

= 症例報告 =

加齢女性生殖機能低下に対するdehydro-epiandrosterone併用による不妊治療 Combined therapy for reproductive dysfunction of aged female with dehydro-epiandrosterone

大塩 達弥^{1,2}

Tatsuya OSHIO^{1,2}

¹Tokyo Bay Ladies Clinic, 〒279-0002 千葉県浦安市.

²日本大学 医学部 産婦人科, 〒173-8610 東京都板橋区.

t.os.fish@jcom.home.ne.jp

要旨

ヒトにおける卵巣機能の加齢変化は個体差が極めて大きく、卵巣機能および予備能評価法が求められる。抗ミュラー管ホルモン(AMH)値は発育卵胞数と相関すると考えられ、卵巣予備能の指標として注目されている。筆者は卵巣機能を賦活目的としてdehydro-epiandrosterone (DHEA)を投与下に体外受精-胚移植(IVF-ET)などのassisted reproductive technologies (ART)を施行し、その成績と下垂体機能、卵巣機能、AMH値を比較した。Premature ovarian failure (POF)と診断された53症例には過排卵誘発施行前にDHEAを3ヶ月投与し、血清のFSH値(10 mIU/ml以下)かつtestosterone (T)値(20 ng/ml以上)になったことを確認した後にDHEA、recombinant FSH (r-FSH)併用療法を施行した。DHEA投与によりFSH値は49.5から28.2 IU/mlに、T値は14.7から62.6 ng/mlに変化した。FSH値が10 mIU/ml以下かつT値が20 ng/ml以上に改善し、血清E₂値上昇を認めた症例が43例(改善率83%)に達し、17症例(妊娠率32%)でIVF-ETによる妊娠が成立した。過排卵誘発を実施した157例(27-49歳)を年齢別に4群に分類し、血中AMHを測定した。AMH値は35歳未満では23.0 ± 17.5 pmol/lであったが、年齢とともに減少し、41歳以上では7.2 ± 5.3 pmol/lへと顕著に減少し、加齢変化を確認できた。採卵数は20 pmol/l未満の2群は20 pmol/l以上の群に比して有意に低下した。これまで卵胞成熟はゴナドトロピン、ステロイド等の血中濃度を指標として評価されてきた。ゴナドトロピンは卵巣血流による組織移行を介して卵胞成熟に関与する。hCG投与直後、採卵時の血中および卵胞液中のhCG濃度から組織移行率を観察した結果、hCG卵胞液内移行率は加齢にともない有意に低下し、同時に採卵数も減少した。その原因として排卵直前の血管新生低下が推察された。非分割卵を後方視的に解析すると、非分割卵の80%以上が精子不侵入で占められ、これが卵非分割の最大原因であることが示唆された。さらにその率は加齢とともに増加する傾向を認めた。成熟卵は第二減数分裂中期で静止しているが、観察した非分割卵には様々な異常が認められ、紡錘体形態異常と染色体不整列の両者を合わせもったものが最も高頻度であった。35歳以上の群で紡錘体系異常の発生率が増加したが、核系異常の頻度は年齢による変化は少ない傾向を認めた。

キーワード: 加齢, 卵巣, 卵, dehydro-epiandrosterone (DHEA), hCG, 組織移行, 非分割卵

序論

ヒト加齢に伴うゴナドトロピン感受性低下は卵巣機能低下をもたらす。そのため加齢婦人は過排卵誘発に抵抗性であることが多く、成熟卵を得られない症例をしば

しば経験する。血清のFSH 10 mIU/ml以上、E₂ 25 pg/ml未満であり、human menopausal gonadotropin (hMG)製剤による排卵誘発に抵抗性を示す症例は子宮内膜非薄化、成熟卵胞数減少および最大卵胞径の

