

—総説—

## 合成ステロイド剤ジエノゲストの作用機序に関する研究

甲木由紀夫<sup>a)</sup>\*, 平野和行<sup>b)</sup>

**要約:** ジエノゲスト (Dienogest) は、合成ステロイド剤の一つであり、経口投与にて progesterone 様作用を現わすことから、estrogen 依存性疾患に対する効果が期待され、子宮内膜症治療薬として現在臨床試験中である。本研究における動物実験の結果、dienogest の主たるホルモン作用は progesterone 様作用であるものの、本作用は progesterone 受容体拮抗薬 RU-486 存在下においても発現することから、作用発現様式の点で他の progestins と異なることが示唆された。また、ラットの実験的子宮内膜症モデルにおいて、内膜症組織に対する治療効果を示したのに加え、腹腔内免疫環境の改善ならびに骨量の維持など既存薬の作用を上回る特徴も認められた。さらに、本剤は、medroxyprogesterone acetate および danazol に比し、サルに長期投与しても血栓症発症のリスクが少なかった。この結果、dienogest が子宮内膜症治療薬として、高い有効性と安全性を併せ持った薬剤となる可能性が明らかとなった。

**索引用語:** ジエノゲスト、ホルモン作用、エストロゲン依存性疾患、子宮内膜症、骨量、血栓症、動物

## Mechanism of the Action of Dienogest, a Synthetic Steroid

Yukio KATSUKI<sup>a)</sup>\*, Kazuyuki HIRANO<sup>b)</sup>

**Abstract:** Dienogest is an orally active synthetic steroid with prominent progestational activity. It is thus being evaluated clinically for treatment of endometriosis, an estrogen-dependent disease. The drug was found to differ from other progestins in mechanism of action on progesterone receptor since progestational activity did not disappear in the presence of RU486, a progesterone receptor antagonist. Dienogest showed therapeutic effect in rats with experimental endometriosis as well as amelioration of endometrial implant-induced alteration in the intraperitoneal immune system and maintenance of bone mineral density, compared to commonly used drugs for endometriosis. A long-term treatment resulted in lower risk of thrombosis than medroxyprogesterone acetate or danazol in monkeys. Dienogest should thus serve as a highly safe potent agent for treating of endometriosis.

**Keyphrases:** dienogest, hormonal activity, estrogen-dependent disease, endometriosis, bone mineral density, thrombosis, animals

### 緒言

子宮内膜症は、estrogen 依存性疾患の一つであり、その患者数は近年増多の一途を辿っている。古くは、卵巣摘除術が本疾患の最も有効な治療法の一つとされたが、患者の多くが生殖年齢に属し、挙児希望を考慮すべきことから、本症の estrogen 依存性に着目し、ホルモン剤による

保存療法が治療の第一選択となっている<sup>1)</sup>。一般的なホルモン剤には、danazol、medroxyprogesterone acetate (MPA) をはじめとする progestins ならびに buserelin をはじめとする gonadotropin releasing hormone agonists (GnRH-a) が用いられる。これらは、子宮内膜症に対して比較的効果的ではあるが、同時に深刻な副作用が報告されている。Danazol は、その anabolic/androgenic 作用による体重増加に加え、

a) 持田製薬株式会社総合研究所 (〒412-8524 御殿場市神場字上ノ原 7 2 2)

Research Center, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd. (722, Jimba-aza-Uenohara, Gotemba, Shizuoka 412-8524, JAPAN)

b) 岐阜薬科大学薬剤学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5 丁目 6 - 1)

Laboratory of Pharmaceutics, Gifu Pharmaceutical University (5-6-1, Mitahora-higashi, Gifu 502-8585, JAPAN)

脂質代謝異常、肝機能障害および脳血栓症<sup>2)</sup>を惹き起こす。MPAはandrogenic作用による副作用および血栓症<sup>3)</sup>が知られる。DanazolおよびMPAによる血栓症の発症機序は、未だ特定されていない。GnRH-aは、その主作用であるestrogen低下作用に起因して、更年期様症状ならびに骨量減少を惹き起こすため、臨床投与期間が制限されている<sup>4)</sup>。以上の状況から、子宮内膜症に高い有効性を示しつつ、しかも既存の治療薬に比較して副作用がより少ない、新しい治療薬の開発が切望されている。

Dienogest (Fig. 1)は、ドイツJenapharm社によって新規に合成されたステロイド剤であり、経口投与可能でprogesterone様作用を現わすことから、当初、本剤とethinylestradiolとの合剤が低用量ピルとして開発され、ドイツで市販されている。その後、本剤単独で子宮内膜症治療薬として評価する試みがスタートし、現在、ドイツ、フランスおよび日本において臨床試験が進行中である。

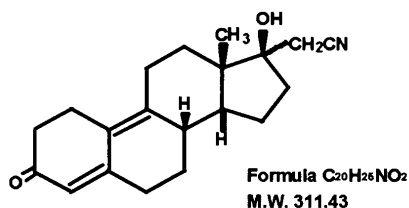


Fig. 1. Chemical structure of dienogest (17 $\alpha$ -cyanomethyl-17 $\beta$ -hydroxyestra-4,9-dien-3-one).

本研究は、dienogestの臨床適用の基礎となるホルモン作用プロフィールを動物実験より明らかにすると共に、本剤が、子宮内膜症治療薬として前述の課題を解決し得る有効性および安全性を有するか否かについて、実験的に明らかにし、さらに、その作用機序を明らかにすることを目的とした。

## 実験

### 1. 実験材料

**動物：** Wistar-Imamichi系雌雄ラットを今道動物繁殖研究所(茨城)より、SLC-Wistar系雄ラットおよびNew Zealand White系雌ウサギを日本SLC(浜松)より、Sprague-Dawley系雌ラットをCharles River Japan Inc. (横浜)より、雌アカゲザル(3~5才令)を、CSK Research Park (諏訪)より、雌カニクイザル(5才令)を、日本SLC(浜松)より、それぞれ購入して用いた。実験期間中、動物を、12時間明暗周期下、温度23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、相対湿度55 $\pm$ 15%の飼育室中に維持し、固形飼料および滅菌水道水を自由摂取させた。

**薬物および試薬：** DienogestはJenapharm GmbH (Jena, Germany)より提供された。Danazol、17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)、progesterone (P<sub>4</sub>)、dexamethasone (DEX)、testosterone propionate (TP)、medroxyprogesterone acetate (MPA)、

norethisterone (NES)および17 $\beta$ -estradiol benzoate (E<sub>2</sub>B)をSigma (St. Louis, MO, USA)より、Dydrogesteroneを第一製薬(東京)より、buserelin acetateをHoechst Japan (東京)より購入した。RU-486 (progesterone受容体拮抗薬)はRoussel-Uclaf (Romainville, France)より供与された。被験薬経口投与時には、薬物を0.5% sodium carboxymethyl cellulose水溶液に懸濁し、皮下投与時には1% ethanol含有sesame oilに溶解した。また、<sup>3</sup>H-P<sub>4</sub>、<sup>3</sup>H-testosterone (<sup>3</sup>H-T)、<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>、<sup>3</sup>H-R5020 および <sup>3</sup>H-R1881 をDuPont-NEN (Boston, MA, USA)より購入して受容体結合能測定に用いた。

