リスクが高い (多忙な有職者、比較的高齢者) に対しては、より早くから ART の選択肢を提示することが重要と考えられる。PCOS は卵質低下から ART 成績が

良好でないとの報告もあるが、今回の検討では非 PCOS 症例と概ね差が無い成績を確認できた。非 ART では発生が見られなかった OHSS であるが、ART においては依然発生があり、非 PCOS 症例よりリスクが高いことから、刺激方法の個別化が今後も必要と考えられた。LOD 実施後の PCOS 例 ART 成績検討で、LH の低下、FSH の上昇を認め、内分泌的に PCOS の状態から離脱していることが確認できた。採卵数が少なく、OHSS のリスクは低く安全に ART を実施することが可能な点が LOD 術後の特徴であるが、FSH の上昇、使用ゴナドトロピン量の増加が顕著で、LOD 手術による卵巣予備能の低下が明らかな症例が存在し、LOD においては必要以上に卵巣予備能を低下させないよう慎重に手術を実施する必要があると考えられた。

#### E. 結論

PCOS の診断として本研究で用いた診断基準は以下の通りである。

- 1, 月経異常：希発月経、第 1 度無月経、無排卵周期症
- 2, 卵巣所見：左右各々に小卵胞 10 個以上をみとめること。
- 3, 内分泌所見：LH 値、または男性ホルモン（テストステロン、遊離テストステロン、アンドロステンジオン）

PCOS 症例にはまずクロミフェン療法を行い、無効症例はメトホルミン＋クロミフェン併用療法あるいは低用量 FSH 療法を行うことが推奨された。治療中の妊娠は 6 回目までに限られるので、そのような症例には腹腔鏡、ART などの治療を考慮する。高齢、多忙な有職者など社会的リスクの高い症例は積極的に ART の選択肢を示すが、OHSS のリスクが高いため、刺激方法の個別化が必要である。LOD は OHSS リスクが軽減する一方、卵巣予備能の低下が懸念され、高齢、卵巣予備能が低い症例に

LOD を行うことは慎重な判断が必要とされる。

ライフスタイルの変化や社会的要因に基づき個別化して治療に当たる有用な知見を得られたことは、今後の PCOS 治療にとり重要と考えられる。

F. 研究発表  
投稿中

G. 知的財産権  
特になし

表1 個別調査(症例調査)の患者背景

	PCOS 1028例	PCOS疑い 771例	その他 470例
平均年齢(歳) (平均±標準偏差)	28.1 ± 4.9	28.4 ± 5.3	28.4 ± 6.9
平均身長(cm) (平均±標準偏差)	158.1 ± 5.2	158.0 ± 5.4	157.9 ± 5.6
BMI(平均±SE) ≥ 25	23.1 ± 6.0 <sup>a</sup> 肥満例 25.9% <sup>a</sup> (266/1028)	23.3 ± 6.1 <sup>a</sup> 肥満例 24.5% <sup>a</sup> (189/771)	21.9 ± 5.8 肥満例 17.9% (84/470)
高血圧	無 89.2%(917/1028) 有 3.0% (31/1028) 不明 6.2% (64/1028)	無 86.8%(669/771) 有 3.5% (27/771) 不明 6.5% (50/771)	無 90.0%(423/470) 有 2.1% (10/470) 不明 6.0% (28/470)
糖尿病	無 88.7% (912/1028) 有 3.7% (38/1028) 不明 5.6% (58/1028)	無 81.2% (626/771) 有 3.4% (26/771) 不明 11.8% (90/771)	無 87.2% (410/470) 有 2.6% (12/470) 不明 8.3% (39/470)
高脂血症	無 78.4% (806/1028) 有 4.0% (41/1028) 不明 15.6% (160/1028)	無 65.8% (507/771) 有 3.6% (28/771) 不明 26.7% (206/771)	無 76.2% (358/470) 有 3.6% (17/470) 不明 18.3% (86/470)