投稿日: 2010年11月9日

掲載決定日: 2011年6月15日

ウェブサイト事前公開日: 2011年6月16日

増加遅延を認める場合が多く、卵の質的低下は受精率、妊娠率の低下を招く。その頻度は加齢に伴い増加し、治療は困難を極めることが多い。

一方、卵巣機能の加齢変化は個々の症例間で変動幅が極めて大きいこともよく知られており、卵巣機能およびその予備能を多面的に評価する方法が求められる。抗ミュラー管ホルモン(Anti-mullerian hormone: AMH)は発育卵胞、前胞状卵胞から分泌され、その血中濃度は発育卵胞数と相関すると考えられ[3]、加齢に従い卵巣機能が低下するとFSHは上昇し、発育卵胞数が減少するとAMHは低下する。AMHは、性周期の影響を受けにくいいため、卵巣予備能の指標となると考えられている。

本論文では、卵巣機能を賦活させると考えられる dehydro-epiandrosterone (DHEA)[2]を投与した場合、下垂体機能、卵巣機能、AMH値で示される卵巣機能予備能などのパラメーターの変化や改善の有無、また体外受精-胚移植(IVF-ET)によるARTの成績について検討した。さらに非分割に終わった卵の状態を後方視的に観察した。

対象(材料)と方法

検討1. FSH高値であり排卵誘発に抵抗性を示す症例に対するdehydro-epiandrosterone (DHEA)併用した場合の不妊治療

Day 3 (月経初日をDay 0とする)の血清FSH 10 mIU/ml以上、E₂ 25 pg/ml未満である、hMG製剤による過排卵誘発に抵抗性であり、子宮内膜の非薄化、卵胞数の減少、最大卵胞径の増加遅延を認め、血清総testosterone (T) が20 ng/ml以下、の条件を満たす53症例(34.5 ± 3.6歳)をDiminished Ovarian Reserve (DOR)と定義して対象とした。さらにこれらの不妊治療経過を検討した

検討2. hCG組織移行率を指標とした卵巣機能の評価

これまで卵胞成熟はゴナドトロピン、ステロイド等の血中濃度を指標として評価されてきた。ゴナドトロピンは卵巣血流による組織移行を介して卵胞成熟に深く関与し、hCG 投与により顕著に卵巣血流が増加することが報告されている[6]。hCG は採卵決定後に一定量をone shot 静注し、一定時間後に採卵が行われる。本研究は外因性hCG 組織移行の薬動学的解析が、卵巣機能評価に有用であるかを検討した。投与直後、採卵時の血中および卵胞液中のhCG 濃度は常法に従い測定した。体重の1/13を患者血液量と仮定し、採卵時の卵胞液中/血中hCG濃度×100を組織移行率と定義し、解析を行った。過排卵誘発を施行した66症例を対象とした。

検討3. AMHを指標とした卵巣予備能の評価

過排卵誘発を実施し、AMHを測定した症例(27-49歳)を年齢別に4群(34歳以下、35-37歳、38-40歳、41歳以上)に分類し、比較した。

検討4. IVFにおける非分割卵の後方視的観察

Conventional-IVFを試みたが非分割に終わった症例のうち、廃棄胚の観察に同意が得られた38症例(年齢25-44歳)から提供された134卵を対象とした。

POFと診断された症例には過排卵誘発施行前に性ステロイド前駆体であるDHEAを3ヶ月間投与(50 mg/日)した[4]。その後、血清FSH 10 mIU/ml、Tが20 ng/ml以上になったことを確認し、DHEA、r-FSHまたはhMG併用療法を施行し、最大卵胞径が18 mm以上に達するまで投与した。卵胞数、最大卵胞(主席卵胞)径の大きさ、子宮内膜厚、FSH、E₂およびT値を測定した。さらに、加齢とAMH値との関連、AMH値と内分泌所見の関連さらにART成績との関連を観察した。AMHはEIA AMH/MIS KIT (IMMUNOTECH, Marseille, France)を用いて測定した。

