

Japanese Journal of Fertility and Sterility

January 1978

日本不妊学会雑誌

第 23 卷

第 1 号

昭和 53 年 1 月 1 日

— 目 次 —

会 告

第23回総会・学術講演会予告

原 著

Single AID (1 周期 1 回非配偶者間人工授精) と分娩予定日の研究…小 林 栄 子… 1
SIGNIFICANCE OF JONES-JONES OPERATION ON DOUBLE

UTERUS —VASCULARITY AND DATING OF ENDOME-

TRIUM IN UTERINE SEPTUM—……………K. Mizuno・他… 9

外性子宮内膜症の X 線像に関する研究—Scoring の試み……………江 沢 健 夫…14

銅—IUD の子宮内膜に及ぼす影響……………玉 舎 輝 彦・他…24

銅 IUD (Copper-T) に関する基礎的検討(その 1)……………村 上 旭・他…28

遅延排卵に関する臨床統計的考察……………野 口 邦 夫・他…35

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE MECHANISM OF
CELL GROWTH AND PROGESTERONE SYNTHESIS

IN HUMAN GRANULOSA CELL IN VITRO……………M. Shoji・他…41

TESTOSTERONE BIOSYNTHESIS AND METABOLISM

ON CRYPTORCHIDISM IN MAN……………I. Takenaka・他…49

ウシの性周期における末梢血中 Progesterone, Estrone, Estradiol-17 β ,

Estriol, Cortisol および Corticosterone の動態について……………鳥 居 隆 三・他…55

反復過排卵処理に対するマウスの排卵反応の系統差……………石 島 芳 郎・他…59

発生初期におけるウサギ卵子のステロイド脱水素酵素の

組織化学的研究……………新 村 末 雄・他…64

2 抗体法による ¹²⁵I-Estradiol Radioimmunoassay System の検討…倉野 彰比古・他…69

子宮外妊娠における子宮内膜の病理組織学的研究

——特にその特異像の分析と診断学的意義について……………中 島 敏 男…77

昭和51年度日本不妊学会北海道地方部会……………92

日本不妊学会関東・東北連合地方部会……………92

第77回日本不妊学会関西支部集談会……………93

第78回日本不妊学会関西支部集談会……………94

第23回日本不妊学会総会および 学術講演会予告(第1回)

第23回日本不妊学会総会および学術講演会は、下記の要領により開催されますので、多数ご参加下さるよう、ご案内申し上げます。

会 期	昭和53年11月17日(金)(役員会), 18日(土), 19日(日)
会 場	京王プラザホテル 〒160 東京都新宿区西新宿 2-2-1 TEL (03) 344-0111
学 術 講 演 会	外人招請講演, 会長要請講演, シンポジウム(不妊領域における外科的療法), 教育講演, 一般演題
演題申込締切	昭和53年6月30日(当日消印有効)
演題申込資格	本会会員に限ります。会員以外の方(共同発表者を含む)は, 演題申込みと同時に昭和53年度会費納入の上, 会員となつて下さい。演題申込み方法などについては次号でお知らせいたします。

第23回 日本不妊学会総会会長

飯 塚 理 八

連絡先 東京都新宿区信濃町 35
慶応義塾大学医学部産婦人科学教室内
第23回日本不妊学会総会事務局

〒160 TEL (03) 353-1211

内線 2393, 2313

学 会 開 催 の 通 知

V International Congress on Hormonal Steroids—1978

日 時：1978年10月30日—11月4日

場 所：New Delhi

主 催：Dep. Reproductive Biology, All India In-
stitute of Medical Sciences. New Delhi—
110016, India. Prof. K. R. Lanmas

CONTENTS

Studies of Single AID (Artificial Insemination of Donor) and the Estimated Date of Confinement.....	<i>E. Kobayashi</i>	1
Significance of Jones-Jones Operation on Double Uterus —Vascularity and Dating of Endometrium in Uterine Septum—.....	<i>K. Mizuno, K. Koike, K. Ando, O. Hirata & Y. Yagami</i>	9
Radiological Studies on the Endometriosis Externa.....	<i>T. Ezawa</i>	14
Effect of Copper-IUD on the Human Endometrium.....	<i>T. Tamaya, Y. Nakata, S. Nioka, T. Obata, S. Higashiyama & H. Okada</i>	24
A Fundamental Study of Copper-T (intrauterine device) —Part 1—.....	<i>A. Murakami, T. Murakami, T. Tamaya, M. Koyama & T. Matsumoto</i>	28
A Clinical and Statistical Study on Delayed Ovulation.....	<i>K. Noguchi, M. Saito & H. Otsuka</i>	35
The Relationship between the Mechanism of Cell Growth and Progesterone Synthesis in Human Granulosa Cell <i>in vitro</i>	<i>M. Shoji, H. Kinoshita, H. Hosoda, K. Ohkawa, S. Tamai, M. Endo, I. Yamamoto & S. Hachiya</i>	41
Testosterone Biosynthesis and Metabolism on Cryptorchidism in Man.....	<i>I. Takenaka & H. Goto</i>	49
Plasma Progesterone, Estrone, Estradiol-17 β , Estriol, Cortisol, and Corticosterone during Estrous Cycle in Cow.....	<i>R. Torii, S. Nakama & T. Imori</i>	55
Strains Difference of Ovulatory Response in Mice to Repeated Superovulation-treatment.....	<i>Y. Ishijima, K. Anabuki, T. Endo & Y. Sakuma</i>	59
Histochemical Studies of Steroid Dehydrogenases in Rabbit Eggs at Preimplantation Stages.....	<i>S. Niimura & K. Ishida</i>	64
Evaluation of ¹²⁵ I-Estradiol Radioimmunoassay System with Double Antibody Method.....	<i>A. Kurano, G. Nakamura, M. Kusuda & I. Taki</i>	69
Histo-pathological Findings of the Endometrium in Cases of Ectopic Pregnancy —Analysis of Morphological Characteristic and its Diagnostic Significance—.....	<i>T. Nakajima</i>	77

Single AID (1周期1回非配偶者間人工授精) と分娩予定日の研究

Studies of Single AID (Artificial Insemination of Donor) and The Estimated Date of Confinement

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

小 林 栄 子

Eiko KOBAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University
(Director: Prof. Rehachi Iizuka)

Single AID により妊娠した529例を対象にして、その臨床成績を検討し以下の結論をえた。

1. 排卵日起算の妊娠持続日数は 265.85 ± 5.95 日, 人工授精日からは 265.65 ± 7.54 日, 最終月経第1日目よりは 278.01 ± 7.84 日であった。
2. 分娩予定日は排卵日起算266日目である。
3. 妊娠持続日数が排卵日起算280日をこえる症例を分娩予定日超過とした場合529例中1.51% (8例) 存在した。
4. 529例の妊娠分娩例のうち排卵日の授精により31.5% (167例), $-2 \sim 0$ day までの間に75.6% (400例) が妊娠している。
5. 529例における児の性比は男:女=100:105であった。また、授精日と児の性比の間に有意の差は認められなかった。
6. 同一妊婦正常産生児をえた症例において、尿中 E_3 値のパターンは全例下降型を示し、血清 CAP は上昇型 (47%) と下降型 (53%) に大別され、血清 HSAP の変動パターンは上昇型が大多数 (82.3%) であった。

I. 結 言

最近、分娩予定日超過の問題と関連して、種々の胎盤機能検査法が臨床応用されている。しかし、分娩予定日は真の授精日の把握の困難さから最終月経より起算する方法により求められており、真の妊娠持続日数を基になされていない。著者は、1周期に1回のみ授精 (Single AID) により妊娠した例、すなわち、授精日を確定できる症例を対象にして産科学上最も重要な課題の1つである真の妊娠持続日数を求め、それを基礎として、分娩予定日超過と胎盤機能との関連を主な目的として検討した。また、同時に Single AID を対象とすることにより、生殖生理学上の授精日周辺の2~3の間

題、すなわち、排卵日と授精日の検討による精子、卵子の妊孕性維持日数、授精日による新生児の性比など Single AID でなければ確認しえない課題についても検討した。

II. 研究対象と研究方法

1960年から1972年までに、慶応病院産婦人科家族計画相談所において実施された Single AID による妊娠分娩例のうち、当病院産科での分娩例および当病院産科以外での分娩の場合、本人または該当病医院あて文書で回答を求めて、基礎体温表の入手と正確な分娩日を把握しえた例、529例を対象とした。なお、帝切分娩例、分娩誘発例はすべて除外した。また、慶応病院産科および東

京歯科大学市川病院において, Single AID 妊娠例52例 (いずれも正常産, 生児をえた症例のみ) を対象として, 妊娠36週以後, 以下の検査を行った.

1) 尿中 Estriol 値 (以後 E_s と略す)

24時間蓄尿を持参させ検体採取.

検査方法, Brown 神戸川法¹⁵⁾, Amberlite XAD-2法

2) 血清 L-Cystine Aminopeptidase (以後 CAP と略す)

2 ml 採血, 検査方法, 和田変法³⁵⁾

3) 血清 Heatstable alkaline Phosphatase (以後 HS-AP と略す)

5 ml 採血

検査方法, 56°C 30分間熱処理後 Alkaline Phosphatase 測定法にしたがつた.

III. 研究成績

A) Single AID 妊娠分娩例の臨床成績

1) 授精日と排卵日との関係

Single AID 妊娠例 529 例について授精日と排卵日との関係を表わしたのが図1で, 基礎体温表上, 推定排卵日である低温最終日を O-day として, その前を (-), その後を (+) で示した. 妊娠例の授精日は -5 日より +4 日にわたり分布しているが, O-day の授精例が167例 (31.5%) と最も多く, -2 日より O-day までの授精例が400例 (75.6%) をしめる. しかし, 基礎体温の上昇期にも65例 (12.3%) が妊娠している.

Single AID 授精日と排卵日との関係
(1960~1972年)

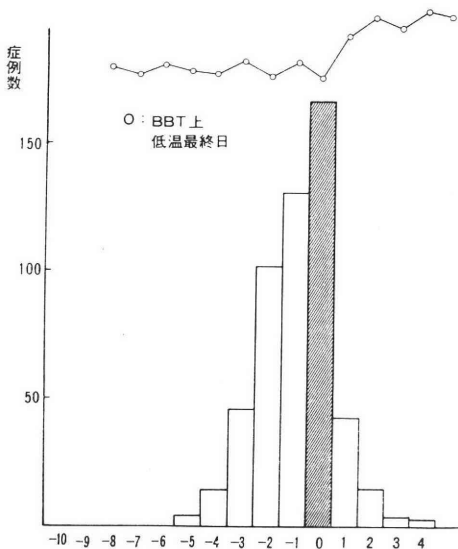


図 1

2) 妊娠持続日数について

Single AID 妊娠分娩例 529 例において妊娠持続日数を調べると, 排卵日起算の妊娠持続日数平均とその標準偏差は 265.85 ± 5.95 日 (260~272日) で, このうち O-day 起算266日目に分娩しているのは40例 (7.5%), 266 ± 5 日の間には365例 (68.9%) が分娩している. また, 人工授精日からでは 265.96 ± 7.54 日 (259~274日), 最終月経第1日目起算では, 278.01 ± 7.84 日 (271~286日) であった (図2).

Single AID 妊娠例平均妊娠持続日数

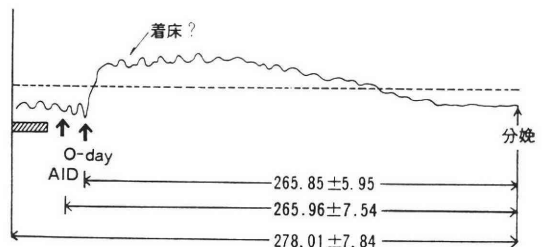


図 2

3) 分娩予定日超過率

O-day 起算の妊娠持続日数より, 排卵日起算272日をこえる症例を分娩予定日超過例 (理論値) と考えると Single AID 妊娠分娩例 529 例中には51例 (9.64%) 存在した. また, 臨床上分娩予定日超過としてよく用いられる Naegle 式算出法による妊娠持続日数294日以上の症例は8例 (1.51%) にすぎなかった (図3, 表1).

4) 分娩予定日超過児死亡率

Single AID 妊娠分娩例529例中, 排卵日起算272日をこえる51症例の児死亡率は今回の調査では0であった.

5) 妊娠持続日数と児体重の関係

O-day 起算の妊娠持続日数平均値および, その標準偏

Single AID 妊娠例の予定日超過率

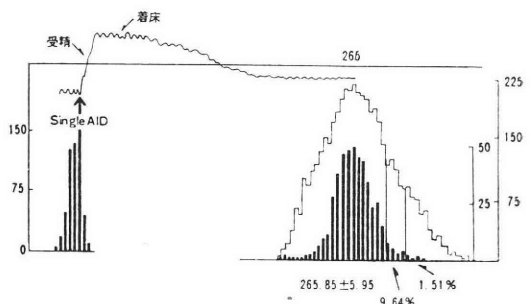


図 3

表 1 非配偶者間 1 周期 1 回授精妊娠例の
晩期産頻度 (1960~1972年)

Single AID	早 産	正 期 産	晩 期 産
529	11 2.07%	510 96.42%	8 1.51%

排卵日起算 妊娠持続 日数	183~259	260~272	273~
Single AID			
529	65 12.29%	413 78.07%	51 9.64%

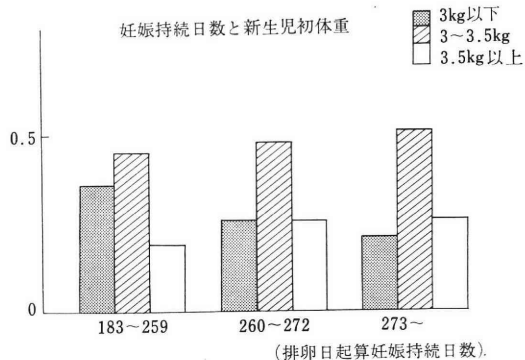


図 4

差値より、妊娠持続日数183~259日まで(以下いずれもO-day 起算)を早産、260~272日まで正期産、273日以上を晩期産と考え、妊娠持続日数と児体重の関係をみると図4のようである。早産群にて3000gr 以下がわずかに多く認められるが、正期産と晩期産群では変動を認めず3500gr 以上が晩期産に多いとは思われなかった。

6) 授精日と児の性比

Single AID 妊娠分娩例529例の男女児の比率は271:258で男児が女児に比して多い。しかし、授精日別の児の性比は-2~+1日までの授精例では差がなく、また、推定排卵日を中心として、その前後で児の性比は有意水準5%にて有意の差はみられなかった(図5、表2)。

B) 胎児胎盤機能検査との関連

1) 尿中 E_s 値の変動

Single AID 妊娠例52例の経日の尿中 E_s 値は妊娠持続と共に増加傾向を示し、日別平均値では、妊娠持続日数 O-day 起算 257 日で最高値となり以後下降している(図6)。

4回以上測定しえた Single AID 妊娠例34例の E_s 値のパターンは、全例妊娠経過と共に増加し最高値を示した後下降して分娩にいたる、いわゆる下降型であった。

授精日と児性比

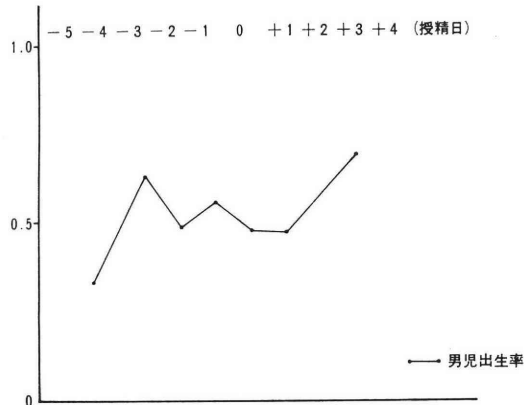


図 5

表 2 授精日と児の性比

	♂	♀	計	男児出生率
+4	2	1	3	0.666
+3	2	2	4	0.500
+2	11	4	15	0.733
+1	20	23	43	0.465
0	80	87	167	0.479
-1	72	59	131	0.550
-2	49	53	102	0.480
-3	29	17	46	0.630
-4	5	9	14	0.357
-5	1	3	4	0.250
計	271	258	529	$\frac{271}{258} = 1.05$

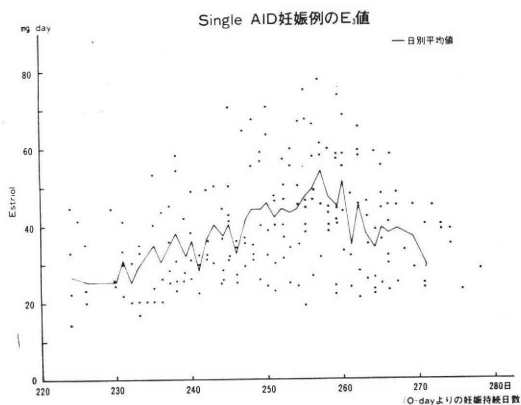


図 6

そして、分娩日を基準として図示すると、分娩7~10日前に最高値を示す症例は25例(73.5%)みられた(図7)。

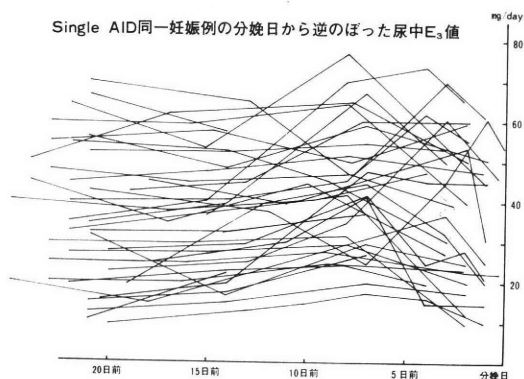


図 7

2) 血中 CAP 値の変動

Single AID 妊娠例52例の血中 CAP 値は妊娠経過と共に増加傾向を示すが、そのバラツキは大きい。4回以上測定しえた34例の CAP 値のパターンは、いわゆる上昇型と下降型がみられ、上昇型16例(47%)、下降型18例(53%)であり、その下降型の中で排卵日起算250~

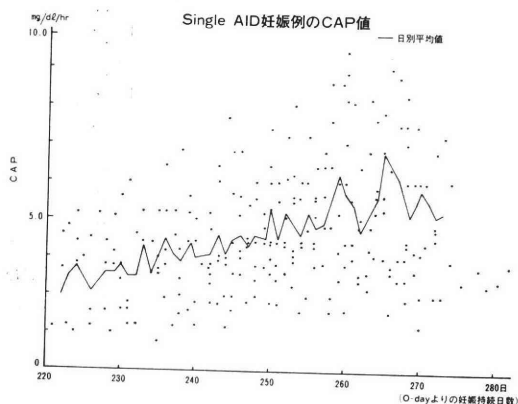


図 8

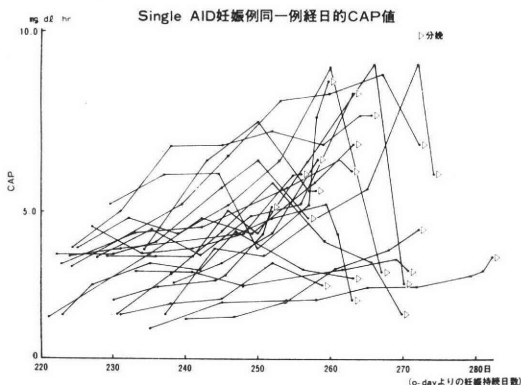


図 9

252日にピークに達し以後下降して分娩にいたるもの4例, 259~261日では6例, 266~267日では4例, 269~272日では4例であった(図8, 9).

3) 血中 HSAP 値の変動

Single AID 妊娠例52例の HSAP 値は妊娠持続と共に増加傾向を示し、日別平均値では O-day 起算260日目に最高値を示している。また、頻回に測定しえたHSAP 値のパターンは山口のいわゆる上昇型、下降型、不安定型に分けられ、上昇型は34例中28例(82.3%)、下降型5例(14.7%)、不安定型1例(3.0%)であった(図10, 11).

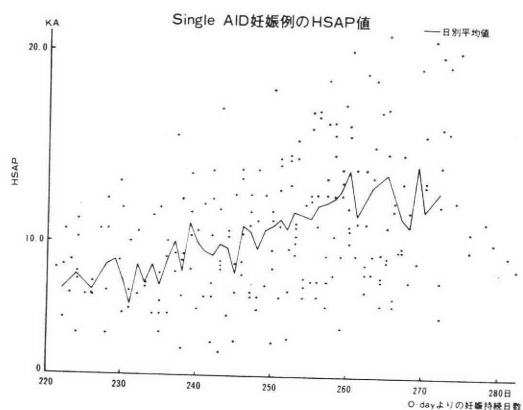


図 10

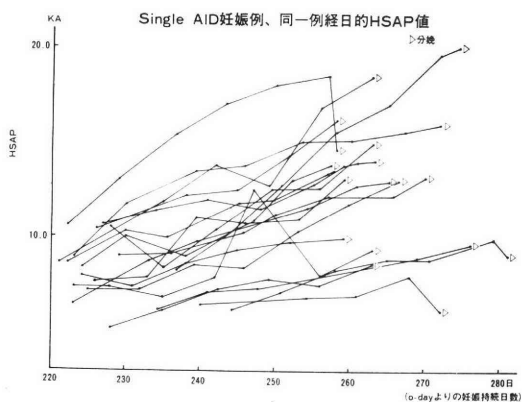


図 11

4) 尿中 E₃ 値、血中 CAP 値、HSAP 値の3者の相関について

Single AID 妊娠例における頻回に測定しえた3者のパターンを検討してみると、O-day 起算266日前後の分娩例では E₃ 値は下降型、HSAP 値は上昇型、CAP 値は上昇型、下降型を示す例が多く、266日を超過するにしがいい、HSAP 値が下降型、不安定型をとる傾向が

表 3 妊娠持続日数と尿中 E₃ 値, 血清CAP, HSAP 値との関連

	I	II	III	IV	V	
E ₃ の 型	下 降 型					
HSAPの型	上昇型	上昇型	下降型	下降型	不安定型	
CAPの型						計
O-day よりの妊 娠持続日数 (日)	上昇型	下降型	上昇型	下降型	下降型	
~265	9	2	/	/	/	
266	2	6	/	/	/	
267~273	2	5	1	/	/	
274~279	/	2	1	2	1	6
280	/	/	1	/	/	1
	13	15	3	2	2	34

みられた (表 3)。

IV. 考 案

1) 基礎体温表, 頸管粘液の性状, 膣スミア等を考慮して, 施行された Single AID 妊娠例の授精日と排卵日との関係では (図 1), 基礎体温 - 2 日より O-day までの 3 日間に, 75.6% が妊娠している。しかし, 基礎体温上昇期の授精による妊娠も全体の 12.3% 存在しており, 基礎体温表上, 低温最終日と推定排卵日が必ずしも一致しないと思われる例がある。それは, 飯塚の基礎体温表の分類^{12, 13)}に従うと, 定型的 2 相性以外での基礎体温表上での O-day 決定の問題, また, 低温最終日 = 排卵日としているが, Buxton & Engle によると体温上昇第 1 日目の開腹所見では 18 例中 6 例は未排卵であった¹²⁾ということよりも, O-day 決定が容易でないことがうかがえる。しかし, 大多数例では基礎体温表上, - 2 日より O-day に妊娠しており臨床応用には基礎体温表上, 低温最終日を排卵日と考えることは妥当である。

2) 分娩予定日 (妊娠持続日数) の算出方法は, 今日多数みられるが, 現在最も広く用いられているのは, 正常健康婦人の月経周期を 28 日とし, 最終月経第 1 日目より起算する Naegle 式算出法である。すでにその方法で報告されている妊娠持続日数をみると, 飯塚ら¹²⁾ 278.7 ± 1.1 日, 梅沢ら³⁴⁾ 279.1 ± 13.7 日, 松田ら²⁰⁾ 278.2 ± 13.4 日, Eastman ら⁹⁾ 280.8 ± 12.88 日, Magram ら¹⁰⁾ 276.5 ± 16.1 日, 著者の Single AID の調査にても 278.01 ± 7.84 日で, いずれも標準偏差が 2 週間前後である。また, この方法では約 60% が ± 8 日以内に分娩する⁹⁾といわれているが, 鈴木によれば³⁰⁾ Naegle による

予定日の ± 14 日以内に約 70% しか分娩にいたっていない。これは, 月経周期, 特に, 卵胞期の変動が大である妊孕期婦人において, 妊娠の成立していない最終月経第 1 日目より起算するがぎり, 個々人の違いはもとより正常月経周期および周期毎の日数変動を考慮すると, 分娩予定日は, やはり ± 14 日間の幅を考えざるをえないと思われる。

3) しかし, 推定排卵日 もしくは 授精日が明確な場合, それに比してより正確な在胎日数の統計値がえられる。当教室の吉田³⁸⁾ は, さきに Single AID 妊娠分娩例 47 例の妊娠持続日数は 264.95 ± 1.65 日と報告している。著者は Single AID 妊娠分娩例 529 例につき排卵日および授精日より起算した妊娠持続日数を求めたが, 両者とも 266 日が妊娠期間であるとされている理論値に一致する結果であった。

4) 予定日超過の定義に関してこんにちまでの諸家の報告を総括すると, Naegle 式算出法による分娩予定日すなわち 280 日より 2 週間を超過しているものを, 予定日超過妊娠と定義しているのが Biermann¹⁾, Evans²⁾, Mead¹⁸⁾ 等最も多い。分娩予定日超過の頻度は報告者により最終月経起算で 3.5~20% とかなりの差が認められる。松田²⁰⁾ は一般妊娠例において 7.3% の予定日超過率が月経歴や初発胎動自覚日等より再検討すると 4.3% という結果を示したと報告しているが, 著者の Single AID 妊娠例 529 例における調査では, わずかに 1.51% であった。すなわち, 真の予定日超過率は極めて低率にしか存在しない。以上のことより, 自然妊娠分娩例においても, 分娩予定日や分娩予定日超過等定義のあいまいさや, 診断上の問題点など更に考慮されれば, 実際には, 分娩予定日超過率はより少ないものであると考察される。

5) 予定日超過妊娠に関して胎児の大きさが問題となるが, 妊娠持続日数と新生児初体重とは必ずしも一致しない。著者の成績からも Single AID 妊娠分娩例において 3500gr 以上のものが予定日超過例に特に多くはなかった。

6) 児の自然性比は 100 対 106 といわれているが, 著者の今回の調査では ♀ : ♂ = 100 : 105 であった。AID 授精日と新生児の性比の関連について, Guerrero³⁹⁾ は AID 240 例 (米国の数カ所の機関より集めた症例) において, 男児出生率は推定排卵日 (O-day) に最も高い (62.1%) 山型曲線を描くと報告し, 全く逆の結果をえた自然妊娠例との比較で, 異なる環境下での精子の生存能, 妊孕能の差を原因としてあげている。著者の場合, 同一機関での Single AID 529 例において, 授精日と児の性比との間には有意の差はみられなかった。しかし, 頸管粘液, 精子

輸送, 腔プールの問題, 異なる環境下での精子の生存能妊娠能および環境に対する母体側の内分泌学的生殖学的研究とも関連がありその結論は今後にまちたい。

7) 尿中 Estriol 値

妊娠末期に尿中 Estrogen が増量し, その大部分のものが E_3 であることはよく知られており²⁸⁾²⁹⁾³⁰⁾, 従って, 妊娠経過中の E_3 値の測定が臨床的に胎児胎盤機能を知る上で意義があるといわれている。すなわち, E_3 の産生には胎児の副腎や肝臓が大きく関与しており²⁸⁾, また妊娠末期の尿中 E_3 の測定により, 胎盤機能のみならず, 胎児の生活環境をもうかがい知ることができる²⁸⁾。Brown²⁾, 塚田³¹⁾は妊娠38週で, 斉藤²⁹⁾は妊娠39週で, 中山²³⁾は分娩前8~14日目に E_3 値がピークになると報告している。また, 我が教室の曾³²⁾は, 妊娠38週より41週にかけて E_3 値はほとんど差がないとしている。著者の成績では Single AID 妊娠例正常産生児を得た症例において, E_3 値は妊娠経過と共に増加し, 最高値を示した後下降して分娩にいたる下降型を示したが, 分娩7~10日前に最高値を示した症例は25例(73.5%)にみられた。

8) 血清 L-Cystine Aminopeptidase

1957年に Tuppy³²⁾が L-Cystine Aminopeptidase (CAP) を Oxytocinase 活性値の測定に利用しうることを見出した。その Oxytocinase は非妊婦や男子の血中にはほとんど存在しないとされているが CAP は少量証明されている。CAP は主として妊婦の血中に存在し, その測定値は胎盤機能を反映し妊娠持続の判定を行う一指標と考えられている。CAP 値の妊娠中の変動は妊娠初期より増加傾向を示し¹¹⁾¹⁴⁾²⁶⁾妊娠月数の診断に応用しうとする人もあるがこれに否定的な報告もある。妊娠後期の CAP 値の変化については, 特に, 変動を示さないとする説⁵⁾¹⁴⁾²⁶⁾, 下降して分娩にいたるとする説²⁴⁾³⁶⁾, 上昇傾向を示しつつける説¹⁰⁾¹⁹⁾²²⁾²⁷⁾あるいは, 上昇型, 下降型, 停滞型, 不安定型の4つのパターンに分類する説²⁵⁾などがある。著者の Single AID 妊娠例正常産生児を得た症例においては CAP 値は妊娠経過につれて上昇し, 分娩1~2週間前の間にピークに達し以後下降して分娩にいたる下降型と, 妊娠経過につれて上昇しつづけ, そのまま分娩にいたる上昇型の2型に分類された。また, 分娩予定日を過ぎると胎盤機能不全, fetoplacental dysfunction 等が問題となるが, 和田³⁶⁾は分娩予定日を過ぎると CAP 活性は減少すると述べている。いずれにしても, CAP 値は胎盤機能の一指標となりえても単独では妊娠経過を推測することは出来ない。

9) 血清 Heat-stable Alkaline Phosphatase

妊娠時アルカリ・フォスファターゼの増量することは

1934年 Coryn³³⁾により発見され, 妊娠経過につれて増量するものは, Naele²¹⁾により HSAP (56°C 30分間熱処理をしても失活しないことを証明された) と呼ばれ, これは胎盤起源のものであると報告されている。この HSAP は妊娠経過と共に増加し妊娠第10カ月において, その活性値は最高を示す^{17,25)}とされ胎盤の Damage で異常に上昇する⁴⁾ともいわれている。また, 山口³⁷⁾は妊娠末期の HSAP の活性値のパターンを上昇型, 下降型, 停滞型, 不安定型の4型に分け, 正常産群では上昇型が多く不安定型は少ないと報告している。著者の Single AID 妊娠例正常産生児をえた症例においても上昇型が82.3%と最も多く, 下降型(14.7%), 不安定型(3.0%)は少なかった。また, 妊娠経過とともに増加傾向を示す HSAP 値は Single AID 例においてもバラツキが大きかった。

V. 結 論

1. Single AID 妊娠分娩例529例の排卵日起算の妊娠持続日数は 265.85 ± 5.95 日, 人工授精日からは 265.96 ± 7.54 日, 最終月経第1日目よりは 278.01 ± 7.84 日であった。

2. 分娩予定日は O-day 起算266日目である。

3. 妊娠持続日数が排卵日起算280日をこえる症例を分娩予定日超過とした場合, 529例中1.51%(8例)存在した。

4. Single AID 529例において, O-day の授精により31.5%(167例), -2~O-day までの間に75.6%(400例)が妊娠している。

5. Single AID 妊娠分娩例529例において, 児の性比は♀:♂=100:105, 授精日と児の性比の間には有意の差は認められなかった。

6. Single AID 同一妊婦の経日的尿中 E_3 値のパターンは全例下降型を示し, 分娩7~10日前に最高値を示す症例は73.5%(25例)みられた。

7. Single AID 同一妊婦正常産生児をえた症例の血清 CAP 値のパターンは上昇型47%, 下降型53%に分類された。

8. Single AID 同一妊婦正常産生児をえた症例の血清 HSAP 値のパターンは, 上昇型82.3%, 下降型14.7%, 不安定型3.0%がみられた。

稿を終えるにあたり, 本研究に御指導, 御校閲を賜った恩師飯塚理八教授に謹んで感謝の意を表します。また, 終始, 御指導を戴いた東京歯科大学市川病院大野虎之進院長および当教室小林俊文講師に心から感謝致します。

測定にあたり御協力戴きました慶応病院家族計画相談

所ならびに市川病院産婦人科の各位に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨は、昭和47年度日産婦関東連合地方部会および昭和48年度第18回日本不妊学会総会において発表した。

参 考 文 献

- 1) Biermann, J. M. et al.: Analysis of the outcome of all pregnancies in a community, *Am. J. Obst. & Gynec.* 91 : 37, 1965.
- 2) Brown, J. B.: Sex-hormone excretion, *Lancet* (London) CCLXXI, 955, 1956.
- 3) Coryn, G.: *J. chir* (Paris). 213, 1934.
- 4) Cursen, P. & Morris, I.: Serum alkaline phosphatase in the hypertensive disorders of pregnancy, *J. Obst. Gynec. Brit. Comm.* 72: 397, 1965.
- 5) Dicker, S. E. & Whyley, G. A.: Inactivation of oxytocin by plasma of pregnant women, *J. Obst. & Gynec. Brit. Emp.* 66 : 605, 1959.
- 6) Eastman, N. J. & Hellman, L. M.: *Williams Obst.* 13th Edition. P. 219, Appleton-Century-Crofts Division of Meredith Publishing Company, N. Y. 1966.
- 7) Evans, T. N. Kaeff, S. T. & Morley, G. W.: Fetal effects of prolonged pregnancy, *Am. J. Obst. & Gynec.* 85 : 701, 1963.
- 8) Greenhill, J. P.: *Obstetrics*, 13th Edition p.257, W. B. Sanders Co. Philadelphia London 1965.
- 9) Guerrero, R.: Association of the type and time of insemination within the menstrual cycle with the human sex ratio at birth, *The New England Journal of Medicine*, 14: 1056, 1974.
- 10) Hilton, J. G., Johnson, R. F.: Changes in blood oxytocinase during parturition, *Am. J. Obst. & Gynec.* 78 : 479, 1959.
- 11) 橋本武次: Studies on L-Cystine aminopeptidase, Part II. Clinical observations, *J. Jap. Obst. & Gynec.* 8 : 96, 1961.
- 12) 飯塚理八, 吉田 豊: Single insemination よりみたる 2 ~ 3 の問題について, *産婦の実際*, 11 : 429, 1962.
- 13) 飯塚理八: 基礎体温曲線の臨床的利用価値, *産婦の実際*, 12 : 194, 1963.
- 14) 金沢太郎: Pitocinase に関する知見補遺, *日産婦誌*, 5 : 101, 1953.
- 15) 神戸川明: 妊婦尿中 Estriol の簡易測定法, *ホと臨床*, 19 : 355, 1971.
- 16) Magram, H. & Cawanagh, W.: The problem of postmaturity, *Am. J. Obst & Gynec.*, 79 : 216, 1960.
- 17) McMaster, Y. et al.: The mechanism of the elevation of serum alkaline phosphatase in pregnancy, *J. Obst. Gynec. Brit. Comm.*, 71 : 735, 1964.
- 18) Mead, P. B. & Marcus, S. L.: Prolonged pregnancy, *Am. J. Obst & Gynec.*, 89 : 49, 1964.
- 19) Müller-Hartburg, W. H. Nesvadba und H. Tuppy., *Die Anwendung einer chemischen Methode zur Bestimmung des Oxytocinase-spiegels im Schwangerenserum*, *Arch, Gynäk*, 191 : 442, 1959.
- 20) 松田正二, 杉山好広: 予定日超過, *臨産婦*, 24: 681, 1970.
- 21) Neale, F. C., J. S. Clubb, D. Hotdikis and S. Posen.,: Heat stability of human placental alkaline phosphatase, *J. clin. Pathol.* 18: 359, 1965.
- 22) 中山方郎: 分娩前後における血中子宮収縮物質ならびに拮抗物質に関する研究, *産婦の世界*, 13 : 569, 1961.
- 23) 中山徹也: 産婦人科領域における Estrogen の代謝と意義に関する研究, 第17回日産婦総会宿題報告, 1965.
- 24) 並木 勉: 脳下垂体後葉「ホルモン」拮抗物質に関する研究, *日産婦誌*, 4 : 819, 1952.
- 25) 延谷寿太郎: 産科領域における L-Cystine Aminopeptidase に関する研究, *日産婦誌*, 26 : 299, 1974.
- 26) Page, E. W.,: The value of plasma pitocinase determinations in obstetrics, *Am. J. Obst. & Gynec.* 52 : 1014, 1946.
- 27) Riad, A. M.,: Studies on pregnancy serum cystine aminopeptidase activity "Oxytocinase", *J. Obst. Gynec. Brit. Comm*, 69 : 409, 1962.
- 28) Smith, G. H. & Smith, O. W.,: Estrogen and progestin metabolism in pregnant women with special reference to pre-eclamptic toxemia and the effect of hormone administration. *Am. J. Obst & Gynec.*, 39 : 405, 1940.
- 29) 齊藤淳一: 尿中卵胞ホルモンの比色定量法および妊娠, 分娩, 産褥時に於ける該ホルモン尿中排泄量の変化, *日産婦誌*, 7 : 473, 1955.
- 30) 鈴木雅洲, 高橋克幸: 分娩予定日超過の定義, *産と婦*, 38 : 741, 1971.
- 31) 曾 敏明: 妊娠末期胎児胎盤系機能検索に関する研究, *ホと臨床*, 16 : 447, 1968.
- 32) Tuppy, H. & Nesvadba, H.,: Über die Aminopeptidaseaktivität des Schwangerenserums und ihre Beziehung zu dessen Vermögen, Oxytocin zu inaktivieren *Mh. chem.* 88 : 977, 1957.
- 33) 塚田一郎: 妊娠中毒症の胎盤機能に関する研究一尿 Estriol を指標として, *日産婦誌*, 18 : 535, 1966.
- 34) 梅沢 実: 分娩発来に関する研究, 第17回日産婦総会宿題報告, 1965.

- 35) 和田 等: 血清 L-Cystine aminopeptidase の新測定法, 日産婦誌, 18: 1077, 1966.
- 36) 和田 等: 産科領域における血清 CAP の臨床応用について, 日産婦誌, 18: 1169, 1966.
- 37) 山口竜二, 吉田 威, 矢崎士郎: 妊婦血清耐熱性アルカリフォスファターゼによる胎盤検査法について, 日産婦誌, 20: 567, 1968.
- 38) 吉田 豊: Studies on single insemination with donor's semen, J. Jap. Obst & Gyn. Soc., 7: 19, 1960.
- 39) Zondek, B., Goldbey, S.,: Placental function and foetal death, J. Obst & Gynec. Brit. Emp. 64: 1, 1957.

Studies of single AID (artificial insemination of donor) and the estimated date of confinement

Eiko Kobayashi

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University
(Director: Prof. Rihachi Iizuka)

Clinical study was made on 529 women who had become pregnant by the single AID. The following results were obtained.

(1) The number of days of pregnancy was 265.85 ± 5.95 days from the ovulation day, 265.96 ± 7.54 days from the day of artificial insemination of donor, and 278.01 ± 7.84 days from the 1st day after the last menstruation.

(2) The estimated date of confinement was the 266th day after the ovulation.

(3) When the women in whom the duration of pregnancy was more than 280 days after the ovulation were regarded as those with excess of the estimated date of confinement those women were observed in 8 of 529 women (1.51%).

(4) Of 529 pregnant women, 167 (31.5%) became pregnant by the insemination of the ovulation day, and 400 (75.6%) became pregnant between -2 and 0 day of the ovulation.

(5) The sex ratio of the babies was ♀:♂ = 100:105. There was no significant difference between the day of insemination and the sex ratio of the babies.

(6) In all women who were delivered normally, urinary levels of E_3 tended to decrease. On the other hand, blood levels of CAP were divided into the pattern of increase (47%) and the pattern of decrease (53%). In many women, blood levels of HSAP tended to increase (82.3%).

(受付: 昭和52年 7 月25日)

SIGNIFICANCE OF JONES-JONES OPERATION ON DOUBLE UTERUS

—VASCULARITY AND DATING OF ENDOMETRIUM IN UTERINE SEPTUM—

Kinichiro MIZUNO, Koichi KOIKE, Katsuya ANDO,

Osamu HIRATA and Yoshiaki YAGAMI

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University
Medical School

Abstract: In eighteen patients associated with the double uterus, the vascularities in the uterine septum were studied angiographically and histologically, and in three of them the histologic changes of the endometrium were studied. Pelvic angiograms were studied before and after Jones-Jones operation in each case. These angiograms indicated that blood vessels in the septal tissues were scanty, while that the anastomosed uterine fundus after excision of the uterine septum have larger number of blood vessels. The septal tissues of the uterus were stained by hematoxylin-eosin and the number of blood vessels distributed in these tissues were counted under the microscope. The average number of blood vessels in 40 fields was 119 ± 36 in the septal tissues, as contrasted to 235 ± 42 in the fundi of the normal uteri. It was demonstrated that the vascularity in the septum of the double uterus was poorly developed.

On the other hand, the histologic picture of the endometrium was the same throughout the whole uterus including the excised septal area.

These results suggest that Jones-Jones operation on the double uterus not only reforms the uterine cavity, but also improves the blood circulation in the uterine wall because the poorly vascularized septal area has already been removed and results in a favorable environment for the development of the fertilized ovum.

Introduction

The malformed uterus does not always cause the complicated pregnancy and labor. However, many investigations have indicated that there is a high incidence of abortion, premature labor and difficulties of labor in cases associated with the bicornate uterus.

Ruge¹⁾ in 1884 first reported the vaginal incision of a uterine septum in a woman who had had two abortions, followed by a full term delivery. The popularized surgical unification for the double uterus include two techniques originated by Strassmann²⁾ and Jones-Jones³⁾ respectively, although it remains to be established which might be the

better concerning the success rate in delivering a live infant.

Our previous report⁴⁾ has demonstrated that Jones-Jones' operation for unification of the double uterus is more effective on bearing living infants than Strassmann's operation, and have suggested that this favorable result might be due to the well reformed uterus by Jones-Jones' operation.

In this report, the vascularity of the septal area together with endometrium of the area was studied to evaluate the further advantage of Jones-Jones' operation.

Materials and Methods

Jones-Jones' operation was performed in

eighteen patients who had history of sterility or repeated abortions and were diagnosed to have a bicornate uterus by hysterosalpingography. In all patients, the pelvic angiography by Seldinger method and the hysterosalpingography was performed with the uterus kept in the same position before the operation. The same procedures were then repeated three or six months after Jones-Jones' operation. The pelvic angiography was performed at 5th to 10th day of the menstrual cycle.

Thus, the vascular pattern of the septal area or the reformed fundus portion could be accurately recognized by overlapping a hysterosalpingogram on a pelvic angiogram.

In nine of all patients, the uterine septal tissues excised by Jones-Jones' operation were sliced and stained with hematoxylin-eosin. After then, the number of blood vessels distributed in the septal tissues were calculated microscopically by Schwalm' method⁵⁾, and compared with those in the normal uterine fundi of 3 women whose uteri were removed because of other diseases.

In three cases, before Jones-Jones' operation, some specimens of the endometrium were obtained from the uterine septum, anterior, posterior and lateral sides of the uterus by curettage. Three months after the metroplasty, endometrial biopsy was performed again in each case by the same way as before the operation including the endometrium of the reformed fundus. All specimens were examined histologically and the dating of menstrual cycle to which the appearance of each specimen correspond was diagnosed by Noyes method⁶⁾.

Results

Radiologically, the vascularities in the uterus septa were interpreted as poorly developed, while the reformed uterine fundus after Jones-Jones' operation appeared to have abundant blood vessels. Fig. 1 is a pre-operative enlarged angiogram which shows scant blood vessels in the uterine septum as evidenced by faint visualization of contrast medium. Fig. 2 is a post-operative enlarged angiogram in the same case. This shows abundant blood vessels in the reformed

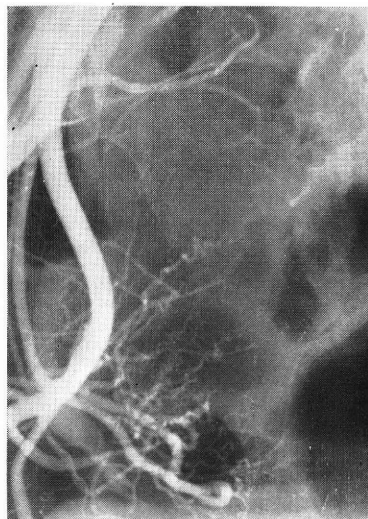


Fig. 1 Pre-operative pelvic angiogram ($\times 4$) scanty vascularity is noted in the area which the uterine septum corresponds to.

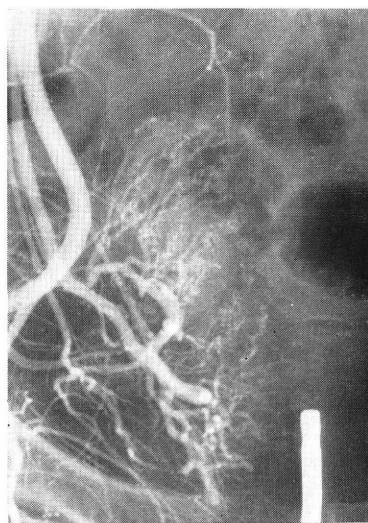


Fig. 2 Post-operative pelvic angiogram ($\times 4$) vascularity in the uterine fundus obviously increased (the same case in Fig. 1)

portion which has been repaired by a triangular excision of the muscular septum.

