

〔シンポジウム／子宮内膜症の腹腔鏡手術—合併症を回避するために—〕

卵巣予備能の維持

—卵巣内膜症性嚢胞の温存手術における卵胞損失について—

弘前大学大学院医学研究科産科婦人科学講座

藤井 俊策, 横田 恵, 福原 理恵, 福井 淳史, 水沼 英樹

緒 言

内膜症性嚢胞は、生殖年齢女性で最も多い卵巣病変の1つである。不妊を伴うことが多く、薬物療法は妊孕性を向上しない〔1〕ため、通常は外科的治療が行われる。外科的治療にはさまざまな方法があり、術後の再発率や妊娠率といった短期的予後からは核出術が推奨されている〔2,3〕。しかし、卵巣内膜症性嚢胞の多くは卵巣皮質が陥入してできた卵巣外嚢胞であり〔4〕、その場合の核出操作は卵巣皮質のほぼ半分を剥き取ること（stripping）になる。

卵巣予備能とは、卵巣に残っている卵胞数と同義である。卵細胞は胎生5週頃に原始生殖細胞から増殖・分化した細胞がすべてであり、胎生6月頃に約700万個に達して有糸分裂を終えた後は、一次卵母細胞に分化する過程で一定の割合でアポトーシスに陥り、出生時には約200万個、思春期発来時には30万個に減少し、性周期のたびに一定数の卵胞が閉鎖に陥る〔5〕。近年、卵巣予備能の指標として、卵巣顆粒膜細胞で産生される anti-Müllerian hormone (AMH) が注目されている。AMH は transforming growth factor (TGF)- β スーパーファミリーに属する糖蛋白で、月経周期内変動がなく〔6〕ホルモン薬の影響を受けないため、随時測定できるマーカーとして優れていると考えられている〔7〕。加齢に伴う卵胞数の減少は生理的変化であるが、子宮内膜症〔8〕や内膜症性嚢胞核出術〔9,10〕により卵巣予備能が低下すると報告されている。

今回、卵巣内膜症性嚢胞に対する温存手術が

卵巣予備能に及ぼす影響を明らかにし、卵巣予備能に対して低侵襲な治療法を確立することを目的として、温存手術前後における血清 AMH 値の変動、嚢胞組織におけるパワーソースなどによる卵胞損失、および嚢胞壁中の卵胞の有無による術前の画像検査所見や術中の腹腔内所見の違いについて検討した。

方 法

1. 卵巣内膜症性嚢胞手術前後の血清AMH値の変動

2009年4月から10月までの期間に、当科において良性卵巣疾患に対して腹腔鏡下に温存手術を施行した40歳未満の生殖年齢女性を対象とした。内膜症性嚢胞に対しては腹腔鏡下経腔的エタノール固定術（ethanol sclerotherapy; EST, $n=5$ ）、開窓焼灼術（ $n=3$ ）、または核出術（ $n=3$ ）を行い、皮様嚢腫（ $n=3$ ）に対しては核出術を施行した。血清 AMH は術前、術後1ヵ月、術後3ヵ月に採血し、EIA法（Immuno-tech, Beckman Coulter, France）で測定した。

腹腔鏡下経腔的 EST は以下のように行った。すなわち、腹腔鏡をインストールした後、エタノールのリーク対策として骨盤腔に生理食塩水約500mlを注入し、経腔超音波ガイド下に16G針で嚢胞を穿刺し、内腔を丁寧に洗浄した後、嚢胞容積の50~70%量の99.5%エタノールを注入して約10分間固定した。固定が終了してから子宮マニピュレータを装着し、腹腔鏡下に嚢胞周囲の癒着を剥離して、嚢胞を開窓して終了した。

2. 手術操作に伴う卵巣組織障害

1) パワーソースによる嚢胞壁の熱損傷

核出した内膜症性嚢胞壁 (n = 1) の一部を患者の同意を得て使用した。嚢胞壁を短冊状に細切し、それぞれの嚢胞内腔面をモノポーラ鉗子 (スプレー凝固モード, 30-W), バイポーラ鉗子 (30-W), アルゴンプラズマコアギュレータ (APC), およびラジオ波ブレード電極 (Surgi-Max™, ellman-Japan) を用いて約 1 秒間焼灼した。これらの組織の H-E 染色切片において、好酸性変性した組織の厚さを各 5 枚の切片それぞれの任意の 20 ヲ所 (計 100 ヲ所) で測定し、平均値と標準偏差を求めた。