媒精2-3日後の非分割卵を2%パラホルムアルデヒド固定し、抗 α -tubulin 抗体を用いて免疫染色し、propidium iodideを用いて核染色した。観察には共焦点レーザー顕微鏡(LSM510 META, Carl Zeiss Microimaging, Jena, Germany)を用いて核、紡錘体を撮影し、写真上で以下に示す基準に従って解析した。卵の異常は、紡錘体および核由来に大別した。さらに紡錘体は1) 形態異常(染色体は整列しているが、紡錘糸に乱れがある)、2) 多極紡錘体(樽の先端の部分に位置する紡錘体極は通常2ヶ所であるが、3ヶ所存在するもの、この場合は染色体も不整列)、3) Premature Chromosome Condensation (PCC: 卵由来の紡錘体の他に、精子由来の紡錘体様核が観察される)に細分類した。核は1) 染色体不整列(紡錘糸は樽の先端をすばめたきれいな形状をしているが、染色体が整列していない)、2) 核断片化(紡錘糸は観察されず、DNAも染色体の形状をとらず、卵全体に散ってバラバラである)、3) 染色体凝集(紡錘糸は観察されず染色体が一ヶ所に凝集している)、4) 前核停止(DNAが前核様で停止しており、実体顕微鏡下では明瞭な前核が観察されない)に細分類した。精子については卵細胞質への精子侵入について観察した。

結果

検討1. FSH高値であり排卵誘発に抵抗性を示す症例に対するDHEA併用の不妊治療

高FSH、低E₂、低T値を認める症例にDHEAを併用投与した。DHEA投与前後における内分泌値を表1に、卵胞数、最大卵胞径、子宮内膜厚を表2に示す。症例全

表1. ヒト女性不妊治療患者に対するDHEA投与による血中ホルモン(FSH, E₂, T)値の変化

	投与前	投与後
FSH (mIU/ml)	49.5 ± 11.8 ^a	28.2 ± 2.4 ^b
E ₂ (pg/ml)	58.1 ± 19.8 ^a	71.6 ± 43.0 ^b
T (ng/ml)	14.7 ± 12.5 ^a	62.6 ± 43.5 ^b

症例数=53。値は、平均 ± 標準偏差。^{a, b}同行異符号間に有意差あり(P < 0.05)。

表2. ヒト女性不妊治療患者に対するDHEA投与による卵胞数、最大卵胞径および子宮内膜厚の変化

	投与前	投与後
卵胞数	1.6 ± 0.97 ^a	3.4 ± 1.2 ^b
最大卵胞径(mm)	12.6 ± 1.90 ^a	18.8 ± 1.68 ^b
子宮内膜厚(mm)	6.8 ± 1.3 ^a	10.2 ± 1.3 ^b

症例数=53。値は、平均 ± 標準偏差。^{a, b}同行異符号間に有意差あり(P < 0.05)。

表3. ヒト女性年齢別の採卵時におけるhCG投与前後の残存率および卵胞内移行率と採卵数

年齢	症例数	体重 (kg)	血中hCG (mIU/ml)		残存率 (%) [#]	卵胞液中hCG (mIU/ml)	hCG卵胞内移行率 (%)	採卵数(個)
			hCG投与時	採卵時				
34以下	16	49.2 ± 6.6	2686.4 ± 344.5	241.2 ± 62.8	9.1 ± 2.4	172.3 ± 59.7	72.4 ± 18.7 ^a	5.6 ± 3.7 ^a
35-37	21	54.1 ± 8.0	2446.6 ± 313.8	172.2 ± 89.4	6.9 ± 3.0	125.1 ± 76.3	71.0 ± 19.9 ^a	3.6 ± 2.6 ^b
38-40	12	53.3 ± 10.2	2513.2 ± 448.9	177.0 ± 80.4	7.1 ± 3.0	116.7 ± 75.8	60.0 ± 24.2 ^{ab}	2.2 ± 2.3 ^b
41以上	17	53.6 ± 7.8	2475.0 ± 365.4	214.0 ± 108.9	8.6 ± 3.9	120.8 ± 88.5	53.5 ± 20.3 ^b	1.9 ± 2.8 ^b