### 2. ホルモン作用プロフィールの検討

**In vitroでのホルモン受容体結合能：** Botellaらの方法<sup>5)</sup>に従い、卵巣摘除後E<sub>2</sub>前処置したWistar-Imamichiラットの摘出子宮ホモジネートよりサイトゾル画分を得た。また、Asaiらの方法<sup>6)</sup>に従い、E<sub>2</sub>前処置幼若ウサギの摘出子宮内膜よりサイトゾル画分を得た。各サイトゾル画分200  $\mu$ lを、ホルモン受容体特異的放射能標識リガンドならびに各濃度の被験薬とともに4 $^{\circ}$ C、16~24hrインキュベートした。Progesterone受容体(PR)特異的放射能標識リガンドには<sup>3</sup>H-R5020(ラットおよびウサギ)あるいは<sup>3</sup>H-P<sub>4</sub>(ウサギ)を、estrogen受容体(ER)には<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>を、androgen受容体(AR)には<sup>3</sup>H-R1881(ラット)あるいは<sup>3</sup>H-T(ウサギ)を、それぞれ用いた。なお、<sup>3</sup>H-R1881の場合には、triamcinolone acetateを<sup>3</sup>H-R1881の1,000倍の濃度で共存させた。放射能標識リガンドの結合を50%置換する被験薬濃度(IC<sub>50</sub>)を、SAS nonlinear regression programにて決定し、被験薬の相対結合親和性(RBA)を、以下のように算出した：

$$RBA (\%) = (\text{標準薬のIC}_{50}\text{値} / \text{被験薬のIC}_{50}\text{値}) \times 100$$

**ウサギ子宮内膜形態変化惹起作用(McPhail test)：** McPhailの方法<sup>7)</sup>に従い、幼若ウサギをE<sub>2</sub>B (50  $\mu$ g/0.2 ml sesame oil/kg/day)6日間皮下投与により前処置した後、E<sub>2</sub>B最終投与24hr後より5日間、dienogest (0.001~1 mg/kg/day, po)、MPA (0.001~1 mg/kg/day, po)、dydrogesterone (0.01~10 mg/kg/day, po)、NES (0.01~10 mg/kg/day, po)、danazol (300 mg/kg/day, po)、progesterone (0.2 mg/kg/day, sc)、あるいはvehicleのみ(control)を投与した。被験薬最終投与翌日に子宮を摘出し、ホルマリン固定、パラフィン包埋した後、1子宮当たり6切片をhematoxylin & eosin染色し、子宮内膜形態変化の程度を組織学的に評価した。

**ウサギ子宮内膜形態変化に対するRU-486の抑制作用：** 幼若ウサギを前述と同様にE<sub>2</sub>B前処置した後、E<sub>2</sub>B最終投与24hr後に左子宮角を管腔結紮し、その内腔にRU-486 (10  $\mu$ g/0.2 ml sesame oil/uterine horn)を1回注入した。右子宮角も管腔結紮し、内腔にsesame oil (0.2 ml/uterine horn)を注入して対照とした。RU-486注入日より3日間、dienogest (0.1 mg/kg/day, po)、MPA (0.1 mg/kg/day, po)、progesterone (0.2 mg/kg/day, sc)、あるいはvehicleのみ(control)を投与し、被

験薬最終投与翌日、上述と同様に子宮内膜形態変化の程度を組織学的に評価した。

その他のホルモン作用：Dienogestのラットにおけるestrogen様作用をLausonらの方法<sup>8)</sup>により、抗estrogen作用をBlackらの方法<sup>9)</sup>により、androgen様作用をHershbergerらの方法<sup>10)</sup>により、LHおよびFSH分泌抑制作用をMaedaらの方法<sup>11)</sup>により、glucocorticoid作用をChartらの方法<sup>12)</sup>により、mineralocorticoid作用をMarcusらの方法<sup>13)</sup>により、ヒトSHBG (hSHBG)に対するin vitro結合親和性をNisulaらの方法<sup>14)</sup>により、それぞれ測定した。

### 3. ラットの実験的子宮内膜症における有効性の検討

#### 3-1. In vivoにおける研究

実験的子宮内膜症の作成：9週齢のSprague-Dawley雌ラットを用い、子宮内膜自家移植法により実験的子宮内膜症を作成した<sup>15)</sup>。すなわち、sodium pentobarbital (50 mg/kg, ip)麻酔下に開腹し、左子宮角を切り出し、5×5 mm角の子宮内膜組織片を分離して左側腎皮膜下に自家移植した。この2週後に再度開腹し、子宮内膜移植片の生着を確認し、その長径、短径および高さより体積を算出した。体積20～60 mm<sup>3</sup>の移植片を有する動物を、以後の研究に用いた。

子宮内膜症移植片および骨密度に及ぼす影響：実験的子宮内膜症ラット75匹を無作為に8群に群分けし、vehicleのみ (control; n=9)、dienogest (0.03 mg/kg/day, po; n=10)、dienogest (0.1 mg/kg/day, po; n=9)、dienogest (0.3 mg/kg/day, po; n=10)、dienogest (1 mg/kg/day, po; n=9)、danazol (100 mg/kg/day, po; n=10)、buserelin (30 μg/kg/day, sc; n=9)および両側卵巣摘除後vehicleのみ(n=9)の群とした。薬物処置を3週間行った後、子宮内膜移植片の体積を測定した。また、薬物処置が骨密度(BMD)に及ぼす影響を検討するため、摘出左大腿骨近位部海綿骨BMDを、peripheral quantitative computed tomography法 (XCT-960A, Norland-Stratec, Fort Atkinson, WI, USA)により測定した。

腹腔内NK活性に及ぼす影響：実験的子宮内膜症ラット35匹を無作為に5群(n=7)に群分けし、vehicleのみ (control)、dienogest (0.1 mg/kg/day, po)、danazol (100 mg/kg/day, po)、buserelin (30 μg/kg/day, sc)および両側卵巣摘除後vehicleのみの群とした。さらに、週齢を一致させ子宮内膜症作成術を施していない(intact)動物を用意しintact群(n=5)とした。3週間薬物処置し、子宮内膜移植片体積を測定した後、腹水および脾臓中の単核球をPercoll-Conray密度勾配法にて集め、これをeffector細胞としてNK活性測定に用いた。K562細胞(Dainippon Pharmaceutical)を予めEuropium-DTPA (Sigma)によって標識してtarget細胞とし、effector細胞/target細胞比100:1に混和して、5% CO<sub>2</sub>-95% airにて37°C、4hrインキュベートした後、上清中に漏出したEuropium蛍光を時間分解蛍光光度計

(DELFI, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)により測定した。NK活性をtarget細胞の融解率(%)により表わした。