2) EST による嚢胞壁の変性

EST 後の組織変性は、生存細胞中の nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (NADH-TR, 別名 NADH diaphorase) が NADH 存在下で基質である nitroblue tetrazolium chloride (NBTC) を還元して青色に発色させる酵素組織化学的方法で調べた。核出した内膜症性嚢胞壁 (n = 1) の一部を患者の同意を得て使用した。嚢胞壁を細切して約 2 cm 四方のシートを 5 枚作り、リングル液を浸したガーゼ上に嚢胞内面が表になるように置き、それぞれに 99.5% エタノールを十分に滴下し、固定時間をそれぞれ 1 分間, 3 分間, 5 分間, 7 分間, 10 分間とし、生理食塩水で洗浄した後、リングル液に保存した。NADH-TR 染色は既報 [11] のごとく行った。すなわち, reduced α -NADH (Sigma Aldrich, MO, USA) 溶液 (蒸留水で 2.5 mg/ml に溶解), NBTC (Sigma Aldrich, MO, USA) 溶液 (蒸留水で 2 mg/ml に溶解), phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) をストック溶液とし, NADH 溶液: NBTC 溶液: PBS: リングル液を 2: 5: 2: 1 で混和して酵素反応液を作成した。リングル液に入れた組織から凍結切片 (8 μ m 厚) を作成し, 酵素反応液と 15 分間室温で反応させた後, 蒸留水で洗浄し, 水溶性マウンティングメディアで封入して直ちに鏡検した。死滅して発色が失われた組織の厚さを各 5 枚の切片それぞれの任意の

20 ヲ所 (計 100 ヲ所) で測定し, 平均値と標準偏差を求めた。

3) 嚢胞壁における原始卵胞の分布と内膜症病変の厚さ

2002 年 1 月から 2009 年 7 月までの期間に, 当科において内膜症性嚢胞核出術を施行し核出した嚢胞壁に卵胞の存在を確認できた症例 (n = 17) を対象とした。嚢胞壁の H-E 染色切片で, すべての原始卵胞について皮質表面からの距離を測定し, 平均値と標準偏差を求めた。また, 内膜症病変については各病変の任意の 5 ヲ所を測定し, 平均値と標準偏差を求めた。

以上の組織学的検討に際しては, 顕微鏡画像解析ソフトウェア (Olympus, DP2-BSW) を用いた。

3. 嚢胞壁における卵胞の有無を判別する所見に関する後方視的検討

腹腔鏡手術の記録メディアに DVD を導入した 2002 年 1 月以降に当科で内膜症性嚢胞核出術を施行した症例のうち, 卵巣予備能が保たれ卵胞の有無を確認しやすい 35 歳未満の女性で, 術前の超音波検査, MRI 検査, 手術中の動画, 核出組織の病理検査標本を確認できた 24 例を対象とした。嚢胞組織中に卵胞が認められた症例と認められなかった症例とで, 術前の超音波検査所見と MRI 検査所見, 術中の腹腔内所見, 嚢胞の stripping に要した時間などについて後方視的に比較検討した。

成 績

1. 卵巣内膜症性嚢胞手術前後の血清 AMH 値の変動

卵巣内膜症性嚢胞に対する手術では, 術式にかかわらず術後 1 ヲ月目の血清 AMH 値が低下し, 術後 3 ヲ月目でも低値のままの症例が多かった。一方, 皮様嚢腫の核出術では術前後でほとんど変化が認められなかった (図 1)。症例数が少なかったため, 統計学的検討は行えなかった。

2. 手術操作に伴う卵巣組織障害

1) パワーソースによる嚢胞壁の熱損傷

モノポーラでは $430 \pm 122 \mu\text{m}$ (265 ~ 650 μm), バイポーラでは $424 \pm 113 \mu\text{m}$ (272 ~ 607 μm),

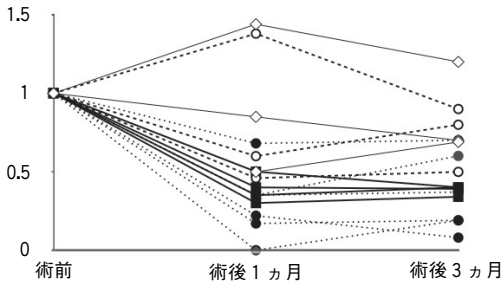


図1 腹腔鏡下温存手術前後の血清 AMH 値の変動
術前の値を1とした比を示す。■：内膜症性嚢胞核出術，●：内膜症性嚢胞エタノール固定術，○：内膜症性嚢胞開窓焼灼術，◇：皮様嚢腫核出術