値は、平均 ± 標準偏差。[#]採卵時の血中hCG/hCG投与時の血中hCG量×100。^{a, b}同行列異符号間に有意差あり(P < 0.05)。

表4. ヒト女性加齢にともなう抗ミュラー管ホルモン(AMH)およびFSH値

年齢	症例数	AMH (pmol/l)	FSH (mIU/ml)
34以下	20	23.0 ± 17.5 ^a	10.2 ± 5.7
35-37	15	20.3 ± 13.6 ^{ab}	9.9 ± 3.4
38-40	23	13.1 ± 11.9 ^{bc}	18.2 ± 28.5
41以上	18	7.2 ± 5.3 ^c	26.0 ± 29.6

症例数=76。値は、平均 ± 標準偏差。^{a, b, c}同列異符号間に有意差あり(P < 0.05)。

体におけるFSH、T平均値の変化は49.5から28.2 IU/ml、14.7から62.6 ng/mlであった。FSHが10 mIU/ml以下かつTが20 ng/ml以上に改善された症例が43例に達し、その改善率は83%であった。hMG反応性が改善されて卵胞数、最大卵胞径、子宮内膜厚が有意に増加した。53症例中17症例にIVF-ETによる妊娠が成立した。その妊娠率は32%であった。DHEA補充療法がhMG感受性を改善し、卵胞発育ひいては卵の質向上に関与する可能性が示唆された。

検討2. hCG組織移行率を指標とした卵巣機能の評価

表3に示すように、投与されたhCGの血中濃度は採卵までに減少し、その残存率は年齢別群間で有意な差を認めなかった。一方、卵胞液中に移行したhCGの濃度を血中濃度で除したhCG卵胞液内移行率は34歳以下群から年齢が上昇するにつれ減少し、37歳以下の2群に比して41歳以上群で有意に低下(P < 0.05)した。同様に採卵数も減少し、34歳以下群に比してそれ以上の3群は有意な低下(P < 0.05)を認めた。一方、取得した卵の受精率、分割率に年齢は影響しなかった。

検討3. AMHを指標とした卵巣予備能の評価

AMH値は34歳以下では23.0 ± 17.5 pmol/lであったが、年齢とともに減少し、41歳以上では7.2 ± 5.3

pmol/lへと顕著に減少し、加齢変化を確認できた(表4)。表5にまとめたようにIVF施行例をAMH値20以上、10以上20未満、0以上10未満(単位: pmol/l)の3群に分類すると、0-10 pmol/ml群の年齢は他の2群に比して有意に高かった。採卵率は10 pmol/l未満の群において、有意に低かった。また採卵数は20 pmol/l未満の2群は20 pmol/l以上の群に比して有意に低下した。一方、比較した3群間でAMH値は得られた卵の受精率、分割率等に影響しなかった。AMH値は、DHEA投与前後で変化しなかった。

検討4. IVFにおける非分割卵の後方視的観察

女性患者の年齢分布を34歳以下、35-37歳、38歳以上の3群に分けて比較した。まず卵細胞質内への精子侵入を観察すると全ての群で非分割卵の80%以上が精子不侵入で占められ、これが卵非分割の最大原因であることが示唆された(図1)。さらにその率は、加齢とともに増加する傾向を認めた。

ヒト成熟卵は第二減数分裂中期で静止しているが、IVF後の非分割卵には様々な異常が認められ、紡錘体形態異常(図2)と染色体不整列の両者を組み合わせたものが最も高頻度であった。また、35歳以上の群で紡錘体系異常の発生率が増加したが、核の異常の頻度においては年齢による変化は少ない傾向を認めた。

表5. ヒト女性年齢別の採卵時における抗ミュラー管ホルモン(AMH)値および採卵率・体外受精成績

AMH (pmol/l)	年齢	採卵率 [#]	採卵数	受精率 (%)	分割率 (%)
20以上	35.5 ± 2.6 ^a	87% (32/37)	3.8 ± 3.7 ^a	64.0 ± 36.8	56.8 ± 39.4
10以上20未満	36.0 ± 4.2 ^a	83% (30/36)	2.1 ± 2.4 ^b	65.1 ± 42.1	64.8 ± 42.4
0以上10未満	38.3 ± 5.2 ^b	55% (46/84)	1.2 ± 2.0 ^b	55.1 ± 47.3	54.7 ± 47.0