The histologic picture of a septal tissues of a double uterus is shown in Fig. 3 and that of a fundus of a normal uterus in Fig. 4. Table 1 lists the number of blood vessels in the uterine septum of nine cases with double uterus and in the normal uterine

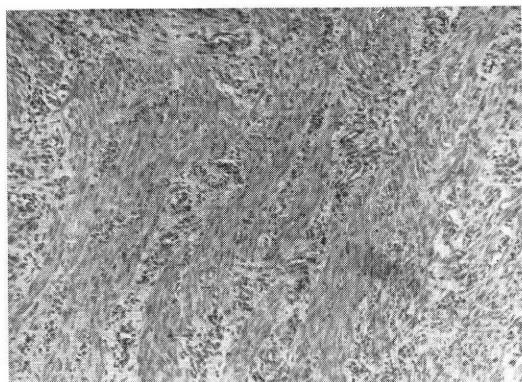


Fig. 3 Microscopical figure of the uterine septum. Blood vessels the septum are poorly distributed

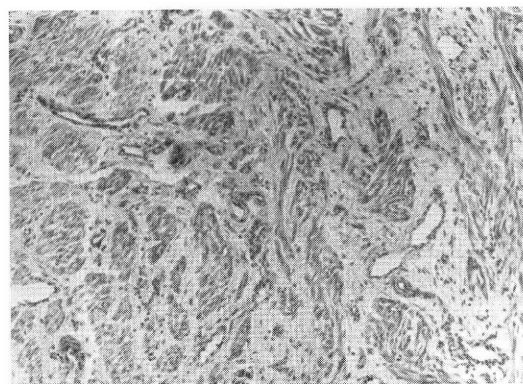


Fig. 4 Microscopical figure of the normal uterine fundus ($\times 200$)

fundus of three cases. The average number of the blood vessels in 40 fields of microscope was 119 ± 36 in the uterine septa and 235 ± 42 in the normal uterine fundi. It was noteworthy that the uterine septa had

Table 1 The number of blood vessels distributed in uterine muscle

1) uterine septum				
no.	case	age	number of blood vessels in 40 fields	
1.	T.M.	31	147	
2.	Y.S.	29	158	
3.	K.T.	24	81	
4.	M.Y.	24	136	
5.	S.Y.	24	180	
6.	M.Y.	28	116	
7.	M.H.	30	71	
8.	S.N.	26	87	
9.	K.N.	28	96	
average			119±36	

2) normal uterine fundus				
no.	case	age	number of blood vessels in 40 fields	
1.	S.H.	38	205	
2.	F.M.	31	294	
3.	S.F.	36	206	
average			235±42	

Table 2 Dating of endometrium obtained from various site of uterus

1) before Jones-Jones operation						
case No.	cyclic day of endometrial biopsy	dating of endometrium				
		(septal wall)	(anterior wall)	(right wall)	(left wall)	(posterior wall)
1.	8	mid-proliferation	mid-proliferation	mid-proliferation	mid-proliferation	mid-proliferation
2.	10	late-proliferation	late-proliferation	late-proliferation	late-proliferation	late-proliferation
3.	17	3rd day of secretion	3rd day of secretion	3rd day of secretion	3rd day of secretion	3rd day of secretion
2) after Jones-Jones operation						
case No.	cyclic day of endometrial biopsy	dating of endometrium				
		(fundus wall)	(anterior wall)	(right wall)	(left wall)	(posterior wall)
1.	9	mid-proliferation	mid-proliferation	mid-proliferation	mid-proliferation	mid-proliferation
2.	11	late-proliferation	late-proliferation	mid-proliferation	late-proliferation	late-proliferation
3.	17	3rd day of secretion	3rd day of secretion	3rd day of secretion	3rd day of secretion	3rd day of secretion

scanty blood vessels than the normal uterine fundi.

The histologic picture of the endometrium remained the same in the anterior wall, posterior wall, lateral wall, septal wall or reformed portion, only if the curettages are performed on the same day of the menstrual cycle. There is no difference on the dating of the endometrium diagnosed by Noyes criteria between the uterine septum or the repaired portion and the other site of the uterus (Table 2).

Discussion

A malformed uterus is not always associated with gynecological and obstetrical difficulties, e.g. dysmenorrhea, sterility, repeated abortions or premature labor. However, it has long been recognized that in cases associated with double uterus there is a high incidence of abortion, premature labor and accidents of labor associated with this anomaly.

Recent experiences have suggested that in properly selected cases plastic repair of double uterus may be indicated. The popularized plastic unifications of double uterus are Strassmann operation²⁾ and Jones-Jones operation³⁾. The technical procedure described by Strassmann is as follows: the uterus is incised transversely from cornu to cornu across the uterine fundus with final suture line in the anterior-posterior midplane of the uterus. Such a procedure incises rather than excises the septum. On the other hand, the technical point of Jones-Jones' procedure is that the muscular septum, by a triangular incision, was excised, resulting in a final vertical midline incision. This has the additional advantage of avoiding injury to the cornus. The availability of Jones-Jones' operation was further supported by Jones⁷⁾, while Thompson⁸⁾ and Sala⁹⁾ have advocated the validity of Strassmann' operation. The final assessment as to which operation is more effective remains to be established.

We had practiced Strassmann operation in fourteen cases and Jones-Jones operation in eighteen cases, all of them had had history of sterility or one or more abortions where

no other cause could be ascribed to. As the result of our practice, the incidence of living infant increased to 48.1% from 3.6% in cases treated by Strassmann operation, while it increased remarkably to 72.7% from 4.8% in the cases treated by Jones-Jones operation, and the post-operative hysterosalpingograms indicated that Jones-Jones operation reformed the uterine cavity more correctly than Strassmann operation did.

In this study, we examined the histopathology of the uterine septum, to evaluate the further advantage of Jones-Jones operation for the double uterus.

There is no histologic change in the endometria between the uterine septum and the other site of the uterus. On the other hand, the pelvic angiogram indicated that blood vessels distributed in the uterine septum were poorly developed. This finding was certified by the histological examination. These facts suggest that uterine septum itself may not interfere with the implantation of the fertilized ovum but disturb the development of the ovum implanted in it because of the poor blood supply.

In summarizing our study, it is concluded that Jones-Jones operation on the double uterus not only reforms the uterine cavity, but also improves the blood circulation in the uterine wall because of removing the poorly vascularized uterine septum.

Acknowledgment

The authors are gratefully indebted to Professor S. Sakuma and his staffs (the department of radiology of our university) for their help in this study. The contents of this study were reported in parts at the VIII World Congress of Fertility, Buenos Aires, Nov. 1974.

References

- 1) Ruge, P.: Ztschr. f. Geburt. und Gynäk.
- 2) Strassmann, E. O.: Plastic unification of double uterus. A study of 123 collected and five personal cases. *Am. J. Obst. & Gynec.* 64, 25, 1952.
- 3) Jones, H. W. and Jones, G. E. S.: Double uterus as an etiological factor in repeated abortion indication for surgical repair. *Am. J. Obst. & Gynec.* 65, 325, 1953.

- 4) Mizuno, K., Nakane, S., Watanabe, K. and Yagami, Y.: Effect of metroplasty on malformed uterus. Jap. J. Fertil. and Steril. 17, 37, 1972.
- 5) Schwalm, H. and Dubrausky, V.: The structure of the musculature of human uterus-muscles and connective tissue. Am. J. Obst. & Gynec. 94, 391, 1966.
- 6) Noyes, R. W., Hertig, A. T. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. Fertil. & Steril. 1, 3, 1950.
- 7) Jones, H. W., Delfs, E. and Jones, G. E. S.: Reproductive difficulties in double uterus. Am. J. Obst. & Gynec. 72, 865, 1956.
- 8) Sala, F. and Tellini, P.: The metroplastic operation after Strassmann. Am. J. Obst. Gynec. 84, 390, 1962.

双角子宮に対する Jones-Jones 手術の意義
—子宮中隔の血管分布と子宮内膜の
Dating—

水野金一郎 小池 皓弑
安藤 勝也 平田 修
八神 喜昭

名古屋市立大学医学部産婦人科学教室

双角子宮の中隔の血管分布を骨盤動脈撮影および組織

学的に検索し、さらに子宮内膜の Dating を行い、双角子宮に対する中隔切除を目的とした Jones-Jones 手術の意義について検討した。

習慣性流産 または 不妊の既往を有する 18 例の双角子宮患者に Jones-Jones 手術を施行する前後に骨盤動脈撮影を行い、中隔部及び中隔切除後の子宮底吻合部の血管分布を観察した結果、中隔部は血管が乏しく術後の吻合部は血管が豊富であることが認められた。

組織学的には 9 例の中隔部の血管は Schwalm 法によつて測定した結果、40 視野で 119 ± 36 で、対照の正常子宮の底部の 235 ± 42 に比して有意に血管の乏しいことがわかった。

3 例の内膜を Noyes の criteria によつて Dating を行つた結果は、中隔部の内膜は子宮腔内の他の部位の内膜との間に差はなく、また術後の子宮底吻合部の内膜も同様に他の部位の内膜との間に差は認められなかった。

以上より、双角子宮の中隔部は妊卵の着床には特に障害を及ぼすことはないが、中隔部の切除を目的とした Jones-Jones 手術は着床卵の発育にとつて単に子宮の形態を改良するのみでなく、血行不良な中隔部への着床をあらかじめ防止することにより流産を防ぐことに意義があることを示唆した。

(受付: 昭和 52 年 6 月 23 日)

外性子宮内膜症の X 線像に関する研究 —Scoring の試み

Radiological Studies on the Endometriosis Externa

東邦大学医学部産婦人科学教室

江 澤 健 夫

Takeo EZAWA

Dept. of Obstet. & Gynec., School of Medicine,
Toho University

子宮卵管造影後、開腹手術により確認された211例の外性子宮内膜症のX線像を一般不妊婦人1,105例と比較検討し、以下の成績を得た。

- 1) 外性子宮内膜症は近年増加の傾向にあり、とくに不妊を主訴とするものが多い。
- 2) 外性子宮内膜症の手術時年齢は30歳にピークがあり、21歳から50歳まで広く分布していた。
- 3) 子宮X線像による分類では、弛緩状、辺縁粗大不正、ポリープ状増生、筋腫状子宮が57%にみられ、子宮位置異常も約30%と高率であつた。
- 4) 卵管通過性については、外性子宮内膜症例では卵管周囲癒着像が比較的高率(両側性22.5%、一側性18.2%)にみられた。
- 5) 外性子宮内膜症例では両側または一側卵巣腫大像が73.6%にみられた。
- 6) 外性子宮内膜症では以上の特徴の2つまたは3つ以上が合併していることが多いので、これを子宮像、卵管像、卵巣腫大像について採点することを試みた。

外性子宮内膜症の平均年齢は34.9歳、平均 Score は2.9、術後妊娠例の平均年齢は28.4歳、平均 Score は2.7であつた。術後再手術は12例で、比較的青年の Score の高い例にみられた。

- 7) 子宮卵管造影法のような日常検査法でも、詳細に検討すれば外性子宮内膜症の特徴をよくとらえるので、とくに不妊患者では早期発見に努め、妊孕性の向上をはかるべきである。

はじめに

外性子宮内膜症は性成熟期中期以降に多発し、性器とその周辺臓器を侵し、ホルモンの影響を受け易いことから、生殖現象と密接な関連性を有することは容易に想像がつく。とくに近年頻発する傾向にあり、不妊症で開腹した例の1/3に認められるほどである。その診断法としては問診と内診による子宮周辺の硬結の触知など経験的な方法によるが、最近の内視鏡検査、ギネコグラフィー、超音波断層法といった特殊検査法も試みられつつある。しかしこれらは長年の経験を要したり、特別な設備、装置を必要とし、必ずしも一般的とはいえない。そこで産婦人科日常検査法の1つである子宮卵管造影法による外性子宮内膜症診断の可能性を造影法後開腹手術例について検討し、若干の興味ある知見を得たのでこ

に報告する。

対象と方法

1964年より1976年末までの13年間、当科外来を受診し、子宮卵管造影法(以下HSGと略す)施行後、1977年3月31日までに開腹手術により病理組織学的に外性子宮内膜症と診断された211例を対象とした。そのうちわけは、不妊を主訴とするもの191例、腫瘤その他を主訴とするもの20例である。各年度別にみると、図1のごとく、不妊群、腫瘤群ともに年々増加傾向にある。1975、76年度外来のものは今後手術対象になり、外性子宮内膜症が発見される可能性があるため、さらに増加する見込みである。

経妊経産回数は表1、表2の如くであり、不妊患者を主な対象としているので、当然妊娠回数の少ないものが

外性子宮内膜症（HSG後開腹例）の
外来年度別患者数（211例）

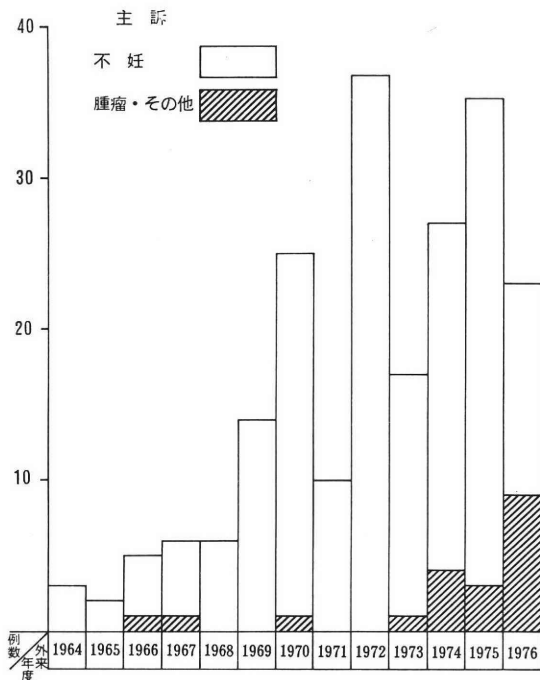


図 1

表 1 外性子宮内膜症の経妊回数

経妊回数	例数	%
0	148	70.1
1	41	19.4
2	15	7.1
3	5	2.4
4	1	0.5
5	1	0.5
計	211	100.0

表 2 外性子宮内膜症手術例の経産回数

経産回数	例数	%
0	190	90.0
1	17	8.1
2	4	1.9
計	211	100.0

多い。年齢別分布は図2の如くで、これは一般不妊婦人の年齢別分布と大差ない。

対照としたのは1974年より1976年の3年間に不妊を主訴として当科にて HSG を施行した1,105例である。

HSG 所見を子宮像、卵管像、卵巢腫大像の3項目にわけ、外性子宮内膜症における特異像を追求した。まず211例の外性子宮内膜症と1,105例の一般不妊例のX線像を各項目別に比較検討することにより、特徴的所見を見

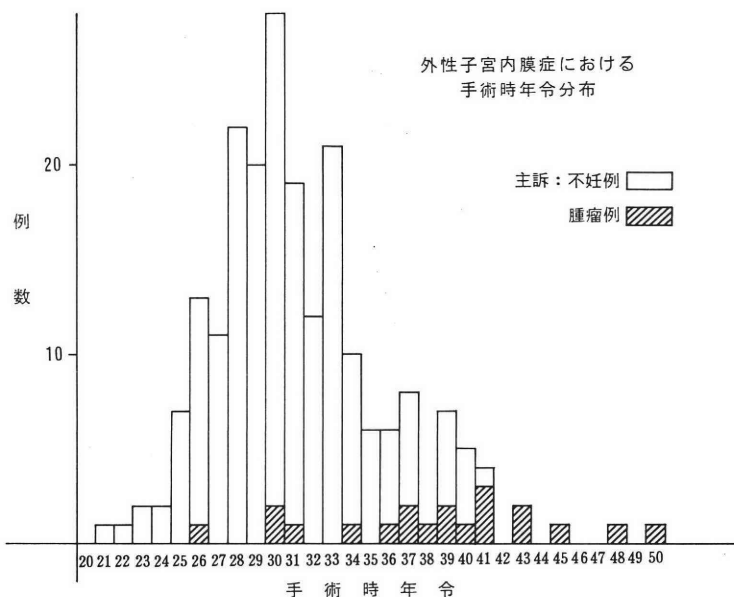


図 2

い出し、次いでそれらを指数化することによって、外性子宮内膜症の判定をより客観化することを試みた。さらに各指数ごとの術後妊娠率、保存手術か根治手術かの選択、および再手術率などについて検討し、以下の成績を得た。

成 績

1. 外性子宮内膜症の子宮X線像

HSG では内性器形態を客観的に評価するという利点を最大限に利用するために、子宮の形態的变化にも注目すべきであり、その手段として子宮X線像を主な12型に分類した。その判定基準と頻度を述べる。

a. 正常子宮像

造影剤の標準注入量を 7 ml とし、これで卵管陰影と十分な腹腔内分散像が得られ、子宮像は小骨盤腔のほぼ中央にあり、全体として逆二等辺三角形で、底辺は直線状、左右側壁は軽く内方に彎曲しているもの (写真1)。

一般不妊婦人ではこの型が45.0%を占めたのに対し、外性子宮内膜症では211例中74例、35.1%であった ($p < 0.05$, 図3)。

b. 發育不全子宮

子宮の位置によつてX線像の拡大率は異なるので、フィルム上で子宮の大小を論ずるには慎重を要する。造影剤が2, 3 ml しか注入できなかつたり、4, 5 ml で既に腹腔内に大量流入しているものを發育不全子宮とした。

一般不妊婦人ではこの型が15.4%に対し、外性子宮内膜症では211例中3例、1.4%にすぎなかつた。

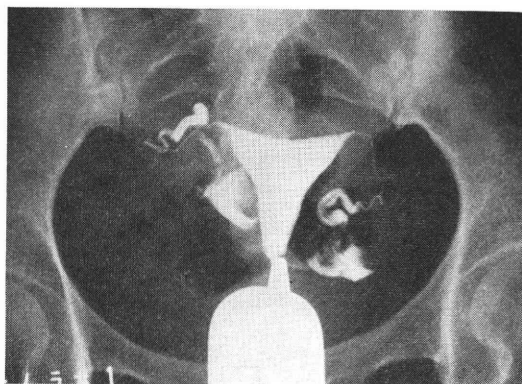


写真1 正常子宮像
Endografin, 7 ml, 200mmHg

c. 弛緩状子宮

子宮底は上方に、側壁は左右に向つてふくらみ、全体として三角形より丸味をおび、7 ml 注入では十分な卵管像が得られず、10 ml, ときには20 ml 近く追加してようやく通過像が得られるもの (写真2)。

一般不妊婦人ではこの型が6.0%に対し、外性子宮内膜症では211例中38例、18.0%に認められた。

d. 辺縁不正像

子宮壁は種々の原因によつて変形が起こる。

微細不正像：子宮像の辺縁に細かい不正があり、全体としてややぼけた感じとなる。炎症性変化の後遺症と考えられ、この変化の高度のものが子宮萎縮像である。

子宮内膜症群では3例1.4%, 対照群では2.9%であった。

粗大不正像：内腔の不規則な鋸歯状、ないし波状のゆ

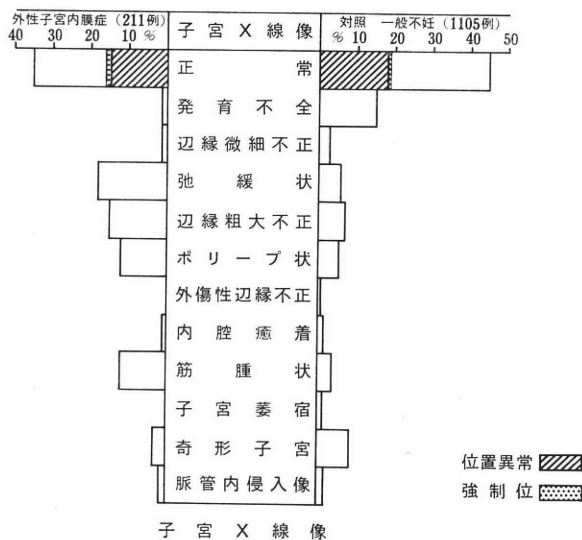


図 3

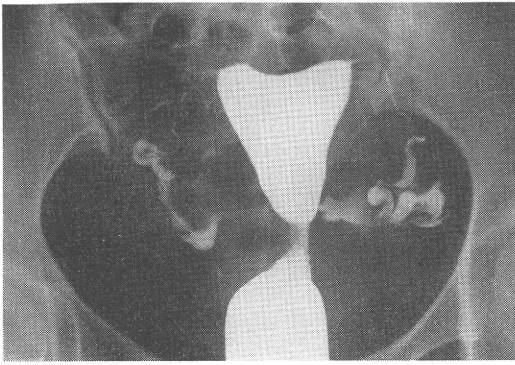


写真 2 弛緩状子宮
Endografin, 16ml, 130mmHg

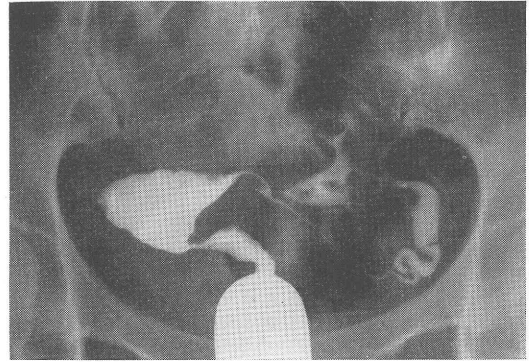


写真 4 ポリープ状増生
Endografin, 8 ml, 80mmHg

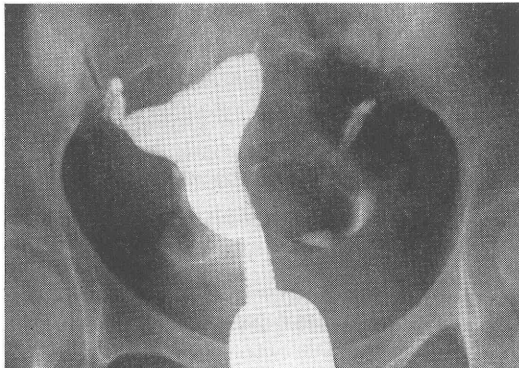


写真 3 辺縁粗大不正像
Endografin, 14ml, 190mmHg

るやかな凹凸不平は子宮粘膜増生の表現とみなされ、月経周期前半では子宮内膜の過剰増生と考えられる (写真 3)。

一般不妊婦人ではこの型が 7.3% に対し、外性子宮内膜症では 211 例中 31 例、14.7% に増えていた。

ポリープ状増生：子宮内膜の増殖がさらに高度になると、子宮像は全体として三角形より丸くなり、辺縁に小指の先ほどの凹凸や、とくに水溶性造影剤を用いた場合には、内腔に淡い円形の陰影欠損を認めることがある (写真 4)。

一般不妊婦人ではこの型が 6.5% に対し、外性子宮内膜症では 211 例中 25 例、11.9% と増えていた。

これら弛緩状子宮、辺縁粗大不正、ポリープ状増生の 3 型で 211 例中 94 例、44.6% を占め、対照の 19.8% に比して明らかに高率であつた ($P < 0.001$)。

外傷性辺縁不正：子宮腔に加えられた種々の手術操作によつて生じたと思われる、局在性の不規則な辺縁不正像である。本型は外性内膜症例には 1 例もなかつた (対照は 0.6%)。

e. 外傷性子宮腔癒着

外性子宮内膜症群で 2 例 0.9%、対照群では 1.5% であつた。

f. 筋腫状子宮

子宮容量の増大、内腔の一部欠損、子宮像の変形、位置の変化などから子宮壁の腫瘍形成が想像できる。子宮内膜症、とくに腺筋症では、筋腫を合併することがよくあるので、子宮内膜症にこの様な変化が高率に認められるのは当然であらう。

一般不妊婦人ではこの型が 2.7% に対し、外性子宮内膜症では 211 例中 25 例、11.9% と増えていた。

g. 子宮萎縮像：造影剤が 1, 2 ml しか注入できず、辺縁がきわめて不正形で、子宮像全体が小さく、ほとんどで角部閉塞を併なう。

一般不妊婦人ではこの型が 1.5% に対し、外性子宮内膜症では 0 であつた。

h. 奇形子宮：左右子宮の分離の程度によつて、弓状、双角単頸、双角双頸、中隔、双口、副角あるいは単角子宮などに分類される。

一般不妊婦人ではこの型が 8.5% に対し、外性子宮内膜症では 211 例中 7 例、3.3% であつた。

i. 脈管像：造影剤が主にリンパ管系に入ると、血管内に侵入するものとがある。

一般不妊婦人ではこの型が 2.1%、外性子宮内膜症では 211 例中 3 例、1.4% であつた。

正常子宮像における位置異常 (病的前屈、後転、左右傾) は一般不妊婦人では 40.6% に対し、外性子宮内膜症では 74 例中 44 例、59.5% に増えていた。このうち 13 例は子宮を外部から押し曲げたような強い後屈位をとり、Douglas 窩、両側卵巣に進行した子宮内膜症に特徴的と思われたので、これを“強制位”と表現した (写真 5)。

以上により外性子宮内膜症では正常子宮や發育不全型子宮が比較的少なく、陰影欠損や位置の異常、とくに子宮内膜の肥厚、増生を思わせる弛緩状子宮や辺縁粗大不

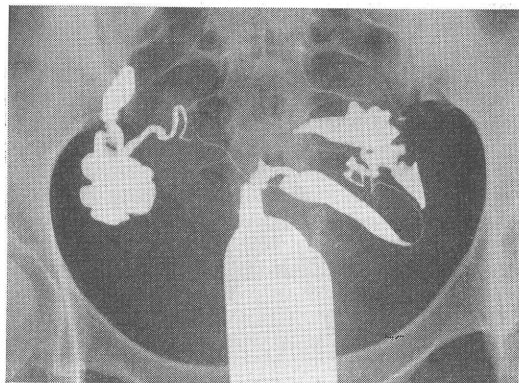


写真5 子宮“強制位”
Lipiodol UF 7ml, 130mmHg

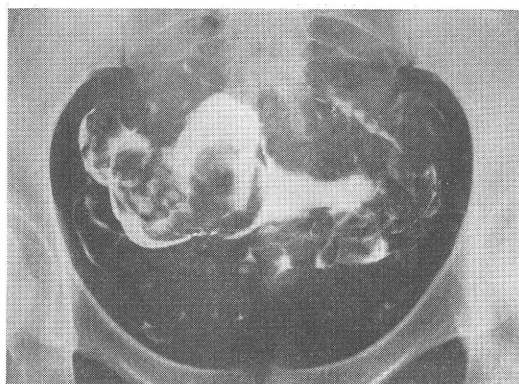


写真6 同左, 24時間後残像
両側卵巣腫大像

正, ポリープ状増生が著しく多いという結果を得た。

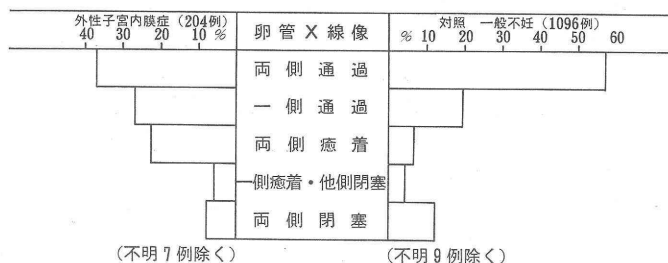
2. 外性子宮内膜症の卵管X線像

TV-X線装置で造影剤の注入経過を観察すると, 40~80mmHgの比較的低い注入圧で造影剤は子宮腔から卵管に進み, 膨大部が現れ, そのほぼ全長が造影されてから再び子宮腔が展開され, 3~5ml くらいで腹腔内へ徐々に拡散されていく。従って100mmHg前後の低い注入圧で卵管走向の全長が現れ, 水溶性造影剤では5分後の, 油性剤では24時間後の残像撮影で, 腹腔内にびまん性の分散像が得られたものを卵管通過像とした。腹膜面

に造影剤の集塊を形成して, 拡散が不十分なものを周囲癒着像とした(写真5)。さらに200~300mmHgの高い注入圧にもかかわらず, 卵管全長が出現しないものを卵管閉塞像とした。

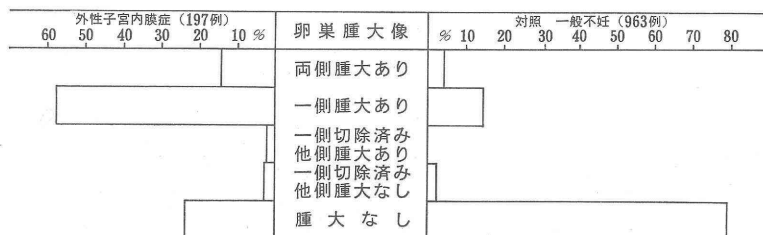
一般不妊婦人のX線像で卵管疎通性をみると, 両側通過57.2%, 一側通過19.6%, 両側癒着6.7%, 一側癒着で他側閉塞4.4%, 両側閉塞12.1%であつた(図4)。

外性子宮内膜症例の卵管疎通性と比較すると, 卵管像不明の7例を除く, 両側通過は204例中75例36.8%に減少し, 一側通過は55例27.0%に増え, なかでも一側通過



卵 管 X 線 像

図 4



注) 卵管閉塞のため卵巣腫大像の有無を判定しえないものを除外する。
(外性子宮内膜症 14例 一般不妊 142例)

卵 巣 腫 大 像

図 5

で他側癒着 37 例 18.2%と著増している (対照では 10.6%) ($P < 0.001$). 両側癒着は 46 例 22.5%, 一侧癒着で他側閉塞は 12 例 5.9%で、いずれも対照群より増加していたが、両側卵管閉塞は 16 例 6.8%で、一般不妊婦人よりむしろ低率であった ($P < 0.001$).

すなわち、外性子宮内膜症では卵管疎通性は比較的良好に保たれているが、走行に異常があつたり、卵管膨大部が腫張して、周囲癒着が疑われる例が多いという結果を得た。

3. 外性子宮内膜症における卵巣腫大像

正常大卵巣は HSG のさいに陰影として映し出されることがほとんどない。しかしこれが鶏卵大以上になると、卵管は延長され、膨大部が迂曲し、あるいは腹腔内に流入した造影剤が卵巣周囲を取り囲んで、橢円形の陰影となることがある。このためには、吸収が遅く、24 時間後の残像撮影が可能な油性造影剤が好適であるが、水溶性剤でも注入経過を観察し、腹膜面における拡がり方を注意深く読みとるようにすれば、見落されることはない。

一般不妊婦人では、両側腫大 4.0%, 一侧腫大 14.5%, 腫大なし 78.9%であつた (図 5)。

外性子宮内膜症患者では、卵管閉塞のために判定不能の 14 例を除く 197 例中、両側腫大は 28 例 14.2%, 一侧腫大 113 例 57.4%, 一侧切除済みで他側腫大 4 例 2.0%と、腫大ありが 73.6%にものぼり、腫大像なしは 23.9%に減少していた ($P < 0.001$).

今回対象となつた外性子宮内膜症は手術例であつて、腫瘤を形成したり、比較的症状の著しい症例が選択されたためもあるが、卵巣腫大—Endometrioma 形成例が多く、これを造影法でもかなりよく反映しうることがわかつた (写真 6)。

4. 外性子宮内膜症における X 線像の Score

HSG 後、開腹した外性子宮内膜症例の X 線学的特徴を要約すると、子宮には位置異常とくに強制位と称すべき強度の変位、弛緩状、辺縁粗大不正像が有意に多いこと、卵管の疎通性は比較的良好に保たれているが、迂曲や走向の異常、造影剤の停滞から周囲癒着と考えられるものが多いこと、さらに卵巣腫大像も 70%以上に認められるという結果を得た。

さらに外性子宮内膜症ではこれらの異常所見が重複して見られることが多い、そこで子宮像、卵管像、卵巣腫大像における、外性子宮内膜症に特徴的と思われる所見に対し表 3 のごとく点数をつけ、その Score と保存手術の可能性、術後妊娠率、再手術率との関連を検討した。

正常婦人では Score は 0 となる筈であるが、外性子宮内膜症では Score 0 が 2 例、1 点 11 例、2 点 68 例、

表 3 外性子宮内膜症における X 線像の Score

点数 X 線像	0	1	2
子宮	正 常	弛 緩 状 辺 縁 粗 大 不 正	*強 制 位
卵 管	両 側 疎 通 性 良 好	一 側 周 圍 癒 着	両 側 周 圍 癒 着
卵 巣	腫 大 な し	一 側 腫 大	両 側 腫 大

* 子宮が左右または後方につよく偏位し、正常の三角像よりはゆがんでみえるもの

表 4 不妊例における第 1 次根治術例 (9 例) の Score と術式

例	指数	年齢	経妊回数	経産回数	術 式
1	3	26	2	1	単純子宮全摘
2	3	30	0	0	単純子宮全摘
3	2	36	1 (外妊)	0	単純子宮全摘
4	3	41	0	0	膣上部切断
5	4	36	0	0	単純子宮全摘
9	6	27	0	0	膣上部切断
7	2	40	0	0	単純子宮全摘
8	3	33	0	0	膣上部切断
9	3	27	0	0	単純子宮全摘

3 点 83 例、4 点 25 例、5 点 20 例、6 点 2 例で、198 例 93.8%が Score 2 以上であつた (平均 2.9)。

不妊を主訴とした 191 例のうち、第 1 次根治手術を要したのは 9 例で、その平均 Score 3.2、平均年齢 32.9 歳であつた (表 4)。保存手術例は 182 例、平均 Score 2.9、平均年齢 34.6 歳であつた。

妊娠例は 49 例あり、うち HSG 後まもなく妊娠し、その後の手術で内膜症を確認されたもの 5 例、保存手術後妊娠成功例は 44 例で、妊娠率は 26.9%となる。その平均年齢は 28.4 歳で、20 歳台の妊娠率は 36.0%, 30 歳台の妊娠率は 21.5%で、平均 Score 2.7 であつた。Score 別の妊娠率をみると、1 点では 9 例中 3 例 33.3%, 2 点では 57 例中 20 例 35.1%, 3 点では 71 例中 18 例 25.1%, 4 点では 23 例中 5 例 21.7%, 5 点では 19 例中 3 例 15.8%と Score が高点数になるほど妊娠率が低下する傾向がうかがわれた (1・2 点と 4・5 点群で有意差 $P < 0.05$, 表 5)。

なお妊娠率を年代別にみると、1973 年より急激に低下しているが、術後平均妊娠成立期間 12.7 カ月から推測すると、今後妊娠率は若干高くなるように思う。妊娠未成立例 133 例では、平均年齢 36.9 歳、平均 Score 3.0 で比較的高年齢及び高 Score であつた。

腫瘤を主訴とする 20 例のうち、第 1 次根治手術例は 14 例で、その平均年齢 39.9 歳、平均 Score 2.4 であつた。

表 5 子宮内膜症 Score と妊娠率および再手術率

指数	例数	主 訴				妊娠成功		再 手 術	
		不 妊		腫 瘤		例数	率	例数	率
		保存	根治	保存	根治				
0	2	2				0			
1	11	9		1	1	3	33.3%		
2	68	57	2	1	8	20	35.1%	3	5.2%
3	83	71	5	3	4	18	25.4%	3	4.1%
4	25	23	1		1	5	21.7%	4	17.4%
5	20	19		1		3	15.8%	2	10.0%
6	2	1	1			0			
	211	182	9	6	14	49	26.9%	12	6.4%

表 6 再発例における再手術までの期間と Score

症例	期 間	Score	再手術の術式
1	6年0カ月	3	単純子宮全摘
2	2年9カ月	3	膈上部切断
3	3年4カ月	2	単純子宮全摘
4	6年10カ月	4	膈上部切断
5	2年1カ月	4	単純子宮全摘
6	4年5カ月	5	両側付属器切除
7	1年10カ月	4	膈上部切断
8	3年10カ月	2	膈上部切断
9	2年3カ月	4	左付属器切除
10	1年11カ月	3	単純子宮全摘
11	2年0カ月	2	Douglas 窩切開, 排膿
12	1年9カ月	5	単純子宮全摘
平均	3年3カ月	3.7	

保存例は6例で、平均年齢34.2歳、平均 Score 2.8であった。未婚例が6例あったが、保存例は3例で、いずれも Score 3 以下で、将来挙児希望であった。

外性子宮内膜症再発による再手術率は保存手術 188 例中12例6.4%で、例数は少ないが、その平均年齢は28.4歳と若く、Score の高いもの程再発率が高くなる傾向がみられた(2・3点と4・5点群で有意差 $P<0.05$, 表5)。保存手術後再手術までの期間は平均3年3カ月であるので、再手術数は今後なお増加するであろう。(表6)。以上により、生殖機能が比較的良く保たれている低い Score のうちに診断をつけることと妊孕性の高い20歳台で早期に保存手術を行う事が術後妊娠率を向上させると同時に、再発防止に最上の処置と思われた(表7)。

考 按

1. 子宮内膜症の成因

表 7 手術時年齢と Score

外性子宮内膜症	例 数	平均年齢	平均指数
総 数	211	34.9	2.9
不妊総数	191	34.5	2.9
不妊 保存総数	182	34.6	2.9
(保存+妊娠せず)	133	36.9	3.0
(保存+妊娠成功)	49	28.4	2.7
根治	9	32.9	3.2
腫瘍 保存	6	34.2	2.8
根治	14	39.9	2.4
再発	12	28.4	3.7

子宮内膜症とは、子宮内膜が異所的に存在し、機能する病態で、病変が主に子宮筋層にある内性子宮内膜症と、卵巣、骨盤腹膜などに変化が著しい外性子宮内膜症に分けられる^{16,24)}。前者は比較的高年令の婦人に多く、後者は20歳代後半から30歳代に頻発し、妊孕性への影響が大きく、近年とくに増加の傾向にあり、不妊診療上重要な位置を占める^{2,4,8,9,18)}。

子宮内膜症の存在は既に前世紀後半より認識されていたといわれるが、その成因についてはなお明らかでなく、Sampson の月経血逆流による子宮内膜片移植説および R. Meyer の胎腔上皮化生説が有力であり²⁴⁾、手術痕やリンパ節における発生なども報告され、一元的には説明しえない。

しかし臨床的には頸管狭窄あるいは閉塞例で、初経から数年のうちに高度の外性子宮内膜症性の変化を認めたこと、結核など明らかな炎症による卵管閉塞例では、卵巣チョコレート嚢胞の成立がみられないこと、進行した外性子宮内膜症患者で、月経時に開腹してみると、汚れた茶褐色の腹水が認められ、スミアで子宮内膜片が証明され経血の逆流を思わせる所見であったことなどから、Sampson 説がもつとも妥当のように思われる。

外性子宮内膜症の病態は極めて複雑多彩で、若年婦人に発生し、短年月のうちに進行して frozen pelvis にまで至り、ほとんど妊孕性を失うこともあれば、長年月静止した状態にあり、閉経時に自然消退するか、子宮筋腫、癌、脱など他の疾患による開腹手術の際、偶然発見されるものもある¹⁰⁾。

今回の研究対象となつた211例は、不妊を主訴とするものが大部分で、平均年齢34.9歳であり、Richter¹⁰⁾の純型外性子宮内膜症の35.1歳に相当し、比較的進行した症例といえる。

2. 外性子宮内膜症の診断

外性子宮内膜症の診断は他の疾患と同じく、病歴、症状、内診所見から始められ、特殊検査によって確認される^{1,5,15,17)}。

教科書的には続発性月経困難症、性交痛、不妊症などの症状があり、典型的な内診所見としては、直腸腔中隔から子宮頸にかけての凹凸ある結節と強い圧痛であり、子宮は癒着性の後屈位をとる。しかしこれらは必ずしも外性子宮内膜症に特異的でなく、慢性炎症、子宮筋腫、卵巣腫瘍でも認められる。従って外性子宮内膜症の術前診断率は低く、Benson (1958) 10%, Brewer (1954) 14~75%, 平均20%²⁴⁾などと報告され、わが国でも高邑(1959)²³⁾が182例中118例64.8%、滝ら(1969)²⁴⁾は37例で8.1%としている。外性子宮内膜症に対する認識が高まった近年でも、Richter (1974)¹⁰⁾は324例中44.1%としているが、多数例について個人的に経験を積んだStevenson & Campbell (1960)¹²⁾は80%, Spangler (1973)¹¹⁾は101例中84例と報告している。

これは外性子宮内膜症では侵された病変と症状とが必ずしも並行しないためであり、骨盤腹膜に小血胞の散在する程度で既に激しい月経痛を訴えるものもあれば、ほとんど frozen pelvis でありながら余り苦痛を示さないものもある。疼痛の評価には客観性を欠き、訴えには個人差が著しく、外性子宮内膜症患者ではとくにその傾向が強い。

本症の確認には病巣の一部切除による異所子宮内膜の証明が必要であるが、近年著しく進歩した内視鏡手技により、早期診断も可能になった。たとえば Douglas 窩が閉塞していない軽度のものであれば、Culdoscopy により卵巣表面の茶褐色小血腫として観察できるし、周囲癒着のつよい進行例では腹腔鏡による視診が開腹手術の時期を決めるのに役立つ(杉本 1976)²¹⁾。

また近年開発改良された超音波断層法によれば、輪廓不規則な多房性の cystic mass として現われる(小林 1975)²⁵⁾が、その判定は必ずしも容易ではなく、ホルモン療法の効果判定など反復観察を必要とするような場合に有力な手段となろう。しかしこれらの方法は特殊な設備と技術、高度の判読能力を要し、すべての施設で可能とは限らない。そこで、われわれは産婦人科領域における日常検査法の1つである子宮卵管造影法で、外性子宮内膜症の診断ができないか、検査後開腹手術により確認された211例について、術前の X 線像の特徴をまとめた。

3. 外性子宮内膜症の X 線診断

外性子宮内膜症では周期的に反復する小出血、血腫形成、壊死、細胞浸潤、線維化、硬い癒着などが特徴的であり、子宮筋腫や腺筋症の合併率が高い。これらの変化

を X 線学的に判定することは不可能であろうか? 子宮腫大、位置異常、可動性の制限、さらに付属器の腫脹、癒着などにより、TV・レントゲン透視を併用した今日の診断手技を駆使すれば、外性子宮内膜症の推測は十分に可能なのである^{8,13,14,20)}。

これまで100例をこえる多数例の外性子宮内膜症の X 線像を検討した報告はなく、Theander & Mehlin (1968)¹³⁾は本症では早期に卵管が閉塞するため、HSG は利用価値が低いとし、小骨盤腔内の観察のためには gynecography と腸管の2重造影を推奨し、川島(1972)¹⁸⁾も卵管癒着と卵巣腫大像に注目して、腹腔内に1,500 ml の空気を注入する gynecography を外性子宮内膜症の診断に応用した。Grant (1964)⁵⁾は油性造影剤を注入し、1・2日後の残像撮影で造影剤の腹腔内分散像を観察し(peritoneogram)、集塊形成像—卵管周囲癒着を外性子宮内膜症の特徴の1つに挙げている。また Acosta (1973)¹⁴⁾は外性子宮内膜症を合併した不妊90例の X 線像で、3例に著明な頸管狭窄と2例に内腔癒着を認めたという。これらは外性子宮内膜症の成因として興味があるが、特異像とはいえない。

4. 外性子宮内膜症における HSG の応用

HSG は子宮卵管腔内の変化を観察するにはもつとも有力な手段であるが、外性子宮内膜症では変化が主として卵巣、骨盤腹膜面にあるため、その診断能力には限界がある。しかし手術対象となつた211例の X 線像を総合すると、特徴的ともいえる傾向をうかがうことはできた。例えば、子宮像については、アトニー像、粘膜肥厚、増生などであり、これらは子宮筋腫でも高率に認められるが、卵管癒着像や卵巣腫大像を伴うことは少ない。しかし既に報告されたように(1974)²⁰⁾、子宮筋腫、腺筋症、外性子宮内膜症、子宮内膜増生は合併しやすく、X 線学的に共通の性格があり、一連の疾患群と考えることができよう。

卵管周囲癒着像に関しても、典型的なものは骨盤内炎症性疾患の後遺症があげられるが、外性子宮内膜症では一般不妊婦人より卵管疎通性が比較的良好であることが多く、完全閉塞はむしろ少なかった。しかし注入された造影剤が卵管内に停滞して(depot 形成)、周囲癒着を疑わせる例が多い。吉沢(1976)²⁰⁾は開腹手術時に卵管内細胞を採取し、鏡検したところ、外性子宮内膜症の卵管は浮腫状で、内容に細胞残渣が多く、卵管運動性低下による清掃機能減弱を示唆する所見を得た。外性子宮内膜症の成因としての経血逆流説とあわせ考えると、興味深い成績といえよう。卵管運動性の客観的評価が臨床的に開発されれば、不妊症のみならず、外性子宮内膜症の原因解明の面からも期待するところが大きい。

卵巣腫大像についても、多嚢胞卵巣 PCO で類似の所見が得られるが、この場合には子宮や卵管に外性子宮内膜症における異常所見を認めないし、月経異常や疼痛を考慮にいれば鑑別に苦しむことはない。今回対象となつたのは開腹手術例であり、外性子宮内膜症も進行した症例がほとんどであるが、70%以上に卵巣腫大像を認めた。

従来、不妊症における外性子宮内膜症については認識率が低く^{6,7,19,22)}、造影法でも卵管疎通性が認められれば、正常と判定されて、それ以上の検討がされないことが多かった。この様な例でも仔細に観察すれば、われわれが注目したような所見を2項目以上認め、再検して外性子宮内膜症と判定された例も少なくない。小血泡を腹膜面に散在性に認める程度の外性子宮内膜症を HSG により発見することは難かしいが、更に進行させて腫瘤形成、癒着が強度になり、保存手術が不能になる以前に発見できれば、日常検査法としての役目は十分に果しうらと思う。

5. X線像 Scoring の意義

外性子宮内膜症における子宮像、卵管像、卵巣腫大像とも、1つ1つについては特異像とはいえないが、これらを総合的に観察し、2項目または3項目に該当すれば、外性子宮内膜症の可能性が高いので、臨床症状の確認、超音波断層法、内視鏡検査にまですすめ、あるいは積極的に開腹手術を考慮すべきであろう。

今回対象とした211例でも、低 Score ものほど妊娠率が高く、再発率が低い傾向をうかがうことができた。

総 括

HSG 後、開腹手術により外性子宮内膜症を確認された211例の子宮像、卵管像、卵巣腫大像について、一般不妊婦人と比較検討した。子宮像では辺縁粗大不正、ポリープ状増生、弛緩状子宮、位置異常が多く、卵管像では周囲癒着、卵巣腫大像が高率に認められ、しかも、これらの特徴の2または3項が合併してみられるのが特異的といえる。

そこでこれらの特徴を Score により総合的に評価し、手術術式、術後妊娠率、再発率を調べたところ、根治手術をせざるをえなかつた例は Score の高いものも多く、術後妊娠率は比較的若年の、Score の低い群において高く、再発率は若年で Score の高いもので多かった。

外性子宮内膜症は早期発見、早期治療—妊娠が必要であるが、日常検査法の1つである HSG でも仔細に検討すればその特徴をつかみうる。今後、不妊原因と関連させてさらに検討を必要としよう。

稿を終るに臨み、木下佐教授の御校閲に感謝致します。また直接御指導、鞭達いただいた百瀬和夫助教授に謝意を表すると共に、推計学的検討にあたり御教示いただいた衛生学教室大本美弥子助教授、資料の集計、整理に協力された教室員各位に感謝の意を表します。

本稿の要旨は1977年2月第1回 Asia 不妊学会総会 (Bombay) 及び同年10月第22回日本不妊学会総会 (鹿児島) において発表した。

参考文献

- 1) Acosta, A. A. et al.: A proposed classification of pelvic endo., *Obstet. Gynec.* 42: 19, 1973.
- 2) Andrews, W. C. et al.: Endometriosis: Treatment with hormonal pseudopregnancy and/or operation. *Amer. J. Obstet. Gynec.* 118: 643, 1974.
- 3) Borglin, N. E. et al.: Roentgenographic observations on the effects of pseudopregnancy in endometriosis. *J. Obstet. Gynec. Brit. Cwlth* 72: 544, 1965.
- 4) Fredrikson, H.: Pregnancy after conservative surgery for ovarian endometriosis. *Acta obstet. gynec. Scand.* 36: 468, 1957.
- 5) Grant, A.: Diagnosis and treatment of endometriosis in young women. *Int. J. Fertil.* 9: 503, 1964.
- 6) Green, T. H.: Conservative treatment of endo., *Clin. Obstet. Gynec.* 9: 293, 1966.
- 7) Kistner, R. W.: Infertility with endo. *Fertil. Steril.* 13: 237, 1962.
- 8) Norwood, G. E.: Sterility and infertility in women with pelvic endo., *Clin. Obstet. Gynec.* 3: 456, 1960.
- 9) Petersohn, L.: Fertility in patients with ovarian endo. before and after treatment. *Acta. obstet. gynec. Scand.* 49: 331, 1970.
- 10) Richter, K.: Untersuchungen an 324 bis zu 17 Jahren beobachteten Patientinnen mit histologisch erwiesener Endo. externa. *Geburtsh. Frauenhk.* 33: 742, 1973. u. 34: 21, 1974.
- 11) Spangler, D. B. et al.: Infertility due to endo., *Amer. J. Obstet. Gynec.* 109: 850, 1971.
- 12) Stevenson, C. S. et al.: Symptoms, physical findings and clinical diagnosis of pelvic endo., *Clin. Obstet. Gynec.* 3: 441, 1960.
- 13) Theander, G. et al.: The radiology of pelvic endo., *Clin. Radiol.* 19: 19, 1968.
- 14) Weidenbach, A. & Klose, B. J.: Endo.: clinical and roentgenographic manifestations. *Radiol. Clin. N. Amer.* 12: 109, 1974.
- 15) 石塚直隆: 子宮内膜症の臨床, *日産婦誌*, 19: 1103, 1963.