APC では $246 \pm 71 \mu\text{m}$ (163~385 μm)，ラジオ波では $76 \pm 19 \mu\text{m}$ (54~109 μm) であった (図2)。

2) EST による嚢胞壁の変性

EST による変性の深達度は、1 分間の固定時間では $20 \pm 5 \mu\text{m}$ (13~26 μm)，3 分間では $44 \pm 10 \mu\text{m}$ (29~59 μm)，5 分間では $91 \pm 23 \mu\text{m}$ (70~145 μm)，7 分間では $144 \pm 51 \mu\text{m}$ (95~237 μm)，10 分間では $201 \pm 30 \mu\text{m}$ (170~238 μm) であった (図3)。

3) 嚢胞壁における原始卵胞の分布と内膜症病変の厚さ

17 症例の嚢胞壁に計270個の原始卵胞が認められ、これらの皮質表面からの距離は $338 \pm 178 \mu\text{m}$ (22~678 μm) であった。原始卵胞が多数認められた嚢胞壁の1例を図4に示した。また、内膜症病変の厚さは $82 \pm 38 \mu\text{m}$ (27~128 μm) であった。以上の組織学的検討の結果を図5にまとめた。

3. 嚢胞壁における卵胞の有無を判別する所見に関する後方視的検討 (表1)

核出した嚢胞壁に原始卵胞が存在したのは14例であり、存在しなかったのは10例であった。術前の経腔超音波検査またはMRI検査で嚢胞外に卵巣実質を同定できたのは、卵胞が存在した症例では0%、存在しなかった症例では4例(40%)であり、両者の比率に有意差を認めた ($P=0.03$)。また、経腔超音波検査で嚢胞と子宮との固着を認めたのは、卵胞が存在した症例

では4例(28.5%)、存在しなかった症例では1例(10%)であった。一方、術中所見として卵巣窩への強固な癒着を認めたのは、卵胞が存在した症例では14例(100%)、存在しなかった症例では3例(30%)であり、両者の比率に有意差を認めた ($P<0.001$)。Strippingの所要時間は、卵胞が存在した症例では 140 ± 75 秒、存在しなかった症例では 308 ± 163 秒であり、両者に有意差を認めた ($P<0.02$)。また、核出が困難だったため卵巣部分切除に変更した症例の比率は、卵胞が存在した症例では0%、存在しなかった症例では3例(30%)であった。

考 察

われわれは、腹腔鏡下経腔的ESTが卵巣に対して低侵襲であろうと考え、生殖年齢女性の内膜症性嚢胞に対する外科的治療においては第一選択の術式としてきた。しかし今回の検討では、卵巣内膜症性嚢胞に対する温存手術では、術式に関わらず血清AMH値の低下が認められ、術後3ヵ月を経ても回復しなかった。術後の血清AMH値の低下からみると、ESTの侵襲は核出術と同程度であり、開窓焼灼術よりも大きい可能性が示唆された。この結果は、2009年の本学会においてわれわれが報告した、EST後の再発率が核出術と同等であったというデータと矛盾しない。Changら[12]は卵巣内膜症性嚢胞核出術の1週間後に血清AMH値は最低値をとり、術後3~6ヵ月後に術前の値と有意差がない程度に復すると報告している。術後の血清AMH値の推移については引き続き検討が必要である。Tsolakidisら[4]は、腹腔鏡下に嚢胞開窓とドレナージを行った後、GnRH agonist療法を3ヵ月間行い、2回目の腹腔鏡で嚢胞内腔をCO₂レーザーで焼灼するというthree-step techniqueにより、血清AMH値の低下を防ぐことができたと報告している。2回の手術とGnRH agonist療法という侵襲や経済的負担の点でルーチンに行うことは困難と思われるが、今後、卵巣内膜症性嚢胞の術式に改善の余地があるのは確かである。