<sup>a</sup>: P<0.01 vs. その他の症例

表2 初診時の主訴および症状

	PCOS	PCOS疑い	その他
月経不順	99.9% <sup>a,c</sup> (1027/1028)	96.4% <sup>b</sup> (743/771)	98.7% (463/469)
多毛	10.5% <sup>a</sup> (108/1028)	8.2% <sup>a</sup> (63/771)	3.4% (16/469)
多毛以外の男性化徴候	2.5% (26/1028)	2.3% (18/771)	1.3% (6/469)
にきび	73.0% (19/26)	77.8% (14/18)	66.7% (4/6)
低声音	7.7% (2/26)	5.6% (1/18)	0.0% (0/6)
陰核肥大	7.7% (2/26)	27.8% (5/18)	16.7% (1/6)
肥満	14.3% <sup>b,d</sup> (147/1028)	10.5% (81/771)	10.0% (47/469)
やせ	1.7% <sup>a,d</sup> (17/1028)	3.2% (25/771)	4.1% (19/469)
乳汁漏出	0.5% (5/1028)	0.4% (3/771)	0.4% (2/469)
その他	3.7% (38/1028)	4.8% (37/771)	5.8% (27/469)

a :  $P < 0.01$  vs. その他の症例

b :  $P < 0.05$  vs. その他の症例

c :  $P < 0.01$  vs. PCOS疑い

d :  $P < 0.05$  vs. PCOS疑い

表3 月経異常の程度

	PCOS	PCOS疑い	その他
月経異常を呈する症例の割合	99.9% (1027/1028)	96.4% (743/771)	98.5% (463/470)
無排卵周期症	16.8 % <sup>b,c</sup> (173/1027)	24.5 % (182/743)	21.6 % (100/463)
希発月経	44.0 % <sup>a</sup> (452/1027)	42.7 % <sup>b</sup> (317/743)	30.9 % (143/463)
第1度無月経	34.9 % <sup>a,c</sup> (358/1027)	25.6 % (190/743)	22.7 % (105/463)
第2度無月経	4.9 % <sup>c</sup> (50/1027) 重複選択:6例	6.1 % <sup>c</sup> (45/743) 重複選択:3例	24.8 % (115/463)

(一部複数選択あり)

<sup>a</sup> :  $P < 0.01$  vs. その他の症例

<sup>b</sup> :  $P < 0.05$  vs. その他の症例

<sup>c</sup> :  $P < 0.01$  vs. PCOS疑い

表4 卵巣所見

	PCOS		PCOS疑い		その他	
卵巣腫大	無	64.6% <sup>a,b</sup> (649/1005)	無	70.7% <sup>a</sup> (526/744)	無	83.9%(380/453)
	有	21.9% <sup>a,b</sup> (220/1005)	有	15.7% <sup>a</sup> (117/744)	有	2.9%(13/453)
	不明	13.5%(136/1005)	不明	13.6%(101/744)	不明	13.2%(60/453)
多嚢胞パターン	無	2.2% <sup>a,b</sup> (22/1008)	無	12.6% <sup>a</sup> (91/721)	無	83.2%(346/416)
	有	97.8% <sup>a,b</sup> (986/1008)	有	87.4% <sup>a</sup> (630/721)	有	16.8%(70/416)

<sup>a</sup> :  $P < 0.01$  vs. その他の症例

<sup>b</sup> :  $P < 0.01$  vs. PCOS疑い

表5 各種血中ホルモンの異常高値率(%)

	PCOS	PCOS疑い	その他
LH	68.2 <sup>a,b</sup> (546/801)	37.7 <sup>a</sup> (209/554)	25.0 (80/320)
LH/FSH比	74.6 <sup>a,b</sup> (592/794)	36.2 <sup>a</sup> (192/531)	17.5 (54/308)
PRL	3.9 (28/709)	4.5 (21/464)	6.7 (19/284)
テストステロン	14.3 <sup>a</sup> (105/734)	15.6 <sup>a</sup> (90/578)	6.3 (18/285)
遊離テストステロン	65.3 (94/144)	64.8 (70/108)	70.7 (29/41)
アンドロステンジオン	67.5 <sup>a,c</sup> (102/151)	53.2 (42/79)	34.3 (12/35)
DHEA	16.7 (3/18)	16.7 (1/6)	100.0 (2/2)
DHEA-S	13.1 (41/312)	11.2 (21/188)	11.9 (8/67)
エストロン	44.4 <sup>c</sup> (12/27)	13.2 (5/38)	0 (0/1)
エストロン/エストラジ オール比	100.0 <sup>b</sup> (26/26)	61.1(22/36)	