- 16) 河合信秀：子宮内膜症の病理，日産婦全書，10/3, 231, 1963, 金原出版.
- 17) 川上 博：子宮内膜症の診断と治療，臨婦産，23:100, 1969.
- 18) 川島吉良：子宮内膜症の臨床，1972, 金原出版.
- 19) 木下 佐：子宮内膜症と不妊，臨婦産，23:105, 1969.
- 20) 百瀬和夫：子宮内膜症と不妊—HSG による診断，日本医事新報，2637, 11, 1974.
- 21) 杉本 修：子宮内膜症と不妊，産婦の実際，24:87, 1975.
- 22) 高田道夫：子宮内膜症の治療成績，臨婦産，23:96, 1969.
- 23) 高邑昌輔：子宮内膜症の臨床—182例，産婦の世界，11:183, 1959.
- 24) 滝 一郎，ほか：子宮内膜症のすべて，1976, 南江堂.
- 25) 小林充尚，ほか：超音波断層法による鑑別診断，産婦の実際，24:99, 1975.
- 26) 吉沢伸二：卵管内細胞診とその臨床応用，日不妊誌，22:20, 1977.

(受付：昭和52年9月1日，特掲)

Radiological studies on the endometriosis externa

Takeo Ezawa

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine Toho University,

Roentgenograms of 211 cases of endometriosis externa which were confirmed by laparotomies following hysterosalpingography were studied in comparison with those of 1,105 cases of infertile patients.

We concluded as follows.

1) Endometriosis externa are seen to be increasing in numbers. Complaints of them are in most cases sterility.

2) Age distribution of endometriosis externa is widely distributed from 21 to 50 years of age concentrating in 30 years of age.

3) By means of hysterosalpingograms, displacement of uterus was observed in about 30 %, and atony, roughly irregular contour, polypoid hyperplasia and myomatous uterus were observed in 57%.

4) Referring to the tubal patency, peritubal adhesions were verified in higher incidence than sterile patients in common (22.5 % in bilateral and 18.2% unilateral).

5) 73.6 % of unilateral or bilateral ovarian enlargement were seen in cases of endometriosis externa.

6) In cases of endometriosis externa, two or three of characteristics referred above criteria often observed to exist at the same time. We tried to score them in the image of uterus, tubes and ovaries respectively. The mean age at which endometriosis externa was found falls at 34.9 years, score being 2.9 in average. Mean age at which patients got pregnant after operation was 28.4 years average score being 2.7. 12 cases were rendered to reoperation, most of them being in the relatively younger age group with higher score.

7) HSG, though routine clinical examination, can be utilized to full advantage to find the characteristics of endometriosis externa, thus leading to the early diagnosis and better treatment of sterile patients.

銅—IUD の子宮内膜に及ぼす影響

Effect of Copper-IUD on the Human Endometrium

京都府立医科大学産婦人科教室

玉 舎 輝 彦 中 田 好 則 二 岡 清 昇
Teruhiko TAMAYA, Yoshinori NAKATA, Suminori NIOKA,
小 畑 義 東 山 秀 声 岡 田 弘 二
Tadashi OBATA, Shusei HIGASHIYAMA, Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural
University of Medicine, Kyoto.

銅 IUD は通常型 IUD よりも避妊効果が増強する。この理由として我々が既に発表したように銅イオンにより progesterone 効果の方が影響を受け易いことから、人でも分泌期子宮内膜の方がより影響を受け易いことを推定した。そこで銅 IUD を装着した女性において BBT の日付と子宮内膜の増殖期と分泌期において組織日付診とを比較検討した。増殖期内膜では BBT の日付と内膜日付診にずれのあるものは8例中2例で、この2例は日付診が促進する場合と遅延する場合とであつた。分泌期内膜では BBT の日付と内膜日付診と比較した症例18例中7例(39%)に日付診に遅延を認め、1例に日付診が促進しているものを認めた。このことから銅 IUD による影響は増殖期内膜では少なく、分泌期内膜では progesterone の効果が低下する場合が多く、すなわち黄体機能不全型の内膜を示すことも効果発現機構の一つにあげられると考えられた。

緒 言

IUD (子宮内装置) に銅線を付加した銅 IUD は通常型の IUD より避妊効果が増強することや IUD の合併症(脱出率や出血)が減少すること¹⁻⁵⁾などが知られている。そしてこれら効果発現機構は色々考えられてきた。我々は銅 IUD のこれら効果の発現機構をうさぎ子宮において検討し、その結果銅イオンにより estrogen receptor や progesterone receptor が変性し、その結果これらステロイドの効果が伝わらない^{6,7)}こともその一つに考えた。さらに progesterone receptor の方が estrogen receptor より銅イオンに不安定⁷⁾と考えられ、このことから銅 IUD 装着した女性において、増殖期子宮内膜よりも分泌期子宮内膜において特に progesterone の効果が減弱するのではないかと推定した。そこで銅 IUD を装着した女性の正常基礎体温 (BBT) を示す場合において BBT よりの日付と内膜日付診とを比較検討した。

実験材料と方法

銅 IUD は Copper-T 200 と Copper-7 とを用いた。避妊の目的で銅 IUD を月経中に挿入した。そして次周期以後の内膜(前壁中央付近)を増殖期と分泌期(可能な限り着床時期、つまり排卵期後6~10日目)とに採取した。内膜はヘマトキシリン・エオジン染色をし、内膜日付診(Noyes らによる⁸⁾)をおこなつた。なお内膜日付診で2日前後のずれは正常範囲のずれと考えた。

また同時に BBT をつけさせ、正常周期(松本⁹⁾の分類I型)を示すものについて BBT による日付(BBT の陥落日を推定上の排卵日とした)と組織診による内膜日付とを比較検討した。

結 果

Table 1 に示したように増殖期内膜では BBT の日付と内膜日付診にずれのあるものは8例中2例のみであつた。この2例は内膜日付診が促進している場合と遅延している場合とであつた。したがって増殖期内膜では銅 IUD による影響は少ないといえる。

Table 1 The comparison of the dating by basal body temperature and the endometrial dating of the proliferative phase in the Copper-IUD (Copper-T) wearers

Case Number	Dating		Response*1
	BBT	EB	
1	EP	EP	—
2	EP	EP	—
3	EP	EP	—
4	LP	LP	—
5	LP	LP	—
6	LP	LP	—
7	EP	MP	↑
8	LP	EP	↓

*1: The endometrial dating was compared with the BBT dating.

EP=early proliferative, MP=mid-proliferative, LP=late proliferative, EB=endometrial biopsy.

一方 Table 2 に示したように分泌期内膜での BBT の日付を内膜日付診について比較検討した。検討した症例 18 例の内 7 例 (39%) に内膜日付診に遅延が認められ、1 例に促進しているものが認められた。このことから分泌期内膜では銅 IUD により黄体機能不全型内膜を示すものが比較的多いといえる。

考 案

我々は steroid receptor におよぼす銅イオンの影響を検討した結果 progesterone receptor より estrogen receptor の方が安定であることから progesterone の効果の方がより銅イオンによつて影響を受け易いことを報告してきた⁷⁾。そこでここでは実際女性において銅 IUD 装着している内膜で検討したところ、増殖期内膜では銅 IUD による影響はほとんどなく、分泌期内膜では 39% に BBT の日付と比べると内膜日付診の遅延が認められた。このことは主に progesterone 効果が低下したといえ、臨床的には内膜の黄体機能不全型内膜を示し妊卵の着床障害につながるものと考えられる。実験動物で仮定したように銅 IUD より放出される銅イオンによつて内膜細胞内の progesterone receptor が主に影響を受けたためと考えられる。

形態学的な変化をうさぎ子宮で検討した場合、Zipper ら⁴⁾は対照側妊娠で他側銅 IUD 挿入側は妊娠は全くなく、その組織像は stromal hypertrophy をきたし、これは estrogen 効果と報告し、さらに我々も¹⁰⁾うさぎ子宮で銅 IUD による estrogen と progesterone との生

Table 2 The comparison of the dating by basal body temperature and the endometrial dating of the secretory phase in the Copper-IUD wearers

Case Number	Dating		Response*1
	BBT	EB	
1	7 d.a.o.	13 d.a.o. (+6)	↑
2*2	7 d.a.o.	9 d.a.o. (+2)	—
3	8 d.a.o.	10 d.a.o. (+2)	—
4*2	7 d.a.o.	8 d.a.o. (+1)	—
5	6 d.a.o.	7 d.a.o. (+1)	—
6	3 d.a.o.	4 d.a.o. (+1)	—
7	3 d.a.o.	3 d.a.o. (0)	—
8	3 d.a.o.	4 d.a.o. (−1)	—
9	7 d.a.o.	6 d.a.o. (−1)	—
10*2	7 d.a.o.	6 d.a.o. (−1)	—
11	11 d.a.o.	9 d.a.o. (−2)	—
12	8 d.a.o.	5 d.a.o. (−3)	↓
13	14 d.a.o.	10 d.a.o. (−4)	↓
14	12 d.a.o.	8 d.a.o. (−4)	↓
15*2	7 d.a.o.	2 d.a.o. (−5)	↓
16	7 d.a.o.	1 d.a.o. (−6)	↓
17	4 d.a.o.	LP	↓
18	7 d.a.o.	EP	↓

*1: The endometrial dating was compared with BBT dating.

*2: Wearers of Copper-7. (Others were those of Copper-T)

d.a.o.=day after ovulation, EB=endometrial biopsy, BBT=basal body temperature, EP=early proliferative, LP=late proliferative.

物学的効果への影響を検討した所、形態学的にも両 steroid の効果が低下していた。

ところが人においての検討では銅 IUD の装着者の子宮内膜の組織像に著明な変化を認めないという報告¹¹⁾があり、我々が示したように BBT の日付と内膜日付診との比較などからかろうじて明らかになるものであつた。この理由として特に形態学的に内膜の変化を検討した場合、人で銅 IUD の銅の表面積が増えると効果がそれだけ上がるので^{3,5)}銅イオンの濃度が最も関係すると考えられる。したがって人子宮内膜での検討では銅 IUD の銅部分と接する付近の内膜や、内子宮口付近の内膜は銅イオン濃度がより高く、他の部位の内膜とくらべて形態学的変化は強くでるものと考えられる。

さらに透過型電子顕微鏡や走査型電子顕微鏡により検討すると銅 IUD を装着した内膜細胞での変化を認められる¹²⁾ので形態学的にも変化があることは明らかであ

る。

しかし実際には銅 IUD の避妊効果増強の理由は色々考えられており、たとえば銅イオンによる子宮頸管、卵管、内膜の生化学的形態学的変化^{4,6,7,10,13}、blastocyst への直接の影響と着床阻害¹⁴⁻¹⁷、spermatocidal effect¹⁸⁻²⁰などが考えられている。ここで我々が示したような内膜での黄体機能不全型変化も避妊効果増強因子の一つと考えられる。

本研究の要旨は第5回国際内分泌学会（西ドイツ、ハンプルグ 昭和51年7月18～24日）において発表した。

稿を終るにあたり御援助いただきました京都第2日本赤十字病院部長村上旭博士、宇治病院部長杉原養一博士に深謝し、また Copper-T の提供を受けたミドリ十字社と Copper-7 の提供を受けた大日本製薬の各社に深謝します。

文 献

- Roy, S., Cooper, D. and Mishell Jr., D. R.: Experience with three different models of the copper T intrauterine contraceptive device in nulliparous women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 119 : 414, 1974.
- Shaila, N. G., Lane, M. E. and Sobrero, A. J.: A comparative randomized double blind study of the copper-T 200 and copper-7 intrauterine contraceptive devices with modified insertion techniques. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 120 : 110, 1974.
- Timonen, H., Toivonen, J. and Luukkainen, T.: Use-effectiveness of the copper-T 300 during the first year. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 120 : 466, 1974.
- Zipper, J. A., Tatum, H. J., Pastene, L., Medel, M. and Prager, R.: Suppression of fertility by intrauterine copper and zinc in rabbits. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 105 : 529, 1969.
- Zipper, J. A., Tatum, H. J., Medel, M., Pastene, L. and Rivera, M.: Contraception through the use of intrauterine metals I Copper as an adjunct to the "T" device. The endouterine copper "T". *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 109 : 771, 1971.
- 玉舎輝彦, 中田好則, 二岡清昇, 古田典夫, 石原貞尚, 岡田弘二: Steroid hormone receptor に対する金属イオンの影響, 日内泌誌, 51 : 856, 1975.
- Tamaya, T., Nakata, Y., Ohono, Y., Nioka, S., Furuta, N. and Okada, H.: The mechanism of action of the copper intrauterine device. *Fertil. Steril.*, 27 : 767, 1976.
- Noyes, R. W., Hertig, A. T. and Rock, J.: Dating the endometrial biopsy. *Fertil. Steril.*, 1 : 3, 1950.
- 松本清一: 性周期の臨床, 内分泌学 II. (三宅儀, 山本清編), 1341, 朝倉書店, 1964.
- 玉舎輝彦, 中田好則, 大野洋介, 本山敏彦, 石原貞尚, 岡田弘二: 銅 IUD の避妊効果発現機構, 日産婦誌, 28 : 727, 1976.
- Salaverry, G., Menedz, M. D. C., Zipper, J. and Medel, M.: Copper determination and localization in different morphologic components of human endometrium during the menstrual cycle in copper intrauterine contraceptive device wearers. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 115 : 163, 1973.
- González-Angulo, A. and Aznar-Ramos, R.: Ultrastructural studies on the endometrium of women wearing TCU-200 intrauterine devices by means of transmission and scanning electron microscopy and X-ray dispersive analysis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 125 : 170, 1976.
- Oster, G. K.: Chemical reactions of the copper intrauterine device. *Fertil. Steril.*, 23 : 18, 1972.
- Chang, C. C. and Tatum, H. J.: A study of the antifertility effect of intrauterine copper. *Contraception*, 1 : 265, 1970.
- Chang, C. C., Tatum, H. J. and Kincl, F. A.: The effect of intrauterine copper and other metals on implantation in rats and hamsters. *Fertil. Steril.*, 21 : 274, 1970.
- Noeslund, G.: Blastocystotoxic effect of copper in vitro. *Contraception*, 6 : 281, 1972.
- Polidoro, J. P., Culver, R. M., Thomas, S. and Hahn, D. W.: Mechanism of anti-implantation by copper IUD in the rabbit: Transport and recovery of ova. *Contraception*, 10 : 481, 1974.
- Macleod, J.: Sulfhydryl groups in relation to the metabolism and motility of human spermatozoa. *J. Gen. Physiol.*, 34 : 705, 1951.
- Ullmann, G. and Hammersterin, J.: Inhibition of sperm motility in vitro by copper wire. *Contraception*, 6 : 71, 1972.
- White, I. G.: The interaction between metals and chelating agents in mammalian spermatozoa: *J. Exp. Biol.*, 33 : 422, 1956.

Effect of copper-IUD on the human endometrium

**Teruhiko Tamaya, Yoshinori Nakata,
Suminori Nioka, Tadashi Obata,
Shusei Higashiyama and
Hiroji Okada**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of
Medicine, Kyoto

Copper intrauterine contraceptive devices (Cu-IUD) is known to have more increased contraceptive effect and less complications than inert IUD.

We have previously shown that progesterone receptor binding is more affected by copper ions

and the presence of copper in rabbit uterus results in less sensitivity to progesterone. It was expected that in human wearer of Cu-IUD, the Cu induced changes of the endometrium in the secretory phase will be more obvious than that in the proliferative phase.

In this study, we compared the histological endometrial dating with the dating by the basal body temperature. In the proliferative phase, 2 cases in 8 had the delayed and advanced datings respectively. In the secretory phase, 7 cases in 18 had the delayed dating and 1 case in 18 had the advanced dating.

These results indicate that the proliferative endometrium (estrogen effect) is not affected but the secretory endometrium (progesterone effect) is affected by Cu-IUD, possibly resulting in the luteal insufficiency.

(受付：昭和52年7月20日)

銅 IUD (Copper-T) に関する基礎的検討 (その 1)

A Fundamental Study of Copper-T (intrauterine device) —Part 1—

京都第二赤十字病院産婦人科 (院長：宇山理雄博士)

村 上 旭

Akira MURAKAMI*

京都府立医科大学産婦人科学教室 (主任：岡田弘二教授)

村 上 利 樹 玉 舎 輝 彦

Toshiki MURAKAMI** Teruhiko TAMAYA**

株式会社ミドリ十字中央研究所

小 山 守 松 本 剛

Mamoru KOYAMA*** Tsuyoshi MATSUMOTO***

* Department of Obstetrics and Gynecology,
Second Red Cross Hospital of Kyoto

** Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto prefectural University of Medicine

*** Green Cross Corporation

銅 IUD は inactive IUD に比して避妊効果が高いことが認められている。この機構を検討するために Clauberg 兎子宮内に銅 IUD を挿入し、progesterone による内膜増殖が銅挿入側で著明に低下すること、およびこの効果が兎子宮内膜ホルモンレセプターと progesterone の結合を銅イオンが阻害することによって起こることを実験的に推論した。銅挿入子宮角の内膜銅濃度は $19.5 \mu\text{g/g wet wgt}$ で対照角の $2.5 \mu\text{g/g wet wgt}$ に比して明らかに高値を示し、これは receptor-progesterone 結合阻害を説明するに足る上昇である。

しかし正常性周期婦人に銅 IUD を挿入したときの内膜銅濃度は $2.16 \mu\text{g/g wet wgt}$ で対照婦人の $1.38 \mu\text{g/g wet wgt}$ に比して著明な上昇を認めず、また組織学的にも銅 IUD 挿入によって子宮内膜日付診断上著明な遅延は認められなかった。

I はじめに

銅は動物、植物の蛋白ことに oxydase や catalase などの酵素の構成成分として存在し、種々の酵素の activator や inhibitor として働くとともに薬剤ことに抗菌物質や抗癌剤などとキレートすることによりその生物学的効果の発現に寄与するなど、生体反応にひろく関与している。

1969年 Zipper ら¹⁾ は銅をウサギ子宮角に挿入し、非

常な低濃度で挿入側子宮角の卵着床を阻止することを報告し、さらに臨床的にも、それまでの“inert” IUD に比して Cu-IUD が高い避妊効果をあげることを報告した²⁾。

われわれも Copper-T を臨床的に使用してその優れた避妊効果を認めたが、その作用機構を知るためにウサギおよび婦人に Cu-IUD を挿入してその子宮内膜の銅含量を測定するとともに組織学的に検討を加え、ことにウサギでは銅イオンと steroidhormone receptor の関

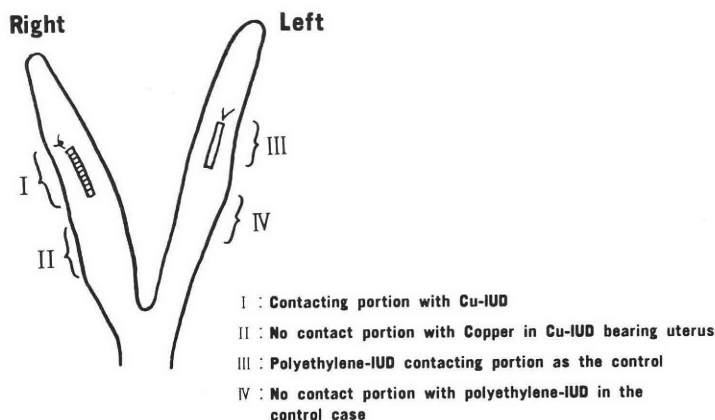


Fig. 1

連の面から検討した。

II Cu-IUD のウサギ子宮内膜 progestational proliferation に及ぼす影響

A) 実験方法

生後2カ月以内の未熟雌ウサギを用い、ゴマ油に溶解した estradiol-17 β 5 μ g を6日間連日皮下注射し、7日目に開腹、右側子宮角に Cu-IUD、左子宮角に对照としてポリエチレン IUD を図1に示すごとく装着した。

使用した IUD は Copper-T (以下 Cu-T) で銅 IUD としては Cu-T の銅線部分を $\frac{1}{2}$ にカットしたもの、すなわち径 1.6mm のポリエチレン (20%硫酸バリウム含有) に径 0.25mm の銅線 (純度99.99%) を 132.5mm 巻きつけたものを使用した。銅の表面積は 208.13mm² である。ポリエチレン IUD としてはこの銅 IUD と同径同長のポリエチレンアームを使用した。

IUD 装着の当日 estradiol-17 β 5 μ g を1回注射し、その翌日よりゴマ油に溶解した progesterone 0.4mg を5日間連日皮下注射した。注射終了の翌日断頭と殺し、子宮をとり出し、肉眼的観察後、No. 1 ~ No. 6 のウサギについては図1の I. II. III. IV の部に分けて、その中間部を輪切して組織学的検索用とし、他の部は子宮を切開し、内膜をそはして銅濃度測定に供した。なお No. 7 ~ No. 11 のウサギは組織学的検索を行わずに銅挿入側、対照側に分けて内膜を採取し銅濃度測定に使用した。

輪切した組織は一部を10%ホルマリン固定後パラフィン切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を行ない、一部は硫化水素飽和純アルコール溶液で固定後 Timm 変法^{3,4)}に準じて銅染色を行なった。

内膜中の銅定量は、採取した内膜をろ紙で軽く拭きと

った後、秤量し、Parker ら⁵⁾の方法に若干の改変を加えて7ml の濃硝酸と1ml の過塩素酸を加えて加熱した後、全量を水で10ml として島津原子吸光フレーム光度計 AA-610S によつて銅含量を測定し、内膜湿重量あたりの濃度を求めた。

B) 実験成績

1. 肉眼的所見

対照ポリエチレン IUD 装着子宮角は發育良好であるが、Cu-IUD 装着側の子宮角はやや細く、ウサギによつては銅 IUD 接触部が特に細くなっているものも認められた。(写真1)

2. 組織学的検索

H-E 染色の標本を作成した6例について、Mc Phail scale にもとづいて progestational proliferation を観察した。表1および写真2、3に示すように対照ポリエチレン IUD 側がすべて完全な増殖 (Mc Phail scale 4) を示したのに対し、Cu-IUD 側では平均2で、とくに銅接触部により強い抑制がみられた。

Table 1 Effect of Cu-IUD on progestational proliferation of Clauberg rabbits' endometrium

rabbit No.	Cu IUD horn		Control horn	
	I	II	III	IV
1	1	2	4	4
2	3	3	4	4
3	2	2	4	4
4	2	3	4	4
5	2	2	4	4
6	2	1	4	4
mean	2	2.2	4	4

銅接触部の Timm 変法による染色標本を写真4に示す。銅存在部は黒褐色の顆粒として腺上皮下の組織に証明された。対照ポリエチレン挿入側の子宮角ではこの黒褐色顆粒は全く認められず、また Cu-IUD 挿入側でもⅡの非接触部ではこの黒褐色顆粒はわずかに証明されるのみであつた。

3. 子宮内膜銅含量

11羽の Clauberg ウサギについてポリエチレン装着子宮角の内膜銅含量は内膜湿重量1gあたり $2.52 \pm 0.95 \mu\text{g}$ ($M \pm S.D.$) であるのに対し、銅 IUD 装着子宮角の内膜では、 $19.50 \pm 8.62 \mu\text{g/wet wgt}$ と著増していた。

III ウサギ子宮 cytosol における steroid hormone receptor 複合体に及ぼす銅イオンの影響

未熟雌ウサギに priming として、ゴマ油に溶解した estradiol- 17β を $50 \mu\text{g/日}$ 、8日間連日皮下注射し、最終注射の48時間後に断頭と殺、子宮を摘出し、 4°C の cold room 内で EDTA-Tris buffer を加えてホモゲナイズし、 $800 \times G$ 10分遠心した上清を、 4°C 、 $274,200 \times G$ で1時間遠心分離した上清をウサギ子宮 cytosol とした。ついで ^3H -estradiol- 17β ($3.49 \times 10^{-9} \text{M}$) または ^3H -progesterone ($3.12 \times 10^{-9} \text{M}$) とこの cytosol に、buffer にとかした銅イオンを加えて 4°C 、2時間 incubate した後、dextran coated charcoal を加えて攪拌し、30分 incubate した。なお銅濃度は 10^{-7}M から 10^{-2}M になるように調整した。つづいてこれを $800 \times G$ 、10

分遠心、上清 0.2ml にメタノール 3.0ml とトルエンシンチレーター 10ml を加え、Packard 3390液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。銅イオンを添加しないときの結合量を100として、銅イオン添加による結合の比率を示したのが第2図である。

10^{-6}M の銅イオン濃度で影響がみられ、 10^{-4}M では対照の63%となる。

IV Cu-T 挿入婦人子宮内膜の銅濃度と組織学的検討

1. Cu-T 挿入婦人子宮内膜銅濃度

30~45歳の正常性周期を有する子宮筋腫婦人の月経第3~6日に Cu-T を挿入し、15~20日後に子宮を摘出切開し、Cu-T を除去し、内膜面をろ紙で軽く拭きとつた後に内膜をそへし、一部を組織学的検索に供し、のこりを銅測定用試料とした。銅の測定は、Ⅱの(A)に述べたと同様の方法によつた。また同時期に子宮筋腫などで子宮を摘出したもののうち、正常性周期を有し、組織学的に黄体期であつたものの子宮内膜を対照として銅濃度を測定した。

対照黄体期婦人子宮内膜(13例)の銅濃度は $1.58 \pm 0.61 \mu\text{g/g wet wgt}$ であるのに対し、Cu-T を挿入した4例の婦人内膜銅濃度は $2.42, 3.14, 0.91 \mu\text{g/g wet wgt}$ で、1例は採取時月経が開始しており、内膜量も少量であつたが $4.23 \mu\text{g/g wet wgt}$ であつた。

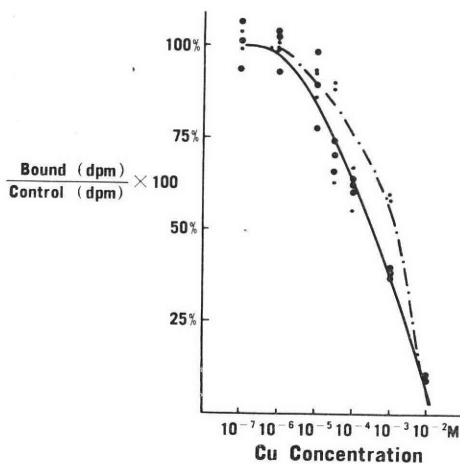
なお、これらの子宮内膜組織像は Cu-T 挿入の1例が月経期であつた以外はすべて分泌期像を呈していた。

2. Cu-T 挿入婦人における子宮内膜組織学的変化

22~32歳の正常性周期を有する婦人に BBT を記録さ

Table 2 Effect of insertion of Cu-T on the human endometrium

Case No.	BBT-date at the endometrial biopsy	EB-date of endometrium	Discrepancy of the dating
1	D23	D22	-1
2	D23	D24	+1
3	D20	D21	+1
4	D22	D22	0
5	D26	D24	-2
6	D19	D15	-4
7	D18	D19	+1
8	D23	D20	-3
9	D18	D19	+1
10	D21	D17	-4
11	D21	D19	-2
12	D23	D16	-7
13	D25	D24	-1



(○, —————) : ^3H -estradiol-receptor binding
(○, - - - - -) : ^3H -progesterone-receptor binding

Fig. 2 The effect of copper on steroid hormone receptor binding in the rabbit uterine cytosol

せ、月経第3～7日に Cu-T を装着し BBT の平均低温相より 0.2°C 以上上昇した第1日を BBT-date 16日とし、BBT-date 18～26日に Cu-T を除去するとともに子宮前壁より内膜をそーはして、Noyes ら⁹⁾ の分類に従って日付診断を行ない、これを E. B.-date とした。

その成績は第2表のごとくで13例中4例に3日以上の変延が認められたが、他は ± 2 日以内のずれにとどまり、ほぼ BBT-date と一致した。

V 考 案

Zipper ら (1969)¹⁾ は、銅・亜鉛など種々の金属 wire をウサギの一側子宮角に挿入し、交尾後開腹し、銅や亜鉛を入れた子宮角の着床数は著減するが銀・マグネシウム、錫は着床数に影響を与えないこと、および銅挿入部の内膜 G/M 比の低下を報告し、これは粘膜間質の増殖によるもので estrogenic effect を示すものであるとした。

Chang ら (1970)⁷⁾ はラット、ハムスターの子宮に金属 wire を入れると着床の抑制がおこるが、金・銀・プラチナのような溶解度の低いものは効果が著しく劣り、銅は D3 に挿入されるなら完全に着床を阻止することが出来、他に亜鉛・コバルト・カドミウム・鉛なども着床阻止作用があること、さらに偽妊ラットの内膜 decidualization が銅の存在で著明に抑制されると報告している。

Okereke ら (1972)⁸⁾ はラット子宮内に入れた銅 wire は着床を阻害するが、この銅 wire を semipermeable collodion で覆つても着床が起こらなかつたのに対し、銅をエナメルで覆うと着床が認められ、この銅の着床阻止作用が銅イオンによるものであることを示すとともに、硫酸銅を腹腔内に注入しても避妊効果はないと報告した。

このような Cu-IUD を挿入したウサギ (Nutting ら⁹⁾, Polidoro ら¹⁰⁾), ラット (Chang ら⁷⁾) でも排卵数に差はなく受精および blastocyst への発育も影響ないことが確認されており、正常の blastocyst は銅の作用をうけている子宮角へ運ばれても着床せず、銅挿入側の blastocyst を正常子宮に入れると着床する (Chang ら¹¹⁾) こと、さらにウサギで Cu-IUD を頸管に近く挿入して両子宮角を外科的に内腔を接続すると対側の着床も抑制され、子宮内分泌液の届かない吻合部から離れた遠くの部に着床がみられるという Polidoro ら¹⁰⁾ の実験成績からみても、銅による着床抑制は blastocyst が着床出来なくなるような種類の子宮内環境の局所の変化に由来し、この銅の効果は銅イオンによるもので銅イオンが一定以上の濃度存在することによって効果が発現するものと考え

えられる。

Nutting ら (1975)¹²⁾ は Clauberg ウサギに Cu-IUD を装着して銅接触部内膜の Mc Phail scale の低下と、挿入側子宮角の内膜炭酸脱水酵素活性の著明な抑制を報告し、この progestational effect の局所的抑制は銅イオンが組織への progesterone の結合を妨げることによつて起こると推論した。

著者らの一人、玉舎¹³⁾ は estrogen で priming したウサギ子宮内膜 cytosol を用いて、steroid hormone receptor binding が 10^{-5}M 以上の銅イオンの存在によつて抑制されることを証明した。われわれが今回行なった実験の Cu-IUD 挿入側ウサギ子宮内膜の銅濃度は平均 $19.5\mu\text{g/g wet wt}$ で $3.1 \times 10^{-4}\text{M}$ に相当し、これは対照側に比して $2.7 \times 10^{-4}\text{M}$ の銅イオンを添加したことになり、さきの in vitro の成績をこれに直接あてはめてみると、この銅装着側の銅イオン濃度は Progesterone receptor binding を抑制し、これによつて progesterone の効果である増殖を著しく低下させるのに十分なものと考えてよいであろう。

婦人においてウサギと同様に銅イオンによる steroid hormone-receptor 結合の抑制が避妊の主な機構となるとすれば、やはり内膜の組織学的変化、すなわち、inadequate luteal phase のような形で現われることが考えられる。しかし本稿でも示したように Cu-T 装着婦人の内膜日付診の著明な遅延を起こすとは考え難い結果が得られた。同様の結果は Hagenfeldt ら (1972)¹⁴⁾, Medel ら (1972)¹⁵⁾ によつても確認されている。婦人においては Cu-IUD 装着時の内膜銅濃度はわれわれの測定成績によると少数例ではあるが非装着婦人のたかだか2倍程度である。この成績は Hagenfeldt (1972)¹⁶⁾ の neutron activating method による Cu-T 装着婦人後期分泌期内膜銅濃度 (対照 $1.4\mu\text{g/g wet wt}$ に対し、Cu-T 群 $1.7\mu\text{g/g wet wt}$)、Larsson (1976) の Cu-IUD 装着婦人の卵管内分泌液中の銅濃度 (対照の $16.5 \pm 4.6\mu\text{M}$ に対し $30.7 \pm 14.2\mu\text{M}$) とほぼ一致するものである。すなわち婦人子宮内膜においては Cu-T の装着による銅イオンの増加は 10^{-5}M ないしそれ以下と考えられる。

ヒトとウサギの内膜の銅イオンの濃度にこのような差があるのは子宮内腔容積に対する銅表面積の比率も当然考慮されなければならないが、銅は子宮腔内の分泌液に溶解し、内膜との接触面より内膜組織内に滲透すると考えられるので、ウサギの内膜腺が子宮内腔へ皺襞状に増殖して銅イオンとの接触面が広いのに対し、婦人内膜では腺は井戸状に深く、増殖により屈曲蛇行して内膜単位重量当りの内腔との接触面が小で、このため銅イオンが内膜中へ進入し難いことも両者の内膜における濃度差を

まねくものと考えられる。

婦人において blastocyst の内膜への着床阻害が著明な組織学的変化によつて起こるものではないとしても、子宮腔の銅イオン接触部である内膜表層付近でわずかな生化学的変化が着床の阻害に関与している可能性は否定出来ない。

Hagenfeldt (1972)¹⁸⁾によると婦人子宮腔内洗浄液においては、Cu-T 装着例は対照に比して蛋白重量当りの銅濃度が著明に高く、この高い濃度の銅イオンの spermatotoxic ないし blastotoxic effect によつても避妊効果を説明し得るとしている。

Oster (1972)¹⁹⁾, Kesserü ら (1972)²⁰⁾, Elstein ら (1973)²¹⁾ は in vitro で銅を作用させた婦人頸管粘液中で、精子運動の低下や死滅がおこることを報告しており、精子への直接の toxic effect や銅による頸管粘液の変化も銅 IUD の作用機構の1つであることを示唆している。

Tredway ら (1975) は婦人で、鈴木ら (1976)²²⁾ はラットで、Cu-IUD のみでなくプラスチック IUD 装着でも卵管から回収される精子数が対照に比して著しく低いことを報告している。しかしウサギやラットでは銅IUDを挿入しても受精卵の数が著減しないことから、このような精子に対する作用に大きな意義を認めない人も多い。(Nutting ら⁹⁾, Polidoro ら¹⁰⁾)

そのほか、Larsson (1976)¹⁷⁾ は人卵管峡部輪走筋層を in vitro で銅イオンを medium に加えることにより、Cu-T 挿入婦人卵管液中の銅濃度である $3 \times 10^{-5}M$ 以上の濃度で、その収縮波形に変化がおこることを観察し、この銅による卵管運動性への影響はその避妊効果に関連すると考えている。

以上述べてきたように銅 IUD の婦人における避妊効果の機構としては、精子に対する作用、頸管粘液に対する作用、子宮ならびに卵管の運動性に及ぼす作用、胚胞に対する毒性、および内膜への着床を妨げる因子などがそれぞれ関与していることが考えられる。

ウサギの progesterone-receptor 結合に対する抑制による progestational proliferatin の抑制といった決定的とも考えられるような大きな因子は現在の所、婦人においてはみつつかつていない。

もちろん、銅 IUD には銅イオンの効果と関係なく相当の避妊効果を有しているし、銅 wire の存在が medium 中への Cu-イオンの放出による効果ばかりでなく、他の金属イオンをとらえ除去することによつて影響を及ぼすということも考慮されるべきであろう

VI ま と め

Cu-IUD の作用機構を知るために銅 IUD を挿入したウサギおよび婦人の子宮内膜の組織学的検討と銅濃度の測定を行なつた。

1. Clauberg ウサギの progesterone による子宮内膜増殖は Cu-IUD の存在により著明に抑制される。

2. ウサギの銅挿入子宮角内膜の銅含量は対照ポリエチレン挿入子宮角の $2.5 \mu g/g$ wet wgt に対し、 $19.5 \mu g/g$ wet wgt と著増し、これは対照子宮角に比し、銅イオン $2.7 \times 10^{-4}M$ の増加に相当する。

3. 組織化学的に銅は内膜上皮下の組織に証明された。

4. 銅イオンは $10^{-5}M$ 以上の濃度でウサギ子宮 cytosol receptor と progesterone の結合を阻害し、これが progestational proliferation 抑制のもつとも大きな要因と考えられた。

5. Cu-IUD 装着婦人子宮内膜の銅濃度は対照の $1.6 \mu g/g$ wet wgt に対し、 $10^{-5}M$ 以下の増加にとどまつた。

6. Cu-T 装着婦人子宮内膜の分泌期日付診断的検索では銅により著明な組織学的変化は認められず、婦人における Cu-IUD の避妊機構はウサギの場合と少しく異なることが示唆された。

文 献

- 1) Zipper, J., M. Medel, R. Prager: Suppression of fertility by intrauterine copper and zinc in rabbits. Am. J. Obst. Gynec. 105: 529, 1969.
- 2) Zipper, J. A., H. J. Tatum, M. Medel, L. Pastene, M. Rivera: Contraception through the use of intrauterine metals. 1. Copper as an adjunct to the "T" device. Am. J. Obst. Gynec. 109: 771, 1971.
- 3) 佐野 豊: 組織学研究法, 南山堂, p. 629-630.
- 4) 岡本耕造: 顕微鏡学的組織化学, 上巻, 第4版, p. 77, 医学書院.
- 5) Parker M. M., F. L. Humoller and D. J. Mahler: Determination of copper and zinc in biological material. Clin. Chem. 13: 40, 1967.
- 6) Noyes R. W., A. T. Hertig and J. Rock: Dating the endometrial biopsy. Fertil. and Steril. 1: 3, 1950.
- 7) Chang C. C., H. J. Tatum and F. A. Kincl: The effect of intrauterine copper and other metals on implantation in rats and hamsters. Fertil. and Steril. 21: 274, 1970.
- 8) Okereke T., I. Sternlieb, A. G. Morell, I.

- H. Scheinberg: Systemic absorption of intrauterine copper. *Science* 177: 358, 1972.
- 9) Nutting E. F. and M. R. Mueller: The effect of a copper intrauterine device during the early stages of pregnancy in the rabbit. *Fertil. Steril.* 26: 838, 1975.
 - 10) Polidoro J. P. and D. L. Black: The failure of the copper IUD to inhibit fertilization in the rabbit. *J. Reprod. Fert.* 23: 151, 1970.
 - 11) Chang C. C. and H. J. Tatum: A study of the antifertility effect of intrauterine copper. *Contraception* 1: 265, 1970.
 - 12) Nutting E. F. and M. R. Mueller: The effect of a copper intrauterine device on the uterine histology and progestational response in pregnant and immature rabbits. *Fertil. Steril.* 26: 845, 1975.
 - 13) 玉舎輝彦, 中田好則, 二岡清昇, 古田典夫, 石原貞尚, 岡田弘二: Steroid hormone receptor に対する金属イオンの影響, 日内泌誌, 51: 856, 1975.
 - 14) Hagenfeldt K., E. Johannisson, and P. Brenner: Intrauterine contraception with the copper-T device. 3. Effect upon endometrial morphology. *Contraception* 6: 207, 1972.
 - 15) Medel M., E. Guiloff, C. Toscanini, L. Pastene, M. Rivera, J. Zipper and C. G. Rogers: Clinical evaluation of an IUD with 200mm² of copper. A new approach in human contraception. *Excerpta Medica, International Congress. Series No. 260 p. 47* 1972 Ed. by Goldsmith.
 - 16) Hagenfeldt K.: Intrauterine contraception with the Copper-T device. 1. Effect on trace elements in the endometrium, cervical mucus and plasma. *Contraception* 6: 37, 1972.
 - 17) Larsson B.: The influence of copper on the in vitro motility of the human Fallopian tube. *Am. J. Obst. Gynec.* 125: 682, 1976.
 - 18) Hagenfeldt K.: 4. Influence on protein of copper concentrations and enzyme activities in uterine washings. *Contraception* 6: 219, 1972.
 - 19) Oster G. K.: Chemical reactions of the copper intrauterine device. *Fertil. Steril.* 23: 18, 1972.
 - 20) Kesserü Z. and R. Camacho-Ortega: Influence of metals on in vitro sperm migration in the human cervical mucus. *Contraception* 6: 231, 1972.
 - 21) Elstein M. and K. Ferrer: The Effect of a Cu-releasing IUD on sperm penetration in human cervical mucus in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 32: 106, 1973.
 - 22) Tredway D. R., C. U. Umezaki, D. R. Mitchell, P. S. Settlage: Effect of intrauterine device on sperm transport in the human being: Preliminary report. *Am. J. Obst. Gynec.* 123: 734, 1975.
 - 23) 鈴木雅洲, 高橋克幸, 広瀬洋子, 中川公夫, 平野睦男, 渡辺正昭, 水上 端: 子宮内装着 Cu-IUD の作用機序についての検討 —第一報—, 日不妊会誌, 21: 383, 1976.

A fundamental study of copper-T (intrauterine device)

Akira Murakami

Department of Obstetrics and Gynecology,
Second Red Cross Hospital of Kyoto

Toshiki Murakami and Teruhiko Tamaya

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kyoto Prefectural University of Medicine

Mamoru Koyama and Tsuyoshi Matsumoto

Green Cross Corporation

Cu-IUD has been recognized to have a higher contraceptive effect than inactive IUD. To elucidate the mechanism of contraceptive effect, IUD was inserted into uterine horn of Clauberg rabbits. The proliferation of endometrium caused by exogenous progesterone was markedly inhibited in the horn with Cu-IUD while the maximum proliferation was seen in the contralateral horn with polyethylene IUD. The concentration of Cu-ion in the endometrium in the horn with Cu-IUD showed markedly higher level as 19.5 $\mu\text{g/g}$ wet wt. than that in the control horn (level at 2.5 $\mu\text{g/g}$ wet wt.). This corresponds to the same effect as the addition of Cu-ion in a concentration of $2.7 \times 10^{-4} \text{ M}$ to the endometrium of the control horn.

The effect of Cu-ion on the binding of progesterone to the receptor in the cytosol of Clauberg rabbit's uterus demonstrated marked inhibition, and these inhibitory effect of Cu-ion showed in concentration of higher than 10^{-5} M . It was inferable from the case of rabbits that Cu-ions eluted from the Cu-IUD produce a contraceptive effect by inhibiting locally the progesterone receptor binding.

In the case of women with normal menstrual cycle, however, the increase in a concentration of Cu-ion in the endometrium with Cu-IUD was lower than 10^{-5} M , while the control women showed the concentration of 1.6 $\mu\text{g/g}$ wet wt. ($2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$) of endometrium.