卵巣内膜症性嚢胞に対して通常行われている

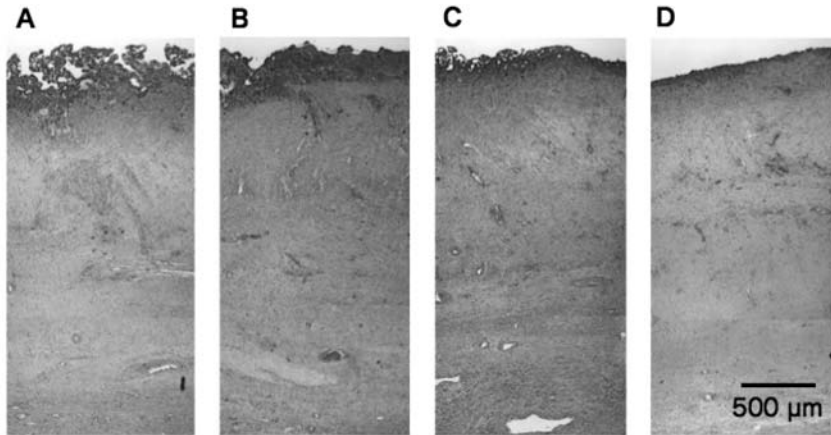


図2 パワーソースによる卵巣内膜症性嚢胞内腔の熱変性 (H-E 染色, ×20)
上が嚢胞内腔側で, 好酸性変性部分が濃染している。
A: モノポーラ (30W, 凝固スプレー), B: バイポーラ (30W), C: アルゴンプラズマコアギュレータ, D: ラジオ波

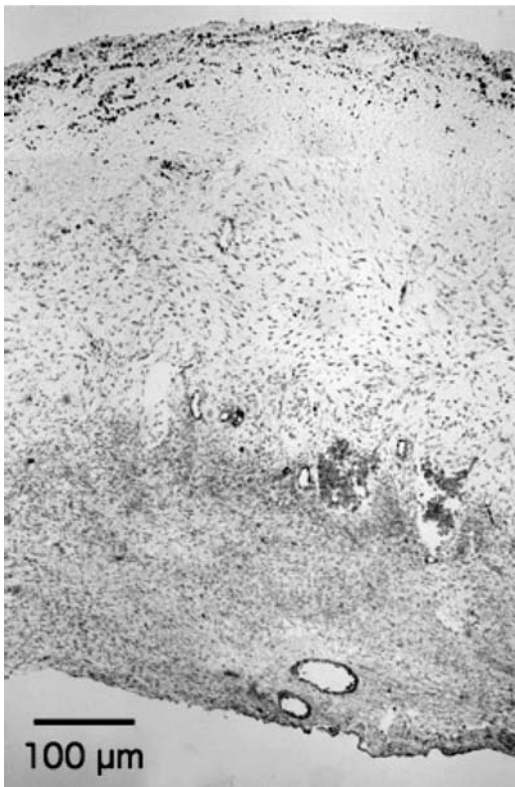


図3 エタノール (10分間) による内膜症性嚢胞壁の変性 (×100)
Nicotinamide adenine dinucleotide-tetrazolium reductase (NADH-TR) 染色. 上が嚢胞内腔側で, 変性組織は青く染まらない。

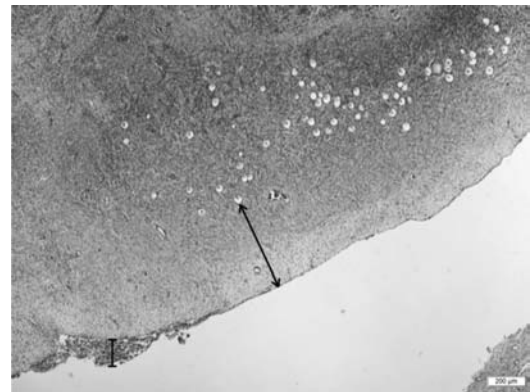


図4 多数の原始卵胞を認めた卵巣内膜症性嚢胞壁
⇔: 嚢胞壁内腔の表面から原始卵胞までの距離
—: 内膜症病巣の厚さ

温存手術では血清 AMH 値が低下し, その原因として病巣除去や止血に用いるパワーソースやエタノールによる卵胞損失が考えられたため, 組織の変性の深度と卵胞の位置関係について組織学的に検討した。今回の検討とは別に27歳の子宮体癌女性から摘出した多嚢胞性卵巣症候群 (polycystic ovary syndrome; PCOS) 卵巣, および27歳の子宮頸癌女性から摘出した正常卵巣について, 卵巣長軸断面の切片で測定した原始卵胞の深さは, PCOS 卵巣では $445 \pm 148 \mu\text{m}$