腹腔内macrophageのinterleukin-1β (IL-1β)産生能に及ぼす影響：実験的子宮内膜症ラット20匹を無作為に2群(n=10)に群分けし、vehicleのみ (control)およびdienogest (0.1 mg/kg/day, po)群とした。また、前述と同様、intact群(n=5)を設けた。3週間薬物処置後、腹腔内macrophageを接着法<sup>16)</sup>により採取し、10<sup>4</sup> cells/wellを24穴プレート上に播種し、5% CO<sub>2</sub>-95% airにて37°C、24hrインキュベートした。この上清中のIL-1β濃度を、抗murine IL-1βウサギ抗体 (Genzyme, Cambridge, MA, USA)およびEuropium標識murine IL-1β (Genzyme)を用いた時間分解蛍光免疫測定法<sup>17)</sup>により測定した。

#### 3-2. In vitroにおける研究

子宮内膜細胞の調整：Sprague-Dawley雌intactラット24匹より子宮内膜を採取し、0.5% type I collagenase (Nitta Gelatin, 東京)および0.02% deoxyribonuclease I (Sigma)処理し、子宮内膜細胞を得た<sup>18)</sup>。

子宮内膜細胞のE<sub>2</sub>誘発増殖に及ぼす影響：子宮内膜細胞を2% DCC処理FCS加Dulbecco's MEM培地に懸濁し、その5×10<sup>4</sup> cells/wellを6穴プレートに播種し、5% CO<sub>2</sub>-95% airにて37°C、17hrインキュベートした。次いで4 ng/ml E<sub>2</sub>存在下に8hrインキュベートした後、培地を交換し、dienogest (3.2×10<sup>-11</sup>～3.2×10<sup>-8</sup> M)、danazol (3.0×10<sup>-11</sup>～3.0×10<sup>-8</sup> M)、buserelin (8.1×10<sup>-11</sup>～8.1×10<sup>-9</sup> M)、またはprogesterone (3.2×10<sup>-10</sup>～3.2×10<sup>-8</sup> M)を添加した。これをRU-486 (1 ng/ml)存在下あるいは非存在下に48hrインキュベートした後、100 μlの10 μM 5-bromodeoxyuridine (BrdU, Sigma)溶液を添加し、さらに2hrインキュベートした。細胞のBrdU取込み量を、抗BrdU抗体 (Amersham, Buckinghamshire, UK)およびEuropium標識抗マウスIgG抗体(Pharmacia Biotech)を用いた時間分解蛍光免疫測定法<sup>19)</sup>により測定した。

子宮内膜細胞のE<sub>2</sub>誘発増殖時における細胞内protein kinase A (PKA)活性およびprotein kinase C (PKC)活性に及ぼす影響：前述と同様、E<sub>2</sub>処置子宮内膜細胞にdienogest (3.2×10<sup>-11</sup>～3.2×10<sup>-8</sup> M)、danazol (3.0×10<sup>-11</sup>～3.0×10<sup>-8</sup> M)、またはprogesterone (3.2×10<sup>-11</sup>～3.2×10<sup>-8</sup> M)を添加し、RU-486 (1 ng/ml)存在下あるいは非存在下に処理した。細胞内PKAおよびPKC活性を、非放射能protein kinase assay kit (MBL, 名古屋)を用いた時間分解蛍光免疫測定法により測定した<sup>20)</sup>。すなわち、マイクロプレートに予め合成ペプチド(PS-peptide: R-F-A-R-K-G-A-L-R-Q-K-N-V)をコートした後、子宮内膜細胞ホモジネート12 μl (10<sup>4</sup> cells)と共に、25 mM Tris-HCl (pH 7.0)、3 mM MgCl<sub>2</sub>、0.1 mM ATP、0.5 mM EDTA、1 mM EGTAおよび5 mM 2-mercaptoethanolを含む反応液108 μlを添加した。また、PKA活性測定時には、2 μM

cAMPを反応液中に添加し、PKC活性測定時には、50 µg/ml phosphatidylserineおよび2 mM CaCl<sub>2</sub>を反応液中に添加した。25°C、5 minインキュベートした後、マウス抗phosphorylated PS-peptide抗体(clone 2B9)およびEuropium標識抗マウスIgG抗体にて処理し、Europium蛍光をDELFLIA蛍光光度計により測定した。PKAおよびPKC活性を、予め作成した標準曲線により算出した。酵素活性を、1分間に1 µmoleのphosphorylated peptideを産生する酵素量を1 unitとして定義した。

#### 4. 凝固線溶系および血小板凝集能に及ぼす影響

Dienogestのサル血液凝固、線溶および血小板凝集能に及ぼす影響：Dienogestの安全性を、特に血栓症のリスクの面からMPAおよびdanazolと比較検討するため、サルに長期投与した。従って、dienogestの用量は、本剤の実験的子宮内膜症ラットにおける薬理的有効用量(0.1 mg/kg)から、サルにおける毒性用量(10 mg/kg)までを用いた。なお、本剤の臨床試験における経口投与用量は、2-4 mg/day (0.03-0.07 mg/kg)である。アカゲザルに、dienogestもしくはvehicleを52週間経口投与し、投与前および投与第13、26、39および52週目に肘静脈採血してクエン酸加血漿を得た。血液凝固パラメーターとして、血漿のprothrombin時間(PT)、活性化部分thromboplastin時間(APTT)、fibrinogen (FBG)量および凝固第II、V、VII、VIII、IX、X、XIおよびXII因子活性を、自動凝固測定装置(KC-40, Amelung, Lieme, Germany)を用いた粘度計測法により測定した。Antithrombin III (AT III)およびprotein C活性を合成基質法にて測定した。線溶パラメーターとして、tissue plasminogen activator (t-PA)量ならびにplasminogen (PLG)およびplasminogen activator inhibitor (PAI)活性を合成基質法にて測定した。また、全血サンプルよりantiplasmin含有試験管中にて血清を分離し、FDPおよびD-dimer量をラテックス凝集法にて測定した。また、クエン酸加血の一部より多血小板血漿(PRP)および貧血小板血漿(PPP)を分離し、ADP (1および5 µM)あるいはcollagen(0.5および1 µg/ml)による血小板最大凝集率を、血小板凝集計(PAC-801, MC Medical, 東京)にて測定した。

DanazolおよびMPAのサル血液凝固、線溶および血小板凝集能に及ぼす影響：Danazolは、日本における子宮内膜症治療に用いられる代表的な合成ステロイド剤の一つであるため、danazolとdienogestとが、それぞれの臨床用量と比較して同等の用量範囲をカバーするようにした。従って、danazolの臨床用量(200-600 mg/day)の1-100倍に相当する10-1,000 mg/kgもしくはvehicleを、アカゲザルに4週間経口投与した。MPAの臨床経口用量を代表する用量としては10 mg/kgを選定した。これは本剤の子宮内膜症臨床用量の12.5倍、子宮体癌および乳癌臨床用量に相当する。MPAの10 mg/kg/dayもしくはvehicleを、アカゲザル