The histological dating of endometrial spe-

cimens (E-B date) with Cu-IUD was examined and compared with expected date of the cycle determined by BBT (BBT date).

The presence of Cu-IUD did not induce any

significant discrepancy in both dating. Consequently the mechanism of increasing contraceptive effect with Cu-ion was considered to be a little different from that in rabbits.

(昭和52年 9 月 5 日 受付)

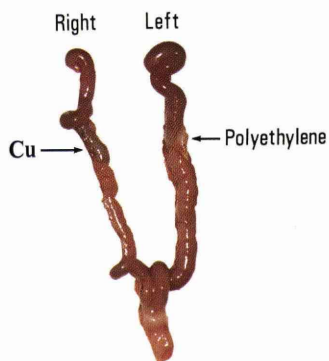


Photo. 1

Macroscopic Findings (Rabbit No. 5)

Left uterin horn : Polyethylene-IUD

Right uterine horn : Cu-IUD



Photo. 3

Rabbit No. 1-III : McPhail scale 4,



Photo. 2

Rabbit No. 1-I : McPhail scale 1,

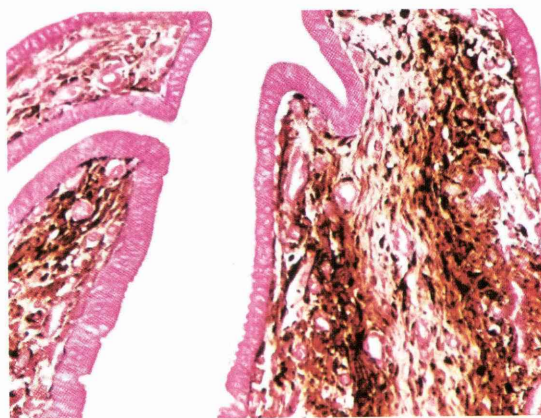


Photo. 4

**Staining of Copper at the Contacting
Region with Cu-IUD**

Stained by the modified method of Timm. (Dark brown particles are seen in correspondence to the presence of copper.)

Nuclear fast red stain was used as a after staining.

遅延排卵に関する臨床統計的考察

A Clinical and Statistical Study on Delayed Ovulation

東京医科歯科大学医学部産科婦人科学教室

野口 邦夫 斉 藤 幹

Kunio NOGUCHI* Motoi SAITO*

東京都立府中病院産婦人科

大塚 晴 久

Haruhisa OTSUKA**

* Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

** Tokyo Metropolitan Fuchu Hospital, Tokyo

基礎体温を記録することにより排卵日を推定しえた婦人で、自然排卵による妊娠、分娩を終了した191例を対象とした。排卵日によって早期群、正常群、遅延群を設定し、それらの妊娠経過、分娩時の母児の状態等について検討し以下の結果を得た。

1) 月経周期からある程度排卵日を推測できるが、周期毎に相当変動を示す。2) 早期群では不妊症の頻度が高い傾向がみられる。3) 切迫流産の頻度は早期群でやや高率であり、遅延群ではむしろ低率である。4) 早期群では在胎日数（排卵・分娩日数）の短いものが少なく、遅延群では“真の予定日超過”が少ない。5) 遅延群では新生児体重平均値が高く、3,000 g以下が少なく、LFDが多い傾向がみられる。6) 遅延群では Fetal distress の頻度が少ない。7) 遅延群では男児が多い傾向がみられる。8) 児の奇形、周産期死亡はいずれも正常群に属した。

緒 言

最近の内分泌学の進歩により排卵の生理が解明されつつはあるが、未だ不明の点が多い。一方、細胞遺伝学の分野における進歩も著しく、卵子に対する種々のアプローチがなされ、その aging (老化) および overripeness (過熟) が問題の焦点となつている。成熟した Oocyte が卵胞内に必要以上に長く停留し、過熟して排卵すると遅延排卵 (delayed ovulation) となる。その原因としては内分泌状態、年齢、心理的要因など多くの因子の関与が考えられるが、詳細な解明はなされていない。さらに、遅延排卵による受精卵の妊娠、分娩および児の予後についても未だ詳細な検討はなされていない。著者らは先に通常の排卵日変動を越えて遅延した排卵により妊娠した婦人の妊娠経過および分娩時の母児の状態について報告したが¹⁾、今回、最終月経第1日より起算した排卵日そのものにより遅延排卵群を設定し、その妊娠結

果、児の状態などについて retrospective に推計学的考察を試みた。また、早期排卵群を設定し同様の考察を試みた。

対象および方法

東京医科歯科大学および都立府中病院において、昭和30年1月から昭和50年3月までの間に分娩を終了したもののうち、妊娠前後の基礎体温表を記録し排卵日を推定できたもので、排卵は自然排卵であり、慢性疾患、糖尿病の合併、多胎妊娠および陣痛誘発例を除外した妊娠満8月以上（妊娠満32週以上）の191例を対象とした。ただし同一母体の妊娠・分娩例については1つだけを無作為に抽出した。対象例の大多数では基礎体温を妊娠前3周期以上にわたり測定し、妊娠前半期もそれを継続した。排卵日は基礎体温表の低温相最終日と推定し、最終月経第1日を1日として算出した。在胎日数は排卵日より起算し分娩までの日数（排卵・分娩日数）とし、排卵

日を0日として算出した。推計学的処理はt検定、 χ^2 検定、Fisherの直接計算法によつた。なお検定に際し水準値は比較ごとの危険率として示した。

結 果

対象191例の排卵日は最短9日から最長76日の範囲にあり、平均値は 19.4 ± 10.4 (M $\pm$ SD) 日である。13日および17日に頻度10.5%のピークをつくり、中央値は17日である。12日から17日までが51.3%と過半数を占め、18日以上は減少する。

排卵日より対象を以下の3群に分けた。すなわち、9日から11日までを早期群、12日から17日までを正常群、18日以上を遅延群と仮定した。早期群、正常群、遅延群の頻度はそれぞれ19例(9.9%)、98例(51.3%)、74例(38.7%)である。上記各排卵日群について以下の項目について検討を試みた。

1. 月経周期と排卵日

月経周期を25日以下、26~31日、32~40日、41日以上、不順(次回月経の予測不能)の5群に分け、それらと排卵日群との関係をみると表1のごとくなる。月経周

表 1 月経周期と排卵日との関係

排卵日群 月経周期	早期群	正常群	遅延群	計
25日以下	5(71.4)	2(28.6)	0	7(100.0)
26~31日	13(11.7)	78(70.3)	20(18.0)	111(100.0)
32~40日	1(2.4)	11(26.8)	29(70.7)	41(99.9)
41日以上	0	2(40.0)	3(60.0)	5(100.0)
不 順	0	5(18.5)	22(81.5)	27(100.0)
計	19	98	74	191

()内は%を示す

期の短い25日以下群においては遅延群は皆無である。最も普通の周期と考えられる26~31日群においては正常群が70.3%を占めるが、早期群および遅延群がそれぞれ11.7%、18.0%を占める。さらに26~31日群のうち28日型と答えたもの48例における早期群、正常群、遅延群の頻度はそれぞれ7例(14.6%)、36例(75.0%)、5例(10.4%)であつた。一方、周期の長い32~40日群においては早期群、正常群はそれぞれ2.4%、26.8%と減少し、遅延群は70.7%と増加する。もつと周期の長い41日以上群および不順群では早期群は皆無となり、遅延群は増加傾向を示す。

2. 排卵日と不妊症、既往流産および切迫流産

対象191例中満3年以上の不妊症は20例(10.5%)であつた。早期群、正常群、遅延群における不妊症の頻度

表 2 排卵日群における不妊症、既往流産および切迫流産の頻度

排 卵 日 群 因 子	早期群 N=19	正常群 N=98	遅延群 N=74	計
不 妊 症	4(21.4)	9(9.2)	7(9.5)	20
自然流産の既往	9(47.4)	59(60.2)	38(51.4)	106
1~2回	9	46	29	
3回以上	0	13	9	
切 迫 流 産	5(26.3)	21(21.4)	10(13.5)	36

()内は%を示す

は表2に示すごとくそれぞれ21.4%、9.2%、9.5%である。遅延群は正常群とほぼ同率であるが、早期群は正常群の約2倍の頻度を示す。

自然流産の既往をもつものは対象例中106例(55.5%)であつた。早期群、正常群、遅延群におけるその頻度はそれぞれ47.4%、60.2%、51.4%である(表2)。早期群、遅延群とも正常群と差がない。自然流産を3回以上くり返した習慣性流産は対象例中22例(11.5%)にみられた。早期群、正常群、遅延群におけるその頻度はそれぞれ0、13.3%、12.2%である(表2)。遅延群は正常群とほぼ同率であるが、早期群では1例も認められない。

切迫流産を妊娠のfirst trimesterにおいて持続性の出血、下痛痛のいずれか一方、あるいは両者を伴うものとする対象例中36例(18.8%)がこれにあたる。早期群、正常群、遅延群におけるその頻度はそれぞれ26.6%、21.4%、13.5%である(表2)。正常群に比べて早期群はやや高率であり、遅延群はやや低率である。

すなわち、早期群においては不妊症および切迫流産の頻度が高い傾向にあり、習慣性流産の頻度が低い傾向にある。一方、遅延群においては不妊症および自然流産の頻度は正常群と差がなく、切迫流産の頻度はやや低い傾向にある。

3. 排卵日と在胎日数(排卵・分娩日数)

対象例の在胎日数(排卵・分娩日数)は216日から285日の範囲にあり、平均 264.1 ± 9.7 (M $\pm$ SD) 日であつた。早期群、正常群、遅延群の平均在胎日数はそれぞれ 268.1 ± 5.6 (M $\pm$ SD) 日、 264.2 ± 11.3 (M $\pm$ SD) 日、 263.1 ± 10.4 (M $\pm$ SD) 日である。早期群は正常群に比べやや在胎日数が延長している。

在胎日数を7日間隔の8区間に分け2)(ただし216~236日間のみは日数幅を増した)、それらと排卵日群との関係をみると表3のごとくなる。早期群、遅延群は265~271日にピークを示し、正常群は258~264日にピークを示す。

表 3 排卵日群と在胎日数 (排卵・分娩日数)

排卵・分娩日数 排卵日群	216 ~236日	237 ~243日	244 ~250日	251 ~257日	258 ~264日	265 ~271日	272 ~278日	279 ~285日	計
早期群	0	0	0	0	5(26.3)	9(47.4)	4(21.1)	1(5.3)	19(100.1)
正常群	1(1.0)	3(3.1)	5(5.1)	13(13.3)	29(29.6)	24(24.5)	11(11.2)	12(12.2)	98(100.0)
遅延群	1(1.4)	2(2.7)	7(9.5)	9(12.2)	18(24.3)	21(28.4)	14(18.9)	2(2.7)	74(100.1)
計	2(1.0)	5(2.6)	12(6.3)	22(11.5)	52(27.2)	54(28.3)	29(15.2)	15(7.9)	191(100.0)

()内は%を示す

表 4 排卵日群と児体重との関係

児体重 排卵日群	2,500g 以下	2,501g ~3,000	3,010g ~3,500	3,501g ~4,000	4,001g 以上	計
早期群	0	8(42.1)	5(26.3)	5(26.3)	1(5.3)	19(100.0)
正常群	4(4.1)	35(35.7)	40(40.8)	16(16.3)	3(3.1)	98(100.0)
遅延群	3(4.1)	15(20.3)	39(52.7)	16(21.6)	1(1.4)	74(100.1)
計	7(3.7)	58(30.4)	84(44.0)	37(19.4)	5(2.6)	191(100.1)

()内は%を示す

在胎日数を257日以内と258日以上に分け比較すると、早期群は正常群に比べ有意に257日以内が少ない ($P < 0.05$)。すなわち、早期群においては在胎日数の短いものの出現が少ないと言える。また、在胎日数279日以上のもを“真の予定日超過”と仮定し²⁾比較すると、遅延群は正常群に比べ有意に“真の予定日超過”の頻度が少ない ($P < 0.05$)。

4. 排卵日と児

a. 出産時児体重について

早期群、正常群、遅延群の児体重平均値はそれぞれ $3,187 \pm 449$ (M $\pm$ SD)g, $3,158 \pm 428$ (M $\pm$ SD)g, $3,210 \pm 407$ (M $\pm$ SD)g であつた。遅延群は正常群に比べやや高体重である。

児体重を5階級に分け、それらと排卵日群との関係をみると表4のごとくなる。早期群は2,501~3,000g にピークを示し、正常群および遅延群は3,001~3,500g にピークを示す。また正常群は2,501~3,000g の割合が比較的多いのに対し、遅延群は3,501~4,000g の割合が比較的多い。さらに児体重を3,000g 以下と3,000g 以上に分け比較すると、遅延群は正常群に比べ有意に3,000g 以下が少ない ($P < 0.05$)。

著者らは先に在胎日数 (排卵・分娩日数) による児体重の予測を試み³⁾、予測値と実測値との差 (実測値 - 予測値) が差の標準偏差の $-\frac{1}{2}$ 以下になるものを SFD, $-\frac{1}{2} \sim +\frac{1}{2}$ の間にあるものを AFD, $+\frac{1}{2}$ 以上になるものを LFD とした。今回これに基づいて排卵日群における SFD, AFD, LFD の頻度をみると表5のごとくなる。

表 5 排卵日群における SFD, AFD, LFD の頻度

排卵日群	SFD	AFD	LFD	計
早期群	1(5.3)	17(89.4)	1(5.3)	19(100.0)
正常群	6(6.1)	88(89.8)	4(4.1)	98(100.0)
遅延群	4(5.4)	65(87.8)	5(6.8)	74(100.0)
計	11(5.8)	170(89.0)	10(5.2)	191(100.0)

()内は%を示す

る。遅延群では正常群に比べやや LFD が多い傾向がみられる。

b. Fetal distress, Apgar score, 奇形および周期死亡について

Fetal distress を胎児心拍数が数回の陣痛周期を通じて毎分120以下または160以上で完全な回復を認めないものとする対象例中11例 (5.8%) がこれにあたる。早期群、正常群、遅延群におけるその頻度は表6に示すごとくそれぞれ5.3%, 8.2%, 2.7%である。早期群、遅延群とも正常群に比べむしろ低率である。

Apgar score は出生1分後の値とした。Apgar score 7点以下のものは対象例中17例 (8.9%) であつた (表6)。早期群、正常群、遅延群における Apgar score 7点以下のものの頻度はそれぞれ5.3%, 10.2%, 8.1%である。早期群、遅延群とも正常群に比べむしろ低率である。

児の奇形は対象例中2例 (1.0%) であり、いずれも

表 6 排卵日群における Fetal distress, Apgar score, 奇形および周産期死亡の頻度

排卵日群 因子	早期群 N=19	正常群 N=98	遅延群 N=74	計
Fetal distress	1(5.3)	8(8.2)	2(2.7)	11
Apgar score 7 点以下	1(5.3)	10(10.2)	6(8.1)	17
奇形	0	2(2.0)	0	2
周産期死亡	0	2(2.0)	0	2

()内は%を示す

表 7 排卵日群における児性別比

排卵日群 児性別	早期群	正常群	遅延群	計
男児	9(47.4)	49(50.0)	47(63.5)	105(55.0)
女児	10(52.6)	49(50.0)	27(36.5)	86(45.0)
計	19(100.0)	98(100.0)	74(100.0)	191(100.0)

()内は%を示す

正常群に属した。周産期死亡も対象例中 2 例 (1.0%) であり、いずれも正常群に属した。

c. 児性別について

児の男女比における男児の割合は表 7 に示すごとく早期群 47.4%, 正常群 50.0%, 遅延群 63.5% である。遅延群では正常群に比べやや男児が多い傾向がみられる。

考 案

基礎体温表における排卵日推定に関して著者らは低温相最終日を排卵日としたが、この日の多くは体温上昇直前の陥落日と一致した。飯塚ら (1962)⁴⁾ の single insemination の報告によると低温相最終日に実施した妊娠例が最も多く、その 2 日前から高温相 1 日までの間の妊娠例が大多数を占め、この時期を離れると妊娠は極端に減少している。すなわち、排卵日を正確に決定することは困難であるが低温相最終日を排卵日と推定することは妥当でありまた方法論的に容易である。

ヒトにおいて、月経初日から数えて幾日までに排卵したら正常で幾日以上経って排卵したら遅延排卵というかとの定義はないし、また定義することは非常に困難である。最も正常と考えられる月経周期 28 日型の婦人では 14 日に排卵すると考えられるが、今回の結果で 14 日に排卵した例は 8.4% (16/191) にすぎないし、排卵日のピークは 13 日と 17 日にあり、中央値は 17 日、平均値は 19 日である。すなわち正常域の決定が難しい。著者らは排卵日の分布が 18 日以降急激に減少することおよび Iffy (1963)⁵⁾

の月経周期の 18 日以降の排卵に流産率が高いという報告とを考え合わせ、18 日以上排卵を遅延排卵と仮定した。また、早期の排卵に関しては任意に、11 日以前の排卵を早期排卵と仮定した。

月経周期と排卵日との関係について、周期の短い群では排卵は極端に遅れることはなく、周期の長い群では排卵は極端に早くおこることはなかった。しかし 28 日型と答えた婦人においても排卵日は 9 日から 25 日までの範囲にわたり、しかも、14 日の排卵は 10.4% (5/48) にすぎない。同一人でも周期毎に相当の変動があることがわかると同時に月経周期の不確かさを示している。

遅延排卵により妊娠、分娩した婦人においては不妊症および流産の既往をもつものが増加すると思われるが、今回の結果ではそういう傾向は認められなかった。一方、早期の排卵により妊娠、分娩した婦人においては不妊症の既往をもつものの増加をみた。遅延排卵による受精卵の予後として切迫流産について検索したが、むしろ低頻度であった。しかるに早期の排卵においてはこの頻度はやや増加する傾向が認められた。これらのことから遅延排卵は不妊、不育の因子として関与する部分は小さいと言えよう。

排卵日と在胎日数 (排卵・分娩日数) との関連について、著者らの以前の報告¹⁾ では排卵・分娩日数 257 日以前における遅延排卵の頻度が有意に多かった。しかし今回の結果では排卵・分娩日数 257 日以前における頻度は遅延群と正常群とで差がなく、早期群が正常群に比べ有意に少なかった。早期群を新たに区別したことにより、より明確な結果があらわれたものと思われる。すなわち、遅延排卵において在胎日数の短いものが多かったという以前の結果は、実は早期の排卵において在胎日数の短いものが少ないという結果であることがわかる。さらに遅延群における“真の予定日超過”が少ないという結果と合わせ考え、在胎日数分布における排卵日群の割合をみると、早期群は“右寄り”の傾向を示し、遅延群は“左寄り”の傾向を示すことがうかがわれる。

児体重に関して、遅延群では正常群に比べ 3,000g 以下のものが有意に少なかった。また児体重平均値は正常群 < 早期群 < 遅延群と遅延群で高値を示した。一方、在胎日数平均値は遅延群 < 正常群 < 早期群と早期群で高値を示した。これらのことを考え合わせると早期群では在胎日数の割合に児体重が小さく、遅延群では在胎日数の割合に児体重が大きいきと言える。SFD, LFD との関連を含めて今後更に検討しなければならない。

遅延排卵による受精卵に関して、Mikamo (1961)⁶⁾ は *Xenopus laevis* (蛙) で軽度の濾胞内過熟卵は排卵刺激を受けると一見正常な成熟分裂を行って受精するが、分

裂中の紡錘体を詳細に調べると、第1成熟分裂や第2成熟分裂において不分離染色体が紡錘極に早期に移動することを観察し、より強い過熟の影響を受けた卵の紡錘糸では退化が明らかなことを観察した。また、Witschi & Laguens (1963)⁷⁾は同じく *Xenopus laevis* (蛙) で過熟卵から生じた発生異常個体を染色体分析し、きわめて高頻度のモノソミー、モザイクを見出し、トリソミーも観察した。哺乳類においては Fugo & Butcher (1966)⁸⁾が発情前期雌ラット (Holtzman) にペントバルビタールを投与し、黄体形成ホルモンの分泌急増を抑制して48時間排卵を遅延させ、受精率の低下、多精子受精、発生異常の増加を観察している。さらに翌年 (1967)⁹⁾彼らは遅延排卵が染色体構成に及ぼす影響を報じ、コントロール群の1.5% (6/410) に比べ遅延排卵群では4.6% (18/390) の染色体異常卵を観察している。最近、Mikamo & Hamaguchi (1975)¹⁰⁾は同様にラットにおいてコントロール群の0.7% (2/280) に比べ、遅延排卵群では7.3% (20/276) の多個性異常胎胚の出現を観察し、複数精子による受精がその原因であろうと報告した。ヒトにおいては、Arrata & Iffy (1971)¹¹⁾および Iffy et al. (1972)¹²⁾の1回性交による受精時期の推定から、および人工・自然流産、子宮外妊娠などの胎児の crown-ump length の測定成績から、遅延排卵による月経周期中期以降の受精が異常卵になる確率の高いことを推察している。

一方、今回の対象中2例の奇形 (兔唇、鎖肛) および2例の周産期死亡はいずれも遅延排卵群に含まれなかった。また遅延排卵群において fetal distress, depressed baby 等の児の異常の増加はみられなかった。さらに、遅延排卵群において在胎日数の割合に児体重の増加をみた。これらのことは遅延排卵に関する従来のマイナス面の強い報告とは相反した結果を示している。

結 論

月経第18日以降の排卵を遅延排卵とし、その妊娠経過、児の状態等について retrospective に推計学的考察を試みた。その結果、遅延排卵において妊娠、分娩、児に関する異常の増加はみられなかった。

なお本研究の一部は日本母性保護医協会おぎあ献金研究費助成によるものである。

文 献

- 1) 野口邦夫, 大塚晴久, 斉藤 幹: 遅延排卵と妊娠, 分娩, 産と婦, 44: 41, 1977.
- 2) 野口邦夫: 排卵日より起算した在胎日数と子宮内胎児発育, 日産婦誌, 28: 775, 1976.
- 3) 野口邦夫, 斉藤 幹: SFD に関する統計的考察—排卵日より起算した胎日数を用いて, 日産

婦誌, 29: 44, 1977.

- 4) 飯塚理八, 吉田 豊: Single Insemination よりみたる二, 三の問題について, 産婦の実際, 11: 429, 1962.
- 5) Iffy, L.: The time of conception in pathological gestations (The scope of the reflux theory), Proc. Roy. Soc. Med., 56: 1098, 1963.
- 6) Mikamo, K.: Overripeness of the egg in *Xenopus laevis* Daudin, D. Sci. Thesis, Hokkaido Univ., 1961.
- 7) Witschi, E. and Laguens, R.: Chromosomal aberrations in embryos from overripe eggs, Develop. Biol., 7: 605, 1963.
- 8) Fugo, N. W. and Butcher, R. L.: Overripeness and the mammalian ova. I. Overripeness and early embryonic development, Fertil. Steril. 17: 804, 1966.
- 9) Butcher, R. L. and Fugo, N. W.: Overripeness and the mammalian ova. II. Delayed ovulation and chromosome anomalies, Fertil. Steril., 18: 297, 1967.
- 10) Mikamo, K. and Hamaguchi, H.: Chromosomal disorder caused by preovulatory overripeness of oocytes, Aging Gametes, Ed. R. J. Blandau, p. 72, S. Karger AG, Basel, 1975.
- 11) Arrata, W. S. and Iffy, L.: Normal and delayed ovulation in the human, Obst. Gynecol. Surv., 26: 675, 1971.
- 12) Jakobovits, A., Iffy, L., Wingate, M. B., Slate, W. G., Chatterton, R. T., Jr. and Kerner, P.: The rate of early fetal growth in the human subject, Acta anat., 83: 50, 1972.

A clinical and statistical study on delayed ovulation

Kunio Noguchi and Motoi Saito

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Tokyo Medical
and Dental University, Tokyo

Haruhisa Otsuka

Tokyo Metropolitan Fuchu Hospital, Tokyo

In a retrospective study of 191 women who were delivered of live infants following the spontaneous onset of labor, the day of ovulation was estimated. Every ovulation occurred spontaneously. The results of basal body temperature recordings were used to estimate the day of ovulation. Three groups of the day of ovulation, early, normal and delayed, were set up. Early ovulation was defined as that occurred before

Day 12 of the menstrual cycle, normal was between Day 12 and Day 17 and delayed was after Day 17.

The relationship between the day of ovulation and the outcome of pregnancy was analyzed. The following results were obtained. 1) The incidence of threatened abortion was higher in early group and lower in delayed group than in normal group. 2) In early group short ovulation-delivery interval in days was significantly less

than in normal group, and in delayed group true prolonged pregnancy was significantly less than in normal group. 3) In delayed group the mean birth weight of infants was higher than in normal group. 4) In delayed group the incidence of fetal distress was less than in normal group. 5) In delayed group the rate of male infants was higher than in normal group. 6) Two cases of congenital anomalies and two cases of perinatal mortality belonged to normal group, respectively.

(昭和52年6月27日受付)

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE MECHANISM OF CELL GROWTH AND PROGESTERONE SYNTHESIS IN HUMAN GRANULOSA CELL *IN VITRO*

Makoto SHOJI, Hideo KINOSHITA, Hajime HOSODA,
Kiyoshi OHKAWA, Shigeru TAMAI, Mamoru ENDO,
Ikuyo YAMAMOTO and Shoichi HACHIYA

Department of Obstetrics and Gynecology The Jikei University School of
Medicine Nishi-Shimbashi Minato-ku, Tokyo 105 JAPAN

Abstract: Granulosa cells, obtained from normal ovaries, were cultured in CO₂ chamber at 37°C; and then secreted progesterone was measured every other day by means of radioimmunoassay. For morphologic study, the cultured cells were fixed for electron-micrography and Sudan III staining.

(1) Progesterone production was observed in higher levels, according to the growth of granulosa cells which were obtained from mature follicles without the addition of exogenous hormone.

(2) In ultrastructural study, the cells, indicating high levels of progesterone, showed such remarkable characteristics as large clear nuclei with prominent nucleolus, grouping of lipid droplets surrounded by mitochondria with dense matrix, and fine filaments and microtubuli. These findings partially resemble that of granulosa lutein cells on the 2nd day after ovulation, and provide sufficient evidence to indicate hyperactivity of progesterone production.

(3) In Sudan III staining, progesterone producing cells showed fine lipid droplets in cytoplasm, which indicates increase of lipid metabolism.

It can be considered that granulosa cells revealed their potential of progesterone synthesis by direct exposure to the culture medium or by loss of inhibitory mechanism of the organic circumstances. On the other hand, high level of progesterone production without the addition of LH or other exogenous hormones in culture can suggest that matured granulosa cells produce progesterone autonomously.

Introduction

The nature of the granulosa cell has been the subject of much interest not only because of its progesterone producing mechanism, but also the related mechanism with oocyte development and follicular fluid. Furthermore, the elucidation of the mechanisms of luteinization and the life span of corpus luteum are much anticipated because of their importance to the study of infertility and sterility.

As it is known, progesterone is very important in making a condition for nidus implantation and maintenance of pregnancy.

LH, FSH, HCG, prolactin, prostaglandin and estrogen are considered to be the factors which have some effect on progesterone production of the granulosa cell. However, its mechanisms are different according to the various ovarian cycles and the species of animals. Thus, it is invaluable to clarify this mechanism in the human being.

Previously, the experiments on steroid production were reported by Channing. In her study culturing granulosa cells in many species and progesterone production of granulosa cell were directly demonstrated. Recently, the mechanisms of luteinization and progesterone production have been

elucidated remarkably due to the establishment of the granulosa cell culture.

In this present investigation, using the techniques of monolayer culture of human granulosa cell, we examined: (1) the relationship between the follicular development (developing process of granulosa cell) and the activity of progesterone production; and (2) the differentiating mechanism of luteinization.

Materials and Methods

(Materials)

Normal ovaries removed by laparotomy were obtained from women aged 25 to 40 with regular menstrual cycles. Ovaries were chosen from the cases which are considered to be endocrinologically normal except those with ovarian diseases. The menstrual cycles of the group varied from 25 to 30 days in length.

(Grouping of the follicles)

Removed ovaries were stored in a cold phosphate buffer solution, and then they were dissected under a binocular dissecting microscope within 2 to 4 hours. The diameter of each follicle was measured.

In this experiment, we divided the dissected follicles into three groups according to their degree of follicular development (Fig. 1). Group 1 consists of the follicles obtained from the 5th to the 10th day of

Materials

- group 1. Follicular phase follicle
menstrual cycle: 1-10th day
follicular size: 2-5mm
- group 2. Preovulatory follicle
menstrual cycle: 11th day-ovulation
follicular size: 6mm
- group 3. Luteal phase follicle
Menstrual cycle: post-ovulation
follicular size: within 5mm

Fig. 1

menstrual cycle and measured 2 mm to 6 mm in diameter. Group 2 consists of follicles in late follicular phase, measuring larger than 6 mm. Group 3 consists of follicles in the luteal phase except luteinized ones.

(Culturing methods)

After being washed with phosphate buffer solution, the dissected follicles were slit with sharp scissors, and granulosa cells were squeezed out and aspirated into Pasteurs pipet. The outline of the procedure is shown in Fig. 2. A sample of suspension

Cultured methods

materials (removed from human ovary)
↓
rinsed with PBS (pH. 7.4)
↓
aspirated the granulosa cells from follicle
↓ (method of Channing)
pipetting with PBS
↓
cell count (Lissamin green staining)
cultured with TC-199 (FBS 20%) in CO₂ chamber
↓ (inoculum size: 0.5-5×10⁴/2 ml/dish)
cell count
medium change (every other day)
↓
fixed for morphological examination

Fig. 2

of granulosa cells was divided into different amounts containing 5×10³ to 5×10⁴. These cells were determined to be living by Lissamin green and were layered on Lab-Tek chambers. Each culture received 2 ml of Medium 199 (CIBCO) containing antibiotics and 20% fetal bovine serum (FLOR), and was incubated at 37°C in CO₂ chamber. Fetal bovine serum added to the culture medium contained immunological LH and FSH activity equivalent to 0.40 mIU/ml and 0.56 mIU/ml, which are considered to be negligible levels comparing to those of *in vivo* (Fig. 3).

Medium contents

20% Fetal Serum
80% TC-199 (Gibco)
0.25 mg/ml Fungizone
10 mg/ml Streptomycin

Hormone levels of medium

Growth Hormone: 0.46 ng/ml
Luteinizing Hormone: 0.4 mIU/ml
Follicle Stimulating Hormone: 0.56 mIU/ml
Estradiol-17β: 14.7 pg/ml
Progesterone: 0.1 ng/ml

Fig. 3

(Progesterone assay)

Every 48 hours the medium was changed and stored at -20°C for assay. The progesterone contained in the cultured medium was assayed by radio-immunoassay method (CEAIRA-SORAN Pg. Kit).

(Morphological observation)

The follicular wall was fixed by formaldehyde for hematoxyrin-eosin staining after aspiration for granulosa cell culture, and the stage of the follicle was determined (Fig. 4, 5, 6).

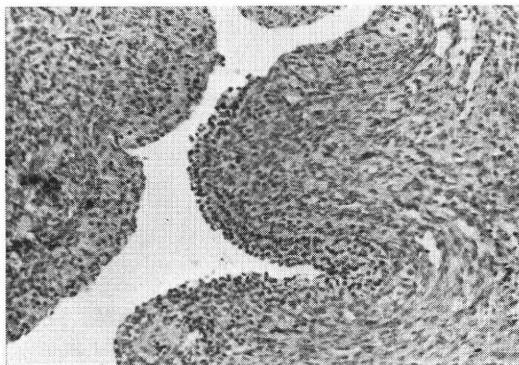


Fig. 4 Treated (pippeting) follicular wall of the 6th day of menstrual cycle.

Granulosa cell layer is connecting tightly with theca cell layer. The nuclei are hyperchromatic. A few mitosis are detectable. These findings indicate proliferation of granulosa cell. It is obvious that only granulosa cells are desquamated in left of picture, but theca layer is intact.

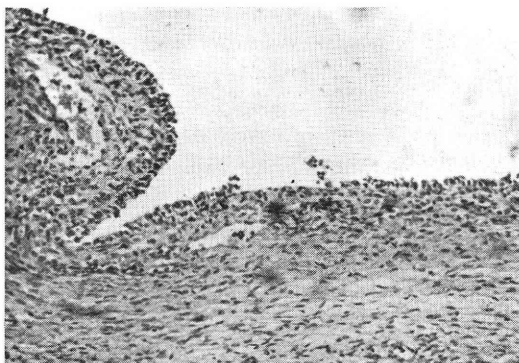


Fig. 5 Treated (pippeting) follicular wall of 12th day of menstrual cycle.

Capillary shows remarkable dilatation and congestion. This follicle indicates preovulatory follicle. The desquamating granulosa cells are represented.

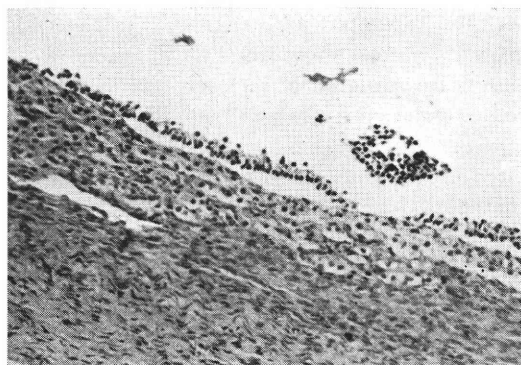


Fig. 6 Treated (pippeting) follicular wall of luteal phase.

Theca cell shows the formation of luteinized cell with enriched cytoplasm and vacuolation. Granulosa cell with pycnotic nucleus connects loosely with theca layer. The mass of granulosa cells can be seen in the middle.

—Electron-microscopic techniques—

The granulosa cells before culture were fixed in chilled 2.5% glutaraldehyde in 0.1 mol phosphate buffer solution for 2 hours; and subsequently changed several times with the same chilled buffer. Then they were postfixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer and embedded in Epon 812. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and were examined with Hitachi HU-11B electron microscope.

Cultured cells were fixed at several periods of culture days, dehydrated and stained by the method described above. They were, then, filtrated in situ embedding with whole recovery of cell colonies grown on glass cover slips. After pipetting a few drops of Epon on the cultured cover slips, they were incubated for polymerization for 36–48 hours at 60°C . Then, Epon disk containing cultured cells were cleaved from the cover slips by rapid cooling. After screened under a microscope, cell colonies were selected and fixed to prepared empty blocks by Sony Bond.

Results*(Cell growth and progesterone production)*

Cell population was calculated every other day to determine growth rate in comparison

to the implanted arrival cells. As the cell growth curves show in Fig. 8, there was significant difference in each group. The cell population increased rapidly until the 4th or 6th day of culture, and it exhibited a tendency to decrease slowly after that period.

Progesterone secretion rate per cell per day was calculated in each case and was studied in three groups as shown in Fig. 7.

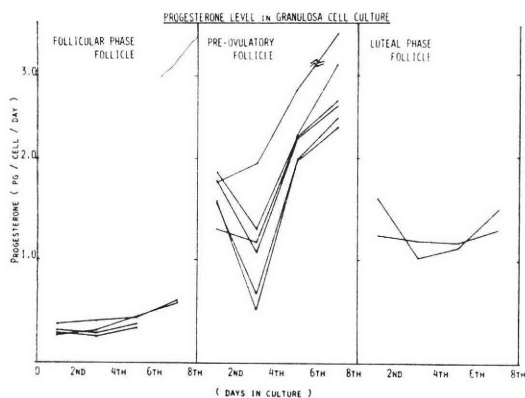


Fig. 7 Progesterone level of culture medium in each case.

The medium progesterone levels of cultured granulosa cell which were removed from preovulatory follicles are at the highest on the 6th and the 8th day of culture (middle part). They are at the lowest in the cases follicular phase (left part). Medium progesterone level is measured as described in *materials and methods*.

By comparing the progesterone secretion rates in each group, it was revealed that the granulosa cells obtained from preovulatory follicles secreted the highest level of progesterone. On the other hand, the granulosa cells obtained from follicular phase follicles secreted the lowest level. The secretion rates of the cells obtained in luteal phase showed the same result as group 2, which exhibited the tendency to increase from the 4th day of culture. However, the increasing degree was weaker and indicated significantly lower levels than group 2 (Fig. 8).

(Morphological findings)

—Light microscopic observation—

Morphologically, granulosa cells in culture

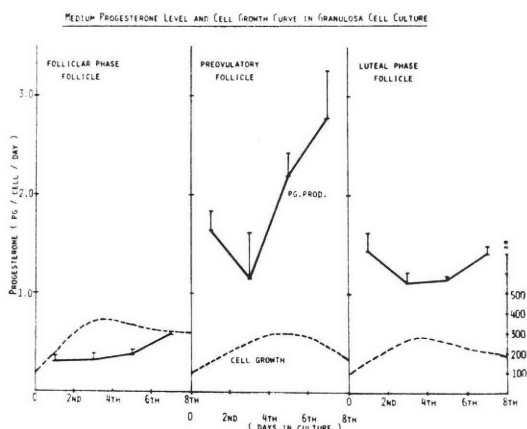


Fig. 8 Medium progesterone level and cell growth curve in each group.

Cell population increased rapidly until the 4th day of culture, and there is no significant difference among each group. The progesterone level of group B (removed from preovulatory follicles) is significantly high and the level shows rapid increase from the 4th day of culture. On the contrary, group A (removed from follicular phase follicles) shows the lowest level and does not show significant increase of progesterone production. Each point represents the mean $\pm$ SD. of value.

exhibited epithelial or epithelial-like patterns in the phasecontrast microscope. After 48 hours in incubation, formation of some colonies and enlargement of cytoplasm were obvious, and moderate amounts of fine granules were observed in cytoplasm surrounding round or oval nucleus. These granules exhibited a tendency to increase gradually.

In the histochemical observation by Sudan III staining, the cultured cells which indicated high level of progesterone production showed prominent fine lipid droplets in cytoplasm (Fig. 9, 10).

—Electron-microscopic observation—

Ultrastructural characteristics of cultured granulosa cells, indicating high level of progesterone production, were as follows: 1) nuclei enlargement with homogenous chromatin pattern and prominent nucleolus; 2) cytoplasm containing aggregated lipid droplets surrounded by mitochondria with dense matrix, microfilaments and microtubuli; and 3) prominent tight junction (Fig. 11). Consequently, we recognized that these find-

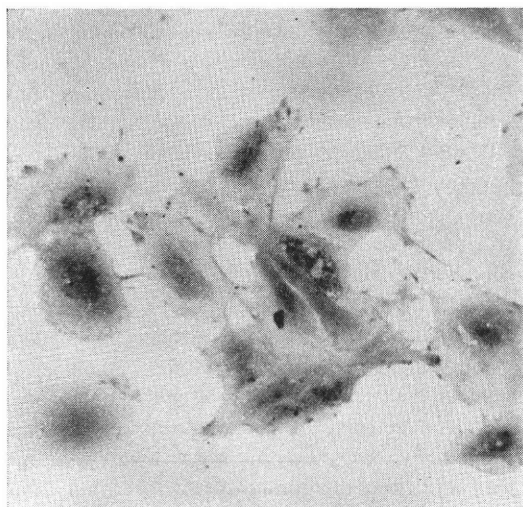


Fig. 9 Sudan III staining of the 4th day of culture cells of group B.

They show epithelial or epithelial-like patterns and red fine granules stained by Sudan III staining in cytoplasm. These lipid granules exhibit the tendency to increase gradually in the presence of high-level of progesterone production (original Mag. $\times 200$).

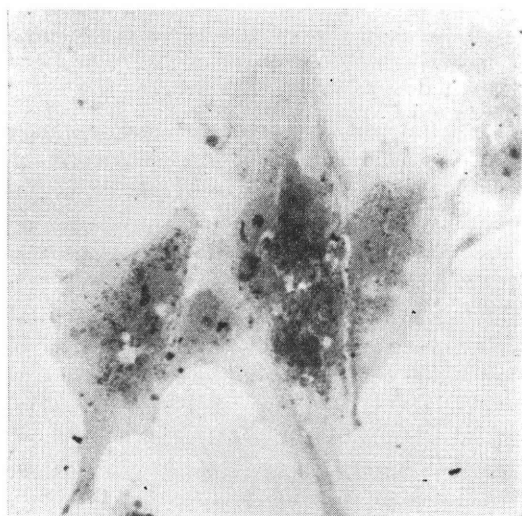


Fig. 10 Sudan III staining of the 6th day of culture cells of group B.

Fine lipid granules exhibit the tendency to increase gradually surrounding round or oval nucleus in enlarged cytoplasm. (original Mag. $\times 400$)

ings resembled the results of Ohkawa in his report concerning granulosa lutein cell *in vivo* on the 2nd day after ovulation (Fig. 12).

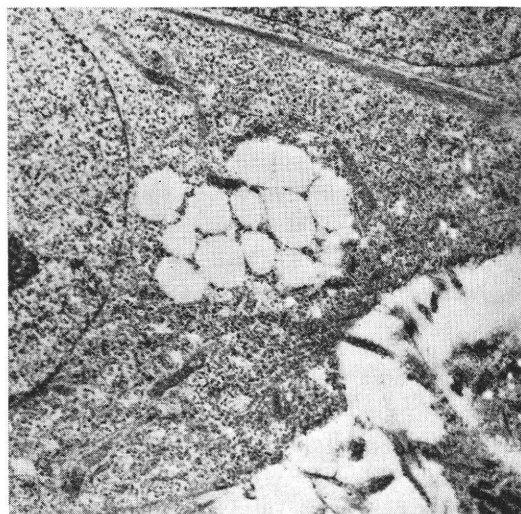


Fig. 11 Electron-micrograph of granulosa cell (8th culture day)

A large nucleus with prominent nucleolus can be seen on the left. In cytoplasm, aggregated lipid droplets surrounded by mitochondria with dense matrix, microfilaments and microtubuli are seen. Tight junction is obvious in upper part.

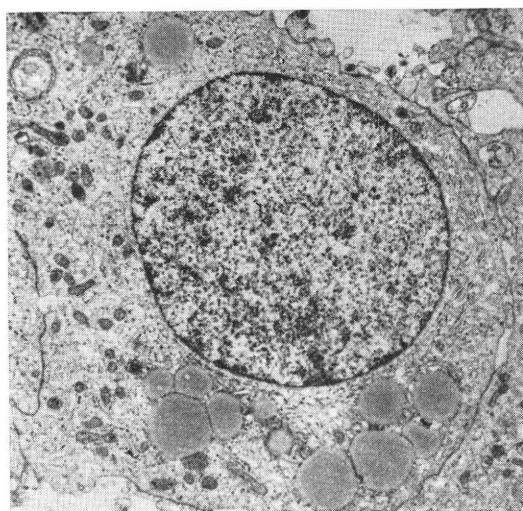


Fig. 12 Electron-micrograph of the 2nd day after ovulation *in vivo*.

Granulosa cell has the features of lutein cell. A large round nucleus, many lipid droplets, massive SER and tight junctional complex are obvious. These features resemble granulosa cell in Fig. 11 and indicate hyperfunction of steroidgenesis.

Discussion

1) Follicular development and progesterone producing activity of granulosa cell

The granulosa cells obtained from mature follicles produced high level of progesterone, which can mean that they were cultured without losing the potentiality of progesterone production. Although the problems of similarity between *in vivo* and *in vitro* have been remaining, this result indicates that the granulosa cells of early follicular phase (immature follicles) possess poor activity or lack activity of progesterone production, and also that granulosa cells obtain their activities with follicular maturation.

Merk et al. stated in an investigation, giving estradiol to hypophysectomized rats, that estrogen in the rat may prepare granulosa cell for further differentiation by pituitary hormone or other factors. On the other hand, Channing previously demonstrated that the addition of LH and FSH or d-b-c-AMP reveals progesterone production of medium-sized follicle in monkey.

Because of the findings of difference among species, the mechanisms of preparation or conditioning for response in the cellular level of the human granulosa cell has not been elucidated sufficiently.

The process of fine structural changes correlated with progesterone production *in vitro* was mentioned by Channing and Crisp using rhesus monkey. In their study, the mitochondria possessing tubular or villiform cristae and electron dense matrices, microtubuli, dispersed or hypertrophied accumulation of numerous lipid droplets are evident in luteinized granulosa cells in culture. These findings resemble those which were described by Nicosia using rabbit. Furthermore, they are similar to those which described granulosa lutein cell *in vivo* and to the findings of another steroid producing cell (Dahl, Aoki and Connell). From the morphological point of view, it is very difficult to discuss the similarity between progesterone producing cell *in vitro* and the luteinized cell *in vivo*. Numerous factors, such as LH, HCG, estrogen, hormone-like factors or mechanical factors of surrounding

tissue have considerable effects on morphological luteinization. In this study, we also recognized evidence which indicates that progesterone production is characterized by enlarged nuclei, prominent nucleolus, and aggregated lipid droplets surrounded by mitochondria. This evidence refers to co-worker Ohkawa's previous report concerning fine structural changes in the human granulosa cell in early luteinizing phase *in vivo*.

2) Realization of progesterone production in culture

As a result, the granulosa cell, which obtained the activity of progesterone production sufficiently, secreted in high level without the addition of gonadotropin or other exogenous hormones in culturing, and thus, presents two possible suggestions described below :

First, the granulosa cell having sufficient activity of progesterone production is inhibited by some external factors when they are in the follicle, and then as a trigger ovulation will release the inhibitory systems. Secondly, it reveals its potentiality autonomously after ovulation by releasing inhibitory systems rather than by direct influence of gonadotropins or other hormones.

Ovum, theca cell layer, interfollicular pressure, nutrient circumstance and chemical agents including hormones supplied through blood serum, would be considered as inhibitory factors. Some investigators, however, have failed to show the noticeable inhibitory influence of oocyte or follicular fluid. Secretion of sufficient progesterone was observed only by transplantation of granulosa cell to the culture system. This result provides evidence that vascularization of the granulosa cell layer, direct exposure to the blood, rapid change of nutrient circumstance, loss of pressure and including release from ovum would have great influence on granulosa cell. Although group C showed medium level of progesterone production, it is not clear whether the follicles were in degenerative or developmental process.