表1 核出した嚢胞壁に卵胞を認めた症例と認めなかった症例の比較

	卵胞あり (n = 14)	卵胞なし (n = 10)	P
画像診断			
・外向性に発育した嚢胞 (嚢胞外に卵巣実質を同定できた)	0 / 14 (0%)	4 / 10 (40%)	0.03
・子宮との固着 (経膈超音波検査)	4 / 14 (29%)	1 / 10 (10%)	0.18
術中所見			
・卵巣窩への癒着	14 / 14 (100%)	3 / 10 (30%)	0.001
・stripping の所要時間 (秒)	140 ± 75	308 ± 163	0.02
・核出を断念した症例	0 / 14 (0%)	3 / 10 (30%)	0.09

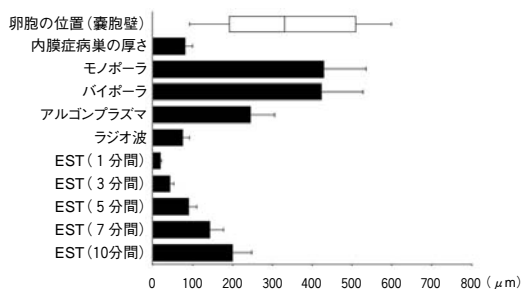


図5 卵巣内膜症性嚢胞壁における卵胞の位置、嚢胞壁における内膜症病巣の厚さ、パワーソースおよびエタノールの組織深達度
箱ヒゲ図は10%, 25%, 中央値, 75%, 90%を示し、横棒グラフはM+SDを示す。

(203~851 μm), 正常卵巣では576 \pm 199 μm (137~997 μm)であり、ほとんどが皮質下300~700 μm という比較的浅い位置に集積していることが確認された。皮質が伸展され菲薄化した内膜症性嚢胞壁では、卵胞はさらに浅い位置 (150~500 μm)に存在し、熱損傷が大きなモノポーラはもちろん、電極間のみに通電されるバイポーラでも、多くが障害を受ける可能性が示された。内膜症病巣除去術に広く用いられているAPCでさえ、卵胞の存在する領域の1/3程度まで熱損傷が及ぶことが明らかになった。一方、主に形成外科領域で用いられるラジオ波は、通常の電気メスの周波数0.5MHzと比べて非常に高い4.0MHzという高周波により熱変性を最小限に抑えたパワーソースである。その卵巣皮質における熱損傷の深達度はAPCの1/3程度であり、低侵襲性という点では最も優れていることを確認できた。

病巣の焼灼に際しては、正常組織に損傷を与えずに病巣のみを焼灼することができれば、それに勝る方法はない。しかし現実的には、すべての病巣を確認しながらピンポイントで焼灼することは不可能に近い。その点、ESTは接触した組織をまんべんなく固定して病巣除去できる利点がある。ESTの固定時間は原法では30分であったが、われわれは手術時間に配慮して10分間に短縮して行ってきた。Nomaらは固定時間が10分未満だと再発率が有意に高まると報告している〔13〕。今回、生存細胞のNADH-TR反応を用いた酵素組織化学的方法により、10分間の固定でもAPCと同程度の深さまで変性が及ぶことが明らかになった。NADH-TR活性は細胞死により速やかに消失し〔14〕、比較的容易に検査できるため、本法は乳癌のradiofrequency ablationの効果判定などに用いられており、検査の信頼性は高いと思われる。今回の検討では、ESTでは時間依存性に組織変性の深達度が増しており、従来の10分間では卵胞の損失を引き起こす可能性が大きく、5~7分間程度の固定で内膜症病変に対しては十分で、かつ卵胞に対しては低侵襲という理想的な治療効果が得られると思われる。今後、短時間のESTによる臨床成績を前方視的に検討する必要がある。

内膜症性嚢胞のすべてが、卵巣皮質の陥入による偽嚢胞というわけではない。今回の後方視的検討では、術前の画像検査で嚢胞と隣接した卵巣実質を別に確認できれば、嚢胞壁に卵胞を含まない可能性が高く、核出術または部分切除