<sup>a</sup> :  $P < 0.01$  vs. その他の症例

<sup>b</sup> :  $P < 0.01$  vs. PCOS疑い

<sup>c</sup> :  $P < 0.05$  vs. PCOS疑い



表6 LH,T,Aの測定値がすべて揃っている症例における  
LHおよび男性ホルモンの測定値高値の関係

PCOS		LH		計		
		正常	異常			
T 正常, A 正常		26	15	41		
TまたはA異常	T 正常, A 異常	50	43	43	33	76
	T 異常, A 異常		7		10	17
	T 異常, A 正常		0		0	0
計		76	58	134		

PCOS疑い		LH		計		
		正常	異常			
T 正常, A 正常		25	6	31		
TまたはA異常	T 正常, A 異常	28	22	10	5	27
	T 異常, A 異常		6		5	11
	T 異常, A 正常		0		0	0
計		53	16	69		

その他		LH		計		
		正常	異常			
T 正常, A 正常		17	4	21		
TまたはA異常	T 正常, A 異常	5	4	2	2	6
	T 異常, A 異常		1		0	1
	T 異常, A 正常		0		0	0
計		22	6	28		

T: テストステロン A: アンドロステンジオン

表7 LH高値と男性ホルモン高値の関係

	PCOS	PCOS疑い	その他
<u>LH、テストステロン、アンドロステンジオンの測定値がある症例</u>	134例	69例	28例
LH高値 LHまたは男性ホルモン高値 男性ホルモン高値 (男性ホルモン高値はテストステロン、アンドロステンジオンの少なくとも1つ。)	43.3% (58/134) 80.6% (108/134) 69.4% (93/134)	23.2% (16/69) 63.8% (44/69) 55.1% (38/69)	21.4% (6/28) 39.3% (11/28) 25.0% (7/28)
<u>LHとテストステロンの測定値がある症例</u>	713例	488例	264例
LH高値 LHまたはテストステロン高値 テストステロン高値	67.7% (483/713) 71.7% (511/713) 14.3% (102/713)	36.1% (176/488) 43.9% (214/488) 12.7% (62/488)	26.5% (70/264) 29.5% (78/264) 5.7% (15/264)
<u>LHとアンドロステンジオンの測定値がある症例</u>	145例	74例	34例
LH高値 LHまたはアンドロステンジオン高値 アンドロステンジオン高値	44.5% (66/145) 82.1% (119/145) 68.3% (99/145)	23.0% (17/74) 60.8% (45/74) 51.4% (38/74)	20.6% (7/34) 44.1% (15/34) 32.4% (11/34)
<u>LHと遊離テストステロンの測定値がある症例</u>	123例	88例	38例
LH高値 LHまたは遊離テストステロン高値 遊離テストステロン高値	62.6% (77/123) 90.2% (111/123) 63.4% (78/123)	36.4% (32/88) 76.1% (67/88) 61.4% (54/88)	34.2% (13/38) 81.6% (31/38) 68.4% (26/38)