値は、平均 ± 標準偏差。[#]1個以上の卵が採取できたIVF周期/全IVF周期。^{a,b}同列異符号間で有意差あり(P < 0.05)。

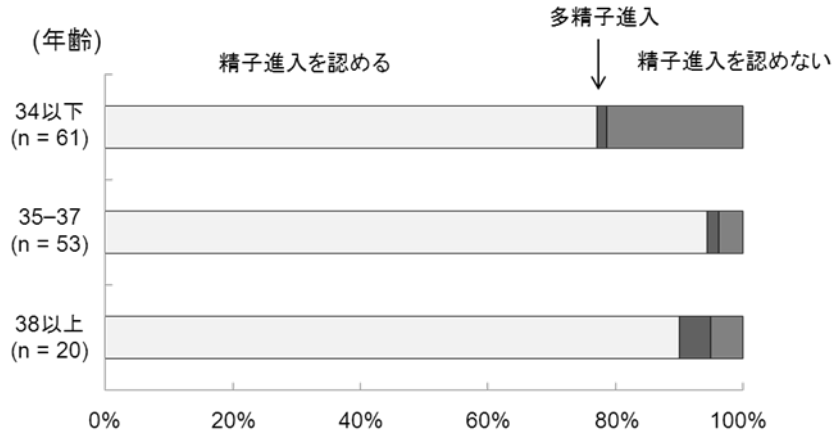
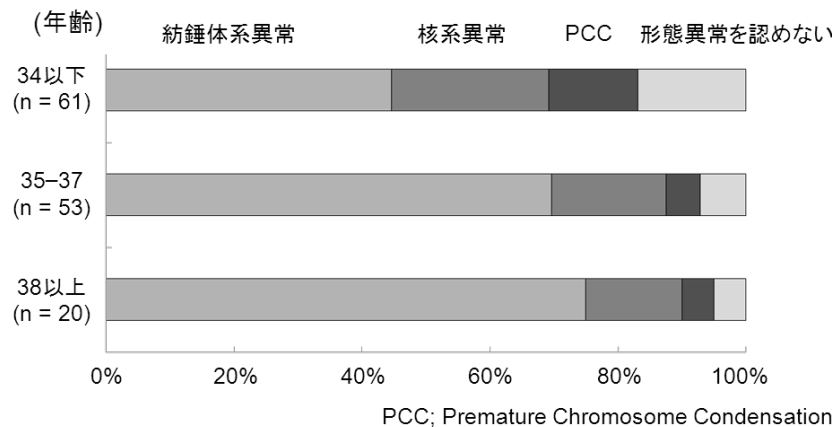


図1. ヒト女性年齢別の採卵・体外受精における非分割卵の精子侵入率



PCC; Premature Chromosome Condensation

図2. ヒト女性年齢別の採卵・体外受精における非分割卵の核の状態

考察

DHEAは副腎皮質でコレステロールから生成されるステロイドホルモンであり、性腺組織で容易にテストステロンおよびエストロゲンに変換される。DHEAは成年初期に産生量がピークに達し、加齢に伴い産生量が減少するホルモンとして知られている。卵巣機能不全の発症にDHEAがどのように関与するのか、また、卵巣機能不全にDHEA補充療法がどのように作用しているかは、不明な点が多い。Barad & Gleicherは高齢者に対する排卵誘発にDHEAを併用投与し、卵巣発育促進を認め、妊娠例が得られたと報告した[1]。そしてDHEA補充療法の作用機序は、卵巣のhMG感受性を改善し、卵巣発育ひいては卵の質向上に寄与したと考察している。