に8週間経口投与した。投与前および投与2週毎に、前節と同様、血液凝固、線溶および血小板凝集を測定した。

DienogestあるいはMPAのサル血小板凝集および血小板脂質に及ぼす影響：本実験においては、dienogestの1および3 mg/kgの2用量(それぞれ、臨床用量の14.3および44.8倍に等しい)およびMPAの10 mg/kgの1用量(臨床用量の12.5倍に等しい)を選定し、血小板凝集促進作用に関するdienogestとMPAとの違いを検討した。これらを雌カニクイザルに6週間経口投与し、前述と同様に血小板凝集能を測定した後、血小板脂質組成を分析するため、EDTA-2K加血より洗浄血小板を分離した。洗浄血小板より総脂質をchloroform-methanol (2:1, v/v)抽出し、その総cholesterol (酵素的CES-COD-POD法)およびphospholipids (過マンガン酸塩法)含量を測定し、cholesterol/phospholipid (C/P)モル比を算出した。

統計学的解析：結果を各群のmean ± SDとして表した。Control群と被験薬投与群間の有意差をDunnett's testにより多重比較検定し、有意水準をp<0.05とした。

## 結果

### 1. ホルモン作用プロフィールの検討

In vitroでのホルモン受容体結合能：ラット子宮PRに対するdienogestの相対的親和性(RBA)はprogesteroneの11%であり、検討した中で最も低い値を示した。また、dienogestのERに対するRBAはestradiolの0.01%以下と、非常に弱い結合能を示し、ARに対する結合能も低値を示した(Table 1)。ウサギ子宮においても同様の結果であり、dienogestの値に種差は認められなかった。

Table 1. Relative binding affinity (RBA) for progesterone (PR), estrogen (ER), and androgen (AR) receptors in rat uterine cytosol

Drugs	RBA (%)		
	PR	ER	AR
Progesterone	100		
Estradiol		100	
Testosterone			100
Dienogest	11.3±0.5	<0.1	2.6±1.2
MPA	59.3±6.9	<0.1	106.6±18.6
Norethisterone	77.7±7.8	<0.1	22.7±3.8
Danazol	15.6±6.4	<0.1	19.6±4.4

Each value represents the mean±SD (n=3).

ウサギ子宮内膜形態変化惹起作用(McPhail test)：Fig. 2の縦軸に形態変化の指標(McPhail index)を、横軸に被験薬の用量をプロットした。Dienogestは、0.01 mg/kg以上の用量においてウサギ子宮内膜形態変化を明らかに惹起した。本作用は0.01 mg/kgにて既にプラトーに達し、以後用量を増加させても同程度の作用を維持した。Dienogestの効力は、MPAの10倍、dydrogesteroneの1,000倍に達した。

NESは他の被験薬に比し弱い作用を惹起したに留まった。Danazolは300 mg/kgの用量においても、何ら作用を示さなかった(未公表データ)。

ウサギ子宮内膜形態変化に対するRU-486の抑制作用：Dienogestは、MPAおよびprogesteroneと同様に0.1あるいは0.2 mg/kgの用量で非常に高いMcPhail indexを示したこと(Fig. 2)から、これらの薬物がすべてprogestin様の生物活性を有することが示唆された。Fig. 3に示すように、MPAあるいはprogesteroneにより惹起される子宮内膜の変化は、RU-486の子宮腔内投与により完全に抑制された。一方、dienogestの作用は、RU-486の投与により、対照側の子宮角(McPhail index 3.3±0.5)に比し部分的に抑制されたのみ(RU-486注入側の子宮角のMcPhail index 2.5±0.7)であった。この結果から、dienogestが純粋なprogestinでないことが示唆された。

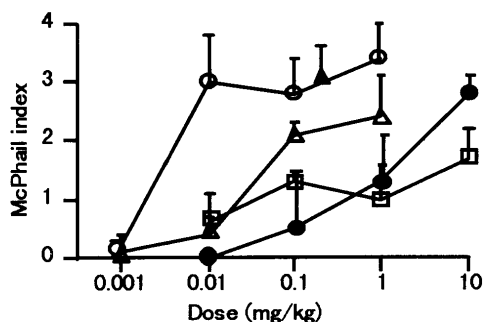


Fig. 2. Progestational activity (McPhail index) of dienogest (○), medroxyprogesterone acetate (△), norethisterone (□), dydrogesterone (●), and progesterone (▲) in the endometrium of immature estrogen-primed rabbits. Each point represents the mean ± SD of 6 animals except for the progesterone group (n=12).

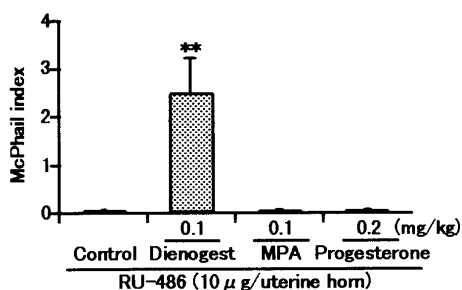


Fig. 3. Inhibitory effect of RU-486 on progestational proliferation of the endometrium of immature estrogen-primed rabbits treated with dienogest (0.1 mg/kg, po), medroxyprogesterone acetate (MPA, 0.1 mg/kg, po), or progesterone (0.2 mg/kg, sc). RU-486 (10 µg/uterine horn) was injected once into a tied segment of the uterine horn. Each column represents the mean ± SD (n = 5). Data were analyzed by Dunnett's test. A significant difference from the control group is marked: \*\* p<0.01.

その他のホルモン作用：Dienogestの各ホルモン作用発現には、estrogen様作用(≥1 mg/kg)、抗estrogen作用(≥1 mg/kg)、LH分泌抑制作用(10 mg/kg)のいずれも高用量を要し、androgen様作用、glucocorticoid作用およびmineralocorticoid作用はいずれも認められなかった(100 mg/kg)。また、hSHBG結合親和性はTの値を100%としてその0.43%と非常に弱かった。

2. ラットの実験的子宮内膜症における有効性の検討

2-1. In vivoにおける研究

子宮内膜移植片および骨密度に及ぼす影響：Dienogestは、0.03 mg/kgの用量においては子宮内膜移植片体積を減少させなかったが、試験したその他のすべての用量(0.1、0.3および1 mg/kg)において有意に減少させた。この効果はdanazolの効果に匹敵し、buserelinあるいはovariectomyの効果に比し、軽度であった(Fig. 4)。大腿骨近位部の海綿骨BMDには、dienogestのどの用量の投与群においても

Table 2. Effects of dienogest, danazol, buserelin, and ovariectomy on the bone mineral density (BMD) of left femur in rats with experimental endometriosis

Treatment	Dose (mg/kg/day)	BMD (mg/cm <sup>3</sup> )	
		Total bone	Trabecular bone
Control	-	702.3±31.6	428.1±44.7
Dienogest	0.03	693.8±48.5	403.7±84.2
	0.1	739.1±65.4	471.7±64.8
	0.3	729.9±84.6	456.3±109.2
	1	709.3±49.0	434.3±69.3
Danazol	100	678.1±38.5	381.9±30.5**
Buserelin	0.03	639.5±79.3*	377.2±99.2**
Ovariectomy	-	608.3±61.3**	329.3±84.1**

Each value represents the mean±SD (n=9-10). Data were analyzed by Dunnett's test. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. control.