Indeed, it is probable that the granulosa cell, which revealed its potentiality in culture, had been already influenced by LH surge, and that it exposed its function

continuously in culture. McNatty et al. demonstrated that there was no significant difference in progesterone level by adding LH or FSH when granulosa cells were removed from the follicles which include sufficient amounts of FSH, LH and estrogen in the fluid. On the other hand, Van de Wiele, subjecting hypophysectomized woman, demonstrated that continuous existence of low level of LH is necessary for the corpus luteum to secrete progesterone sufficiently. Although we could not refer to the problems about maintenance of corpus luteum in this investigation, our results were significant. In this study the progesterone production level of group B exhibited the tendency to increase day by day. Thus indicating that sufficient development of granulosa cell in follicular phase or preovulatory phase is more important than the direct effects of hormones on ovulation or after ovulation.

In conclusion, this investigation using human granulosa cell clarified the importance of previous conditioning (acquisition of potentiality or activity of progesterone production) in follicular phase for sufficient progesterone production. Also granulosa cell reveals its potentiality autonomously after ovulation by releasing the inhibitory system rather than by direct influence of gonadotropin or other hormones.

(Presented at the 28th Annual Meeting of Japan Society of Obstet. Gynec., Matsumoto, May 23-24, 1976, and at the 5th Congress of Endocrin., Hamburg, July 18-24, 1976)

References

- 1) Aoki, A. and Massa, E. M. : Early responses of testicular interstitial cells to stimulation by interstitial cell-stimulating hormone. *Am. J. Anat.* 134, 239-262, 1972.
- 2) Baker, T. G. : Influence of prostaglandins and human chorionic gonadotrophin on progesterone concentration and oocyte maturation in mouse ovarian follicles maintained in organ culture. *J. Endocr.* 65, 10-25, 1975.
- 3) Channing, C. P. : Tissue culture of equine ovarian cell types; culture methods and morphology. *J. Endocr.* 43, 381-390, 1969.
- 4) Channing, C. P. : Temporal effects of LH, hCG, FSH, and dibutyryl cyclic 3',5'-AMP upon luteinization of rhesus monkey granulosa cells in culture. *Endocrinology*, 94, 1215-1223, 1974.
- 5) Connel, C. T. : The effects of luteinizing hormone on the ultrastructure of the Leydig cell of the chick. *Z. Zellforsch.* 128, 139, 1972.
- 6) Crisp, T. M. : Fine structural events correlated with progesterone secretion during luteinization of rhesus monkey granulosa cell in culture. *Biology of Reproduction*, 7, 55-72, 1972.
- 7) Dahl, E. : Studies of the fine structure of ovarian interstitial tissue; b) effects of clomiphene on the thecal gland of the domestic fowl. *Z. Zellforsch.* 109, 227, 1970.
- 8) McNatty, K. P., Sawyer, R. S. and McNeilly, A. S. : A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature, Lond.* 240, 635-635, 1974.
- 9) McNatty, K. P. and Sawyer, R. S. : Relationship between the endocrine environment within the Graafian follicle and the subsequent rate of progesterone secretion by human granulosa cell in vitro. *J. Endocr.* 66, 391-400, 1975.
- 10) Merk, F. B., Botticelli, C. R. and Albright, J. T. : An intercellular response to estrogen by granulosa cell in rat ovary; electron microscope study. *Endocrinology* 90, 992-1007, 1972.
- 11) Moor, R. M., Hay, M. F., McIntosh, J. E. A. and Caldwell, B. V. : Effect of gonadotrophins on the production of steroids by sheep ovarian follicles cultured in vitro. *J. Endocr.* 58, 599-611, 1973.
- 12) Neal, P. and Baker, T. G. : Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin; I. Examination of critical time intervals. *J. Reprod. Fert.* 33, 399-404, 1973.
- 13) Neal, P. and Baker, T. G. : Response of mouse ovaries in vivo and in organ culture to pregnant mare's serum gonadotrophin and human chorionic gonadotrophin; II. Effect of different dose of hormones. *J. Reprod. Fert.* 37, 405-410, 1974.
- 14) Nicosia, S. V. : Luteinization of rabbit preovulatory granulosa cells cultured in vitro in presence of follicular oocytes: I. Growth characteristics and progesterone biosynthesis. *Fertil. Steril.* 23, 791-801, 1972.
- 15) Nicosia, S. V. : Luteinization of rabbit preovulatory granulosa cells cultured in vitro in presence of follicular oocytes; II.

- Histochemical and electron microscopic observation. Fertil. Steril. 23, 802-816, 1972.
- 16) Ookawa, K. et al. : Fine structural changes on human granulosa cell and theca interna cell about ovulation. Nippon Sanka-Fujinka Gakkai Zasshi 27, 47-54, 1975.
- 17) Vande Wiele, R. L. et al. : Mechanisms regulating the menstrual cycle in women. Recent Progr. Hormone Res. 26, 63-95, 1970,

ヒト顆粒膜細胞のプロゲステロン産生能 と細胞増殖の関連性について

庄司 誠, 木下英夫, 細田 肇,
大川 清, 玉井 滋, 遠藤 守,
山本育代, 蜂屋祥一

東京慈恵会医科大学, 第1産婦人科学教室

排卵に伴う黄体形成への移行と Progesterone 産生機序の解明は, 生殖生理学的に黄体細胞の役割と細胞生物学的に増殖と分化という見地から, 極めて興味ある所である。然るに, 顆粒膜細胞の Progesterone 産生能に関して, (1) 卵胞発育, 特に顆粒膜細胞の発育段階と, (2) 顆粒膜細胞の形態的黄体化との関連性について, ヒ

ト正常卵巣の顆粒膜細胞培養法を用いて, 形態的, 内分泌的検索により *in vivo* との対比を加えて検討した。

1) 卵胞期, 排卵前期, 黄体期の各期に採取した顆粒膜細胞の培養液中に産生された Progesterone 量は, RI 法により測定した。各群全れも, 2~4 日の間に一旦低下を示したが, その後, 排卵前期に採取した顆粒膜細胞は, 下垂体ホルモンの添加なしに, 他群に比し著明な Progesterone 産生を示した。

2) 著明な Progesterone 産生を示した群では,

a). Sudan III 染色により, 核辺縁の細胞質に, ステロイド産生を示唆する赤染微細顆粒を有意に認めた。

b). 超微形態的な観察により, 著明な核小体を有する大きな明瞭な核, 電子密度の高い matrix を示す mitochondria, 集簇した lipid droplets 等, Progesterone 産生を示唆する所見を得た。また, ヒト黄体初期の顆粒膜細胞との対比によって種々の類似点を認めた。

以上の結果から, 顆粒膜細胞が一定の Progesterone を産生するには, 少なくとも排卵前期大型卵胞に認められる様な成熟が必要であり, 未熟なものでは産生能が低い事が明らかとなった。すなわち, 顆粒膜細胞は, 卵胞期に Progesterone 産生能を次第に獲得するが, *in vivo* においては, 排卵期までその産生能は抑制されており, 排卵により同細胞固有の Progesterone 産生能を発揮するものと考えられた。

(受付: 昭和52年7月20日)

TESTOSTERONE BIOSYNTHESIS AND METABOLISM ON CRYPTORCHIDISM IN MAN

Ikumasa TAKENAKA and Hajime GOTO

Department of Urology, Tottori University School of Medicine

Abstracts: The biosynthesis and metabolism of testosterone was studied by incubating radioactive pregnenolone and testosterone with the testicular tissue from a cryptorchid patient who showed no spermatogenesis.

The formation of testosterone from pregnenolone-4-¹⁴C was rapid and abundant in a 28 year-old cryptorchid patient who had a large amount of the interstitial cells, while it was little in a 62 year-old patient of prostatic tumor who had a normal spermatogenic function but a small amount of the interstitial cells.

In the studies on the metabolism of testosterone-4-¹⁴C as substrate, DHT, 5 α -androstane-3 α (β), 17 β -diols and androstenedione were identified as the metabolites in two cryptorchid patients (14 years and 19 years old) as well as in a 22 year-old patient of injured testicle. Among them, 5 α -androstane-3 α , 17 β -diol was comparatively abundant, and its highest level was observed in the 14 year-old cryptorchid case without spermatogenic function.

As described above, the cryptorchid patients had a seemingly normal capacity to produce and metabolize testosterone which was comparable to that of the healthy man. This might be affected by the amount of the interstitial cells in the testicular tissue. It was difficult to prove the direct relationship of steroid hormone with the reduction or loss of the spermatogenic function.

Introduction

Cryptorchidism usually accompanies the gradual hypofunction and, finally, the loss of spermatogenesis with aging. Though, in infancy, there is no remarkable difference observed in comparison with the normal testicle, the immaturation of the seminiferous tubule becomes apparent in pre-puberty, and then in puberty and adulthood the complete disappearance of the spermatogenic function is established.

As one of the causal reasons for cryptorchidism, physical troubles such as thermos-thesic disorder have been considered. But there has been little study carried out from the endocrinological viewpoint. According to the extensive studies by Steinberger (1971) on the role of hormones in the spermatogenic function, it is believed that the seminiferous tubule is one of the target organs for testosterone, and therefore that

testosterone is essential for the genesis and maturation of the sperm.

With the aim to determine the endocrine environments in cryptorchidism without spermatogenic function, the biosynthesis and metabolism of the male hormones has been studied utilizing radioactive pregnenolone and testosterone.

Materials and Methods

Materials: 1. Testicular tissues. Testicular tissues obtained from 3 patients with cryptorchidism (14, 19 and 28 years old) were used, and those from patient with testicular injury (22 years old) and with prostatic cancer (69 years old) were used as control. After surgical removal, testicular tissues were immediately chilled with ice cubes and removed from tunica albuginea. The parenchymal tissues were sliced for incubation. Parts of parenchymal tissues were fixed with Bouin's solution and stained with hematoxylin-eosin

for histological examination (Table 1).

2. Steroid preparations. Pregnenolone (3 β -hydroxy-pregn-5-en-20-one), 17-OH-pregnenolone (3 β , 17 α -hydroxypregn-5-en-20-one), progesterone (pregn-4-ene-3, 20-dione), 17-OH-progesterone (17 α -hydroxypregn-4-ene-3, 20-dione) and androstenedione (androst-4-ene-3, 17-dione) used in this study were gifts from the Division of Biochemistry, Institute of Steroid Research, Tottori University Medical School. Testosterone (17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one), androstenediol (androst-5-en-3 β , 17 β -diol), DHT (17 β -hydroxy-5 α -androstane-3-one), 5 α -androstenediol (5 α -androstane-3 α

(β), 17 β -diol) were purchased from Sigma Chemical Co.

3. Radioactive steroids. Pregnenolone-4-¹⁴C (51 mCi/m mol) and testosterone-4-¹⁴C (56.2 mCi/m mol) were obtained from the Radio-Chemical Center (Amersham).

4. Coenzymes. NADPH (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) and G-6-P (glucose-6-phosphate) were obtained from Sigma Chemical Co.

Methods: 1. Incubation procedure. The slices from testicular tissues were incubated with the medium described in Table 2.

2. Extraction of steroids. The incubation

Table 1. Histological findings of testis

	Cryptorchidism			Injury	Prostatic cancer
	14yr	19yr	28yr	22yr	62yr
Sertoli's cell	++	+	+	+	+
Spermatogonia	+	+	—	+	+
1st spermatocyte	—	—	—	+	+
2nd spermatocyte	—	—	—	+	+
Spermatid	—	—	—	+	+
Spermatozoa	—	—	—	+	+
Leydig's cell	++	++	++	++	+

Table 2. Incubation medium

Experiment I

	Cryptorchidism (28 year)	Prostatic cancer (62 year)
Pregnenolone-4- ¹⁴ C (cpm, μ g)	3.7 $\times$ 10 ⁵ , 10.7	5.0 $\times$ 10 ⁵ , 15.5
Testicular tissue (mg)	200	200
Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) with 0.2% glucose (ml)	1.0	1.0

37°C, in air. Time: 3~60 min.

Experiment II

	Cryptorchidism		Injury of testis
	(14 year)	(19 year)	(22 year)
Testosterone-4- ¹⁴ C (cpm, μ g)	3.28 $\times$ 10 ⁵ , 20	8.6 $\times$ 10 ⁵ , 24.5	8.6 $\times$ 10 ⁵ , 24.5
Testicular tissue (slice)	2.0g	130mg	3.5g
Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) with 0.2% glucose (ml)	6.0	1.3	10.0
NADP (mM)	1.0	1.0	1.0
G-6-P (mM)	5.4	5.4	5.4

37°C, in air. Time: 2 hr,

was terminated by adding 3 volumes of dichloromethane: methanol (3:1) and the mixture was allowed to stand in a refrigerator overnight. The mixture was extracted 3 times with 10 ml each of dichloromethane. The combined extracts were dried with anhydrous sodium sulphate and the solvent was evaporated with a rotary evaporator.

3. Measurement of radioactivity. The dried residue was dissolved in ethanol, and an aliquot was measured for radioactivity, using a Pachard TRI-CARB scintillation spectrometer (model 3002) with a 10 ml scintillation fluid containing 4 g of PPO (2, 5-

diphenyloxazol) and 100 mg of POPOP (1, 4-di-[2-5-phenyloxazoly]-benzene) in 1000 ml of toluene.

4. Thin-layer chromatography (TLC). Chromatoplates were prepared with Kiesel Gel GF 254 (Merck) as the adsorbent. The chromatoplates were developed in the following solvent systems; system A, dichloromethane-ether (90:10); system B, benzene-ethylacetate (95:5); system C, benzene-ethylacetate (4:1); system D, benzene-ethanol (95:5); system E, 2-methylpropane-2-ol-ethylacetate-H₂O (5:5:2). For the location of the radioactive steroids the chro-

Table 3. Metabolism of pregnenolone

Cryptorchidism (28 year)

Incubation time (min.)	3	5	10	20	60
Progesterone	13.8	21.3	12.9	5.3	2.8
17-OH-progesterone	9.9	12.5	24.3	42.9	39.7
Androstenedione	6.3	7.7	8.9	11.5	6.6
17-OH-pregnenolone	6.8	4.4	4.0	3.2	3.0
Androstenediol	0.7	1.0	2.6	4.8	5.4
Testosterone	2.9	3.7	9.3	16.3	25.3
Pregnenolone*	#	32.6	23.0	4.3	2.8

Prostatic Cancer (62 year)

Incubation time (min.)	3	5	10	20	40
Progesterone	2.7	2.2	2.2	3.0	2.7
17-OH-progesterone	—	—	0.6	1.0	3.0
Androstenedione	0.9	1.1	2.2	4.6	3.6
17-OH-pregnenolone	2.9	7.1	7.0	7.5	5.7
Androstenediol	—	—	—	3.5	3.7
Testosterone	—	—	0.6	1.3	3.0
Pregnenolone*	72.0	76.9	79.6	74.0	68.3

Figures are expressed as 100% of recovered radioactivity.

* —Precursor # —not determined

Table 4. Metabolism of testosterone. Amount (%) of free metabolites.

	Cryptorchidism		Testicular injury
	14 year	19 year	22 year
Testosterone	87.3	90.1	88.2
DHT	0.2(1.2)	0.1(1.2)	0.3(2.2)
5 α -androstane-3 α , 17 β -diol	2.8(22.0)	1.6(15.7)	1.8(15.3)
5 α -androstane-3 β , 17 β -diol	0.2(1.9)	0.3(2.9)	0.2(1.7)
Androstenedione	1.6(12.7)	0.5(5.2)	1.1(9.3)
Non polar	7.9	7.4	8.4

matograms were scanned with an ALOKA TRM-1 thin layer chromatogram scanner.

5. Separation and purification of labelled steroids. *Experiment I*: The extracts obtained after incubation for 3, 5, 10, 20 and 60 min. were chromatographed separately in system A. By scanning the chromatogram, radioactive areas were detected on the chromatograms having the movabilities coinciding with those of authentic samples of 1) 17-OH-pregnenolone and androstenediol, 2) 17-OH-progesterone and testosterone, 3) pregnenolone, 4) androstenedione and 5) progesterone. The radioactive material in areas 1) to 3) were acetylated with pyridine and acetic anhydride. The acetate of 1) and 2) in system C and 3) in system B were chromatographed. The presence of the radioactive materials were also detected at the origin and the front of the chromatogram, but the further identification of the materials was not carried out.

Experiment II: The extracts were chromatographed in system A and the chromatogram was divided into several radioactive areas, which were extracted separately with acetone. A radioactive substance with the same movability as that of authentic DHT on TLC was acetylated with pyridine and acetic anhydride. Radioactive substance running the same zone as standard androstenediol was extracted and then the isolation of 3α - and 3β -hydroxy steroid was done on digitonin-silica TLC in system D according to Taylor's method (1971).

6. Identification of labelled steroid by recrystallization. Radioactive metabolites purified by TLC were measured for their radioactivity by using aliquots. To the other aliquots, carrier steroids were added and the mixtures were recrystallized to constant specific activities. The radiochemical homogeneity of the acetate was further proved by recrystallizing the free steroids after hydrolysis of the acetate with 2% KOH in ethanol at room temperature.

Results

1. Biosynthesis of testosterone from pregnenolone

In the testicular tissue from a 28 year-old

man with the retained testicle which incubated with radioactive pregnenolone as the starting material, about 70% of the radioactivity was already metabolized in 5 min. The formation of progesterone reached a maximum level of 21.3% at 5 min. after incubation and gradually decreased thereafter. The accumulation level of 17-OH-progesterone was found to be 10% even at 3 min.; climbed to a peak value of 42.9% at 20 min.; and fell slightly at 60 min. after incubation. Though the formation of androstenedione was confirmed to be 6.3% at 3 min. after incubation, the accumulation of this steroid was slow (11.5% at 20 min. and 6.6% at 60 min. after incubation). 17-OH-pregnenolone and androstenediol could be detected even at 3 min. after incubation, but in a less amount. The formation of testosterone could also be confirmed as early as 3 min. after incubation, and increased with time until a maximum accumulation level of 25% was attained at 60 min. after incubation.

On the other hand, in a 62 year-old patient with prostatic tumor who was studied as the control, the metabolism of radioactive pregnenolone was not only decelerated but also yielded less amounts of the metabolites; that is, even 17-OH-pregnenolone which was relatively abundant gave 7.1% of the total radioactivity at 5 min. and 7.5% at 20 min. after incubation. 17-OH-progesterone was confirmed to be present in a trace amount at 10 min. and still at a low level of 3.0% even at 40 min. after incubation. In contrast, progesterone could be detected as early as 3 min. after incubation, but in a small amount. It increased slightly at 20 min. after incubation. The amount of androstenedione was 0.9% at 3 min. and 4.6% at 40 min. after incubation, while that of androstenediol was negligible.

2. Metabolism of testosterone by testicular tissues

The percentage of metabolized testosterone was as low as 10% in the testicular tissues derived from the retained testicle as well as the injured testicle. As the metabolites, DHT, 5α -androstane- 3α , 17β -diol and androstenedione were identified. Among them, 5α -androstane- 3α , 17β -diol was comparatively

abundant, and the level of this metabolite was detected to be 22% in the testicular tissue from a 14 year-old patient with the retained testicle and 15.7% in that from a 19 year-old patient, whereas the testicular tissue from a 22 year-old man with the injured testicle showed a level of 15.3%. On the other hand, DHT which is claimed to a major androgen in the prostate was of 2.2% in the case of injury and 1.2% in the case of the retained testicle. The amount of 5α -androstane- 3β , 17β -diol was small in the said three cases. The level of androstenedione was 9.3% in the injury case, while that was as low as 1.2% in the cases of cryptorchidism.

Discussion

The first step of the biosynthesis of steroid hormone begins with the formation of pregnenolone. In the first experiment where the productivity of testosterone was compared, pregnenolone was employed as substrate. In the case of cryptorchidism in which no spermatogenesis occurred, pregnenolone was rapidly metabolized to form progesterone and 17-OH -progesterone from an initial stage of the metabolism and the production of testosterone was also remarkable. In contrast, in the case of prostatic tumor in which spermatogenesis was observed in spite of the old age, the metabolism of pregnenolone was decelerated with low production of testosterone.

In the experiments where the testicular tissue from a patient with cryptorchidism was incubated with progesterone, Kodaira, T. et al. (1974) reported the decreased biosynthesis of testosterone, though the tissue from an infant with cryptorchidism seemed histologically normal. Sciarra, F. et al. (1968) described that the formation from pregnenolone was low in the testicular tissues which clinically showed a reduced spermatogenesis. Moreover, Becker, W. G. et al. (1966) proved a decreased formation of testosterone in guinea pigs after spermatogenesis was inhibited by auto-immunization, though the propagation of the interstitial cells was observed. Therefore testosterone should be considered to take a certain part of the sem-

iniferous tubule including spermatogenesis.

As described in our experiments, clearcut results could not be obtained which showed a solid relationship between the spermatogenic function and the biosynthesis of testosterone. When the age difference of the cryptorchid patient from the control is considered, the obtained results seem to reflect the difference in the activity of relevant enzymes such as Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and in the biosynthesis of testosterone. Therefore, as indicated by Axelrod (1965) and by Inano et al. (1967), the biosynthesis of testosterone would be affected by the presence of the interstitial cells even in the case of cryptorchidism.

The second experiment was carried out in order to determine the direct effect of testosterone on the testicular tissue. Even in the cryptorchid tissue, DHT, 5α -androstenediol and androstenedione were confirmed as the metabolites. Among them, 5α -androstane- 3α , 17 -diol was most abundant. But, contrary to my expectation, the level of this hormone was higher in the 14 year-old cryptorchid patient without spermatogenic function than in the 22 year-old patient with injury of the testis who had a normal spermatogenic function. DHT was scarce in both cases.

Though the androgenic effect of 5α -androstenediol is thought to be weaker than that of testosterone and DHT (Rosner 1971), its effect on the human testicle is not yet well known. According to the experiments by Rivarola, M. A., et al. (1972) in the rat testicle, the interstitial cell is rich in androstenedione while the seminiferous tubule is rich in 5α -androstane- 3α , 17β -diol. Lloret and Weisz (1974) have reported the conversion of testosterone first to DHT and then rapidly to 5α -androstane- 3α , 17β -diol. Thus the testicle and, more particularly, the seminiferous tubule can be thought as a target organ for 5α -androstenediol (Forman, Y., et al., 1973; Matsumoto and Yamada, 1973). In our experiments with human testicle, though 5α -androstane- 3α , 17β -diol was confirmed as a major metabolite of testosterone not only in the case of injury of the testicle with normal spermatogenic function but also in the cases of cryptor-

chidism without spermatogenic function, this hormone could not be concluded to have a direct effect on the spermatogenic function. Therefore, as indicated by *Matsumoto and Yamada* (1973), 5 α -androstanediol seems to have a role in the preparation of the spermatogenic environments in pre-puberty as far as the androgenic effect is concerned.

Acknowledgment

I express my deep thanks to Professor Kyutaro Shimizu, Department of Biochemistry, Steroid Institute, Tottori University, and Professor Fujinori Nakada, Department of Chemistry, Shimane Medical College, for their interest in the present experiment.

References

- 1) Axelrod, L. R. : Metabolic pathway of steroid biosynthesis in young and aged human testis. *Biochim. Biophys. Acta* (Amst). 97 : 551-556, 1965.
- 2) Becker, W. G., Snipes, C. P. and Migeon, C. J. : Progesterone-4-¹⁴C metabolism to androgens by testes of normal and isoimmune aspermatogenic guinea pigs. *Endocrinology*. 78 : 737-744, 1966.
- 3) Folman, Y., Ahmad, N., Sowell, J. G. and Eik-Nes, K. B. : Formation in vitro of 5 α -dihydrotestosterone and other 5 α -reduced metabolites of ³H-testosterone by the seminiferous tubules and interstitial tissue from immature and mature rat testes. *ibido*. 92 : 41-47, 1973.
- 4) Inano, H., Nakano, H., Shikita, M. and Tamaoki, B. : The influence of various factors upon testicular enzymes related to steroidogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* (Amst.). 137 : 540-548, 1967.
- 5) Kodaira, T., Hosaka, M., Nishimura, R. and Takai, S. : Studies on androgens biosynthesis on cryptorchidism—Indication of biochemical biopsy method—. *Acta Urol. Jap.* 20 : 665-673, 1974.
- 6) Lloret, A. P. and Weisz, J. : Metabolism of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone in vitro by the seminiferous tubules of the mature rat. *Endocrinology*. 95 : 1306-1316, 1974.
- 7) Matsumoto, K. and Yamada, M. : 5 α -Reduction of testosterone in vitro by the rat seminiferous tubules and whole testes at different stage of development. *ibido*. 93 : 253-255, 1973.
- 8) Rivarola, M. A., Podesta, E. J. and Chemes, H. E. : In vitro testosterone-¹⁴C metabolism by rat seminiferous tubules at different stages of development : Formation of 5 α -androstanediol at meiosis. *ibido*. 91 : 537-542, 1972.
- 9) Rosner, J. M. and Macome, J. C. : Biosynthesis of 5 α -androstanediol by human testis in vitro. *Steroids*. 15 : 181-193, 1970.
- 10) Sciarra, F., Fabbri, A., Sorcini, G., Spera, G. and Conti, C. : "In vitro" steroid biosynthetic and histochemical patterns of human testis. *Reserch on Steroids*. 3 : 81-92, 1968.
- 11) Steinberger, E. : Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Review*. 51 : 1-22, 1971.

ヒト停留睾丸組織におけるテストステロンの生成と代謝

竹中生昌, 後藤 甫

鳥取大学医学部泌尿器科学教室

精子形成のない停留睾丸例を中心に、手術的に摘出した睾丸組織を放射性 pregnenolone および testosterone とインキュベートし、精子形成とホルモンの関係を検討した。pregnenolone-4-¹⁴C から testosterone の代謝は、精子形成はないが間細胞の多い 28 歳停留睾丸例に多く、かつ速やかであった。testosterone-4-¹⁴C を基質とした時、その代謝物として DHT, A-diol, A-dione をみとめた。この中では 14 歳停留睾丸例に A-diol が多くみとめられた。

以上より精子形成能のない停留睾丸例でも正常睾丸の場合と同様に、testosterone の生成ならびに代謝機能を有しており、これは精細管機能よりも間細胞によるものと推測され、精子形成能の低下あるいは欠落とステロイドホルモンの直接の関連を指摘することは困難であった。

(受付昭和 52 年 7 月 11 日)

ウシの性周期における末梢血中 Progesterone, Estrone, Estradiol-17 β , Estriol, Cortisol および Corticosterone の動態について

Plasma Progesterone, Estrone, Estradiol-17 β , Estriol, Cortisol,
and Corticosterone during Estrous Cycle in Cow

大阪府立大学農学部家畜外科学教室

鳥 居 隆 三 中 間 実 徳 蘭 守 龍 雄
Ryuzo TORII Sanenori NAKAMA Tatsuo IMORI

Department of Surgery and Obstetrics, School of Veterinary
Science, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture,
Sakai, Osaka, 591

3頭のホルスタイン系雌ウシを用いて、性周期に伴う末梢血中の性ステロイド・ホルモンの Progesterone, Estrone, Estradiol-17 β , Estriol, および糖質副腎皮質ホルモンの Cortisol, Corticosterone を, Radioimmunoassay および Competitive Protein Binding Assay 法を用いて測定を行ない、その動態につき検討を行なった。その結果、Progesterone は、排卵期前後に低く、黄体の形成とともに増加し、次期排卵期に向い減少する一峰性のパターンがみられた。Estrogens は、性周期を通じ低値を示していたが、Estrone は排卵1～2日後に、また Estradiol-17 β および Estriol は排卵1～2日前に各々ピークを示した。Cortisol および Corticosterone はほぼ同調した変動を示し、一般に排卵期前後に高値を示す傾向がみられた。

緒 言

ウシの性周期における末梢血中のステロイド・ホルモンの測定に関して、近年 Competitive Protein Binding Assay (CPBA), Radioimmunoassay (RIA) の急速な発展に伴い、とくに Progesterone を中心として数多くの報告が提出されてきている。我々は、3頭のウシにつき、末梢血中の性ステロイド・ホルモンのうち、Progesterone (P と略), Estrone (E₁ と略), Estradiol-17 β (E₂-17 β と略), Estriol (E₃ と略), さらに糖質副腎皮質ホルモンの Cortisol (Fk と略) と Corticosterone (Bk と略) を CPBA, RIA 法を用いて測定し、とくに排卵の時期とこれらホルモンの動態との関連についても検討を加えた。

材料および方法

本実験に用いたのは、正常な性周期を営んでいた3頭

のホルスタイン系雌ウシである。性周期における卵胞の形成、発情の発現、排卵、および黄体の形成ならびに退行については、直腸検査を主とし、子宮外口、腔粘膜の性状、ウシの挙動などを参考として性周期の状況の把握に努めた。とくに排卵時期には1日4～5回の直腸検査を行ない、排卵時期の確認を期した。

採血はすべて午前12時に頸静脈より行ない、ヘパリン加血液として毎回15～20mlを採取した。血液は速やかに遠沈し、血漿を分離後測定に供するまで-20°Cに保存した。

末梢血中のこれらステロイド・ホルモンの測定は、さきに報告した方法¹⁾によった。即ち、血漿5mlを石油エーテルおよびメチレンクロライドで抽出後、Sephadex LH-20 microcolumnにより、P, E₁, E₂-17 β , E₃の純化・分離を行ない、Pは抗11 α -OH-P-11-BSA抗血清、E₁, E₂-17 β , E₃は抗E₁-17-BSA抗血清を用いたRIA法で測定した。また、FkとBkは、血漿0.5mlをメ

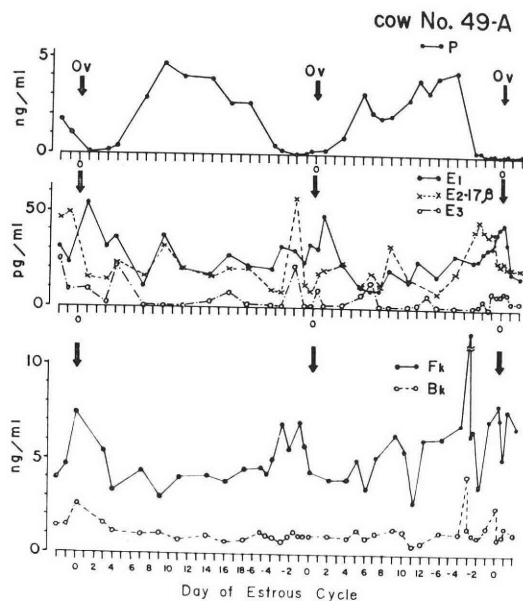


Fig. 1 Bovine plasma progesterone, estrone, estradiol-17 β , estriol, cortisol and corticosterone levels during estrous cycle. Day of ovulation=Day 0

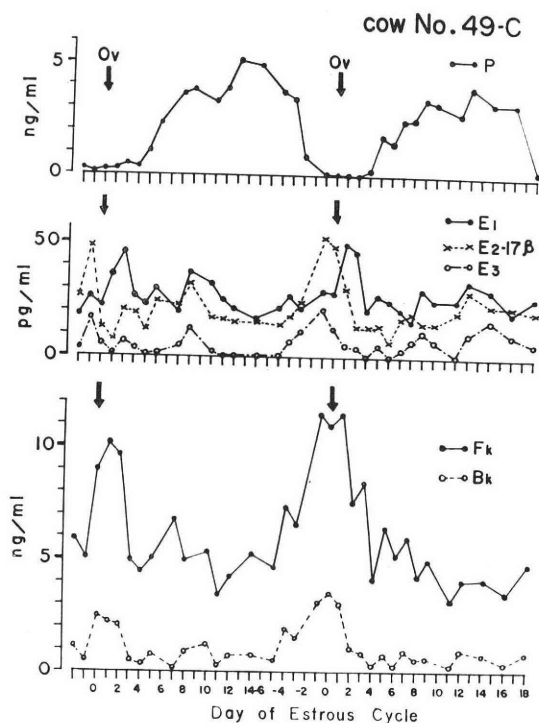


Fig. 3 Bovine plasma progesterone, estrone, estradiol-17 β , estriol, cortisol and corticosterone levels during estrous cycle. Day of ovulation=Day 0

cow No. 49-B

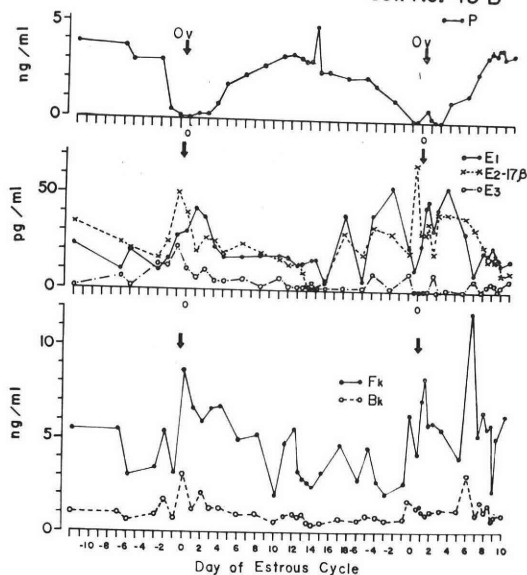


Fig. 2 Bovine plasma progesterone, estrone, estradiol-17 β , estriol, cortisol and corticosterone levels during estrous cycle. Day of ovulation=Day 0

成 績

測定の結果得られた3頭のウシの性周期における末梢血中の P, E₁, E₂-17 β , E₃, Fk および Bk の動態を Fig. 1 ~ 3 に示す。これら3頭の性周期中のホルモンの動態は極めて類似したパターンを示した。

末梢血中の P は、排卵3~4日後より増加し、5~6日頃より15~16日頃にかけて3~5 ng/ml の高値を持続した。その後、排卵の3~5日前頃より急激に低下を示し、排卵1~2日前から1~2日後にわたる時期には0.2 ng/ml 以下の極めて低い値を示した。

血中 E₁, E₂-17 β , E₃ は、とくに排卵期に著明な変動を示した。E₁ は、排卵1~2日後に50~60 pg/ml の鋭いピークを示し、また E₂-17 β と E₃ は、排卵1~2日前に、E₂-17 β では50~60 pg/ml, E₃ は10~20 pg/ml の各々鋭角的なピークを示した。この他の時期には、E₁, E₂-17 β , E₃ ともにほとんど著明な変化はなく、E₁, 10~30 pg/ml, E₂-17 β , 10~20 pg/ml, E₃ の場合は10 pg/ml 以下の値を示した。

Fk と Bk は、性周期を通じ大約3~6:1の比をもつてほとんど同調した動きを示した。排卵の4日前頃か

チレンクロライドで抽出後、Rudd 法の変法による分配操作を加えて純化・分離を行ない、各々 CPBA 法により測定した。

ら 4 日後にかけて, Fk, 7~12ng/ml, Bk, 2~4 ng/ml の高い値を示し, この他の時期においてはわずかな変動にとどまった. このように, Fk と Bk は一般に, 排卵期前後に高く, 他の時期に低い傾向がみられた.

考 察

1. P について

今回測定した 3 頭のウシの性周期における末梢血中 P の動態は, 黄体の形成と退行に伴う典型的な分泌盛衰のパターンを示していた. この成績は, 百目鬼ら²⁾をはじめとする最近の報告とほぼ同程度のレベルで, 同様の傾向を示したものとと言える. 一方, 末梢血中の P 値が 3~5 ng/ml の高値を示す時期は, 直腸検査により察知出来た黄体の開花期とほぼ一致するが, 退行時には明らかに P 値の減少が 1~1.5 日位先行する様相を示した. ただ, 黄体開花期の時期においても, 細部的にはかなりの程度に変動が認められている. 我々が別に行なった実験では, 黄体期の 24 時間内の P 値に明らかな episode 的変動を認めているが, 今回みられた黄体期中の血中 P の変動も, episode 的分泌の影響をうけて出現したものであろう.

2. E₁, E₂-17 β , E₃ について

我々は, ウシの性周期中の末梢血中 Estrogens 3 分画につき詳細に検討した結果, E₁ は排卵 1~2 日後に, また E₂-17 β と E₃ は排卵 1~2 日前に 各々著明な高値が 3 頭いずれにも認められた. Wettelman ら³⁾, Shemesh ら⁴⁾は, E₂-17 β が, また, Echternkamp ら⁵⁾は, E₁, E₂-17 β とともに, 発情日あるいは LH surge の前にピークを示したと報じ, さらに Glencross ら⁶⁾は, E₂-17 β が発情日の 1~2 日前と 5~6 日後の 2 度にわたりピークが出現し, E₁ は発情日前後にはほとんど変動しなかつたと報じている. また Dobson ら⁷⁾も, 発情日前後の E₁ はほとんど著明な変化はしないとしている. 我々の成績では, E₂-17 β のピークの形成時期は, 発情徴候の出現とほぼ一致しており, その時期は従来の報告と大差がなかつた. この E₂-17 β の出現の意義は, 発情開始から排卵までの間にみられる末梢血中 LH の surge を導き, 間接的に排卵を誘発するものであろう. しかし, E₁ が排卵の 1~2 日後に E₂-17 β と同程度のレベルに近い高値を示したことについては, 従来の報告の中には明示されていない. しかし, その意義については現在のところ明確には説明は出来ない. さらに, E₃ が E₂-17 β と同時期に低値ながらもピークを形成したことについても今後なお分析・検討を加える必要があろう. 一方, 発情・排卵期以外の時期に E₁, E₂-17 β がかなり高い値を示す状態がみられたが, 恐らく小卵胞の発育を示すものであろうと推測する.

3. Fk, Bk について

性周期中における末梢血中の Fk と Bk は, およそ 3~6 : 1 の比をもつてほぼ同調的に変動し, 排卵前後に高値を示していた. 従来の報告の中で, Fk と Bk を分離, 測定した Randel らの報告⁸⁾では, 発情期に Fk, Bk がともに高値を示したとしており, 我々の得た成績とほぼ同様の傾向を示している. また, Garverick ら⁹⁾, Swanson ら¹⁰⁾も, Fk については発情期に高値を示したとしながらも, Bk についてはほとんど変動を示さなかつたと報じている. 我々が得た成績で, 発情・排卵の時期に Fk, Bk がともに高値を示したことは, この時期に 3 頭いずれもが強い精神的興奮を示した事実から推して, 外界の刺激に対する副腎の反応の強さによるものと考えられるが, 一部は, E₁, Bk の episode 的変動¹¹⁾の影響をうけたものと推測する.

文 献

- 1) 鳥居隆三, 蘭守龍雄: ウシの末梢血中 Progesterone, Estrone, Estradiol, Estriol, Cortisol および Corticosterone の測定法, 家畜繁殖誌, 20 : 153, 1975.
- 2) 百目鬼郁男, 中原達雄, 山内 亮, 牧野拓雄: Radioimmunoassay による牛血中 Progesterone の測定, 家畜繁殖誌, 20 : 95, 1974.
- 3) Wettelman, R. P. and Hafs, H. D.: LH, prolactin, estradiol and progesterone in bovine blood serum during early pregnancy, J. Anim. Sci., 36 : 51, 1973.
- 4) Shemesh, M., Ayalon, N. and Lindner, H. R.: Oestradiol levels in the peripheral blood of cows during the oestrous cycle, J. Endocrinol., 55 : 73, 1972.
- 5) Echternkamp, S. E. and Hansel, W.: Plasma estrogens, luteinizing hormone, and corticoid in postpartum cows, J. Dairy Sci., 54 : 800, 1971.
- 6) Glencross, R. G., Munro, I. B., Senior, B. E. and Pope, G. S.: Concentration of oestradiol-17 β , oestrone and progesterone in jugular venous plasma of cows during the oestrous cycle and in early pregnancy, Acta Endocr., 73 : 374, 1973.
- 7) Dobson, H. and Dean, P. D. G.: Radioimmunoassay of oestradiol-17 α and -17 β in bovine plasma during the oestrous cycle and last stage of pregnancy, J. Endocrinol., 61 : 479, 1974.
- 8) Randel, R. D., Brown, B. L., Erb, R. E., Niswender, G. D. and Callahan, C. J.: Reproductive steroids in the bovine. II. Comparison of freemartins to fertile heifer, J. Anim. Sci., 32 : 318, 1971.
- 9) Garverick, H. A., Erd, R. E., Niswender,

- G. D. and Callahan, C. J.: Reproductive steroids in the bovine. III. Changes during the estrous cycle, *J. Anim. Sci.*, 32: 946, 1971.
- 10) Szego, C. M. and Roberts, S.: The nature of circulating estrogen, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 61: 161, 1964.
- 11) Torii, R. and Imori, T.: Episodic secretion of cortisol in bovine peripheral plasma (in press).

Plasma progesterone, estrone, estradiol-17 β , estriol, cortisol, and corticosterone during estrous cycle in cow

Ryuzo Torii, Sanenori Nakama
and Tatsuo Imori

Department of Surgery and Obstetrics, School
of Veterinary Science, College of
Agriculture, University of Osaka
Prefecture, Sakai, Osaka, 591

Plasma concentration of progesterone, estrone,

estradiol-17 β , estriol, cortisol, and corticosterone were measured by radioimmunoassay and competitive protein binding analysis method during estrous cycle in the three Holstein cows.

Plasma progesterone levels were high during 5 to 15-16 days after ovulation, then it sharply decreased to less than 1.0 to 0.5 ng/ml prior to estrus and ovulation.

Plasma estrone and estradiol-17 β were rather low in their levels in the luteal phase, but during the period of -2 to +2 or +3 days of ovulation, which corresponded to the time of proestrus through metestrus, these levels were kept high. Thus, a peak of estrone was obtained 2-3 days after ovulation, and that of estradiol-17 β was recorded as a surge at 1-2 days before ovulation.

On the other hand, each estriol level showed very low, but made a peak almost at the same time with estradiol-17 β .

Plasma cortisol and corticosterone showed slightly high levels at estrus period, and the change of each plasma levels was almost synchronized throughout the estrous cycle.

(昭和52年 7 月18日 受付)

反復過排卵処理に対するマウスの排卵反応の系統差

Strains Difference of Ovulatory Response in Mice to Repeated Superovulation-treatment

東京農業大学畜産学科

石 島 芳 郎 穴 吹 一 広
Yoshiro ISHIJIMA Kazuhiro ANABUKI

Department of Zootechnical Science, Tokyo
University of Agriculture

日本大学医学部 日本大学農獣医学部

遠 藤 克 佐 久 間 勇 次
Tsuyoshi ENDO Yuzi SAKUMA

School of Medicine, Nihon University and College of
Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University

CF#1系, ICR系, CFW系およびC57BL/6系の4系統のマウスに, PMS 5IU-HCG 5IUの過排卵処理を10日間隔で4回までくり返し, 反復過排卵処理に対する排卵反応の系統差をしらべた。

排卵陽性率は, いずれの系統も2回目まで100%であつたが, 3回目以降低下する傾向が認められた。この低下の程度は系統によつて異なり, 4回目においてもICR系, CFW系のようにそれほど下らないものと, CF#1系, C57BL/6系のように極端に低下する2つの型がみられた。

平均排卵数は, 初回CF#1系が21.3コ, ICR系が19.9コ, CFW系が39.1コ, C57BL/6系が17.9コで, CFW系が極端に高い以外は類似の値を示していた。これに反復処理をくり返すと, CF#1系, CFW系, C57BL/6系では, 3回目から平均排卵数の著しい減少がみられ, 4回目には初回の半数以下に低下した。しかしICR系では, 次回減少, 3回目増加, 4回目減少という波があり, 処理回数が増す中でもかならずしも低下するとはかぎらなかつた。

いずれにしても, 供試マウス全体として卵子の生産数をみると, いずれの系統も排卵陽性率が低下していた関係で, 4回目には著しく減少した。

著者らは, 前報で反復過排卵処理による反応低下の要因をマウスで解明していく前段階として, CF#1系およびdd系マウスを対象に過排卵処理を10~30日間隔で4回まで反復した際の反応成績を吟味した(石島, 佐久間 1977)。その際, 反復処理がすすむと反応低下が著しいことは両系統とも共通した現象として認められたが, 反応の様相にはあきらかに系統差がみられ, CF#1系に比べてdd系は不安定な反応成績を示した。

こうした結果は, マウスを解析に用いる場合に系統の選択が重要なことを示唆しているので, この研究では, CF#1系のほかに新たにICR系, CFW系および

C57BL/6系を加え, 4系統のマウスの反復過排卵処理に対する反応差を比較検討した。

実験材料および方法

この実験には, 閉鎖集団のCF#1系, ICR系およびCFW系, ならびに近交系のC57BL/6系の4系統(CF#1系は東京農業大学で維持, 他の3系統は日本大学医学部で維持)のマウスを供試した。いずれの系統も未経産雌を対象に, 生後60日齢に実験を開始した。

過排卵処理は, 前報と同様5IUのPMSを皮下注射し, ついで48時間後5IUのHCGを皮下注射する方法

Table 1 Ovulatory responses to repeated superovulation-treatment at 10 days interval in CF#1, ICR, CFW and C57BL/6 mice

Strains	Criteria	Periods			
		1	2	3	4
CF#1	No. of mice examined	19	10	19	13
	% ovulated	100	100	74	31
	Ave. no. of ova per ovulating mice	21.3±2.18	21.5±2.83	16.9±2.91	9.8±2.93
	Ave. weight of ovaries (g)	21.1±0.50	26.5±1.16	16.5±1.02	17.4±0.49
ICR	No. of mice examined	20	15	11	10
	% ovulated	100	100	82	60
	Ave. no. of ova per ovulating mice	19.9±1.39	15.1±0.93	22.1±2.75	14.5±3.45
	Ave. weight of ovaries (g)	23.3±1.45	22.2±0.75	25.5±1.39	24.9±1.57
CFW	No. of mice examined	31	12	12	10
	% ovulated	100	100	67	70
	Ave. no. of ova per ovulating mice	39.1±1.67	34.8±4.79	15.3±4.96	16.1±5.70
	Ave. weight of ovaries (g)	22.8±0.95	28.8±1.74	22.0±1.57	21.5±2.73
C57BL/6	No. of mice examined	11	9	10	10
	% ovulated	100	100	90	20
	Ave. no. of ova per ovulating mice	17.9±2.16	15.0±0.99	9.7±2.03	4.0±1.00
	Ave. weight of ovaries (g)	11.8±0.92	15.9±0.64	15.3±1.40	11.6±1.14

± S.E.