術でよいと判断できると考えられた。さらに、術中に卵巣窩との癒着があれば、嚢胞壁に卵胞を含む偽嚢胞の可能性が高いため、核出術ではなく開窓焼灼術またはESTを行ったほうがよいと判断できる。術前の超音波検査により子宮との固着は診断可能であるが、卵巣窩との癒着は診断が難しい。また、MRI検査は病変の質的診断にはきわめて有用であるが、癒着の診断は難しく、卵胞の有無を推測する診断補助にはなりにくいと思われた。

さらに、卵胞を含む嚢胞はstrippingの所要時間が短く、strippingが困難で核出を断念した症例は全例、嚢胞壁に卵胞を含まなかった。Hachisugaら〔9〕は核出が容易なチョコレート嚢胞の74%は卵胞を含む卵巣実質であったと報告している。卵胞を含む嚢胞は強固な卵巣皮質そのものであるため、卵巣髓質から容易に剥がし取ることができたと推測される。

結 語

卵巣内膜症性嚢胞に対して通常行われている種々の温存手術は、残念ながら卵巣予備能に対しては侵襲が大きいといわざるを得ない。妊娠率などの短期的な予後に関しては良好な成績が多数報告されているが、長期的な予後に関しては不明である。卵胞の損失を避ける、すなわち卵巣予備能を維持するため、挙児希望のある女性に対しては、以下の対応を提案したい。すなわち、皮質が陥入した偽嚢胞であれば核出せず熱損傷の少ないパワースーツを用いた開窓焼灼または短時間のESTを行うこと、卵巣表面の病変を除去する際には熱損傷の少ないパワースーツを用いること、出血に留意し凝固止血操作を最低限に控えることである。また何よりも重要なことは、内膜症の再発を否定的に考えず、卵巣を愛護的に扱うことであると思われる。

文 献

- 〔1〕 Hughes E et al. Ovulation suppression for endometriosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007 ; CD000155
- 〔2〕 Hart RJ et al. Excisional surgery versus ablative surgery for ovarian endometriomata. *Cochrane Database Syst Rev* 2008 ; CD004992
- 〔3〕 日本産科婦人科学会. 子宮内膜症取扱い規約 第2部 治療編・診察編. 東京：金原出版, 2010
- 〔4〕 Tsalakidis D et al. The impact on ovarian reserve after laparoscopic ovarian cystectomy versus three-stage management in patients with endometriomas : a prospective randomized study. *Fertil Steril* 2009
- 〔5〕 藤井俊策. 卵巣予備能の評価. IVF ニュース編集委員会編. Schering-Plough Reproductive Medicine Series Vol.4 recFSH—臨床の展開—new protocol をめざして～. 横浜：ヒューマンリプロK, 2009
- 〔6〕 Tsepelidis S et al. Stable serum levels of anti-Mullerian hormone during the menstrual cycle : a prospective study in normo-ovulatory women. *Hum Reprod* 2007 ; 22 : 1837-1840
- 〔7〕 Seifer DB et al. Mullerian Inhibiting Substance is an ovarian growth factor of emerging clinical significance. *Fertil Steril* 2007 ; 88 : 539-546
- 〔8〕 Lemos NA et al. Decreased anti-Mullerian hormone and altered ovarian follicular cohort in infertile patients with mild/minimal endometriosis. *Fertil Steril* 2008 ; 89 : 1064-1068
- 〔9〕 Hachisuga T et al. Histopathological analysis of laparoscopically treated ovarian endometriotic cysts with special reference to loss of follicles. *Hum Reprod* 2002 ; 17 : 432-435
- 〔10〕 Somigliana E et al. Does laparoscopic excision of endometriotic ovarian cysts significantly affect ovarian reserve? Insights from IVF cycles. *Hum Reprod* 2003 ; 18 : 2450-2453
- 〔11〕 Jeffrey SS et al. Radiofrequency ablation of breast cancer : first report of an emerging technology. *Arch Surg* 1999 ; 134 : 1064-1068
- 〔12〕 Chang HJ et al. Impact of laparoscopic cystectomy on ovarian reserve : serial changes of serum anti-Mullerian hormone levels. *Fertil Steril* 2009
- 〔13〕 Noma J et al. Efficacy of ethanol sclerotherapy for ovarian endometriomas. *Int J Gynaecol Obstet* 2001 ; 72 : 35-39
- 〔14〕 Neumann RA et al. Enzyme histochemical analysis of cell viability after argon laser-induced coagulation necrosis of the skin. *J Am Acad Dermatol* 1991 ; 25 : 991-998