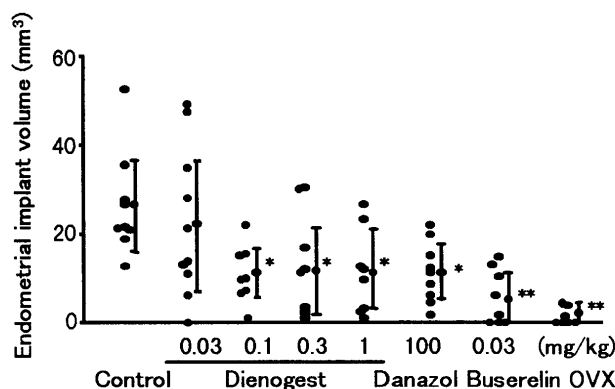


Fig. 4. Effects of dienogest, danazol, buserelin, and ovariectomy (OVX) on the endometrial implant volume in rats with experimental endometriosis. Closed circles represent the individual data, and open circles show the mean ± SD (n = 9-10) for each group. Data were analyzed by Dunnett's test. Significant differences from the control group are marked: \* p<0.05, \*\* p<0.01.

影響を及ぼさなかった。一方、danazol、buserelinおよび卵巣摘除群においてはBMDが有意に減少した。このBMD減少作用は、danazol < buserelin < 卵巣摘除群の順に強まった(Table 2)。

**腹腔内 NK 活性に及ぼす影響：**腹水細胞および脾細胞のNK活性は、子宮内膜組織の自家移植術により、intact群に比し、有意に減少した(Table 3)。Dienogest 0.1 mg/kg投与群のNK活性は、腹水細胞および脾細胞のいずれにおいても、control群に比し、有意に増加し、実質的にintact群の値とほぼ同等の値を示した。Danazol (100 mg/kg)は、腹水細胞のNK活性をわずかに増加させたが、脾細胞のNK活性には何ら影響を及ぼさなかった。Buserelinあるいは卵巣摘除術は、腹水細胞および脾細胞のいずれのNK活性にも影響を及ぼさず、intact群に比し著しく減少したままであった。Dienogestはまた、腹水細胞数をcontrol群に比し、有意に減少させた。一方、danazol、buserelinあるいは卵巣摘除のいずれも影響を及ぼさなかった。腹水量には、intact群を含めいずれの群にも差は認められなかった(未公表データ)。

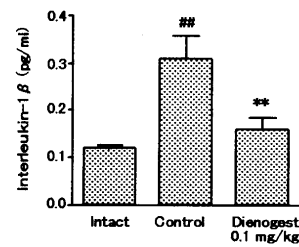
なお、子宮内膜移植片体積は、dienogest ( $13.0 \pm 9.1$ ,  $p < 0.01$  vs. control;  $35.6 \pm 18.9$  mm<sup>3</sup>), danazol ( $13.7 \pm 18.2$  mm<sup>3</sup>,  $p < 0.01$ ), buserelin ( $3.7 \pm 4.5$  mm<sup>3</sup>,  $p < 0.01$ )および卵巣摘除( $1.8 \pm 3.3$  mm<sup>3</sup>,  $p < 0.01$ )のいずれの群においても、Fig. 10に示した実験の場合と同様、有意に減少し、本実験モデルより得られた結果の再現性が確認された。

**Table 3.** Effects of dienogest, danazol, buserelin, and ovariectomy on the natural killer (NK) activity and the number of peritoneal fluid cells in rats with experimental endometriosis

Treatment	Dose (mg/kg/day)	NK activity (% lysis)		Number of peritoneal fluid cells (10 <sup>6</sup> cells/ml)
		Peritoneal fluid cells	Splenic cells	
Control	-	6.8±0.3	8.4±0.6	5.1±0.5
Dienogest	0.1	17.1±0.6**	14.5±1.1**	3.1±0.7**
Danazol	100	9.6±3.4**	9.5±1.8	4.7±0.6
Buserelin	0.03	7.1±0.3	8.5±0.7	5.5±1.0
Ovariectomy	-	6.9±0.4	8.6±0.4	5.4±0.7
Intact	-	19.5±0.6 <sup>###</sup>	16.7±0.2 <sup>###</sup>	3.2±0.5 <sup>###</sup>

Each value represents the mean±SD (n=9-10). Data were analyzed by Dunnett's test, except that for the intact group. \*\*p<0.01 vs. control. <sup>###</sup>p<0.01 for control vs. intact group (Student's *t*-test).

**腹腔内 macrophage の IL-1β 産生能に及ぼす影響：**実験的子宮内膜症ラットの腹腔内 macrophage による IL-1β 産生量は、intact群に比し、有意に増加した(Fig. 5)。Dienogest 0.1 mg/kg 投与群においては、腹腔内 macrophage の IL-1β 産生量は、control群に比し、有意に減少した。



**Fig. 5.** Effect of dienogest (0.1 mg/kg/day, po) on interleukin-1β production by peritoneal macrophages from rats with experimental endometriosis. Each column represents the mean ± SD (n = 10, except n = 5 in the intact group). Data were analyzed by Student's *t*-test. A significant difference between the control and the intact groups is marked as <sup>###</sup> p<0.01; and that from the control group, as \*\* p<0.01.

### 3-2. In vitroにおける研究

**子宮内膜細胞の E<sub>2</sub> 誘発増殖に及ぼす影響：**RU-486 非存在下において、dienogest ( $\geq 3.2 \times 10^{-10}$  M)の濃度に依存してラット子宮内膜細胞のBrdU取込みが減少した(Table 4)。Danazol ( $3.0 \times 10^{-8}$  M)およびprogesterone ( $3.2 \times 10^{-8}$  M)もまた、BrdU取込みを有意に抑制した。しかし、buserelin ( $8.1 \times 10^{-9}$  M)はBrdU取込みを抑制しなかった。Dienogest ( $\geq 3.2 \times 10^{-10}$  M)はまた、RU-486 (1 ng/ml)存在下においても、子宮内膜細胞のBrdU取込みを有意に抑制した。しかしながら、本剤の抑制作用は、RU-486の存在により、非存在下に比し、わずかに減弱した。一方、danazolおよびprogesteroneの抑制作用は、RU-486存在下において消失した。なお、いずれの被験薬も培養上清中への細胞内LDH漏出量を増加させず、viabilityへの影響は認められなかった。

**Table 4.** Effects of dienogest, danazol, buserelin, and progesterone on the proliferation of rat endometrial cells treated with estradiol