を用い (石島, 佐久間 1977), 4 系統とも, この処理を 10 日間隔で 4 回までくり返した。

各回の排卵検査は, いずれの場合も HCG 注射後 24 時間にマウスを殺し, 顕微鏡下で卵管膨大部内の卵子数を算定した。

実験結果

CF#1 系, ICR 系, CFW 系および C57BL/6 系の 4 系統のマウスに, PMS 5 IU-HCG 5 IU の過排卵処理を 10 日間隔で 4 回までくり返した結果, Table 1 および Fig. 1 ~ 3 に示されるような反応成績が得られた。

排卵陽性率は, Table 1 および Fig. 1 から明らかなように, いずれの系統も 2 回目までは 100 % であったが, 3 回目以降低下の傾向が認められた。この低下の程度は系統によつて異なっており, 4 回目においても ICR 系, CFW 系のようにそれほど下らないものと, CF#1 系, C57BL/6 系のように極端に低下するものとがみられた。

平均排卵数は, 初回 CF#1 系が 21.3コ, ICR 系が 19.9コ, CFW 系が 39.1コ, C57BL/6 系が 17.9コで, CFW 系が極端に高い排卵成績を示した以外は類似の反応を示していた。これに反復処理をくり返すと, Table 1 および Fig. 2 に示されるように, CF#1 系, CFW

系および C57BL/6 系では排卵陽性率の低下がはじまる 3 回目から排卵数の減少が目立ち, 4 回目には, 例え排卵したとしても, 初回の半数以下の排卵数しか得られなかった。一方, ICR 系では, 次回やや減少, 3 回目で初回並, 4 回目でまた減少という波があった。

次に, 供試マウス 当りの平均卵子生産数をみると, Fig. 3 に示されるように, CF#1 系, CFW 系および C57BL/6 系は 3 回目以降, また ICR 系は 4 回目に有意な低下が認められた。

卵巣重量は, Table 1 に示されるように, 各系統がそれぞれ異なつた変化を示した。すなわち, CF#1 系では 2 回目に初回より重くなり, 3 回目以降は初回より減少, ICR 系では 2 回目は初回と変わらず, 3 回目以降は増加, CFW 系では 2 回目に重くなり, 3 回目以降は初回と同重量, また C57BL/6 系では 2 回目と 3 回目に初回より重くなり, 4 回目は初回と同重量といった具合であった。

考 察

マウスに過排卵処理を反復すると次第に排卵反応が低下する現象は, すでに Lin and Bailey (1965) が BA-LB/C 系と C57BR 系で, また石島と佐久間 (1977) が CF#1 系と dd 系で観察しているが, これらの場合,

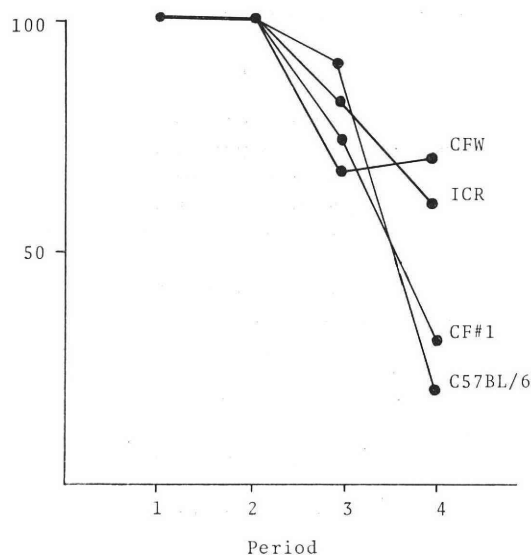


Fig. 1 % ovulated

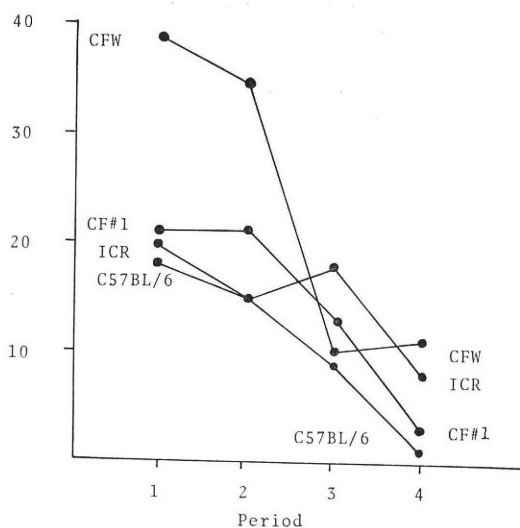


Fig. 2 Average number of ova/mouse ovulating

反復処理に対する反応成績の様相は、供試マウスの系統によってかなりの異なりをみせていた。

このことはマウスで、反復過排卵誘起にみられる反応低下の要因を解析する場合に、系統の選択が重要なことを示唆しているので、この研究では CF # 1 系に、ICR 系、CFW 系および C57BL/6 系を加え、それぞれの系統の反復過排卵処理に対する反応性を吟味してみた。

この実験では、前報 (石島、佐久間、1977) で CF # 1 系マウスに PMS 5 IU と HCG 5 IU の過排卵処理を反復した際、顕著な反応低下がみられた 10 日間隔の方法を採用し、日齢の揃った 4 系統のマウスに同じ条件の処理

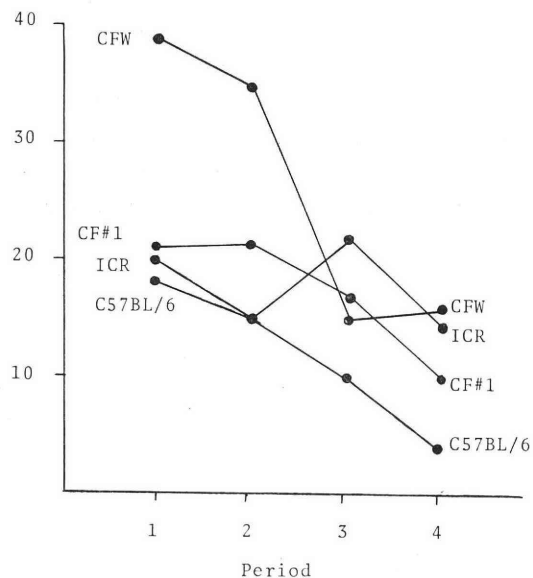


Fig. 3 Average number of ova produced/mouse examined

を行なった。

その結果、CF # 1 系の場合は、3 回目の処理から排卵陽性率の低下がみられ、それと同時に、排卵したものの排卵数も減少をはじめ、4 回目にはわずか 30% の個体から平均 9.8 コの卵子を得たにすぎなかった。こうした反応のパターンは、前報の CF # 1 系の成績とよく一致しており、いくぶんの反応数値のちがいを除けば処理に対する反応に再現性のあることがうかがえた。この実験の場合、平均排卵数は 2 回目まで全く変わらず、3 回目の排卵数が前回と同じ処理の 2 回目の排卵数と同程度であった。このちがいは、実験開始日齢が前回と今回で異なったことも一因と思われる。この実験の初回の排卵成績は、すでに著者らが経験している値と同様であった (Ishijima and Watanabe 1970, 石島、佐久間 1977)。また、CF # 1 系マウスの PMS 5 IU-HCG 5 IU 処理に対す反応成績には、排卵陽性率で 85%~100%、平均排卵数で 17 コ台~20 数コと幅がみられるので (Ishijima and Watanabe 1970, 石島、佐久間 1977, 穴吹ら 1977)、今回の 3 回目の反応低下は、さほど大きいとはいえない結果であった。卵巢重量は、これまでと同様に (石島、佐久間 1977, 穴吹ら 1977)、2 回目の処理で増加し、3 回目以降は初回よりも軽くなっていた。

ICR 系の場合は、排卵陽性率は 3 回目からいくぶん低下しはじめるが、4 回目でも 60% にとどまった。このことは、4 回の処理ではまだ反応に余力を残している個体が多いことを示している。また平均排卵数は、初回に

くらべ2回目と4回目がいくぶん低く、3回目にはむしろいくぶん高いという、他の系統にはみられないパターンを示した。こうした反応の仕方が、この系統の特徴かどうかは、この1回の実験だけでは断定できないが、反復処理に対する反応が特異な系統であることがうかがえる。この実験の初回および3回目の平均排卵数は、伊藤ら(1976)が PMS 5 IU-HCG 5 IU 処理で得ている排卵成績に近いものであった。これからすると2回目と4回目の減少はあきらかに処理の影響といわざるを得ない。ICR 系の卵巣重量の変化は、ちょうど CF #1 系と逆の傾向を示し、反復処理が重なるが増加していた。この傾向も、今回用いた他の系統とは異質のものであった。

CFW 系の場合は、前の2系統と同様3回目以降の排卵陽性率は低くなっており、排卵したものの平均排卵数も初回にくらべ明らかに低くなっていた。しかし、排卵陽性率、平均排卵数ともに3回目と4回目のあいだには差がみられなかった。従来、CFW 系の PMS 5 IU-HCG 5 IU 処理に対する反応は、排卵陽性率 80%~90%、平均排卵数 22.0 コと報告されており(伊藤ら 1974, 1976)、この実験の初回のような高い排卵成績は得られていない。今回の CFW 系は上記報告者と由来の同じものを用いたにもかかわらず、平均排卵数に大きな差が生じたのは、導入による環境条件、飼育条件などのちがいによると思われる。したがって、この系統については再検討が必要であろう。CFW 系の卵巣重量は、2回目に重くなる以外は初回と差がみられなかった。このような処理2回目に卵巣が重くなる傾向は、CF #1 系の場合とよく一致したが、その後は CF #1 系のような低下を示さなかった。このちがいが、どのような理由によるかは判然としない。

C57BL/6 系の場合は、排卵陽性率は3回目でも 90% を維持しており、4回目になって急激な低下を示した。また平均排卵数は、処理回数がすすむごとに順々に低下していった。このように、反復処理に対して比較的明瞭な反応を示したのは、近交系を用いたことによると思われる。この実験の初回の平均排卵数は、伊藤ら(1971)の報告とほぼ同様であった。この系統の卵巣重量は2回目と3回目に増加しており、CFW 系とは3回目の反応が異なるが、4回目が初回と変らない点は一致した。

以上のように、4系統の反復処理に対する反応は、排卵陽性率、平均排卵数ともに系統によって異なりをみせたが、いずれの系統も3回目以降排卵陽性率が低下するため、卵子の生産数が減少する傾向は一致した。今回の4系統のマウスでは ICRC 系が反復処理に対する反応が特異的で、CF #1 系および C57BL/6 系が解析材料に適した系統とみることができた。

(本研究は文部省科学研究費補助金によって行なつた。)

文 献

- 1) 穴吹一広, 石島芳郎, 平林 忠: マウスの反復過排卵誘起, とくに短期間の反復処理の影響, 畜産の研究, 31: 899-900, 1977.
- 2) 石島芳郎, 佐久間勇次: 性腺刺激ホルモンによるマウスの反復過排卵誘起, 日不妊会誌, 22, 245-250, 1977.
- 3) Ishijima, Y. and Watanabe, A.: Effect of estradiol on superovulation in adult mice. Jour. Agri. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku, 15: 17-22, 1970.
- 4) 伊藤雅夫, 佐久間勇次, 猪 貴義: 過排卵反応に及ぼす諸要因の解析, I. マウス系統間における過排卵反応の差違, 日畜会報, 42 (学会号), 51, 1971.
- 5) 伊藤雅夫, 樋口勝啓, 佐久間勇次, 猪 貴義: 過排卵処置マウスにおける排卵数と着床数の関係, 家畜繁殖誌, 19: 153-159, 1974.
- 6) 伊藤雅夫, 横尾芳夫, 関 秀雄, 荻島 浩, 野入五男, 石川明芳: 過排卵処置マウスにおける PMS および HCG の投与量と排卵数の関係, 日大医誌, 35, 117-124, 1976.
- 7) Lin, T. P. and Bailey, D. W.: Difference between two inbred strains of mice in ovulatory response to repeated administration of gonadotrophins. J. Reprod. Fert., 10: 253-259, 1965.

Strains difference of ovulatory response in mice to repeated superovulation-treatment

Yoshiro Ishijima, Kazuhiro Anabuki

Department of Zootechnical Science, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156

Tsuyoshi Endo

School of Medicine, Nihon University, Tokyo 173

and Yuji Sakuma

College of Agriculture and Veterinary Medicine, Nihon University, Tokyo 154

The present study was undertaken to examine the response of mice of four strains to repeated superovulation treatments.

Sixty-one CF#1, 56 ICR, 65 CFW and 40 C57BL/6 female mice, aged 60 days at the time of the first treatment were used. Superovulation was induced by an injection of 5 IU of PMS, followed 48 hours later by an injection of 5 IU of HCG. This treatment was repeatedly four

times at intervals of 10 days in all strain mice. The all females examined were killed 24 hours after HCG injection, and then ova in tubal ampullae were counted under a microscope.

The results obtained are as follows: 1) In CF#1 mice, for the 4 times treatments resp., the proportion of animals ovulated was 100, 100, 74 and 31%, and the number of ova/animal ovulating averaged 21.3, 21.5, 16.9 and 9.8. 2) In ICR mice, for the 4 times treatments resp., the proportion of animals ovulated was 100, 100, 82 and

60%, and the number of ova/animal ovulating averaged 19.9, 15.1, 22.1 and 14.5. 3) In CFW mice, for the 4 times treatments resp., the proportion of animals ovulated was 100, 100, 67 and 70%, and the number of ova/animal ovulating averaged 39.1, 34.8, 15.3 and 16.1. 4) In C57BL/6 mice, for the 4 times treatments resp., the proportion of animals ovulated was 100, 100, 90 and 20%, and the number of ova/animal ovulating averaged 17.9, 15.0, 9.7 and 4.0

(昭和52年 7 月23日 受付)

発生初期におけるウサギ卵子のステロイド 脱水素酵素の組織化学的研究

Histochemical Studies of Steroid Dehydrogenases in Rabbit Eggs at Preimplantation Stages

新潟大学農学部畜産学科

新 村 末 雄 石 田 一 夫
Sueo NIIMURA Kazuo ISHIDA

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture,
Niigata University

1細胞期から胞胚期までのウサギの卵子について、 Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) (基質 DHA, pregnenolone, 17α -hydroxypregnenolone), 17β -HSD (基質 estradiol- 17β , testosterone), 20α -HSD (基質 20α -hydroxyprogesterone) および 20β -HSD (基質 20β -hydroxyprogesterone) を組織化学的に検出した。pregnenolone を基質にした Δ^5 - 3β -HSD, testosterone を基質にした 17β -HSD, 20α -HSD および 20β -HSD の活性は1細胞期から胞胚期まで常に観察された。DHA と 17α -hydroxypregnenolone を基質にした Δ^5 - 3β -HSD, estradiol- 17β を基質にした 17β -HSD の活性は1細胞期、桑実期および胞胚期の卵子には観察されたが、2ないし8細胞期の卵子にはみられなかった。これらの結果から、ウサギの卵子は発生初期を通して progesterone, 20α -hydroxyprogesterone, 20β -hydroxyprogesterone などの progestagen や androgen の合成を行っていることが推察された。estrogen と 17α -hydroxyprogesterone は1細胞期では合成されているが、2ないし8細胞期に至って合成能が消失し、桑実期から再現することがうかがわれた。

緒 言

哺乳動物卵子における hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) の組織化学的研究は Dickmann ら¹⁻⁸⁾, Flood⁹⁾, 著者ら¹⁰⁻¹⁵⁾によつて行われ、卵子のステロイドホルモン合成能が示唆されている。Dickmann ら^{1-4, 6-8)}はラット、ハムスター、ウサギにおいて、dehydroepiandrosterone (DHA) を基質にした Δ^5 - 3β -HSD の活性は分割卵子が胞胚に変形する時期にはじめて出現することを観察し、Flood⁹⁾はブタにおいて、 Δ^5 - 3β -HSD (基質 DHA), β - 3β -HSD (基質 3β -hydroxy- 5β -androstane- 17 -one), 17β -HSD (基質 estradiol- 17β , testosterone) の活性は妊娠10日の胞胚ではみられないが、妊娠12~19日の胞胚では認められたと報告している。一方、著者ら¹⁰⁻¹⁵⁾はハムスターとブタにおいて、 Δ^5 - 3β -HSD (基質 DHA, pregnenolone, 17α -hydroxypregnenolone), 17β -HSD (基質 estradiol- 17β , testosterone), 20α -HSD

(基質 20α -hydroxyprogesterone), 20β -HSD (基質 20β -hydroxyprogesterone) の活性は排卵直後から胞胚に至る時期を通して常に認められると述べており、HSD 活性の出現時期について他の研究者の結果とかなりの食い違いがみられる。

ウサギの卵子については、Dickmann ら^{7, 8)}が、1細胞期から胞胚期までの Δ^5 - 3β -HSD (基質 DHA) を調べているが、他の HSD については、交尾後6日の胞胚について 17β -HSD (基質 estradiol- 17β) の検出が試みられているに過ぎない。

本研究は1細胞期から胞胚期までのウサギの卵子について、 Δ^5 - 3β -HSD (基質 DHA, pregnenolone, 17α -hydroxypregnenolone), 17β -HSD (基質 estradiol- 17β , testosterone), 20α -HSD (基質 20α -hydroxyprogesterone) および 20β -HSD (基質 20β -hydroxyprogesterone) の組織化学的検出を行い、卵子におけるこれら酵素の出現状態を調べ、progestagen, androgen および es-

trogen の合成能について検討したものである。

実験材料および方法

供試家兎は体重 2.5~3.0kg の日本白色種の雌 12 頭である。卵子は過排卵誘起¹⁶⁾ によって採取した。すなわち、馬下垂体前葉製剤 (ゴナドベト, 大日本製薬) 5 R. U. を 5 日間皮下注射し、最終注射の翌日、雄と交尾させた。交尾後直ちに HCG (ゴナトロピン, 帝国臓器) 50 I. U. を静脈注射した。使用した卵子の発生時期と時齢は次の通りである。すなわち、1 細胞期の卵子は交尾後 12 時間、2 細胞期の卵子は 24 時間、4~8 細胞期の卵子は 48 時間、桑実期の卵子は 96 時間、胞胚期の卵子は 96 および 120 時間である。1 細胞期から 8 細胞期までの卵子は卵管から、桑実期および胞胚期の卵子は子宮から 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で灌流して採集した。1 細胞期の卵子は 0.1% ヒアルロニダーゼ水溶液によって卵丘細胞を解離させた。

検出した酵素は Δ^5 -3 β -HSD (基質 DHA, pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone), 17 β -HSD (基質 estradiol-17 β , testosterone), 20 α -HSD (基質 20 α -hydroxyprogesterone) および 20 β -HSD (基質 20 β -hydroxyprogesterone) で、基質液の組成は Dickmann と Dey¹⁷⁾ の使用した処方に従った。すなわち、基質 1.8mg, 補酵素 4.0mg, nitro-BT 2.0mg, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 10ml で、基質はあらかじめ 0.5ml のジメチルホルムアミドに溶解して使用した。20 α -HSD の補酵素には NADP を用い、他の HSD の補酵素には NAD を使用した。浸漬は 37°C で、 Δ^5 -3 β -HSD (基質 DHA) の検出のために 60 分間、17 β -HSD (基質 testosterone) と 20 β -HSD の検出のために 90 分間、その他の HSD の検出のために 120 分間行なった。観察した卵子の数はそれぞれの発生時期において 1 種類の基質につき 5 ないし 6 個であった。酵素活性の判定は浸漬時間を加味し、沈着したジホルマザン顆粒の量により強度、弱度および陰性の 3 段階とした。なお、基質を除いた液を対照として使用した。HSD の組織化学的反応は NADH₂ または NADPH₂-dehydrogenase に依存している¹⁷⁾、これらの酵素の検出を Barka と Anderson の方法¹⁸⁾に従って行なった。処理した卵子はあらかじめワセリン・パラフィンのカバーガラスの四隅に位置するように置いたスライドガラスの中央に移し、カバーガラスをかぶせ、静かに押して卵子を圧した。

実験結果

卵子を基質液に浸漬することによって、細胞質にジホルマザン顆粒の沈着がみられた (Fig. 1)。ジホルマザン

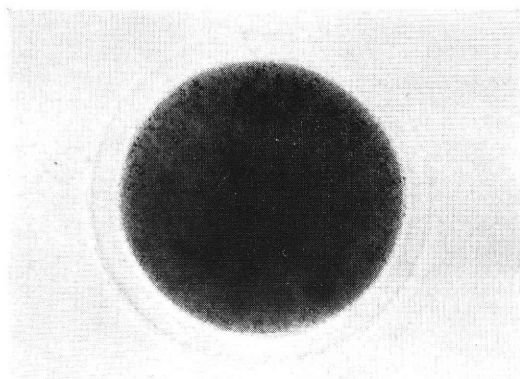


Fig. 1 A 1-cell egg. Δ^5 -3 β -HSD (DHA) reaction. $\times 250$.

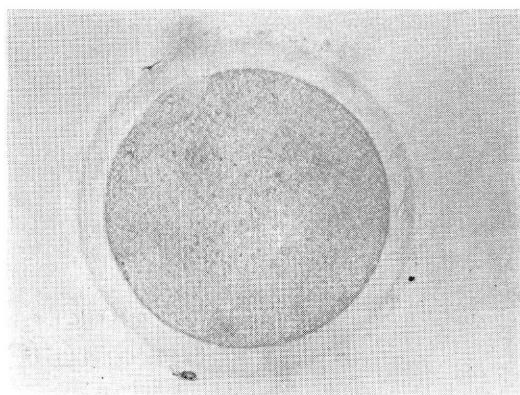


Fig. 2 A 1-cell egg. Without a substrate (control). $\times 250$.

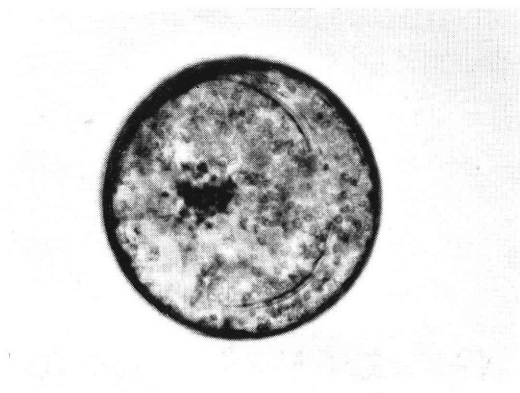


Fig. 3 A blastocyst. NADH₂-dehydrogenase reaction. $\times 40$.

ン顆粒は基質を除いた液に浸漬した卵子には出現しなかった (Fig. 2)。この顆粒が HSD の活性をあらわしていることが確認された。NADH₂ および NADPH₂-dehydrogenase の活性はいずれの発生時期の卵子にも観

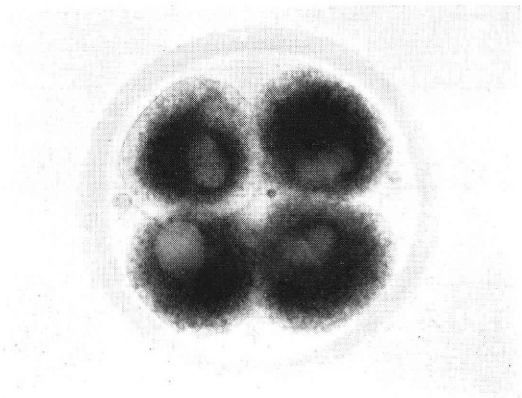


Fig. 4 A 4-cell egg. 20β-HSD reaction. ×250.

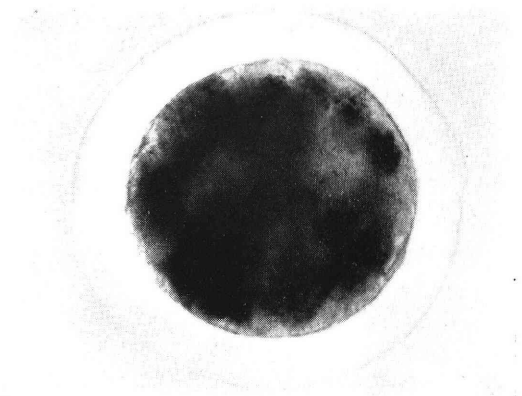


Fig. 5 A morula. Δ5-3β-HSD (pregnenolone) reaction. ×250.

察された (Fig. 3).

1細胞卵子において、ジホルマザン顆粒は細胞質に一樣に分布しており、第1極体にもわずかながら認められた (Fig. 1). 分割卵子 (2細胞期～桑実期) においても、ジホルマザン顆粒は割球の細胞質に一樣に分布していたが (Fig. 4, 5), 同一卵子で、割球によつてジホル

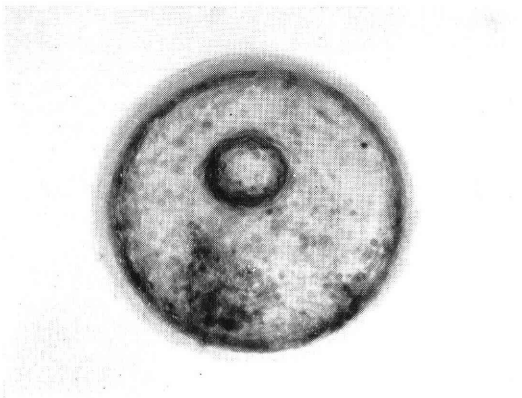


Fig. 6 A blastocyst. 17β-HSD (estradiol-17β) reaction. ×80.

マザン顆粒の沈着量が異つているものも観察された。胞胚においては、ジホルマザン顆粒はトロホブラスト、内細胞共に細胞質に一樣に分布しており、兩種細胞の間に沈着量の違いはみられなかつた (Fig. 6). いずれの時期の卵子においても透明帯は反応しなかつた。なお、基質の種類によるジホルマザン顆粒の分布状態の差異はみられなかつた。それぞれの発生時期における卵子のHSD活性は Table 1 に示した通りである。

Δ5-3β-HSD

DHA を基質にした Δ5-3β-HSD 活性は、1細胞卵子では強かつたが、2～8細胞卵子になつて消失した。しかし、桑実期に至り再び出現し、胞胚では強くなつた。pregnenolone を基質にした酵素の活性は1細胞卵子から胞胚まで常に観察され、1細胞卵子の中には若干強いものもあつたが概して弱かつた。17α-hydroxypregnenolone を基質にした酵素の活性は1細胞卵子では弱いながら認められたが、DHA を基質にした酵素と同様、2～8細胞卵子では全く観察されなかつた。桑実期に至り再び弱い活性が出現し胞胚まで持続した。

Table 1 Hydroxysteroid dehydrogenase activities in rabbit eggs

Enzymes	Substrates	Developmental stages					
		1-Cell (12 hr)	2-Cell (24 hr)	4 to 8-Cell (48 hr)	Morula (96 hr)	Blastocyst (96 hr) (120 hr)	
Δ5-3β-HSD	DHA	++	—	—	+	++	++
	Pregnenolone	++	+	+	+	+	+
	17α-Hydroxypregnenolone	+	—	—	+	+	+
17β-HSD	Estradiol-17β	+	—	—	+	+	++
	Testosterone	++	+	+	+	+	++
20α-HSD	20α-Hydroxyprogesterone	+	+	+	+	+	+
20β-HSD	20β-Hydroxyprogesterone	+	+	+	+	+	++

() -Time after copulation ++ Strong, + Weak, — Negative

17 β -HSD

estradiol-17 β を基質にした 17 β -HSD の活性は 1 細胞卵子では弱かったが、2～8 細胞卵子では観察されなかった。桑実期に至り活性が出現し 120 時間の胞胚で強くなった。

20 α -HSD

20 α -hydroxyprogesterone を基質にした 20 α -HSD の活性は 1 細胞卵子から胞胚まで常に観察されたが全期間を通して弱かった。

20 β -HSD

20 β -hydroxyprogesterone を基質にした酵素の活性は 1 細胞卵子から 96 時間の胞胚までは弱かったが、120 時間の胞胚は強かった。

考 察

Huff と Eik-Nes¹⁹⁾ は 1966 年に哺乳動物卵子のステロイド代謝について生化学的に研究し、交尾後 6 日のウサギの胞胚は acetate から cholesterol や pregnenolone を合成する能力を持っていることを発表した。それ以来、哺乳動物卵子のステロイド代謝に関する生化学的研究が広く行われている。新村と石田¹⁰⁻¹⁵⁾ はブタとハムスターの卵子についてステロイドホルモンの合成に直接関与している HSD の検出を組織化学的に行い、これらの卵子に androgen, estrogen および progestagen の合成能のあることを示唆した。ウサギの卵子については、Dickmann ら^{7,8)} が交尾後 6 日の胞胚に estrogen の合成能のあることを示唆している。本実験の結果から、ウサギの卵子は 1 細胞期から胞胚期まで常に progesterone, 20 α -hydroxyprogesterone, 20 β -hydroxyprogesterone などの progestagen と androgen の合成能を有しているが、17 α -hydroxyprogesterone と estrogen の合成能は 2～8 細胞期に一時消失することがうかがわれた。

Dickmann ら^{1-4,6-8)} は、ラット、ハムスターおよびウサギの卵子において 4 β -3 β -HSD (基質 DHA) 活性は分割卵子が胞胚に変形する時期にはじめて出現すると述べ、Flood⁹⁾ もブタの胞胚において HSD 活性の出現するのは妊娠 12 日以降であると報告している。一方、著者ら¹⁰⁻¹⁵⁾ はハムスターとブタの卵子は排卵直後から胞胚期まで常に HSD 活性が認められたと報告している。ウサギの卵子を調べた本実験においても、HSD 活性は排卵直後の卵子に出現し、2, 3 の HSD 活性は 2～8 細胞期に一時消失したものの、大部分の HSD 活性は胞胚期まで持ち続けていることを観察した。

ウサギの胞胚に progesterone, 17 α -hydroxyprogesterone, 20 α -hydroxyprogesterone および estradiol が

含まれていることが数名の研究者によって報告されている²⁰⁻²²⁾。これらの物質は子宮液中にも検出されることから、卵子に存在しているステロイドホルモンは子宮液中のものに由来しているのではないかと考えている研究者もいる^{21,22)}。この考え方はウサギの胞胚のトロホブラストが滑面小胞体やクリステの発達したミトコンドリアのようなステロイド合成細胞の特徴とされている構造を備えていないことから支持されている²²⁾。しかし、本実験の結果から明かなように、ウサギの胞胚には progestagen, estrogen および androgen の合成に関与している HSD の活性がみられたので、胞胚に含まれているステロイドホルモンは胞胚内で合成されたいが、微細構造との関係については電子組織化学的手技の確立と卵子への応用によって将来確かめる必要がある。

文 献

- 1) Dickmann, Z. & Dey, S. K.: Two theories: the preimplantation embryo is a source of steroid hormones controlling (1) morula-blastocyst transformation, and (2) implantation. J. Reprod. Fert. 35 : 615, 1973.
- 2) Dickmann, Z. & Dey, S. K.: Evidence that 4 β -3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat blastocysts is autonomous. J. Endocr. 61 : 513, 1974.
- 3) Dickmann, Z. & Dey, S. K.: Steroidogenesis in the preimplantation rat embryo and its possible influence on morula-blastocyst transformation and implantation. J. Reprod. Fert. 37 : 91, 1974.
- 4) Dey, S. K. & Dickmann, Z.: 4 β -3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat embryos on day 1 through 7 of pregnancy. Endocrinology 95 : 321, 1974.
- 5) Dey, S. K. & Dickmann, Z.: Estradiol-17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in preimplantation rat embryos. Steroids 24 : 57, 1974.
- 6) Dickmann, Z. & Gupta, J. S.: 4 β -3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase and estradiol 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in preimplantation hamster embryos. Devel. Biol. 40 : 196, 1974.
- 7) Dickmann, Z., Dey, S. K. & Gupta, J. S.: Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos (hydroxysteroid dehydrogenases/estrogen). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 72 : 298, 1975.
- 8) Dickmann, Z., Dey, S. K. & Gupta, J. S.: Evidence for steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. Anat. Rec. 181 : 346, 1975.
- 9) Flood, P. F.: Steroid-metabolizing enzymes

- in the early pig conceptus and in the related endometrium. *J. Endocr.* 63 : 413, 1974.
- 10) 新村末雄, 石田一夫: 発生初期におけるハムスター卵子のステロイド脱水素酵素の組織化学的研究. 家畜繁殖誌, 22 : 13, 1976.
 - 11) 新村末雄, 石田一夫: ハムスター卵子における 20α および 20β ハイドロオキシステロイド脱水素酵素の組織化学的研究. 家畜繁殖誌, 22 : 55, 1976.
 - 12) Niimura, S. & Ishida, K.: Histochemical studies of $4^5-3\beta$, 20α - and 20β -hydroxysteroid dehydrogenases and possible progestagen production in hamster eggs. *J. Reprod. Fert.* 48 : 275, 1976.
 - 13) 新村末雄, 石田一夫: ハムスター卵子における $4^5-3\beta$ -ハイドロオキシステロイド脱水素酵素の組織化学的研究. 日畜会報, 48 : 173, 1977.
 - 14) 石田一夫, 新村末雄: 発生初期におけるブタ卵子の estradiol- 17β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性について. 日畜会報, 48 : 373, 1977.
 - 15) 石田一夫, 新村末雄: 未発表.
 - 16) 石島芳郎, 佐久間勇次: 馬下垂体前葉製剤 (ゴナドベト) による家兎の過排卵誘起. 畜産の研究, 30 : 898, 1976.
 - 17) Baillie, A. H., Ferguson, M. M. & Hart, D. McK.: Developments in Steroid Histochemistry. p 1, Academic Press, London & New York, 1966.
 - 18) Barka, T. & Anderson, P. J.: Histochemistry. p 296, Hoeber Medical Division, Harper & Row, Publishers, Inc., New York, Evanston & London, 1965.
 - 19) Huff, R. L. & Eik-Nes, K. B.: Metabolism in vitro of acetate and certain steroids by six-day-old rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 11 : 57, 1966.
 - 20) Lutwak-Mann, C.: The rabbit blastocyst and its environment: physiological and biochemical aspects. In *The Biology of the Blastocyst* (Blandau, R. J. ed.) p 243, The Univ. of Chicago Press, Chicago, 1971.
 - 21) Seamark, R. F. & Lutwak-Mann, C.: Progestins in rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 29 : 147, 1972.
 - 22) Borland, R. M., Erickson, G. F. & Ducibella, T.: Accumulation of steroids in rabbit preimplantation blastocysts. *J. Reprod. Fert.* 49 : 219, 1977.

Histochemical studies of steroid dehydrogenases in rabbit eggs at preimplantation stages

Sueo Niimura and Kazuo Ishida

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University

Rabbit eggs at early developmental stages were histochemically studied for the presence of $4^5-3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) (DHA, pregnenolone, 17α -hydroxypregnenolone as the substrates), 17β -HSD (estradiol- 17β , testosterone), 20α -HSD (20α -hydroxyprogesterone) and 20β -HSD (20β -hydroxyprogesterone).

Eggs were obtained at following stages; 1-cell eggs 12 hours after copulation, 2-cell eggs 24 hours, 4 to 8-cell eggs 48 hours, morulae 96 hours and blastocysts 96 and 120 hours. Histochemical demonstration of enzymes was made by the Dickmann and Dey method. The composition of the medium was 1.8 mg substrate, 4.0 mg cofactor, 2.0 mg nitro-BT and 10 ml 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.5).

The activities of $4^5-3\beta$ -HSD (pregnenolone as the substrate), 17β -HSD (testosterone), 20α -HSD (20α -hydroxyprogesterone) and 20β -HSD (20β -hydroxyprogesterone) were always found in the eggs 1-cell through blastocyst stages. The activities of $4^5-3\beta$ -HSD (DHA, 17α -hydroxypregnenolone) and 17β -HSD (estradiol- 17β) were observed in 1-cell eggs, morulae and blastocysts, but not in 2 to 8-cell eggs. The diformazan granules, formed by HSD reaction, were distributed evenly throughout the cytoplasm of the eggs.

From these results, it seems that androgen and progestagen, i.e., progesterone, 20α -hydroxyprogesterone and 20β -hydroxyprogesterone are always getting synthesized in rabbit eggs throughout the stages of 1-cell to blastocyst, and that 17α -hydroxyprogesterone, one of the progestagens, and estrogen are synthesized in the eggs at the stages of 1-cell, morula and blastocyst, but not in the eggs at 2 to 8-cell stages.

(昭和52年 7 月28日 受付)

2 抗体法による ^{125}I -Estradiol Radioimmunoassay System の検討

Evaluation of ^{125}I -Estradiol Radioimmunoassay System with Double Antibody Method

九州大学医学部産婦人科学教室 (主任: 滝 一郎教授)

倉野 彰 比古 中 村 元 一

Akihiko KURANO Genichi NAKAMURA

楠 田 雅 彦 滝 一 郎

Masahiko KUSUDA Ichiro TAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,
Kyushu University (Director: Prof. Ichiro Taki)

^{125}I -Estradiol を使用した2抗体法による E_2 の RIA kit を基礎的および臨床的に検討して以下の成績を得た。

測定感度は 3.1pg/tube であり, water blank は $3.2 \pm 3.15\text{pg}$, 回収率は $92.6 \pm 4.55\%$ であった。アッセイ内の変異係数は $4.3 \sim 5.1\%$ であり, アッセイ間の測定値の相関性は相関係数 $r=0.9870$ ($p<0.001$), $Y=1.002X+2.853$ と高い相関性を示した。 ^3H -RIA 法と本法との相関を検討してみると, 相関係数 $r=0.9754$ ($P<0.001$), $Y=1.188X+4.774$ と高い相関性を示したが本法の測定値はやや高くなる傾向にあった。

本測定法を用いて正常性周期婦人, 黄体機能不全症, 無月経症, 去勢婦人, 正常男子および排卵誘発成功例の血中 E_2 値を測定したが, ほぼ満足すべき結果を得た。

本法はクロマトグラフィーを行わない簡便な測定法であるため, 多数の検体処理が可能で, 臨床的に充分応用出来ることが判明した。

I. 緒 言

臨床的にも重要な意義をもつ血中 estradiol (以下 E_2 と略) の測定は, 1969年 Abraham¹⁾ が estradiol-17 β -succinyl BSA に対する抗血清を使用した solid-phase の radioimmunoassay (以下 RIA と略) を報告して以来, 測定法に種々の改良がなされ, 目ざましい発展を遂げて来た。すなわち特異性の高い抗体の作製, 感度の改善, E_2 の分離法などの研究がなされて来たのである。しかし, その多くはクロマトグラフィーを使用するために操作が煩雑で, 多数の検体を処理しなければならない臨床応用にはもつと簡便で迅速な測定法の開発が望まれて来た。またトレーサーとして使用されている核種も ^3H が大部分であり, 多量の有機物質を使用するシンチレーターや, 高価な液体シンチレーションカウンターを必要と

することから, よく普及しているウエル型ガンマシンチレーションカウンターで測定出来る核種を標識とした RIA の開発が待たれていた。このたび第一ラジオアイソトープ研究所より ^{125}I を標識 tracer とした E_2 の RIA キットが開発されたので, このキットの基礎的検討を行い, 臨床応用の可能性について検討したので報告する。

II. キットの内容

E_2 -RIA キットはつぎの試薬から成っており, 1 キットは100tubes 分である。

- (1) E_2 抗血清 (凍結乾燥品): 1 バイアル
- (2) 標準 E_2 (凍結乾燥品): 1 バイアル
- (3) E_2 - ^{125}I (凍結乾燥品): 約 $2.0\mu\text{Ci}$, 1 バイアル
- (4) リン酸緩衝剤 (凍結乾燥品): 1 バイアル

われわれは従来 CIS (CEA-IRE-SORIN) 製の RIA キットを使用し、測定方法に一部改変を加えて E₂ の測定を行つて来た。すなわち 50% メタノール 0.4ml と n-ヘキサン 1 ml による defatting 操作を加えた。この測定法の操作過程の概略を図 2 に示した。この方法による precision をみると intraassay variance 5.7% ($118.2 \pm 6.74 \text{ pg/ml}$, N=6), interassay variance 12.8% ($105.3 \pm 13.48 \text{ pg/ml}$ N=7) であった。

4) 血中 progesterone の測定法

血中 progesterone の測定は第一ラジオアイソトープ研究所製の progesterone RIA キットを用いて行つた。この測定系の intraassay variance 5.6~8.6%, interassay variance は 9.0% であり accuracy も十分満足すべきものであった²⁾。

IV. 実験成績

1) 標準曲線

標準液の各濃度における count 数を B, ゼロスタンダードの count 数を B₀, N サンプルの count 数を N とし、 $B-N/B_0-N$ を求めて得られた標準曲線を図 3 に示

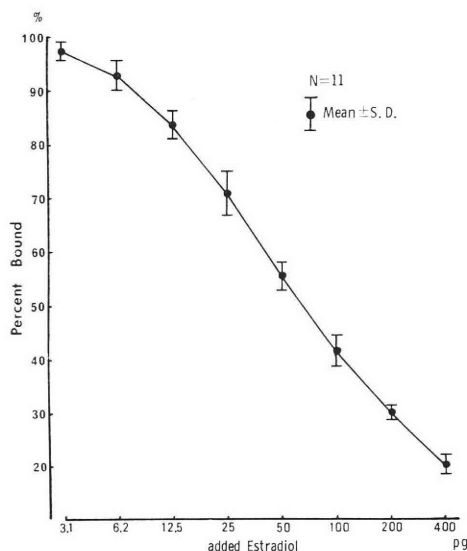


図 3 ¹²⁵I-RIA 法の標準曲線

した。非特異的結合率は平均 1.7%, 添加 E₂ 0 pg における結合率は平均 51.2% であった。E₂ 0 pg における bound % を 100% とすると 3.1pg における bound % は $97.3 \pm 1.92\%$ 両者間に有意差を認め ($P < 0.001$), この測定系の sensitivity は 3.1pg/tube と考えられた。なお各濃度における bound % の標準偏差は最小 1.46%,

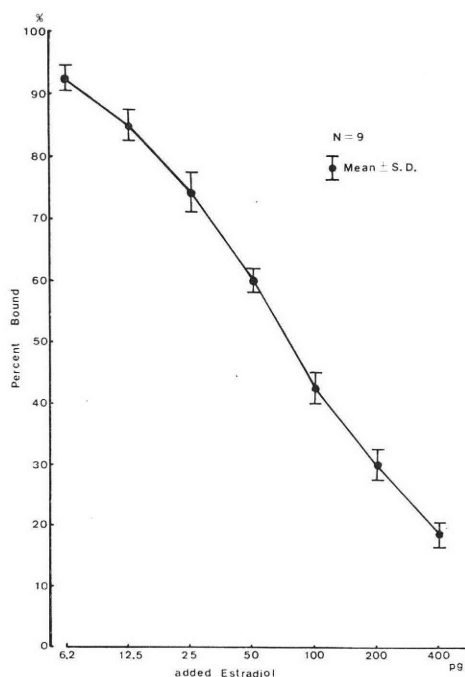


図 4 ³H-RIA 法の標準曲線

最大 4.24% であった。また ³H-RIA 法の標準曲線を図 4 に示した。この方法におけるは sensitivity は 6.2pg/tube と考えられた。

2) 回収率

水に 160pg の E₂ を添加して全測定操作を行つた場合の回収率は $92.6 \pm 4.55\%$ (N=11) でその変異係数 (CV) は 4.9% であった。またプールした去勢婦人血清 0.3ml に ³H-E₂ を約 10,000 dpm 添加して defatting 操作前後の回収率をみるとそれぞれ $97.3 \pm 3.89\%$ (N=5), $93.7 \pm 4.22\%$ (N=5) であった。

3) Accuracy

プールした正常男子血清 0.2ml にリン酸緩衝液で稀釈した E₂ 0, 5, 20, 50, 100, 200, および 400pg を加えて (0.1ml) 全測定操作を行い回収率補正をして accuracy を検討した (表 1)。また精製水 0.3ml についても全測定操作を行いブランク値を求めた。各濃度における収量の変異係数はそれぞれ 7.4, 6.3, 6.6, 6.1, 8.2, 5.7 および 9.5% でほぼ満足すべき結果を得た。またブランク値は $3.2 \pm 3.15 \text{ pg}$ であった。

4) Precision

本キットの precision を検討してみると、サンプル A を 5 回、サンプル B を 6 回測定したアッセイ内の平均値および変異係数はそれぞれ $3.30 \pm 1.41 \text{ pg/ml}$, 4.3% および $174.9 \pm 8.84 \text{ pg/ml}$, 5.1% であった (表 2)。また種々

表 1 ^{125}I -RIA 法の Accuracy と water blank

Estradiol added (pg)		0	5	20	50	100	200	400	0
No.		5	5	5	5	5	5	5	11
Estradiol quantified	Mean (pg)	13.2	17.6	31.4	62.2	109.5	203.3	399.0	3.2*
	S.D. (pg)	0.98	1.11	2.07	3.79	8.98	11.59	37.91	3.15
	S.E. (pg)	0.438	0.496	0.926	1.695	4.016	5.183	16.954	0.950
	C.V. (%)	7.4	6.3	6.6	6.1	8.2	5.7	9.5	

S.D.; Standard Deviation

S.E.; Standard Error

C.V.; Coefficient of Variation

*; Water Blank

表 2 ^{125}I -RIA 法の Precision

	Sample A	Sample B
No.	5	6
Mean (pg)	33.0	174.9
S.D. (pg)	1.42	8.92
S.E. (pg)	0.635	3.642
C.V. (%)	4.3	5.1