AMHは発育卵胞、前胞状卵胞から分泌され、その

血中濃度は発育卵胞数と相関すると考えられている。加齢に伴い卵巣機能が低下するとFSHは上昇し、発育卵胞数が減少することによりAMHは低下する。AMHは性周期の影響を受けにくいいため、卵巣予備能の良い指標となると考えられている[5]。

本論文ではPOFと診断された症例にDHEAを先行投与し、83%にホルモン値の改善を認め、これらの症例に引き続いて過排卵誘発を施行した結果、妊娠例を得た。これらの結果は、上述したBarad & Gleicher [1]の考察を支持する。

また、本論文では卵巣機能の指標としてAMH値を観察し、表4に示すように加齢に伴う低下を認めた。さらに表5にまとめたように、AMH値は採卵率、取得卵数に影響することを認めた。これらの結果は、性周期により値が大きく変動するFSHに比して安定的な卵巣機能評価に寄与する可能性が考えられ、今後さらに症例を集積

してAMH値における限界低値の設定が求められる。一方、AMH値は取得卵の受精率、分割率には影響しなかった。

hCGのenzyme immunoassayは内因性の下垂体性ホルモンと免疫学的交叉性が極めて低く(hCG:100、LH:0.7、FSH:0.06)、ほぼhCGの特異的測定が可能である。One shot静注されたhCGはタンパク質性ホルモンの体内動態追跡の指標として適している。本論文で示された結果は、ホルモン血中濃度と標的細胞が存在する卵胞液中に濃度は必ずしも比例せず、加齢とともにゴナドトロピンの卵胞内移行率が低下している可能性が示唆され、その原因として排卵直前の血管新生低下が推察されるが、今後組織学的観察を含めた詳細な検討が求められる。

本論文で述べた、1. DHEAによる血中ホルモン値の正常化、2. AMHを指標とする卵巢予備能の評価、3. hCGの血中動態および卵胞液中への移行率測定は、多面的解析により加齢に伴う卵巢機能低下を把握する試みである。研究4は結果として未分割に終わった卵に関する後方視的解析を行うことにより、研究1、2、3で解析した卵巢がどのような卵を形成したかに関する情報を提供する。卵が未分割に終わったことは、まず精子が侵入していたか否か、精子侵入卵において未分割の原因が精子側にあるのか、卵側にあるのか、両者であるか詳細に解析することにより、形成された卵の質的評価、さらには次回治療方針決定に重要な情報を提供する。図2に示すように精子未侵入が80%を占めたことは、同時に精子機能に関する多面的な解析が不可欠であるこ

とも示唆している。当院を受診する患者の年齢層は高く、38歳以上が約60%を占めている。一般に加齢婦人の不妊治療は躊躇されがちである。当院が行ってきた試みは、多面的な評価による卵巢機能および卵質の把握、およびそれらの情報に基づいた適切な卵巢機能賦活を行うことにより、加齢かつDOR症例においても妊娠の可能性があることが示された。

参考文献

1. **Barad D, Gleicher N.** Increased oocyte production after treatment with dehydroepiandrosterone. *Fertil. Steril.* 2005; 84: 756.
2. **Casson PR, Lindsay MS, Pisarska MD, Carson SA, Buster JE.** Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. *Hum. Reprod.* 2000; 15: 2129–2132.
3. **Fanchin R, Schonauer LM, Righini C, Guibourdenche J, Frydman R, Taieb J.** Serum anti-Müllerian hormone is more strongly related to ovarian follicular status than serum inhibin B, estradiol, FSH and LH on day 3. *Hum. Reprod.* 2003; 18: 323–327.
4. **大塩 達弥.** FSH高値であり、排卵誘発に抵抗性である高齢者に対するDHEA-S併用療法の有用性の検討. *産婦人科治療* 2006; 93: 339–342.
5. **Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP.** Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 2006; 131: 1–9.
6. **Vrtacnik-Bokal E, Meden-Vrtovec H.** Utero-ovarian arterial blood flow and hormonal profile in patients with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 1998; 13: 815–821.



Japan Society for Reproduction Engineering