Treatment	Concentration (M)	BrdU uptake (pmole/10 <sup>4</sup> cells)	
		RU486 (-)	RU486 (+)
Control	-	67.1±0.6	67.5±0.2
Dienogest	$3.2 \times 10^{-11}$	66.8±0.6	67.2±0.2
	$3.2 \times 10^{-10}$	63.2±0.2**	62.2±0.8**
	$3.2 \times 10^{-9}$	52.2±0.1**	59.3±1.4**
	$3.2 \times 10^{-8}$	35.5±0.4**	56.4±2.2**
Danazol	$3.2 \times 10^{-11}$	67.0±1.2	66.7±1.2
	$3.2 \times 10^{-10}$	66.9±1.2	67.6±1.5
	$3.2 \times 10^{-9}$	65.8±0.2	66.8±0.5
	$3.2 \times 10^{-8}$	63.5±0.3**	64.9±2.2
Buserelin	$3.2 \times 10^{-11}$	66.6±0.3	NT
	$3.2 \times 10^{-9}$	66.1±0.4	NT
Progesterone	$3.2 \times 10^{-10}$	67.5±0.4	67.1±0.3
	$3.2 \times 10^{-9}$	65.7±1.8	67.0±0.7
	$3.2 \times 10^{-8}$	53.5±2.6**	67.3±0.4

Each value represents the mean±SD (n=3). Data were analyzed by Dunnett's test. \*\*p<0.01 vs. control (DMSO). NT, not tested.

子宮内膜細胞の E<sub>2</sub> 誘発増殖時における細胞内 PKA および PKC 活性に及ぼす影響: RU-486 非存在下において、dienogest ( $\geq 3.2 \times 10^{-10}$  M) はラット子宮内膜細胞の PKC 活性を有意に抑制した (Table 5)。この抑制作用は、dienogest のみに特異的に認められ、danazol あるいは progesterone には認められなかった。また、RU-486 非存在下において、dienogest、danazol および progesterone それぞれの最高濃度にて、細胞内 PKA 活性が有意に減少した。RU-486 存在下においては、本作用はいずれの薬物においても消失した。

3. 凝固線溶系および血小板凝集能に及ぼす影響

**Dienogest のサル血液凝固、線溶および血小板凝集に及ぼす影響:** 結果を Fig. 6 にまとめた (一部未公表データ)。血液凝固系では dienogest 投与第 13 週目から 52 週目にかけて、0.3 mg/kg 以上の用量において FBG (凝固第 I 因子) 量を有意に増加し、10 mg/kg の用量において凝固第 II 因子活性が有意に増加した。また、投与第 13 週目から 52 週目にかけて、10 mg/kg の用量において AT III 活性が有意に増加し、1 mg/kg 以上の用量において protein C 活性が有意に増加した。凝固第 V、VII、VIII、IX、X、XI および XII 因子活性には影響は認められず、また、PT および APTT にも影響は認められなかった。線溶系では、PLG 活性、t-PA 量、PAI 活性、FDP 量および D-dimer 量のいずれにも影響しなかった。血小板凝集に対し、dienogest は、ADP あるいは collagen による最大凝集率に何ら影響を及ぼさなかった (Fig. 7)。

**Danazol および MPA のサル血液凝固、線溶および血小板凝集に及ぼす影響:** Danazol は、10 mg/kg 以上の用量において、凝固第 II、XI および XII 因子活性を有意に増加させ、100 mg/kg 以上の用量においては、FBG 量、凝固第 V、VII、VIII および X 因子活性、ならびに AT III および

protein C 活性を有意に増加させた。また、PT を用量に依存して短縮させ、1,000 mg/kg の用量において有意差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。凝固第 IX 因子活性および APTT に変化は認められなかった。線溶に対しては、10 mg/kg 以上の用量において PLG 活性を有意に増加させたが、PAI 活性、あるいは t-PA、FDP、および D-dimer 量に影響を及ぼさなかった。 (Fig. 6、一部未公表データ)。Danazol の血小板最大凝集率に対する影響は認められなかった (Fig. 7)。また、MPA は、投与第 8 週目の FBG 量を有意に増加させ、protein C 活性を有意に減少させ、投与第 4 から 8 週目の PLG 活性を有意に増加させたが、その他の凝固線溶系には影響を及ぼさなかった (Fig. 6、一部未公表データ)。MPA は、投与第 4 から 8 週目の ADP および collagen に対する血小板最大凝集率を、いずれも有意に増加させた (Fig. 7)。

**Dienogest あるいは MPA のサル血小板凝集および血小板脂質に及ぼす影響:** 前述と同様、dienogest は血小板凝集に何ら影響を及ぼさず、一方、MPA は投与第 4 および 6 週目における ADP および collagen 凝集率を有意に増加

Table 6. Effects of dienogest and medroxyprogesterone acetate (MPA) on platelet lipids in female cynomolgus monkeys

Drugs	Dose (mg/kg /day)	Platelet lipids		
		Cholesterol (mmol)	Phospholipids (mmol)	C/P ratio
Control	-	40±6	87±15	0.46±0.06
Dienogest	1	44±2	89±12	0.50±0.07
	3	41±3	90±5	0.46±0.05
MPA	10	54±3**	66±7*	0.86±0.08**

Each value represents the mean±SD (n=4). Data were analyzed by Dunnett's test. \*p<0.05, \*\*p<0.01 vs. control.

Table 5. Effects of dienogest, danazol, and progesterone on the PKA and PKC activities of rat endometrial cells treated with estradiol

Treatment	Concentration (M)	PKA activity (mU/104 cells)		PKC activity (mU/104 cells)	
		RU486 (-)	RU486 (+)	RU486 (-)	RU486 (+)
Control	-	0.45±0.05	0.40±0.02	0.19±0.01	0.20±0.01
Dienogest	3.2×10 <sup>-11</sup>	0.39±0.03	0.39±0.05	0.19±0.00	0.19±0.00
	3.2×10 <sup>-10</sup>	0.41±0.02	0.35±0.06	0.13±0.01 **	0.11±0.02 **
	3.2×10 <sup>-9</sup>	0.39±0.01	0.41±0.16	0.12±0.00 **	0.12±0.01 **
	3.2×10 <sup>-8</sup>	0.23±0.02 **	0.35±0.02	0.12±0.01 **	0.12±0.01 **
Danazol	3.2×10 <sup>-11</sup>	0.40±0.08	0.38±0.05	0.19±0.01	0.19±0.00
	3.2×10 <sup>-10</sup>	0.37±0.05	0.36±0.04	0.19±0.01	0.19±0.00
	3.2×10 <sup>-9</sup>	0.40±0.04	0.35±0.01	0.19±0.01	0.19±0.00
	3.2×10 <sup>-8</sup>	0.27±0.01 **	0.38±0.04	0.19±0.01	0.19±0.00
Progesterone	3.2×10 <sup>-11</sup>	0.42±0.05	0.36±0.04	0.20±0.01	0.20±0.00
	3.2×10 <sup>-10</sup>	0.38±0.02	0.36±0.02	0.20±0.01	0.20±0.01
	3.2×10 <sup>-9</sup>	0.38±0.03	0.38±0.03	0.20±0.00	0.20±0.00
	3.2×10 <sup>-8</sup>	0.23±0.03 **	0.39±0.02	0.20±0.00	0.20±0.00

Each value represents the mean±SD (n=3). Data were analyzed by Dunnett's test. \*\*p<0.01 vs. control (DMSO).