S.D.; Standard Deviation

S.E.; Standard Error

C.V.; Coefficient of Variation

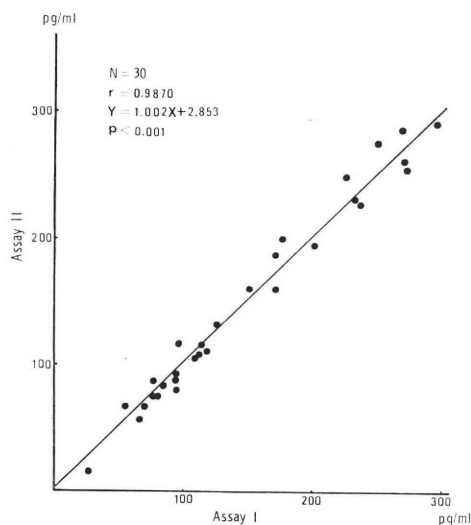
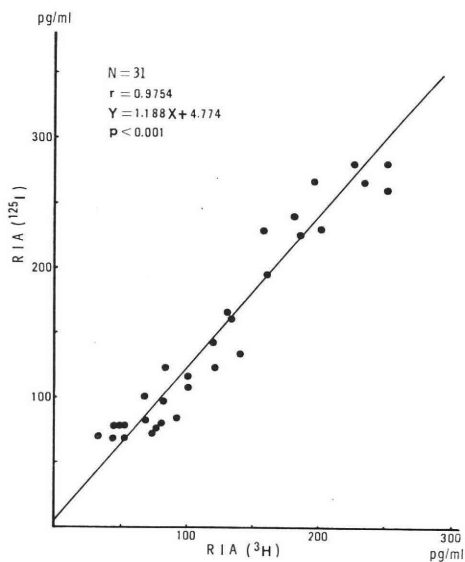


図 5 アッセイ間の測定値の相関性

の濃度の30検体について異った時に2回測定した場合の第Ⅰアッセイと第Ⅱアッセイの相関をみると、図5に示すごとく、相関係数 $r=0.9870$ ($P<0.001$) で高い相関を示し、第Ⅰアッセイ (X) に対する第Ⅱアッセイ (Y) の回帰直線を求めると、 $Y=1.002X+2.853$ となった。

5) ^3H -RIA 法との相関図 6 ^{125}I -RIA 法と ^3H -RIA 法との相関

本キットと ^3H -RIA 法との相関性を検討するために種々の濃度の31検体について使用血清量を同じにして前述の方法で測定した。図6に示すごとく相関係数 $r=0.9754$ ($P<0.001$) であり、 ^3H -RIA 法 (X) に対する本法 (Y) の回帰直線を求めると $Y=1.188X+4.774$ となり両者間の相関性はかなり高かったが、本法の測定値は ^3H -RIA 法による測定値より若干高値となる傾向を示した。

6) 臨床的検討

a) 正常性周期婦人の血中 E_2 値

BBT の低温最終日を 0 day とし、卵胞期を負で、黄体期を正で表して、それぞれの日の血中 E_2 値をプロットしたものが図7である。 E_2 値はしだいに上昇し day-4頃より急激に上昇し、day-1頃ピークを作りその後急に下降して、黄体中期に相当する day 5～9に再び高値を維持しその後しだいに下降する傾向を示したが、値

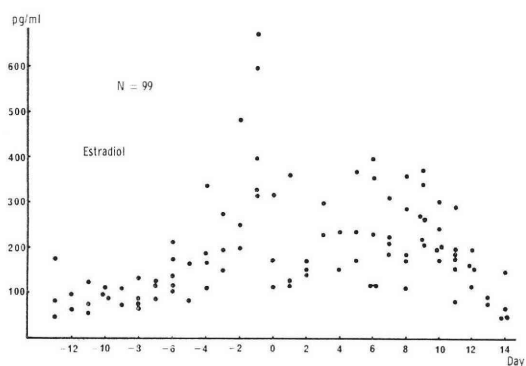


図 7 正常性周期婦人の estradiol 値

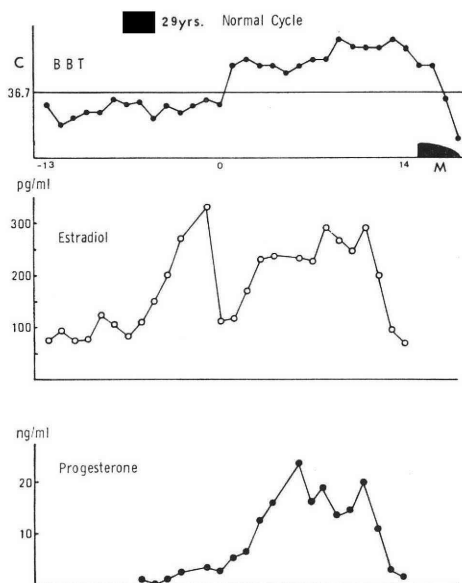


図 8 正常性周期婦人の連続測定における estradiol 値

のばらつきもかなりみられた。

b) 正常性周期例

連日測定を行つた正常性周期を有する29歳の続発性不妊症患者的の BBT, 血中 E_2 値, 血中 progesterone 値を図8に示した。卵胞期前期の E_2 値 100pg/ml 前後で卵胞期中期よりしだいに上昇し, 排卵期のピーク値は 330.0pg/ml であった。その後 progesterone 値が上昇し, 黄体期を形成し, 黄体期中期の E_2 値は $224.6 \sim 292.6\text{pg/ml}$ であった。黄体期後期になると E_2 値も progesterone 値も急激に下降し月経が始つた。

c) 黄体機能不全例

高温持続日数が7日間しかない黄体機能不全 (short luteal phase) の1例を図9に示した。排卵期の E_2 値は 321.1pg/ml と前症例とほぼ同じ値であったが, 黄体

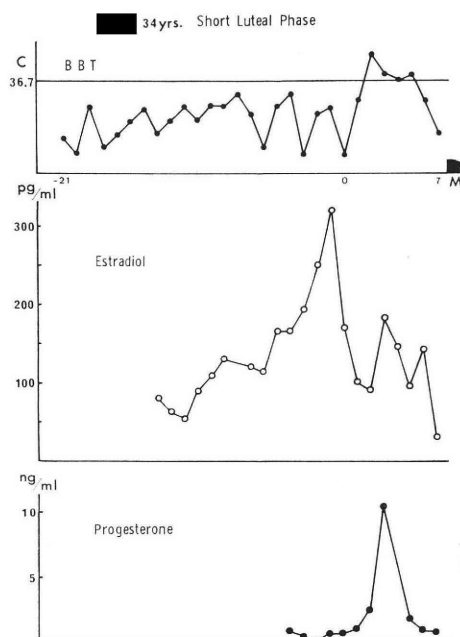


図 9 黄体機能不全の1例

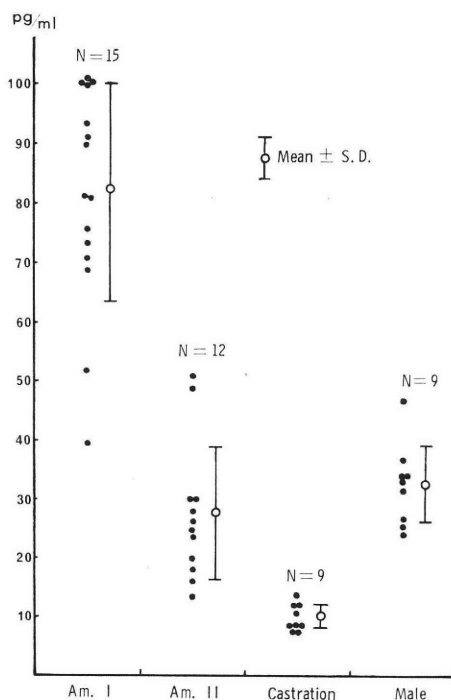


図 10 無月経症, 去勢婦人および正常男子の血中 estradiol レベル

期の E_2 値はやや低く全て 200pg/ml 以下であり, progesterone 値も 10.6ng/ml が最高値で他は極端に低値を示した。

d) 無月経症、去勢婦人および正常男子の血中 E_2 値
第1度無月経症15例、第2度無月経症12例、去勢後1
カ月以上経過した婦人9例、および正常成年男子9例の
血中 E_2 値を図10に示した。第1度無月経症の E_2 値は
 $82.2 \pm 18.89 \text{ pg/ml}$ 、第2度無月経症は $27.5 \pm 11.25 \text{ pg/ml}$ 、
去勢婦人は $9.9 \pm 2.07 \text{ pg/ml}$ 、正常男子は 32.6 ± 6.46
 pg/ml であった。第1度無月経症の E_2 値は正常性周期
の卵胞期前期の E_2 値と同程度であり、無月経の程度に
より E_2 値は大きく異なることが示されたが、第2度無月
経症の E_2 値は正常男子のそれより若干低い傾向を示し
た。

e) 排卵誘発成功例

HMG-HCG 投与による排卵誘発成功例を図11に、
Clomid-HCG 投与による排卵誘発成功例を図12に示し
た。

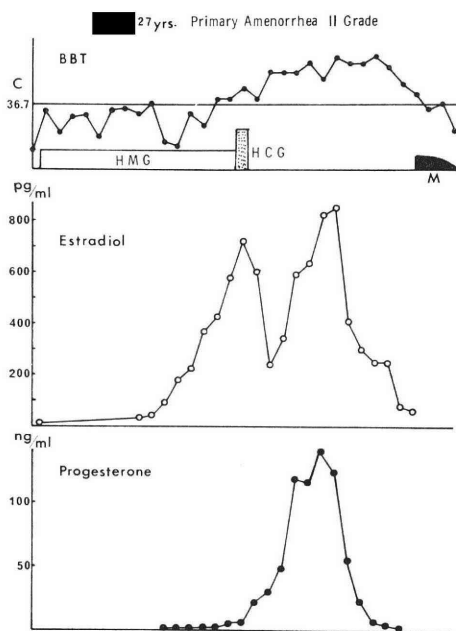


図11 HMG-HCG 療法により排卵に成功した
原発性無月経症の1例

27歳の原発性無月経第2度の症例に HMG を1日450
IU を15日間投与した後 HCG 10,000単位を1回投与し
て排卵誘発に成功したが、血中 E_2 値は HMG 投与前
の 12.8 pg/ml という低値から、HMG 投与と共に上昇
し、HCG 投与時は 725.0 pg/ml とピークを作りその
後一度下降するが、再び上昇し黄体期中期の最高値は
 858.3 pg/ml と排卵期の値より高値を示した。血中 pro-
gesterone 値は HCG 投与後急激に上昇し、黄体期中
期の最高値は 140.8 ng/ml と異常高値を示した。この症
例は過排卵が疑われたが妊娠には至らなかった。

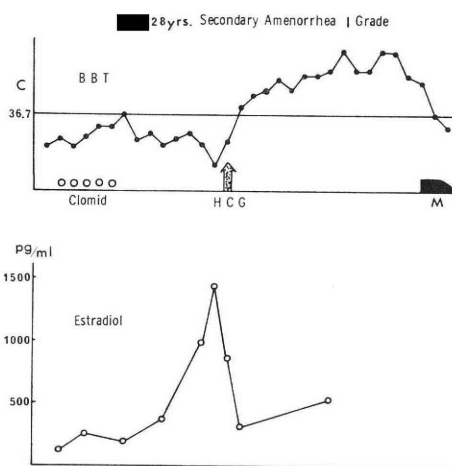


図12 Clomid-HCG 療法により排卵した
続発性無月経症の1例

28歳の続発性無月経第1度の症例に Clomid 150 mg/
日を5日間投与し、Clomid 投与終了後9日目に HCG
を10,000単位投与して排卵誘発に成功したが、この症例
の排卵期の E_2 値は 1438.6 pg/ml と非常に高い値を示し
た。この症例の血中 progesterone 値は測定していない
が、子宮内膜の生検で分泌期像を確認した。

V. 考 察

血中 E_2 値の定量は産婦人科領域、特に生殖内分泌学
領域では極めて重要な役割を演ずる。しかし、臨床面で
は正確さは無論であるが迅速さも強く要求される。その
ためには煩雑なクロマトグラフィーを行わなくても良い
簡便な測定方法の開発が必要とされて来た。クロマトグ
ラフィーの目的はステロイドの純化と assay の際に反応
を阻害する物質、特に脂質を除去することにあるが、ス
テロイドの純化に関する問題は特異性の高い、すなわち
他のステロイドと交叉性の少ない抗体を作製すればある
程度解決すると考えられる。今回使用した RIA キットの
抗体は E_2 -6-oxime-BSA を家兎に免疫して得たもの
であるが、 E_2 の構造活性部位である A 環および D 環が
intact の状態になっているため、 E_2 に対する特異性の
高い抗体と考えられる。事実 Exleyら³⁾、Jeffcoateら⁴⁾、
および牧野⁵⁾はそれぞれ E_2 -6-oxime-BSA、 E_2 -6-oxime-
HSA および E_2 -6-BSA より作製した抗血清を発表し、
 E_2 に対し特異性が極めて高いことが示された。また脂
質を主とする不純物除去に関しては、血清量が 0.1 ml
以下の場合には問題ないが、それ以上になると脱脂操作が
必要となつて来る⁵⁾。非妊婦血清を使用する場合、本法
ではほとんど 0.3 ml を使用したので当然脱脂操作を必要
とするが、本法での defatting 操作は50%メタノールと

n-ヘキサンで分配する方法を用いており、回収率をみるとエーテル抽出で97.3%, defatting 操作後93.7%, 全操作過程を行った場合92.6%と良好であった。

本法の標準曲線は3.1pg/tube から400pg/tube で良好な曲線が得られたが、 ^3H -RIA 法での標準曲線は6.1pg/tube から400pg/tube で良好な曲線が得られ測定感度は6.1pg/tube であった。 ^{125}I を使用した場合分子当りの radioactivity が高くそれだけ感度も良くなる可能性があり試料も少なくてすむと考えられるが、本法の感度は3.1pg/tube であり、 ^3H -RIA 法のそれより若干高かった。

Accuracy については正常男子血清 0.2ml に標準 E_2 を5~400pg 添加した際、変更係数は10%以下で回収されほぼ満足すべき結果を得た。

Precision は、アッセイ内の変異係数4.3~5.1%であり、 ^3H -RIA 法のアッセイ内変異係数5.7%より若干優れていた。またアッセイ間の値の相関係数をみると第Iアッセイと第IIアッセイの相関係数 $r=0.9870$ ($P<0.001$) と極めて高い相関性を示した。

本法と ^3H -RIA 法の比較のため、使用血清量を同じくして測定値をみてみると両者間の相関係数 $r=0.9754$ ($P=0.001$) とかなり高い相関性が得られた。本法による測定値は ^3H -RIA 法による測定値より若干高い傾向を示したがこれはシステムそのものの違いによるものと推定された。

本測定システムによって得られた正常性周期を有する婦人の血中 E_2 レベルは、クロマトグラフィーを行わない方法によつて測定した諸家の報告と比較した場合、十分満足出来る値であつた^{7,8,9)}。

黄体機能不全の1例は midcycle の血中 E_2 値は正常性周期婦人のそれと同程度であるにもかかわらず、その後の黄体期の血中 E_2 値はやや低く、血中 progesterone 値も低いことから、排卵前の卵胞の発育と排卵後の黄体の機能は必ずしも平衡しないことを示している。

無月経症患者の血中 E_2 レベルは第1度無月経症、第2度無月経症の順に高く、去勢婦人の E_2 レベルは最も低値であるのは十分納得出来る結果であつた。しかし、無月経の grading にも問題があり、今回われわれは Dydrogesterone 10mg/day, 5日間投与後の消退出血の有無によつたが、使用する Gestagen の量、質に grading も左右されるので当然 E_2 レベルも動くことになる。また正常男子の血中 E_2 値が、平均32.6pg/ml であつたが、他のステロイドのわずかな交叉反応の影響の可能性も考えられた。

HMG-HCG 療法や Clomid-HCG 療法による排卵誘発成功例では、排卵前、特に midcycle の E_2 値が高く

なつており、黄体期の E_2 値も高いことから卵巣に対する過剰刺激または過排卵が考えられた。これらの例の測定は経日的に行わず精度の上昇を期して、まとめて同一 assay で行つたので、いわゆる monitoring が出来ず、投与量および時期のコントロールが出来なかつたとも推察された。

以上述べたごとく、 ^{125}I 標識 E_2 を用いた RIA キットの基礎的検討を行い、臨床例にも応用して十分満足すべき結果を得た。本キットの長所は、ビペッティング操作が少いこと、シンチレーターなどの排液の処理が不要なこと、ガンマカウンターで放射能測定が可能なこと、 ^{125}I の半減期が短いので管理が比較的簡単なこと、短時間に多数の検体の処理が出来ること、などである。今回の成績から排卵誘発時の monitoring や産科管理などにも応用出来る可能性が示唆された。

終わりに本 RIA キットの提供をいただいた第一ラジオアイソトープ研究所に感謝致します。

また、本研究は文部省科学研究費の補助によることを並記し謝意を表します。

文 献

- 1) Abraham, G. E.: Solid-phase radioimmunoassay of estradiol- 17β , J. Clin. Endocr., 29: 866 : 1969.
- 2) 倉野彰比古, 中村正彦, 楠田雅彦: ^{125}I を tracer とした progesterone の radioimmunoassay の検討, ホと臨床, 25 : 331, 1977.
- 3) Exley, D., Johnson, M. W. and Dean, P. D. G.: Antisera highly specific for 17β -estradiol, Steroid, 18 : 605, 1971.
- 4) Jeffcoate, S. L. and Searle, J. E.: Preparation of a specific antiserum to estradiol- 17β coupled to protein through the B-ring, Steroid, 19 : 181 : 1972.
- 5) 牧野拓雄: 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay, 日内分泌誌, 49 : 629, 1973.
- 6) 伊藤武久: I^{125} -Estrone を用いた血中 Estrogen の Radioimmunoassay, 日産婦誌, 29 : 547, 1977.
- 7) Korenman, S. G., Stevens, R. H., Carpenter, L. A., Robb, M., Niswender, G. D. and Sherman, B. M.: Estradiol radioimmunoassay without chromatography: procedure, validation and normal values, J. Clin. Endocrinol, Metab. 38 : 718, 1974.
- 8) 立山浩道, 梶原健伯, 村上利樹, 宇津宮隆史: Estradiol-radioimmunoassay-Kit による血中 estradiol 測定法の基礎的検討, ホと臨床, 24: 473, 1976.
- 9) 植村次雄, 高口二郎, 白須和裕, 塩島令儀: Estradiol- ^{125}I kit 法と Estradiol- ^3H radioimmunoassay 法の比較,

Evaluation of ^{125}I -estradiol radioimmunoassay system with double antibody method

Akihiko Kurano, Genichi Nakamura,
Masahiko Kusuda and Ichiro Taki

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, Kyushu University
(Director: Prof. Ichiro Taki)

The basic and clinical evaluation of a new radioimmunoassay (RIA) kit for estradiol (E_2) using ^{125}I -estradiol was performed. This system was double antibody method of RIA with ^{125}I -labeled E_2 , antiserum against E_2 -6-oxime-BSA and second antibody. The lowest detectable amount was 3.1 pg/tube, the water blank was 3.2 ± 3.15 pg ($N=11$), and the recovery rate through procedure was $92.6 \pm 4.55\%$. The coef-

ficient of variation was 4.3~5.1% for intraassay and the correlation between E_2 values in I-assay and those in II-assay was good ($N=30$, $r=0.9870$, $p<0.001$). Compared with ^3H -RIA method, there was a high correlation between this method and ^3H -RIA method in E_2 values ($N=31$, $r=0.9754$, $p<0.001$), but E_2 values obtained by this method were slightly higher than those obtained by ^3H -RIA method.

Serum E_2 values in normal cycle, short luteal phase, amenorrhea, castrated women, normal men and cases of induced ovulation were measured with this RIA kit, the results were very satisfactory.

From these results, it is suggested that this RIA kit can be qualified for clinical application, because this kit is the system without chromatography and many clinical samples can be measured within one day.

(受付昭和52年9月19日, 特掲)

子宮外妊娠における子宮内膜の病理組織学的研究

——特にその特異像の分析と診断学的意義について——

Histo-pathological Findings of the Endometrium in Cases of Ectopic Pregnancy —Analysis of Morphological Characteristics and Its Diagnostic Significance—

東京慈恵会医科大学産婦人科第一講座（主任：蜂屋祥一教授）

中 島 敏 男

Toshio NAKAJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, The Jikei University School of Medicine,
(Dir. Prof. S. Hachiya)

外妊時子宮内膜の病態像を把握する事は本症の診断にきわめて重要である。そこで外妊内膜構成組織の再構築という角度より外妊時内膜50例を分析し、これら内膜像に種々の影響を与えている臨床的事項、その背景となる内分泌動態を合わせ検討した。なお、比較対照として子宮内流産後異常出血をきたした45例についても合わせ検討し、以下の結論を得た。

- 1) 外妊脱落膜は子宮内妊娠時にみられる壁脱落膜と、その形態・機能が同質であり、床脱落膜と判別する事が出来る。
- 2) 脱落膜遺残度は出血日数に関係なく妊娠初期中絶（6～7週）に高く、週数の進むに従がい低下する。
- 3) 構成要素の再構築から外妊時子宮内膜を以下の5型に分類出来た。
I型：全層をもった内膜像
II型：脱落膜様層は剝脱するも、機能層は置残し、一見分泌後期内膜を示す像
III型：機能層下部腺管と基底腺管から構成される像、しばしば Arias-Stella の像が認められる。
IV型：III型の一部に新生内膜が混在する像
V型：新生内膜に置換され妊娠性内膜の遺残の殆んど認められない像
- 4) この5型の組織構成パターンは臨床症状とくに出血、また背景となる特徴あるホルモン分泌動態と極めてよく関連している事が明らかになった。
- 5) これまで明確な動態を把握出来なかった異常着床時におけるホルモン活性（HCG, progesterone）の変動に関する貴重な成績が得られた。
- 6) Arias-Stella 所見は妊娠遺残内膜に発現した退行変化であり、発現層は機能層下部に限定される。また出血日数が長期間にわたるものに高率に認められた。
- 7) 外妊時子宮内膜に経時的に発現する新生内膜は内分泌的異常環境のため再生障害があり、また特徴ある形態を取り診断学的に意義ある所見が認められた。

緒 言

子宮外妊娠は産婦人科領域の急性腹症の一つとして重篤な病像を示すものであるが、その診断に際しては、内

診所見、Douglas 窩穿刺や HCG 定量などの日常検査を用いても、なお、不全流産、卵巣出血などの鑑別診断に悩まされることは稀ではない。

さて診断の有力手段の一つとして子宮内膜組織検査が

検索の対象とされるようになって久しいが、遺憾ながら外妊時子宮内膜組織診は、子宮内妊卵成分の確認による本症に対しての否定的根拠の意義に止まっているのが現状である。

外妊時子宮内膜所見については1877年 Cohnstein¹⁾ が外妊時の診断に絨毛を伴わない脱落膜変化所見が応用出来ると報告した。その後この絨毛の認められない脱落膜細胞の証明は、妊娠中絶の時期、内膜採取部位によってその証明出来る頻度が異なる為、Sampson²⁾、Novak 等の如く診断の有力な手がかりにするには否定的見解を示す者が多くなってきた。

一方、内膜の脱落膜細胞とは別に、Hellmuth, Baniecki³⁾は間質組織の萎縮退行像と腺の著明な分泌性変化に注目し、これらを外妊時内膜の特徴像として診断的意義を強調した。とりわけ1954年 Arias-Stella⁴⁾ が内膜腺に関する詳細な観察を行ない、いわゆる Arias-Stella-reaction を発表以来、外妊時内膜の検索は、この所見を中心に腺の異型性が主に論ぜられて来た感強い。

我が国においても、河合⁵⁾、鈴木⁶⁾、小原⁷⁾、豊田⁸⁾、三宅⁹⁾においてそれぞれ異なった立場から内膜像が研究されて来ているが、これらの研究は局所の組織形態、とくに間質の脱落膜化、腺の異型性を個々にとりあげての微細な所見の分析であり、外妊時内膜の多彩な変化を考慮すると、いずれも診断的根拠を得るものとはいいがたい。すなわち、外妊時内膜は、妊娠の時期、妊卵着床部位によって異なる事は言うまでもないが、中絶経過、それに伴って変化する内分泌的背景などによって経時的に変化し、多様性を示す為、生検による診断には腺、間質を構成要素として総合的に観察し、外妊時内膜の逐時的全体像を明らかにすることがまず不可欠の前提条件とされなければならない。

このような観点から、その構成組織の再構築という角度より外妊時内膜を分析し、臨床的事項と共にその背景となる内分泌の動態を合わせ追求し検討した結果、極めて興味ある知見を得たので報告する。

研究対象・方法

1970年から1975年までの6年間に東京慈恵会医科大学附属病院産婦人科、およびその関連病院において外妊手術前に子宮内膜搔爬術を施行し得た50例を対象とした。なお妊娠部位による内訳(表1)は卵管妊娠46例、間質

表1 検索対象

卵管膨大部妊娠	46例
間質部妊娠	3例
卵管采妊娠	1例

部妊娠3例、卵管采妊娠1例であった。

比較対照群として、流産後出血、または人工妊娠中絶時の搔爬術施行後に異常出血を訴えた45例につき内膜搔爬診を行なった。

子宮全面搔爬内膜をアルコール、10%フォルマリン、Carnoy 氏液でそれぞれ固定後、病理組織標本を作製し、Hematoxylin-Eosin 染色、鍍銀染色、PAS 染色、Sudan III染色により病理組織学的検索を行なった。

また、その背景となる内分泌の環境を解明するため、全例に免疫学的妊娠反応(Gonavisslide または、Hi-Gonavis 持田)によつて半定量)を施行し、可能な症例には血中progesterone値をRadioimmunoassay(帝臓臨検)によって測定した。

研究成績

A. 病理組織学的事項

1. 構成内膜組織について

子宮外妊娠の中絶以前における子宮内膜の組織学的パターンについては、本症の臨床的病態からいって、多数例の検討は未だないといつてよい。しかし、中絶後の病理組織学的検索に当つては、このパターンこそ基本的な問題として分析されねばならない。

本研究の対象中10例は中絶前に採取された内膜であり、分析検討の上、これを基本的構造として検討を行なった。

子宮内膜は言うまでもなく、妊娠環境下の Hormone 活性の影響により脱落膜変化を現わす。しかし外妊中絶時の搔爬診に発現する組織構成は、妊卵着床部位、妊娠中絶週数、その中絶機転などに左右される事は論をまたない。換言すれば、外妊の病態推移そのもの、さらに、中絶過程における HCG, Estrogen, Progesterone などの Hormone 活性の消長が出血を中心とする内膜の病理組織的多様性を形成し、これに子宮内膜自己再生能が経時的に加わり複雑な病理組織パターンが形成されることは明らかである。

そこで対象50例について病理組織学的に観察すると次の4つの要素から成り立っている事が明らかになった。

1) 内膜表層における変化(脱落膜変化)(写真1)

正常妊娠時の壁脱落膜と同様な変化を示す。すなわち、表層上皮直下の間質細胞の肥大、方形化と共に核の円形、核質の淡明化、核小体の出現などがみられ、個々の細胞は比較的に密ではあるが、細胞間隙は存在し、Pavement like pattern を示す床脱落膜にみられるような密着の状態ではない。排泄管部に相当する腺管は腔狭小、上皮は単層方形の明るい細胞で、核は円形、淡明である。PAS 染色では肥大した細胞内に顆粒状、細胞

間隙内には一部小顆粒状、瀰漫性に陽性物質が存在し、主として細胞間隙内に陽性物質が限局する床脱落膜の形態的特徴とは極めて対称的である。消化試験で顆粒状のPAS 陽性物質は消失する。鍍銀染色による線維の消長では、脱落膜細胞間隙に比較的繊細な Collagen が存在し、これも床脱落膜にみられる狭小な細胞間隙に強固な線維網を形成するパターンと極めて対比的である。

2) 機能層中層における変化 (写真 2)

内膜間質は腺の拡大に伴ない、この層では量的に少なく、十分な脱落膜様変化を示さない。未熟な間質細胞、すなわち形質の肥大は中等度、核はやや楕円形で核質も表層ほど淡明化していない。しかし細動脈を中心とする周囲の結合組織細胞は同心円状に密に配列し、他の細胞との密度に濃淡の差がみられる。この層の間質は血管に富み浮腫状を呈する。腺構造は月経前内膜腺に類似し、拡大した腺を有する。腺腔内乳頭状突起がみられ、腺上皮は骰子状、淡明、ほぼ円形の核を有するもので脱落膜様細胞層の直下に存在する。

3) 機能層下層における変化 (写真 3, 4)

分泌性変化のやや微弱な腺と間質からなり、腺成分に比べ間質の占める割合は機能層上部に比べ高い。腺拡大はみられるが弱く、腺上皮も円柱状に近く、淡明化も少ない。間質細胞密度は上層より高く、個々の細胞は紡錘形、核は楕円形、中絶後採取内膜に発現するこの層ではしばしば Arias-Stella 現象 などの特異性のある腺がみられる。中絶後長期出血例では、この層の腺からの増殖像として方形細胞に近い腺上皮を有する micro-gland の分岐がみられる事もある。間質細胞は紡錘形に近く楕円形の核を有し、月経前期の間質細胞に類似する。

4) 新生内膜 (写真 5)

内膜は菲薄で疎に分布する単管状腺と密な間質から成り立っている。腺上皮は円柱状で多くは単層に近く、細胞の軽度な肥大がみられ、分泌期の極めて初期の腺上皮を思わせる所見を呈する。稀れには明るい核下空胞もみられる。間質細胞はやや肥大し形質は明るく、核質の軽度淡明化がみられる。

子宮外妊娠時の内膜はこれらの 4 つの組織構成要素がいろいろに組み合わせられて多様な内膜像を形成している。外妊子宮内膜は妊卵着床の存在しない事から中絶によるホルモン動態によく反応し、融解、剥脱、出血、再生の各機転を経時的に発現させる。そこで、これらに伴なう時期的な形態推移の立場から外妊内膜構成組織の再構築を行ない次の如く分類する事が出来た (図 1)。

〔I 型〕 (写真 6)

表層上皮直下には脱落膜変化のある肥厚した間質細胞層を伴ない、中層は腔内分泌物の貯溜の認められる拡大

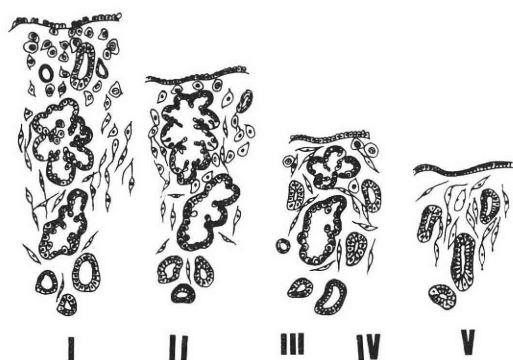


図 1 組織構成パターンの分類

した腺、次いで妊娠腺に近い像をもつ腺が基底層に向って存在する定形的な全層をもつた内膜像。

〔II 型〕 (写真 7)

肥厚した脱落膜様層が剥脱するも、中層は遺残し、機能層腺管は拡大、著明な明るい細胞の上皮の腔内増殖、すなわち妊娠腺をもち、表層が被覆され一見、分泌後期内膜を示す像。

〔III 型〕 (写真 8)

妊娠腺の発現した機能層上部は欠如、または一部残存し、機能層下部腺管と基底腺管から構成される像、しばしば Arias-Stella の像が認められる。

〔IV 型〕 (写真 9)

III 型の一部に新生内膜が混在する像。

〔V 型〕

新生内膜に置換され、妊娠性内膜の遺残の殆んど認められない像。

以上の 5 型に分類出来た。

新生内膜所見については後述するが、III 型に混在する新生内膜は常に量的に少ない。

B. 臨床的事項

そこでこれら内膜像に種々影響を与えていると考えられる主な臨床症状について対象となつた 50 例について検討した。

1) 妊娠反応とダグラス窩穿刺 (表 2)

外妊の中絶は卵囊の破綻、着床臓器の組織破壊によって生ずる事は論をまたない。これらの組織崩壊は当然な

表 2 妊娠反応とダグラス窩穿刺 (初診時)

	Har	+	-	不明	計
Douglas					
+		20	3	1	24
-		14	2	0	16
不 明		6	4	0	10
計		40	9	1	50

がら妊卵・絨毛の退行につながり、ひいてはホルモン活性の消長となり、内膜の融解、剥脱による出血へと導かれる。従って腹腔内出血の有無は妊卵の着床、発育状態の指標となり、ひいては内膜の内分泌環境の推定に必要な条件となる。また、妊娠反応は間接的に妊卵の維持状態を、その産生する HCG 活性で推定する事が出来る事から、これも内膜の生態と密接な関係を有している。

これらの点からまず、妊娠反応と Douglas 窩穿刺の検査結果を検討し、両者の関係を追求した。妊娠反応は免疫学的妊娠反応試薬 (Gonavis-slide) で行なった。

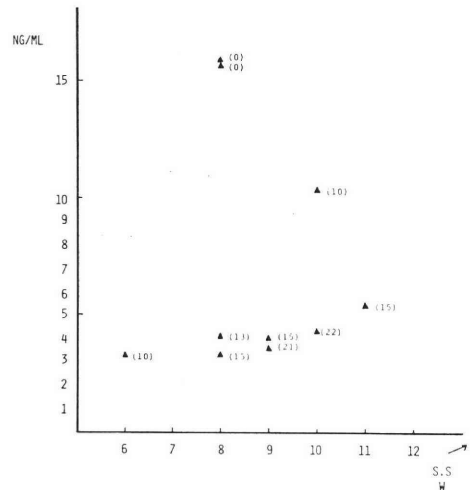
妊娠反応陽性で、Douglas 窩穿刺陽性の定形的中絶症状例は20例 (40%) であった。妊娠反応陽性は40例 (80%) で Glass, R.H., Jesure H. M.¹⁰⁾等の74%の報告値よりやや高かった。不明を除き陰性例9例のうち3例は Hi-Gonavis test で LH レベル以上の上昇を示し妊娠を推定させる値を示した。また4例は経過観察中に妊娠反応陽性になった。当然初診時に Hi-Gonavis レベルで追求すれば、早期に妊娠を疑わせる値を示したものと思われる。妊娠反応、Douglas 窩穿刺共に陰性の2例は経過観察中腹腔鏡にて診断し得た陳旧性外妊例であった。

2) Progesterone 活性について (表3)

本症における子宮内膜の病態分析には、これに大きな影響を持つ卵巣ステロイドホルモン、とりわけ Progesterone の消長が大きな役割を持つものと考えられる。特に妊娠中絶による急激な内分泌環境の変化とその後の消長は子宮内膜の病態、特に出血に深いかかわりを持つものである。この意味から本症に対する Progesterone の追求を行なった。

測定法は RIA 法 (帝臓臨検) により行なった。表3はその測定値を示す。高値を示した2例はいずれも妊娠中絶を希望し、その時点での測定値であり、活性はほぼ妊娠週数に一致した正常値を示した。他の8例について検討すると、1例は比較的高値を示しているが、その他

表3 外妊時血中 Progesterone 値



() 内は出血日数

は低値を示した。すなわち、外妊中絶例では少なくとも出血10日以後、妊娠週数に関係なく Progesterone の急激な下降が存在する事を物語っている。その活性値は妊娠週数に関係なく3~6 ng/ml 内に包括された。この値は正常周期における黄体期の Progesterone 活性値下限にほぼ相当する。

3) 妊娠週数と出血日数 (表4)

出血日数0が11例 (22%) もあり6~8週に集中していた。これらは人工妊娠中絶希望者であった。また妊娠9週までに35例 (70%) が集中していた。この事は妊卵の発育に伴う物理的な増大と卵管の妊卵を包括する容器としての限界性が考えられた。

ここに示した出血日数は緊急症状を示し、手術を受けた時点までのものである事を考慮し逆算すると、殆んど症例に於いて出血開始の時期は妊娠6~7週に集約される事が判明した。

C. 臨床経過と組織学的病態との関係

表4 妊娠週数と出血日数 (異型腺)

Week Day	6	7	8	9	10	11	12	↗	計
0	3	3	3		1	1			11
1~5			3			1	2		6
6~10	4(1)	1	1	1					7(1)
11~15		3(1)	2(1)	3(1)	1	2(1)			11(4)
16~20		1	2(1)	1(1)	1(1)			1	6(3)
21~25		1	2	1(1)	1(1)		1		6(2)
26~						1		2(1)	3(1)
計	7(1)	9(1)	13(2)	6(3)	4(2)	5(1)	3	3(1)	50(11)

表 5 妊娠週数と組織構成パターン (異型腺)

Week Type	6	7	8	9	10	11	12	13≤	計
I	6(1)	6(1)	9	5(3)	2(1)	1			29(6)
II	1	2	2(1)	1	1	1	1		9(1)
III						1(1)			1(1)
IV		1	2(1)		1(1)		2	2(1)	8(3)
V						2		1	3
計	7(1)	9(1)	13(2)	6(3)	4(2)	5(1)	3	3(1)	50(11)

表 6 出血日数と組織構成パターン (異型腺)

Day Type	0	1~5	6~10	11~15	16~20	21~25	26≤	計
I	11	4	6(1)	4(2)	1(1)	3(1)		29(5)
II		2	1	3	2(1)	1		9(1)
III				1(1)				1(1)
IV				2(1)	2(1)	3(1)	1(1)	8(4)
V				1			2	3
計	11	6	7(1)	11(4)	5(3)	7(2)	3(1)	50(11)

これら臨床データが既に述べた内膜の病態像と如何に係り合っているかは、組織像の解釈、すなわち診断の重要な因子となる。このような点から両者の関係を追求した。

1) 妊娠週数と組織構成パターン (表 5)

妊娠週数が進む程、すなわち妊娠環境が長期にわたるに従って、子宮内膜の構築性が固定する。外妊の中絶にいたつた週数により特異な形態化を呈するかの点を明らかにする為、妊娠週数と組織構成パターンの関係を観察した。

妊娠週数が進む程、特に12週以降ではIV、V型の剥脱後の再生内膜のみられる度が高く、また早期妊娠ほど全層の遺残I、II型の発現が多かった。10週の初期以降では結合組織の融解、剥脱により脱落膜発現層を欠いたII型内膜あるいは、機能層下部以下の妊娠性変化を受けた内膜の遺残部を示すIV型が認められる事が多い。

2) 出血日数と組織構成パターン (表 6)

次に融解、剥脱ともつとも関連性が深い出血日数と組織構成パターンの関係をみてみると、出血期間が短いもの程、脱落膜や表層に近い組織が遺残しているI型が多いのは当然考えられたが、しかし長期間にわたつたものでも、少数ではあるが脱落膜がみられた症例があり、その背後の内分泌的環境の異常または、内膜の反応不規則性が推定された。

これとは対照的に融解、剥脱後におこる組織の新生であるIV、V型の発現が日数の経過とともに増加するのが

認められた。

3) 異型腺 (表 5, 6 の () 内)

1954年 Arias-Stella は絨毛組織を有する個体に発生する内膜腺の異常について次の如き特徴像を挙げた。

- 腺上皮の腺腔内増殖 (突出)
- 腺細胞の異型と多形性
- 核のクロマチン増加、肥大、空胞形成
- 腺細胞の肥大、形質の空胞化
- 腺細胞の分裂像
- 形質の合胞化

本研究の対象50例につき Arias-Stella 所見に代表される異型腺を観察し次の結果を得た。

腺の異型像は妊娠週数、各組織構成パターンに関係なく認められたが、未出血内膜例には認められていない。同じI型でも10日以上出血があつたものには存在していた。

外妊時内膜でも機能層中層、とくにその上部腺管は拡大し、腺上皮は腔内に向かい乳頭状突起となつて増殖し、いわゆる妊娠腺を形成しているが、これら異型像はその下部、基底層に近く、未だ腺管腔の比較的狭少な層に発現する。また、その発現部位は限定され、その部では集族的に幾つかの腺で認められるのが特徴である。対象例中、核分裂像は認められなかつた。

組織化学的検索では、腺腔内増殖上皮細胞は何れも内膜間質細胞線維を伴つた乳頭状突起であり、周期の分泌期後半に認められる腺の鋸歯状配列と同質のものと認

表 7 Frequency of newly replaced endometrium

	Ectopic pregnancy	Abortion
Duration of bleeding	Number of cases examined	Number of cases examined
0	0/11	0
1~5	0/6	1/3
6~10	0/7	3/5
11~15	4/11	4/6
16~20	2/6	3/3
21~25	3/6	4/6
26~	3/3	17/22
Total	12/50	32/45

められた。

粘液多糖類は細胞形質内に大小不同の粗大顆粒として存在し、妊娠性変化の遺残として存在すると考えられた。

脂質染色では形質内に粗大顆粒として存在し、空胞形成と関連するものごとく、上皮細胞の退行過程にある事も推定される。

出血日数と本所見の発現との関係を検討すると異型腺は出血6日目より発現し始めている事がわかる(表6)。機能層下部が表層に存在するIV型に本症が高い頻度で発現している事は、前述の組織化学的所見とも併せ考察すると、本所見と内膜組織の退行性過程の關係が重要な課題としてとりあげられなければならない。さらに、腺上皮細胞の異常形態を各変化に分けて観察すると、I、II型の出血日数15日以内のものでは細胞腔内増殖、ならびに核のクロマチン増加、肥大に止まり、出血がそれ以上のもの、またIII、IV型のものまでは細胞の大小不正、配列の異常、形質内空胞、核では肥大、クロマチン増加、不正形化、空胞化などの高度の異常所見が認められた。

4) 新生内膜について(表7, 8)

子宮内膜は月経、流産、分娩に際して強い自己修復能を有し、剝脱した内膜の欠損部には直ちに内膜の再生が行なわれる。

この新生内膜は対象50症例中12例に於いて認められた。

新生内膜は菲薄で、狭小な単管状腺を有し腺腔内は多くの場合、分泌液の貯溜を欠いている。腺上皮は単層で方形の細胞からなり、形質の分化は著明、核は円形~楕円形で核質は明るい。間質は結合組織細胞に富み、幅の広い紡錘細胞から成り、核は楕円形でクロマチンに富む。腺上皮、間質結合組織ともに細胞分裂像は殆んど認められない。血管の拡張はわずかながら認められる。淋巴球浸潤は軽度存在する。この様な所見は一般に、月経、

表 8 Structure of Newly Replaced Endometrium

	Newly Replaced Endometrium			
	Regenerative endometrium		Proliferative endometrium	Endometrium with secretory change
	Regular regenerative endometrium	Irregular regenerative endometrium		
Ectopic pregnancy	1	1	0	10
Abortion	2	12	18	0

流産後、分娩後の内膜に認められず、きわめて特異的な所見と言ひ得る。

PAS 染色では腺上皮、間質細胞内外には陽性物質(顆粒)は認められないが、腺腔内腺細胞に接してわずかな陽性物質の存在が認められ、消化試験では消失しなかった。

このような再生組織の特異性を求めて、子宮内妊娠中絶(流産、人工妊娠中絶)後異常出血をきたした45例について再搔爬を施行し、その再生組織対比検討を行なった。その結果これらのうち32例に新生内膜を認め、その同一出血期間症例での発現率は外妊例に比べ何れも高く、かつ流産例では比較的早期から新生内膜の発現がみられた。

構成組織の性状について検討してみると、妊娠成分の遺残による新生内膜の不全再生は子宮内妊娠に圧倒的に多く発生していて出血の原因となっていた。

子宮内妊娠流産における再生内膜の病理組織学的検討では、内膜腺は狭小、腺腔分泌物を欠き、腺上皮は多くの場合偽重層を示し、細胞は円柱状、核は楕円形でクロマチンに富み、分割像がしばしば認められる。間質の結合組織細胞は肥大し、細胞間線維の増生が著明で、しばしば核分割像が認められる。小円形細胞浸潤は中等度、血管の拡張は認められない。PAS 染色では全く陰性を示した。

以上新生内膜は、子宮内妊娠流産後に認められるそれと極めて対照的な特異像を示すと言う得る。

考 察

子宮外妊娠時の子宮内膜の病態に関する研究は、1877年 Cohnstein が初めて子宮内妊娠と同様な脱落膜が子宮内に認められる事を報告するまでは、妊娠による変化は着床部位を中心とした検索に止まり、子宮内膜組織診についての解明には到っていなかったと言つても過言ではない。この報告は子宮外妊娠における内膜の研究に大きな刺激となり、その後の病理組織学的研究^{11,12,13)}によ

つて次第に病態が明らかにされ、Hustein は本症における子宮内膜組織診の価値を高く評価した。

しかしながら、これら多くの研究者の報告にもみられる如く、外妊時の内膜病態像は極めて多彩を示し、積極的にその診断的意義を強調する内容にまでは到らなかった。すなわち、子宮内膜には外妊時でも脱落膜形成が認められる。しかし、これを欠損する所見も屢々認められ、分泌初期内膜、同後期内膜、または増殖期内膜さえも発現する多様さで¹⁴⁾、むしろ、その診断的意義は絨毛、または絨毛細胞が存在する事によつてのみ子宮内妊娠を確認するといった否定的根拠に基づくものであるとされてきた。

1954年、Arias-Stella は前述した 6 項目の組織学的特徴像を挙げ、流産、胞状奇胎、絨毛上皮腫、子宮外妊娠における子宮内膜組織診において発現した特異像を詳述した。

以後、本症の子宮内膜に関する研究は Arias-Stella 所見との相関について注目が集まり、多くの報告^{15,16,17)}が行なわれた。そして、外妊時の内膜にこれら異型腺の発現が高率にみられ、本症の診断に大きな意義が存在する事を強調する報告^{18,19)}も少くない。

しかし、Arias-Stella 自身の発表にある如く、流産や絨毛性疾患、とくに前者では最近の報告にある如く、比較的高い率で認められるようになって来ると、これらの所見は、妊娠に伴う特異像ではあつても、外妊の決定的要素とは考えられ難いものとなつた。