表8 使用された測定系の一覧

LH	アーキテクトLH	34.12% (577/1691)	テストステロン	エクルーシス試薬テストステロン	44.89% (723/1611)	
	エクルーシス試薬LH	16.26% (275/1691)		アーキテクトテストステロン	19.80% (319/1611)	
	バイダスアッセイキットLH	12.18% (206/1691)		DPCトータルテストステロンキット	16.39% (264/1611)	
	Eテスト「TOSOH」II (LH II)	11.77% (199/1691)		ケミルミACS-テストステロン	10.43% (168/1611)	
	DPCイムライズ LHⅢ	9.70% (164/1691)		バイダスアッセイキットテストステロン	7.57% (122/1611)	
	スパック-S LHキット	6.68% (113/1691)		Access2試薬テストステロン	0.87% (14/1611)	
	ケミルミACS-LH II	5.56% (94/1691)		Eテスト「TOSOH」II (テストステロン)	0.06% (1/1611)	
	Access2試薬LH	2.07% (35/1691)		遊離テストステロン	DPCフリーテストステロンキット	100% (323/323)
	ルミパルスLH	1.60% (27/1691)		アンドロステンジオン	DPCアンドロステンジオン	100% (275/275)
エバテストLH	0.06% (1/1691)	DHEA	BML自家調整試薬	85.71% (24/28)		
FSH	アーキテクトFSH	33.17% (551/1661)		DPC・DHEA(販売中止)	14.29% (4/28)	
	エクルーシス試薬FSH	16.38% (272/1661)	DHEA-S	DPC・DHEA-S	99.84% (616/617)	
	バイダスアッセイキットFSH	12.40% (206/1661)		Access DHEA-S	0.16% (1/617)	
	Eテスト「TOSOH」II (FSH)	11.86% (197/1661)	エストロン	BML自家調整試薬	2.99% (2/67)	
	DPCイムライズ FSHⅣ	9.93% (165/1661)		帝国臓器製薬自家調整試薬	65.67% (44/67)	
	スパック-S FSHキット	6.80% (113/1661)		シオノギ 自家調整試薬	31.34% (21/67)	
	ケミルミACS- FSH	5.66% (94/1661)		(3つとも同じ)		
	Access2試薬FSH	2.11% (35/1661)	エストラジオール	エクルーシス試薬 E2	37.65% (486/1291)	
	ルミパルスFSH	1.63% (27/1661)		DPCイムライズ エストラジオール II	23.47% (303/1291)	
エバテストFSH	0.06% (1/1661)		アーキテクトエストラジオール	12.55% (162/1291)		
PRL	アーキテクトプロラクチン	36.85% (541/1468)		バイダスアッセイキットエストラジオール II	10.69% (138/1291)	
	エクルーシス試薬 プロラクチン	20.03% (294/1468)		Eテスト「TOSOH」II (E2)	9.22% (119/1291)	
	バイダスアッセイキットプロラクチン	11.17% (164/1468)		ケミルミACS-エストラジオール6	5.81% (75/1291)	
	DPCイムライズ プロラクチン	8.45% (124/1468)		Access2試薬エストラジオール	0.31% (4/1291)	
	ケミルミACS-プロラクチン	6.95% (102/1468)		エバテストE2	0.31% (4/1291)	
	スパック-Sプロラクチンキット	6.47% (95/1468)				
	Eテスト「TOSOH」II (PRL)	5.31% (78/1468)				
	Access2試薬プロラクチン	2.86% (42/1468)				
	ルミパルスPRL	1.84% (27/1468)				
エバテストPRL	0.07% (1/1468)					

表9 多嚢胞性卵巣症候群の診断基準

---

以下の1～3の全てを満たす場合を多嚢胞性卵巣症候群とする

1. 月経異常

2. 多嚢胞卵巣

3. 血中男性ホルモン高値

または

LH基礎値高値かつFSH基礎値正常

---

注1) 月経異常は、無月経、希発月経、無排卵周期症のいずれかとする。

注2) 多嚢胞卵巣は、超音波断層検査で両側卵巣に多数の小卵胞がみられ、少なくとも一方の卵巣で2-9 mmの小卵胞が10個以上存在するものとする。

注3) 内分泌検査は、排卵誘発薬や女性ホルモン薬を投与していない時期に、1 cm以上の卵胞が存在しないことを確認の上で行う。また、月経または消退出血から10日目までの時期は高LHの検出率が低いことに留意する。

注4) 男性ホルモン高値は、テストステロン、遊離テストステロンまたはアンドロステンジオンのいずれかを用い、各測定系の正常範囲上限を超えるものとする。

注5) LH高値の判定は、スパック-Sによる測定の場合は $LH \geq 7$  mIU/ml (正常女性の平均値 + 1 × 標準偏差) かつ  $LH \geq FSH$  とし、肥満例 ( $BMI \geq 25$ ) では  $LH \geq FSH$  のみでも可とする。

その他の測定系による場合は、スパック-Sとの相関を考慮して判定する。

注6) クッシング症候群、副腎酵素異常、体重減少性無月経の回復期など、本症候群と類似の病態を示すものを除外する。