させた(未公表データ)。投与第 6 週目に同実験より得た血小板脂質において、dienogest の影響は認められなかったが、MPA は、血小板 cholesterol 量を有意に増加させ、phospholipid 量を有意に減少させた。この結果、MPA 群の C/P 比は有意に増加した(Table 6)。

考 察

本研究結果より判明したことは、まず第一に、dienogest が純粋な progestin と異なるホルモン作用を有することである。本剤は、子宮 PR に対する結合能が、検討した progestins の中で最も弱いにもかかわらず、progesterone 様生物活性の指標である McPhail 試験におけるウサギ子宮内膜形態変化惹起作用を被験薬中で最も強力に(0.01 mg/kg の用量にて)発現した。しかも、MPA あるいは progesterone の McPhail 活性が、PR 拮抗薬 RU-486 存在下において完全に消失するにもかかわらず、dienogest の

McPhail 活性は、RU-486 存在下に部分的に減弱したのみであった。さらに、dienogest は、子宮内膜細胞の estrogen 依存性細胞増殖(BrdU 取込み)を progesterone より強く抑制し、dienogest の効力を裏付ける主たるホルモン作用の一つと考えられた。本作用も、活性の上では progesterone 様作用と考えられたが、RU-486 によって progesterone の作用が完全に消失する条件下においても、dienogest の増殖抑制作用は、一部減弱するものの明確に認められた。細胞内情報伝達系レベルでは、子宮内膜細胞内 cAMP 含量および PKA 活性の抑制作用が PR を介する効果と考えられ、dienogest は  $3.2 \times 10^{-8}$  M において本作用を発現したが、さらに低濃度である  $3.2 \times 10^{-10}$  M、すなわち、dienogest が子宮内膜細胞増殖抑制作用を発現する濃度から PKC 活性抑制作用を発現し、本作用は PR を介さないと考えられた。さらに、本剤は、免疫組織化学的に PR 発現が見られず他の progestins が無効であったヒト子宮体癌細胞(HEC-88nu)の、in vivo および in vitro における estrogen 依存性細胞増殖を、本研究と同様の用量範囲( $\geq 0.1$  mg/kg および  $\geq 10^{-8}$  M)において抑制し、同時に PR を介する antiuterotrophic 作用を全く発現しなかったことが報告されている<sup>21)</sup>。これらの結果より、dienogest は、生物活性の上では progesterone 様作用と思われる特定の作用を発現し、その一部は PR を介していると考えられる(RU-486 存在下に抑制される)ものの、作用の主たる部分は progestins と異なる作用点を介して発現していると考えられた。PR 経路以外に、estrogen 依存性細胞増殖に影響を及ぼす可能性には、ER 経路、AR 経路、corticoid 受容体経路などが考えられたが、dienogest の抗 estrogen 作用、androgen 作用、corticoid 作用は、いずれも弱いか認められなかった。また、LH および FSH 分泌抑制作用ならびに hSHBG に対する in vitro 結合親和性も非常に弱く、これらを介する間接的な作用もないと考えられた。従って、従来知られるステロイドホルモン受容体を介する作用では説明できず、この dienogest に特有の作用点がある、PR 分子そのものに対する特殊な結合様式のために RU-486 により阻害されないのか、あるいは新規の受容体が存在するのか、現在の点を中心に検討中である。

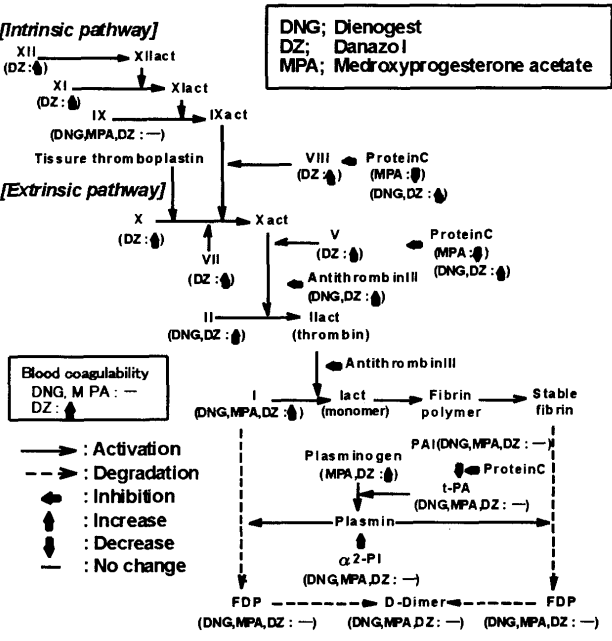


Fig. 6. Effects of dienogest, danazol, and medroxyprogesterone acetate on coagulo-fibrinolysis system in female rhesus monkeys.

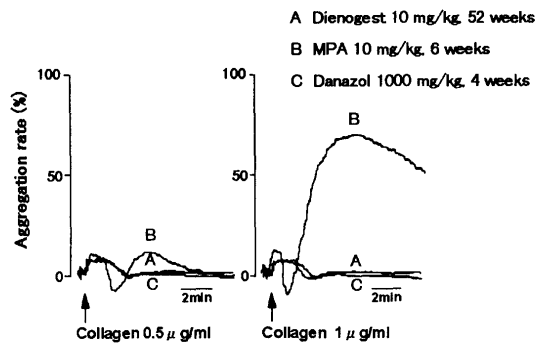


Fig. 7. Effects of dienogest, danazol, and medroxyprogesterone acetate (MPA) on collagen-induced platelet aggregation in female rhesus monkeys.

本研究より判明した第二の点は、既存のホルモン療法剤に比較し、dienogest の estrogen 依存性疾患に対する、より高い有効性が期待されることである。近年、子宮内膜症の頻度は増加しており、生殖年齢女性のおよそ 10% に本症が存在すると考えられている。なかでも、不妊症患者に本症が発見されるケースが多く、通常の不妊検査によって不妊因子が同定できない原因不明不妊症患者においては、およそ 50%に子宮内膜症を認めたとの成績が多く施設から報告され、本症は不妊因子の一つにあげられている。これまで、子宮内膜症治療薬は、子宮内膜症病巣に対する縮小作用の面では一定の効果が認められ



ているが、治療後の妊娠率には、必ずしも改善効果が認められていない<sup>22)</sup>。本研究において、既存の子宮内膜症治療剤である danazol および buserelin、あるいは卵巣摘除術のいずれにも、異所性子宮内膜に対する明らかな病巣縮小効果が認められた。しかしながら、いずれの治療法も、子宮内膜症動物における免疫学的腹腔内環境の悪化、すなわち、腹水細胞数の増加や、腹水単核球および脾細胞中の NK 活性の低下に対しては、改善効果が全く見られないか、甚だ不十分であることが判明した。従って、それらが、不妊症に関わる免疫学的腹腔内環境<sup>23-26)</sup>を治療できていないことが示唆された。Dienogest は、danazol に匹敵する病巣縮小効果を示すと同時に、子宮内膜症動物の免疫学的腹腔内環境を正常動物のそれとほぼ同等のレベルにまで改善したことから、本剤が子宮内膜症そのものだけでなく、治療後の妊娠率の改善にも寄与し得ると考えられた。

本研究より判明した第三の点は、dienogest には、既存のホルモン療法剤が抱える深刻な副作用がいずれも認められず、より高い安全性が期待されることである。Danazol の主な副作用は、androgen 様/anabolic 作用による体重増加、にきび、男性化現象等があげられる。MPA も、androgen 様作用による副作用を高率に発現する。Dienogest の AR および SHBG に対する結合親和性は非常に弱いと、直接的・間接的に androgen 様/anabolic 作用を起こしにくいことが裏付けられた。MPA の主な副作用は、corticoid 作用による Cushing 症候群、moon face、浮腫等があげられる。Dienogest は corticoid 作用を示さないため、この点についても改善が期待される。

さらに、danazol および MPA の最も重篤な副作用として、血栓症があげられる。しかしながら、その発症機序は、これまでのところ特定されていないため、本研究においては、血液凝固線溶能および血小板凝集能の面から danazol および MPA の影響を解析した。Danazol は、その臨床用量に相当する 10 mg/kg の用量から、内因系および外因系凝固因子活性を著明に増加させ、凝固能亢進状態と考えられた。とりわけ、各凝固系のイニシエーションに働く第 XII および VII 因子活性を増加させたことから、血液凝固が非常に起こり易いと考えられた。これが直ちに血栓症に至らない背景は、抗凝固因子活性も増加したため、平常時には凝固系と抗凝固系との間に微妙な均衡が保たれているためと推察された。また、MPA は血小板凝集能を亢進させ、その背景には、血小板の膜流動性の指標である血小板 C/P 比の増加により、凝集刺激時の血小板内への Ca<sup>2+</sup>流入が促進し、凝集能が亢進したと考えられた<sup>27)</sup>。これらの変化は、それぞれ、両薬剤の血栓症のリスクに対する一つの説明と考えられた。Dienogest は、本剤の薬理学的有効用量且つ子宮内膜症に対する臨床用量付近である 0.1 mg/kg において、血液凝固能および血小

板凝集能のいずれにも全く影響が認められなかった。10 mg/kg の毒性用量においても、FBG 量および第 II 因子活性のみ増加し、同時に、抗凝固因子活性も増加し、血液凝固時間が変化しなかったことから、凝固系と抗凝固系の活性は均衡を保っていると考えられた。従って、本剤の血栓症発症のリスクは、danazol および MPA に比し、非常に少ないと考えられた。

また、buserelin (GnRH-a)の主な副作用は、その主たるホルモン作用である estrogen 低下作用に起因した更年期様症状および骨量減少である。特に、骨量減少による骨粗鬆症のリスクを避けるため、臨床における投与期間が制限されている<sup>4)</sup>。本研究より、buserelin および卵巣摘除のいずれにも、BMD 減少作用が確認された。一方、dienogest は BMD に影響を及ぼさず、骨量減少の副作用がない子宮内膜症治療薬として、本剤は極めて有用と考えられた。

## 結 論

以上の結果から、dienogest は、子宮内膜症に対する、高い有効性と安全性を併せ持った治療薬となる可能性が明らかとなった。また、本剤の基礎となるホルモン作用は、progesterone 様生物活性と考えられるが、既存の progestins と異なり、主として PR を介さない経路によって発現すると考えられ、今後、本剤の作用点を分子生物学的に解明することが課題である。

## 引用文献

- 1) Shaw RW. Lancet, 340, 1267-1270 (1992).
- 2) Barbieri RL, Ryan KJ. Am. J. Obstet. Gynecol., 141, 453-463 (1981).
- 3) Moghissi K. Clin. Obstet. Gynecol., 31, 823-828 (1988).
- 4) Henzl MR. Clin. Obstet. Gynecol., 31, 840-856 (1988).
- 5) Botella J, Duc I, Delansorne R, Paris J, Lahlou B. J. Pharmacol. Exp. Ther., 248, 758-761 (1989).
- 6) Asai M, Takeuchi H, Okada H. Acta. Endocrinol., 87, 173-180 (1978).
- 7) McPhail MK. J. Physiol., 83, 145-156 (1934).
- 8) Lauson HD, Heller CG, Golden JB, Sevringhaus EL. Endocrinology, 24, 35-44 (1939).
- 9) Black LI, Jones CD, Falcone JF. Life Sci., 32, 1031-1036 (1983).
- 10) Hershberger LG, Shipley EG, Meyer RK. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 83, 175-180 (1939).
- 11) Maeda K, Tsukahara H, Uchida E, Ohkura N, Ohkura S, Yokoyama A. J. Endocrinol., 121, 277-283 (1989).
- 12) Chart JJ, Shipley EG, Meyer RK. Proc. Soc. Exp. Biol.

- Med., 90, 127-133 (1955).
- 13) Marcus F, Romanoff LP, Pincus G. *Endocrinology*, 50, 286-293 (1952).
  - 14) Nisula BC, Dunn JF. *Steroids*, 34, 771-791 (1979).
  - 15) Sakata M, Terakawa N, Mizutani T, Tanizawa O, Matsumoto K, Terada N, Sudo K. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 163, 1679-1684 (1990).
  - 16) Kukita T, Kukita A, Hata K, Kurisu K. *Endocrinology*, 130, 577-584 (1992).
  - 17) Hemmila I. *Scand J. Clin. Lab. Invest.*, 48, 289-300 (1988).
  - 18) Sharpe KL, Zimmer RL, Khan RS, Penney LL. *Fertil. Steril.*, 58, 1220-1229 (1992).
  - 19) Alftan H. *J. Immunol. Methods*, 88, 239-244 (1986).
  - 20) Yano T, Taura C, Shibata M, Hirono Y, Ando S, Kusubata M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 1144-1151 (1991).
  - 21) Katski Y, Shibutani Y, Aoki D, Nozawa S. *Cancer*, 79, 169-176 (1997).
  - 22) Kauppila A. *Acta. Obstet. Gynecol. Scand.*, 72, 324-336 (1993).
  - 23) Halme J, Becker W, Haskill S. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 156, 783-789 (1987).
  - 24) Taketani Y, Kuo TM, Mizuno M. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 167, 265-270 (1992).
  - 25) Uda S, Umesaki N. *Acta. Obst. Gynaec. Jpn.*, 43, 497-502 (1991).
  - 26) Ishikawa N. *Acta. Obst. Gynaec. Jpn.*, 47, 457-464 (1995).
  - 27) Sato T, Maegawa H, Kometani M, Fujii T. *Thromb. Res.*, 40, 59-68 (1985).

\* 本総説は岐阜薬科大学博士論文（乙第 236 号）の内容を中心にまとめたものである。