このように本症における子宮内膜の病態を歴史的に観察してみると、その大きな焦点は急性性腹症の一つである子宮外妊娠の臨床診断との直接的関係においての報告がその大部分を占め、診断の基礎的検査でありながら子宮内膜の病態推移に対する病理組織学的な検索はむしろ後方に置かれた感が強い。

外妊に際し、子宮内膜が示す動態は、退行病変と再生機転の並行的存在、また Arias-Stella 所見の如き異型腺の発現などに表徴される如く極めて多彩であり、これ等进行分析し、どのような形態的推移の下での発現形式であるかを再構築し、その原因を解明する事によつて、新たな内膜診の意義を見出す事が出来ると考える。

子宮内膜がホルモン活性化下において、臨床的に大きな意義を有する出血の起因となる融解、剝脱の如き最も顕著な変化を惹起するにも拘らず、これまでの研究は内膜組織診と内分泌動態を関連する事なく議論されて来た。この事実が子宮内膜の形態変化を極めて平面的にし、同時にその組織所見を臨床的意義に生かし得なかつた大きな理由である。

このような観点から、本研究では、患者の臨床経過、

来院時の諸検査、特に内分泌動態を出来る限り把握し、病理組織学的検索の背景とし、外妊の内膜動態を把握すると同時にこれを臨床診断の大きな指針とする可能性について検討を行なつた。

本研究の対象50例は、妊娠部位は卵管膨大部46例、間質部3例、采部1例で頻度パターンとしては極めて普遍的であると考えてよい。しかし、これらの中には妊娠中絶を希望し、外妊の自然中絶の発現の前に内膜搔爬を行なつた症例が10例あり、これ等は外妊における内膜の動態について、基本的研究が行なえる貴重な対象となつた。

A. 病理組織学的事項について

極めて多彩な内膜像も、ここに分析された4つの構成要素からなっている。まずそれらについて観察された特異像を考察してみる。

1) 脱落膜組織について (写真10, 11)

菲薄な表層上皮と疎な脱落膜細胞とから成り立ち、比較的緻細な線維によつて細胞間隙は充たされている。この所見は、教室の塩塚、村上²⁰⁾らが脱落膜の電顕像で行なつた研究の壁脱落膜所見と全く一致している。塩塚等はその論文の中で、床脱落膜としての対比所見について詳細に報告しているが、そのなかで細胞学的性格は、卵巢の直接的作用が大きな役割りを持つものであろうと推論している。

本研究ではその発現率は40例中(中絶手術10例を除く)18例(45%)で過半数に満たない。本症における脱落膜の意義は既述の如くその存在の有無より脱落膜構造ならびに機能的特異性に関する子宮内妊娠性脱落膜との質的対比検討に集約されると思われる。

近年子宮内膜において異種蛋白である妊卵の着床と直接的に係り合う脱落膜組織の免疫学的検討が極めて活発に行なわれている。植田²¹⁾は脱落膜細胞は絨毛の存在の下に淋巴球 DNA 合成能の著明な抑制と T-cell 機能の抑制を示す因子を有する事を述べ、宮永²²⁾は Trophoblast 由来のホルモンが脱落膜細胞に作用し、異種蛋白としての妊卵に局所免疫学的障壁を形成させ、その着床、発育を維持させると述べている。また、正常妊娠で、妊卵は着床部位の絨毛周辺にあるムコ多糖類を介して脱落膜との間に fibrinoid layer を作るが、これは免疫学的障害とはならず、むしろ、Trophoblast 自体が居住する内分泌環境や、脱落膜細胞の外被が免疫抑制的に働き、barrier としての役目を持ち、妊娠を維持させる可能性があると述べている。

以上の如く、現在、子宮内免疫抑制因子として脱落膜が大きく取り上げられ、形態、機能が論じられる状況の中で、外妊内膜に発現する脱落膜は比較検討の対象とし

て貴重な存在であり、ここに述べた脱落膜所見は、その電顕像までの追求は不可能であったものの大きな意義が存在すると考える。とくに10例の中絶前に得られた脱落膜に発現した PAS 所見、線維染色所見、リンパ球所見は大きな価値がある。鍍銀染色による細胞間線維の消長では床脱落膜のそれと極めて対照的なパターンを示して、後者のそれが、Trophoblast の侵襲に対する個体防御的作用を推定させるのに反して、極めて疎な配列を示し興味ある結果であった。

2. 機能層中層について

機能層中層はいわゆる妊娠腺に相当する部で、この部は卵巣ステロイドの消長、主として消退によつて起る内膜の融解、剝脱、時に脱落膜層と共に殆んど剝脱するが、稀に遺残し、遺残腺上皮の再生機転は表層を被覆して、一見月経前期の機能性内膜様構造を呈する。これがⅡ型である。

3) 機能層下層について

下層内膜の腺は中層ほど拡大はみられず、腺上皮の機能はまだ保存されている。この事実は PAS 染色により腺上皮内陽性物質の貯溜からも知る事が出来、中層の exhaust 所見とはよい対照を示している。従つて、融解剝離後遺残した腺上皮は血液浸潤、作用するホルモン消退などによる影響を組織内で直接的に受け種々の形態的变化をする。特に著明な変化は PAS 陽性物質の消失と同時に Sudan III による脂肪染色による腺細胞内陽性物質の発現である。

これ等の変化は Arias-Stella の部に著明に認められ、かつ不規則性発現である事も考慮すると遺残内膜表層部における腺上皮の退行過程と考えざるを得ず、この層にのみ発現する理由もその腺の持つ特異的反応性によると推定される。

4) 新生内膜について

蒐集50例のうち新生内膜の認められたものは12例で、そのうち3例が新生内膜のみしか存在せず、妊娠性内膜から完全に置換されていた。

外妊の搔爬診で新生内膜の所見についての記載は極めて少ない。子宮内膜再生像について鈴木は出血開始後4週以後に始めて認められたとしているが、本研究では2週間後から発現している事が観察された。これらの腺の形態、細胞の特異像については既に述べた。Skulj¹⁴⁾らは脱落膜のみ、または、下層内膜の附随したものは124例中55例(44.3%)新しく再生したものとして分泌期内膜、増殖期内膜が69例(55.7%)存在した事を述べている。本研究の成績50例中12例(Ⅳ、Ⅴ型)と対比すると遙かに高い比率を示している。これは、脱落膜の項で既に述べた本研究Ⅱ型を分泌期内膜として含めたものと考

えられる。

新生内膜に認められた特徴的所見を要約すれば正常月経周期に認められる再生期から増殖内膜と質的に異なり、腺上皮の所見は明らかに Progesterone の影響下の再生を推定させる。教室の渡辺²³⁾は月経周期7日目以前より各種 Gestagen を投与し、人子宮内膜における内膜再生機序、ホルモン反応性について検討を行なつたが、ここに検索した12例に発現した内膜の組織パターンはこれとよく類似し、特に腺上皮の反応性に比して間質の反応性の遅延は極めて特徴的であった。

以上の事から新生内膜が絨毛の遺残、これに関連する卵巣 Progesterone の影響を受けその環境下での異常な再生、増殖である事を示すと推定させる。

5) 内膜組織パターンの類型化について

次に内膜構成組織の組織学的特徴、ならびにその形成機転を考察すると、5型に類型化された外妊時内膜が時期的推移をへて発現する事が容易に理解される。外妊の場合、妊娠による内膜環境は異所性卵囊の退行、これによつて起るステロイドホルモンの消退によつて脱落膜の融解、剝脱が惹起され、それに続く再生機序を取る過程は正常月経周期におけるそれと同質の発現機転を取るものと考えられる。しかし、それと同時にこれを基本的形態変化として、ここに分類された組織パターンは正常周期には発現しない特異像をそれぞれ持ち、先に述べた構成組織要素を複雑な形で組みこんでいると解釈される。

B. 臨床的事項について

外妊の臨床的経過ならびに臨床検査成績をその臨床診断の意味からではなく、内膜病態との関連において分析する事は重要な課題である。それは、これらが間接的に内膜組織の変化に重要な関連を持つからであり、その問題を要約すると次の3点が挙げられる。すなわち

- a) 子宮内膜の妊娠性変化
- b) 卵巣ステロイドホルモンに重要な影響を与える妊卵の消長
- c) 子宮内膜の病態に直接的变化をもたらす出血機転

これらの3点を中心に臨床的事項を検討した。

1) 妊娠反応とダグラス窩穿刺について

絨毛が生活絨毛である限り産生する絨毛性ゴナトロピン(HCG)は血清、尿中から測定出来る。現在行なわれている免疫学的妊娠反応 Gonavis-slide は操作も容易で、感度も高い。蒐集50例尿検では40例が陽性で本法の実施は内膜組織診と併用する事により診断の上で効果があった事を物語り、これに反してダグラス窩穿刺陽性は24例で判定法としては劣るが陽性の場合には直接的診断の価値があり、やはり併用の必要はある(表2)。

妊娠反応陽性率が従来の報告より高かった理由として、妊娠中絶希望例が10例存在した事が大きな理由と考えられる。

藤井²⁴⁾等は外妊18例につき血清、尿中の HCG を HAIR 法により半定量し、2, 3 の例を除き、血清では 8 iu/ml, 尿中 8 ~ 16 iu/ml 以下に分布しており、これは子宮内流産予後不良例 HCG 分布域値に相当する事を報告している。したがって外妊中絶症状の発症以後の HCG 最高値はその域値に存すると考えられるが、より高い値を示した 2・3 の症例は絨毛の退行のまだ広範囲に及ばない症例と考えられる。本研究の対象例中80%は未だ1000iu/l 以上の HCG の検出が可能で、絨毛の内分泌機能の存続を証明出来た。

陰性例 9 例のうち 3 例については Hi-Gonavis test を施行し、陽性が確認されたものである。Hi-Gonavis は検出感度も 5 ~ 10 iu/l ときわめて鋭敏で RIA レベルまでの測定が可能とされている²⁵⁾低単位まで低下した HCG の検出が必要とされる本症に対し Hi-Gonavis が適用され、診断に供された報告²⁶⁾も次第に増加している。

表 2 で検討すると、腹腔内出血、すなわち、着床環境の破壊があるものに於いてもまだ HCG の産生がみられ、この意味からすれば出血の認められなかった11例は当然ながら妊娠反応陽性であろう。ただ、問題として、妊娠反応陰性 9 例のうち 2 例がダグラス窩出血が認められず、妊娠反応も陰性であつたが開腹により陳旧性外妊である事が判明したが、これらの内膜はいずれも Progesterone 活性を内膜所見に認めない、新生内膜像を示していた。

外妊を含めて異常着床妊娠における HCG 値が正常妊娠のそれと比較してどのレベルにあるかは生物学的に極めて興味ある問題である。正常早期妊娠であれば高値を示す HCG が、中絶という急激な変化によつて産生部位である絨毛の活生低下を意味する。この点で Hi-Gonavis test 適用はきわめて有効であつたと思われる。

2) Progesterone 活性について (表 3)

絨毛性ゴナドトロピンはその主成分たる LH 作用により、卵巣の Progesterone 活性の消長はまた妊卵の生活環境を推定させる。この事から流産の予後判定にしばしばその活性の測定が行なわれている²⁷⁾。子宮内膜の動態を追求する本研究では、子宮外の異常着床時における Progesterone の消長もきわめて興味あるところであるが、これに関する研究はまだ皆無であるといつてもよい。これは、本症が偶発的に起り、しかも重篤な臨床経過をとる疾患である事から、緻密な計画性のない限り検体を蒐集し得ない事による。本研究の対象外妊中 2 例について

中絶症状以前に得られた Progesterone 活性値 15.7 ~ 15.9 ng/ml は正常²⁸⁾のそれと殆んど同値を示し、着床部位による活性の差はみられなかった。この事実は極めて貴重で妊娠下で卵巣機能を支配する HCG 活性も正常に近い値を示す事が推定される。

つぎに、Progesterone の変動を経日的に検討すると、出血10日目例では 11.0 ng/ml, 13 日目以降では 6 ~ 3 ng/ml と次第に低下して行くのが観察された。すなわち、出血後約13日目までは Progesterone の経日的漸減がみられるが、これ以後では殆んど或る一定値に止まり、しかもその域値は正常月経周期の黄体期のそれと同一レベルに存在する事が明らかとなった。

測定症例中、出血10日目で 3.4 ng/ml と低値を示した症例があるが、これは妊娠 6 週と極めて早期例であり、Progesterone 活性は妊娠 7 週より急激な上昇がみられる事から、他の症例と同様な判断を下す事に躊躇せざるを得ない特殊な症例と考えられる。

子宮内膜、とくに脱落膜層の融解、剝離は卵巣ステロイドホルモンの消退による出血であり、これをホルモン活性値より検討すると、少なくとも血清 Progesterone 値の約 5 ng/ml の低下が出血の誘発に大きな役割りを演じているものと考えられる。

また Progesterone 3 ~ 6 ng/ml の活性は低い Estrogen 活性とも相俟って内膜の剝脱以後に起る内膜新生の障害になる事は充分予想され、本研究の中で行なつた子宮内流産時との対比において外妊例の方に明らかな新生内膜の発現遅延と菲薄化が認められた。また、同一出血日数例において発現頻度ははるかに低い成績を得ている。この事実は結果として本症の出血の長期持続の原因とも考えられる。

子宮内流産後の内膜所見との対比で観察され特異な所見として挙げられた腺の微弱分泌性変化は渡辺の実験的研究からもこの Progesterone 作用によるものと考えられる。

3) 妊娠週数と出血日数について (表 4)

これら両者の関係を蒐集50例について検討すると外妊症状の発現が妊娠 9 週までに集中している点、ならびに出血開始の時期が成績の項で述べた如く妊娠 6 ~ 7 週に集中している事である。前者については既に多くの報告が臨床的に観察されて、その成績と一致する。後者の出血開始の時期については、まず出血発来は HCG の低下による妊娠黄体機能の低下、すなわち卵巣ステロイドホルモンである Estrogen, Progesterone の活性低下、これが内膜の融解、剝脱につながり惹起される点を考慮すると、急性腹症症状の発現は妊卵の着床部位、絨毛の侵襲度などによつて時期的に差異があり、広い分布を示す

が、背後に存在するホルモン活性は6~7週を限界として退行の消長を辿る事が出血発来時期から推定される興味ある結果を得た。

C. 内膜組織構成パターンと臨床的事項の関連について

外妊の内膜組織は妊娠の中絶を中心とした臨床経過と共に機能的また器質的变化を惹起し特有なパターンを取る事は内膜の持つ特性からみて明らかである。

この観点から先に分類した内膜組織パターンと妊娠週数、出血などの関係を検討してみた。

1) 妊娠週数と組織構成パターンについて (表5)

妊娠週数の早期のものにI, II型が多く、進むに従ってIII, IV型が増加しているように考えられる。しかし、妊娠週数6~8週中には妊娠中絶希望による掻爬診が10例存在するのでこれを除外しても、なお脱落膜層をもつ内膜、または、厚い機能層を持つ内膜が妊娠早期ほど存在している事は、妊卵着床内膜が妊娠経過に伴なつてその構築性を整えてゆくのに反して、外妊内膜では週数の進むにしたがい次第に機能、構造の上での退行の過程を取っている事が観察され、その原因として内分泌的背景、すなわち、胎盤形成に向い得ない絨毛の機能的低下、ならびに正常であれば胎盤産生ステロイドに移行すべき卵巣ステロイドホルモンの活性消失が充分考えられる。

2) 出血日数と組織構成パターン (表6)

出血開始から掻爬までの日数と各組織構成パターンの関係を検討すると、脱落膜を有するI型は出血後でも比較的長期に存在する事が明らかとなつた。II型もこの傾向が共存する。本所見については鈴木も触れている。しかし、多彩に富むその他の型、III~V型においては出血日数が11日以上のものではないと発現せず、組織の大きな変遷過程を推定する事が出来る。すなわち、Progesteroneの緩徐な消退による不規則な脱落膜層の融解剥脱があり、一部の表層脱落では深部まで及ばず表層上皮の再生が起こることが推定される。このII型では表層の脱落膜層が欠如するため、これまで屢々、分泌後期内膜と誤認された例が少なからず報告^{14, 20)}にみられる。

III~V型は剥脱後の遺残腺と、修復機序としての再生内膜の発現であり、当然ながら日数の経過と共に発現している。

3) Arias-Stella 所見について (写真12)

子宮内外妊娠の中絶時、または、絨毛性疾患における子宮内膜の異常像についての最初の報告は1954年 Arias-Stella が「絨毛組織の存在と関連して発現した内膜異常」と題して発表したのに始まる。しかし外妊についてはわずか1例挙げたのみであつた。外妊に関する本所見につ

いては Pildes & Wheeler³⁰⁾が外妊50例中26%に発現した事を述べ次第に関心を集めた。Frederiksen³¹⁾ならびに Brux³²⁾等は少数例ではあるが本所見が高率に認められた事から外妊診断における意義を認め、Overbeck は本所見を Hellen Drüsen とし、脱落膜を伴わない内膜に見出した場合は充分外妊を考えるべきである事を強調した。

本所見は脱落膜を有すると否にかかわらず発現し、本研究でも(表4)約20%に発現している。Novak³³⁾等も25%前後と考えている。本所見が流産時にも発現する点も合わせて考察すると外妊の決定的診断の因子とはなり得ない。ただ、その発現機序から言つて流産時より比較的高い発現率を示す事は否めない。

Arias-Stella 所見の発現は本研究では機能層下部に好発し、且つ部位的に広汎にわたるものは極めて少ない事の特徴とする事を明らかにした。

本所見の発現機序について Arias-Stella は動物実験から HCG と Estrogen の共同作用によるものであるし、Svensson³⁴⁾, Pildes & Wheeler ともこれに同意している。しかし本研究で示された所見は明らかに HCG 低下による卵巣ステロイドの消退から招来された内膜腺の退行変化と考えられ、この考え方は Overbeck も推定している。成績(表4, 6)の示す如く、出血日数の経過に従い発現が多くなる事、また、発現層が遺残内膜の最上層となる機能層下部である事など組織化学所見のみでなくこの事実を推定させる。

これら脱落膜成分、または Arias-Stella の所見も、その発現率において、従来の多くの文献に見られる如く、極めて多様性にわたっている事は、内膜の融解、剥脱から出血、さらには、表層部の退行変化へと連続推移する一つの病態過程によつて左右されることによると考えられる。

本研究の過程で提示された臨床検査成績は、陳旧性子宮外妊娠の診断に関して生体の持つ強い復元機転の作用のため極めて不安定な結果を示す事が明らかとなつた。このことは本症の診断の困難性を示しているといえよう。

結 論

以上本研究により得られた外妊時における内膜の病態に関する成績、ならびにこれに対する考察より次の結論が得られた。

- 1) 外妊脱落膜は子宮内妊娠時にみられる壁脱落膜と、その形態、機能が同質であり、床脱落膜と判別する事が出来る。
- 2) 脱落膜遺残度は出血日数に関係なく妊娠初期中絶

(6~7 週)に高く、週数の進むに従がい低下する。

3) 構成要素の再構築から外妊時内膜を 5 型に分類出来た。

4) この 5 型の組織構成パターンは臨床症状とくに出血、また背景となる特徴あるホルモン分泌動態と極めてよく関連している事が明らかになった。

5) これまで明確な動態を把握出来なかつた異常着床時におけるホルモン活性 (HCG, Progesterone) の変動に関する貴重な成績が得られた。

6) Arias-Stella 所見は妊娠遺残内膜に発現した退行変化であり、発現層は機能層下部に限定される。また出血日数が長期間にわたるものに高率に認められた。

7) 外妊時子宮内膜に経時的に発現する新生内膜は内分泌の異常環境のため再生障害があり、また特徴ある形態を取り診断学的に意義ある所見が認められた。

これまで多彩な所見としてされてきた外妊時の内膜組織を整理し剥脱、再生機転、その背後に存在するホルモン動態による時期的推移による体系づけを行なった。

この成績を子宮外妊娠の組織学的診断基準に導入する事により、より正確な臨床診断に近づく事が出来ると確信する。

稿を終るにあたり、終始御懇切な御指導、御校閲を賜った恩師蜂屋祥一教授に厚く感謝すると共に御援助、御鞭撻をいただいた教室の諸先生に心から感謝いたします。

本論文の要旨は第50回関東連合地方部会総会、第20回日本不妊学会において発表した。

文 献

- 1) Cohnstein. : Beitrag zur Schwangerschaft ausserhalb der Gebärmutterhöhle. Arch. Gynäk. 12 : 355-382, 1877.
- 2) Sampson, J. A. : The influence of ectopic pregnancy on the uterus with special reference to changes in its blood supply and uterine bleeding based on the study of 25 injected uteri associated with ectopic pregnancy. S.G.O. 18 : 587-610, 1914.
- 3) Baniecki. H. : Das Schleimhautbild des Uterus bei abgestorbener Extrauterin gravidität. Zbl. Gynäk. 73 : 349-355, 1951.
- 4) a) Arias-Stella, J. : Atypical endometrial changes associated with the presence of chorionic tissue. Am. M. A. Arch. Path. 58 : 112-128, 1954.
b) Arias-Stella, J. : Abnormal endometrial changes induced in the rat. The effects of chorionic hormone and estrogen. Am. M. A. Arch. Path. 60 : 49-58, 1955.
- c) Arias-Stella, J. : Endometrial changes in the rat. The effect of estrogen when administered after an interval following castration. Am. M. A. Arch. Path. 60 : 59-62, 1955.
- 5) 河合信秀, 鈴木重男 : 卵管妊娠の子宮内膜像, 産婦の世界, 8 : 778-783, 1956.
- 6) 鈴木重男 : 卵管妊娠時に於ける子宮内膜の組織学的研究, 日産婦誌, 9 : 291-300, 1957.
- 7) 小原達也 : 子宮外妊娠の統計的観察, 産婦の世界, 10 : 598, 1958.
- 8) 豊田正治 : 外妊中絶時, 子宮内膜に関する臨床病理学的検討, 産婦の世界, 13 : 527-538, 1961.
- 9) 三宅秀郎, 丸山正義 : 産科と婦人科, 28 : 760-768, 1961.
外妊の子宮内膜(特に腺の変化について)-その 1 28 : 904-912, 1961.
外妊の子宮内膜(特に腺の変化について)-その 2
- 10) Glass, R.H., Jesurun, H.M. : Immunologic pregnancy tests in ectopic pregnancy. Obstet. Gynec. 27 : 66, 1966.
- 11) S. H. Geist., M. R. Matus. : The relation of ectopic gestation to the associated uterine changes and vaginal bleeding. Am. J. Obst. Gynec. 17 : 151-165, 1929.
- 12) Schneider, H. : Die Bedeutung der deciduellen Umwandlung der Uterusschleimhaut für die Diagnose der Extrauterin gravidität. Zbl. Gynäk. 61 : 2381-2388, 1937.
- 13) Winkler., E. G. Capraro, V. J. : Cul-de-sac aspiration and other diagnostic aids for ectopic pregnancy a review of 219 cases. Am. J. Obst. Gynec. 65 : 340-345, 1953.
- 14) Skulj., V. Bunarevic, A. et al. : The Arias-Stella phenomenon in the diagnosis of ectopic pregnancy. A. J. O. G. 87 : 499-503, 1963.
- 15) Bernhardt., R. N. Bruns P. D. and Drose. V. E. : Atypical endometrium associated with ectopic pregnancy the Arias-Stella-phenomenon. Obstet. and Gynec. 28 : 849-853, 1966.
- 16) Charles, D. : The Arias-Stella reaction. J. Obstet. Gynaec. Brit. Comm. 69 : 1006, 1962.
- 17) Mackles, A. Wolfe, S. A. and Pozner, S. N. : Cellular atypia in endometrial (Arias-Stella reaction) as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. Am. J. Obstet. Gynec. 81 : 1209-1219, 1961.
- 18) Loud, H. E. D. Fienberg, R. : The Arias-Stella reaction a nonspecific involutinal phenomenon in intra- as well as extrauterine pregnancy. Am. J. Clin. Path. 43 : 428-432, 1965.
- 19) a) Overbeck, L. : Das Endometrium bei abgestorbener Tubargravidität. Virchows Archiv. 324 : 409-427, 1953.
b) Overbeck, L. : Die Bedeutung der "Hellen Drüsen" in Endometrium für bei Dia-

gnose der Tubargravidität. Geburtsh u. Frauenhk. 19 : 983, 1959.

- 20) a) Hachiya, S. Y. Shiotsuka and N. Murakami. : An ultrastructural study of the secretory patterns of human endometrial glandular cells. J. of Clin. Electron Microscopy. 6 : 276, 1973.
b) Hachiya, S. Y. Shiotsuka and N. Murakami. : An ultrastructural study on the human endometrial stromal cells. J. of Clin. Electron Microscopy. 6 : 278, 1973.
- 21) 植田勝間 : 妊娠個体における免疫機能の変化とその成因に関する研究, 日産婦誌, 27, 678-686, 1975.
- 22) 富永敏朗 : 妊娠現象の同種移植としての移植免疫学的特異性に関する研究, 日産婦誌, 27, 687-696, 1975.
- 23) 渡辺陽一 : 各種 Gestagen 剤投与下における子宮内膜に関する組織学的研究, 産婦の世界, 13, 3, 1-12, 1961.
- 24) 阿部 稔, 本多 啓, 北条泰輔, 鈴木正彦, 藤井久四郎 : 子宮妊娠の内分泌環境, 日本不妊学会誌, 20 : 184, 1975.
- 25) 東条伸平, 足高善彦 : HCG, ホルモンと臨床, 22 : 1239-1246, 1974.
- 26) 吉田 威, 佐藤博信 : 卵管妊娠例の尿中 HCG 濃度, 産と婦, 43 : 106, 1976.
- 27) 高木繁夫, 吉田孝雄, 田根 培, 阿部 誠, 洪川真, 山地瑞雄, 尾崎晴彦 : HCG, ホルモンと臨床, 20 : 701-708, 1972.
- 28) D. R. Mishell, et al. : Serum gonadotropin and steroid patterns during the normal menstrual cycle. A.J.O.G. 111 : 60-65, 1971.
- 29) Berthelsen, H. G. : Atypical endometrial changes in extrauterine pregnancy. Arias-Stella phenomenon. Acta. Obst. Gyn. Scand. 36 : 226-232, 1957.
- 30) Pildes, P. B. Wheeler, J. D. : Atypical cellular changes in endometrial glands associated with ectopic pregnancy. A.J.O.G. 73 : 79-88, 1957.
- 31) Frederiksen, T. : The Arias-Stella reaction as an aid in the diagnosis of ectopic pregnancy. Acta. Obst. Gyn. Scand. 37 : 86-96, 1958.
- 32) Brux, J., Arcla, M. : Arias-Stella endometrial atypias case study with the electron microscope. A.J.O.G. 89 : 661-669, 1964.
- 33) Novak, E. : Gynecologic and Obstetric Pathology. 6 E.
- 34) Svensson, S. A. : Atypical endometrial glandular alterations in ectopic pregnancy. Acta. Path. Microb. Scand. 40 : 401-406, 1957.

(受付昭和52年10月27日, 特掲)

Histo-pathological findings of the endometrium in cases of ectopic pregnancy

—Analysis of morphological characteristic and its diagnostic significance—

Toshio Nakajima

Department of Obstetrics and Gynecology
The Jikei University School of Medicine

It is extremely important for the diagnosis of ectopic pregnancy to distinguish the pathological findings of endometrium. In view of this, 50 cases of ectopic pregnancy were examined from the standpoint of reconstructing the structure of endometrium, also studied on clinical findings which are assumed to influence the endometrium and on endocrine background. In addition to these, another 45 cases of anomalous bleeding after intrauterine abortion were examined comparatively.

Results of the observation are summarized as follow :

1. The configuration and function of decidua in ectopic pregnancy is same as decidua parietalis normally observed in the cases of intrauterine pregnancy. They could easily be distinguished from decidua basalis.

2. The remnant incidence of decidua has been observed higher at the early weeks of pregnancy (from 6 to 7 weeks) and has become lower at the later weeks of pregnancy, having no relation with bleeding terms.

3. Endometrium with ectopic pregnancy has been classified into 5 patterns according to the reconstructing tissue components.

Type I ; endometrium with whole layers including decidua. Type II ; endometrium consists of remnant functional layer without decidua, resembling to late secretory phase. Type III ; endometrium is configured with lower gland of functional layer and basal gland, in which Arias-Stella's reaction is detectable frequently. Type IV ; newly regenerated endometrium is detectable in the pattern of Type III. Type V ; endometrium is almost replaced with newly regenerated endometrium without resting pregnant remnants.

4. The structural patterns have been closely interrelated with clinical signs, among others, bleeding condition and endocrine background.

5. Distinct variation of activities of HCG and

progesterone for the cases of anomalous implantation has been clearly observed.

6. The Arias-Stella phenomenon is considered as a retrogressive change occurring within remnant endometrium, and the layer undergone the change is found to be limited to the lower part of whole functional layers. Incidence of this phenomenon has been observed high in the cases

with long term bleeding.

7. Irregular regeneration, which is considered to be principally due to hormonal imbalance, has been observed distinctly in morphological appearance of newly regenerated endometrium in cases of ectopic pregnancy. The characteristic appearance of the endometrium has been significant for the diagnosis.

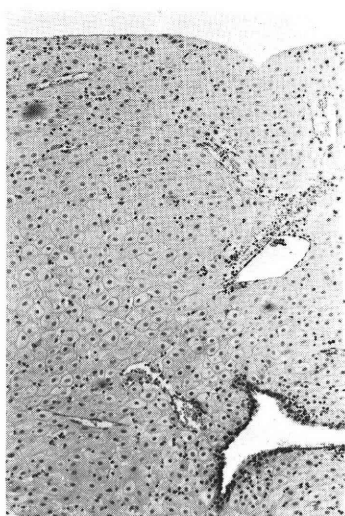


写真 1 内膜表層における変化(脱落膜変化)

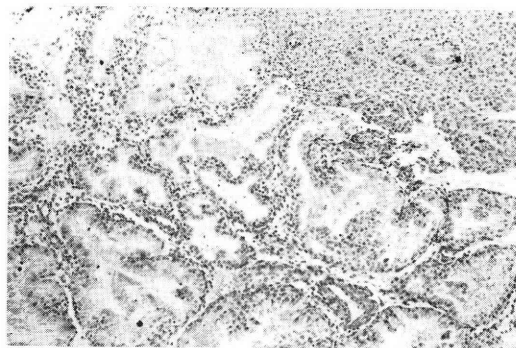


写真 2 機能層中層

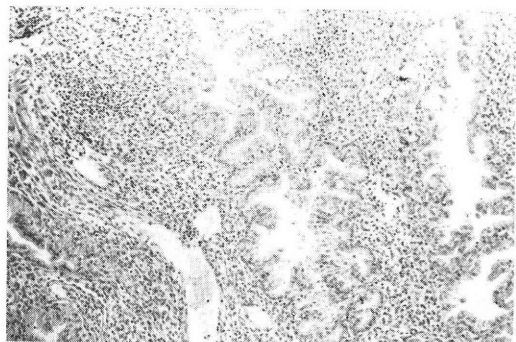


写真 3 機能層下部

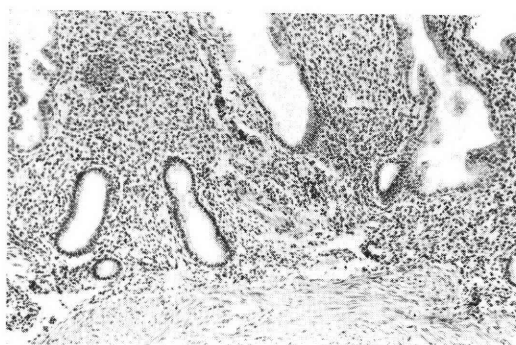


写真 4 基底層腺管

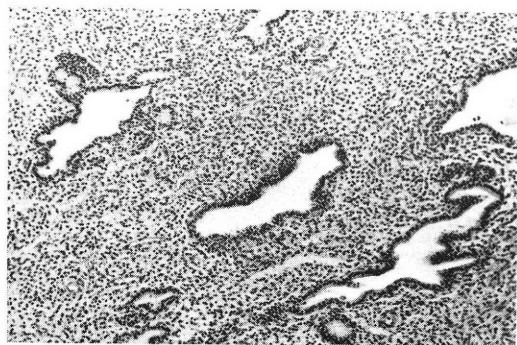


写真 5 新生内膜

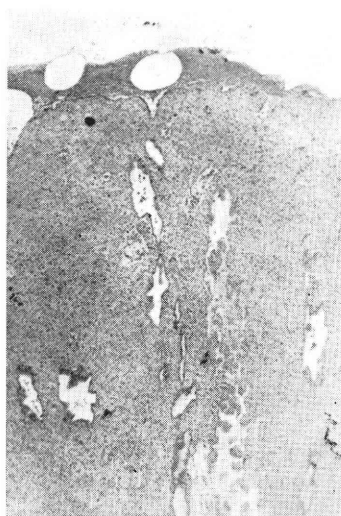


写真 6 I型:全層をもつ内膜

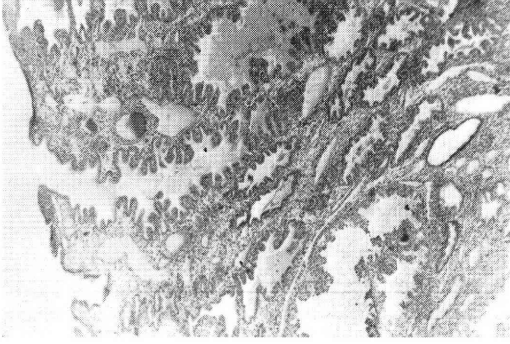


写真 7 II 型：脱落膜層は剥脱するも、機能層は遺残し、一見分泌期内膜を示す像

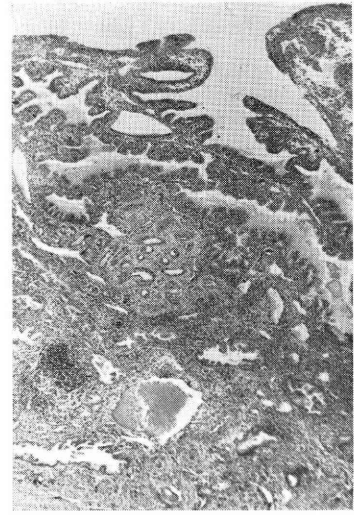


写真 8 III 型：機能層下部腺管と基底腺管

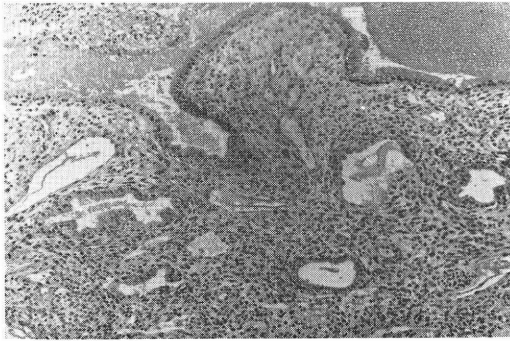


写真 9 IV 型：新生内膜が混在する像

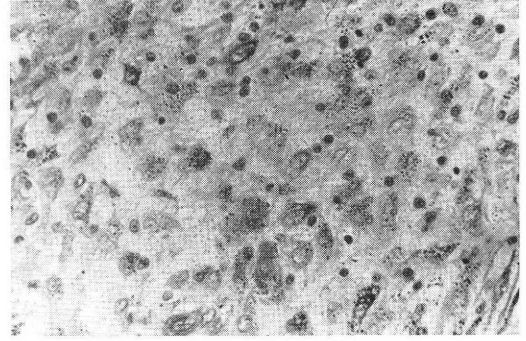


写真 10 壁脱落膜

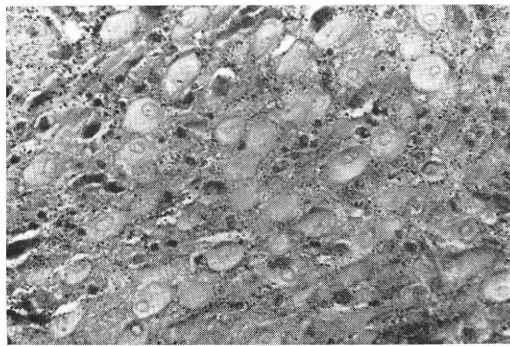


写真 11 床脱落膜

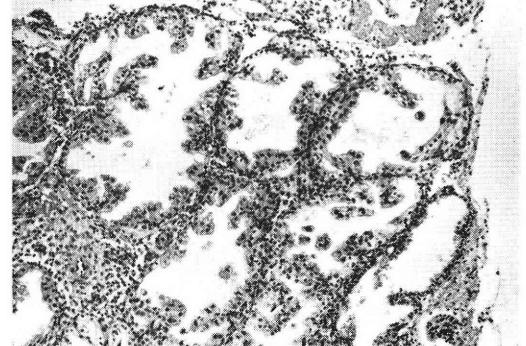


写真 12 Arias-Stella 像

昭和51年度日本不妊学会北海道地方会

担当：北海道大学獣医学部家畜臨床繁殖学講座

昭和51年11月13日

特別講演

家畜繁殖の人為支配一技術とその意義一

西 川 義 正(帯広畜産大学)

一般講演

1) 昭和50年の当科不妊症外来の統計

楨本 深, 清水泰裕, 足立謙蔵

光部啓一, 田中昭一, 橋本正淑

(札幌医大産婦)

2) Clomid+HMG+HCG 併用排卵誘発法について

田中昭一, 清水泰裕, 足立謙蔵

光部啓一, 橋本正淑

(札幌医大産婦)

3) Clomiphene citrate による 排卵誘発妊卵の細胞
遺伝学的研究 (第1報)

田中俊誠, 河東 寛, 佐藤 力

藤本征一郎 (北大産婦)

4) 馬のターナー症候群類似の2例

三宅陽一, 河田啓一郎, 石川 恒

(北大獣医)

5) 腎移植患者の性機能

広田紀昭, 平野哲夫(北大泌尿器)

6) 器官培養下における Spermatogenesis に対する
FSH, Testosterone の効果

木村正一, 熊本悦明(札幌医大泌尿器)

日本不妊学会関東・東北連合地方部会

昭和52年6月11日

開会の辞

竹 内 正 七(新潟大産婦)

一般講演

1) ミニ・ピル投与による排卵抑制の研究

○小笠原 仁, 津端捷夫, 高木繁夫

(日本大産婦)

2) LH・RH テストによる 無排卵症患者の病態に関
する検討

○山本育代, 遠藤 守, 庄司 誠

篠塚正一, 中島敏男, 細田 肇

木下英夫, 蜂屋祥一

(東京慈恵会医大産婦)

3) 17α -Pregn-4-en-20-yno[2,3-d]-isoxazol-17-ol(Danazol) の視床下部・下垂体・卵巣系機能におよ
ぼす影響

○柳 沼 志(富山医科薬科大産婦)

○岡村 隆, 貝原 学, 小林拓郎

(東大分院産婦)

4) 男性不妊症患者における間脳・下垂体・性腺系機
能の内分泌学的・形態学的研究

○小笠原 仁, 坂田寿衛, 田 根培

柳沢洋二, 高木繁夫(日本大産婦)

5) 月経周期にともなう血中 CBG, Te BG の変動に
ついて

○川越慎之助, 広井正彦(山形大産婦)

6) Gonadotrophin および Prostaglandin が in vi-
tro でハムスタ卵子の 17β -Hydroxysteroid dehyd-
rogenase 活性に及ぼす影響

○新村末雄, 石田一夫(新潟大農学部)

7) 当教室における血清精子抗体の検索結果

○須藤寛人, 森田和雄, 吉沢浩二

高橋 威 (新潟大産婦)

8) ^{125}I をトレサーとした E_2 -RIA キットの検定

○古橋信之, 星合 昊, 太田憲道

和田裕一, 平野睦男, 高橋克幸

鈴木雅洲 (東北大産婦)

9) 正常初期妊娠の血中 HCG 値の RRA・RIA に
よる比較検討

○田辺清男, 中村幸雄, 中島 進

上野 裕, 塗 百寛, 飯塚理八

(慶応大産婦)

10) 疑妊娠療法施行内膜の酵素組織化学的研究

○塩塚幸彦, 林 茂興, 林茂一郎

佐橋 徹, 藤井成彬, 小林一夫

(東海大産婦)

11) 不妊症における漢方療法の応用

○村田高明, 吉村泰典, 渡辺 茂

亀井 清 (国立埼玉病院産婦)

12) 過去3年間の当科における子宮奇形について

○鳥取孝成, 須藤寛人, 森田和雄

吉沢浩志, 岸 博士, 佐藤芳昭

高橋 威 (新潟大産婦)

13) 子宮外妊娠の臨床像についての考察

○古賀詔子, 永井 宏, 永井 泰

(永井病院)

14) 過去3年間における当科不妊外来患者の統計的分
析

○森田和雄, 須藤寛人, 吉沢浩志

高橋 威 (新潟大産婦)

15) 当科における不妊臨床統計

○大田憲道, 星合 晃, 斎藤 晃
羽根田敦, 平野陸男, 高橋克幸
鈴木雅洲 (東北大産婦)

16) 高度の精子形成障害にをともなつた精索静脈瘤の

1 例 — 手術後, 5 年間の精液所見について —

○広川 信, 岩本晃明, 藤井 浩
(藤沢市民病院泌尿器科)

○松下和彦(横浜市大第一病理)

17) 交叉性精管吻合による妊娠成功例

○長沢正人, 平井庸夫, 一条貞敏
(福島医大泌尿器)

○宮田宏洋

(郡山寿泉堂病院泌尿器)

18) 男性不妊症と陰囊温度

○光川史郎, 石井延久, 白井将文
松田尚太郎 (東北大泌尿器)

19) 男子不妊症における精路デイスキネジー: 特に射精前後の SVG 所見について

○一条貞敏, 横山 純, 長沢正人
白岩康夫 (福島医大泌尿器)

20) 男性インポテンスに関する研究

第11報 勃起前後の陰茎血流動態の観察

○石井延久, 光川史郎, 白井将文
松田尚太郎 (東北大泌尿器)

21) 精液の総合判定基準

特に Eliasson score の変法について

○白井将文, 石井延久, 光川史郎
松田尚太郎 (東北大泌尿器)

シンポジウム

「不妊診療をめぐる最近の進歩」

1) 不妊症をめぐる免疫学的諸問題

金 沢 浩 二(新潟大産婦)

2) 排卵誘発をめぐる諸問題

平 野 陸 男(東北大産婦)

3) 不妊と感染症について

吉 田 茂 子(東京女子医大産婦)

4) 不妊症とホルモン分泌

広 井 正 彦(山形大産婦)

5) 男子不妊症の治療

熊 本 悦 明(札幌医大泌尿器)

第77回日本不妊学会関西支部集談会

昭和52年 6 月 4 日

大阪大学医学部付属病院

開会の辞

倉 智 敬 一(阪大産婦)

演 題

1) ラット妊娠中期の黄体発育刺激ホルモンについて
中村行雄, 市川繁孝(大阪府立大農)

2) Prostaglandin F_{2α} およびその Analogues (O-NO-1045, ONO-1108) 注射による牛の発情ならびに排卵の誘起試験

中間実徳, 稲葉俊夫, 藺守竜雄
(大阪府立大農)

3) 豚精子の透明帯除去ハムスター卵子の侵入

今井 裕, 丹羽皓二, 入谷 明
(京都大畜産)

4) 無排卵と血中プロラクチンについて

松岡賢光, 蘇 鈞煌, 本橋 享
麻生武志, 村田匡好, 西村敏雄
(京都大産婦)

5) 双角子宮に対する手術療法 特に Jones-Jones 手術の意義

神田隆善, 仮野隆司, 宮崎和典
内藤勝義, 池田義人, 岡崎孝之進
杉本 修 (大阪医大産婦)

6) Prostaglandins 及び Clomiphene citrate のラットに対する流産催起効果

木下道雄, 芦原孝三, 堀越順彦
島岡昌幸, 中島徳郎, 余語郁夫
樫木 勇 (関西医大産婦)

7) AIH による不妊症治療

田中文男, 根来孝夫, 若尾豊一
佐治文隆, 中室嘉郎, 倉智敬一
(大阪大産婦)

8) 本院不妊外来に於ける妊娠成功例について

高野 登, 田中文平, 塩出 進
恩田 博, 友田昭二, 浜田和孝
杉本修一, 須川 信
(大阪市大産婦)

9) 精子不動化抗体の頸管粘液内精子通過性におよぼす影響

伊熊健一郎, 窪田耕三, 山本充一
繁 田 実, 鎌田敏雄, 磯島晋三
(兵庫医大産婦)

10) 無排卵症における下垂体・卵巢系の機能

片山和明, 橋場信之, 鷺尾元夫

仲野良介, 東條伸平

(神戸大産婦)

第78回日本不妊学会関西支部集談会

昭和52年9月17日

大阪医科大学

開会の辞

宮崎 重(大阪医大泌尿器)

演 題

1) 男性不妊に対するカリナクリンの使用経験

日根野卓, 真弓研介, 谷風三郎

守殿貞夫, 石神襄次

(神戸大泌尿器)

2) 男性不妊症患者精液の粘性に関する研究

松瀬幸太郎, 岡野 准, 高崎 登

宮崎 重 (大阪医大泌尿器)

3) ラット卵巢における LH Receptor の基礎的検討

中田好則, 加藤恵一, 村上利樹

高野 登, 加藤英子, 小畑 義

岡田弘二 (京都府立医大産婦)

4) ヒト卵胞のステロイド生合成機能

藤田泰彦, 森 崇英, 鈴木 暁

西村敏雄 (京都大産婦)

5) わが教室における不妊統計, とくに妊娠成功例を

中心として 池田 良, 奥田喜代司, 柚木孝塚

假野隆司, 岡崎孝之進, 杉本 修

(大阪医大産婦)

6) 女性不妊診断へのラパロスコピーの応用

岡崎孝之進, 神田隆善, 松本 健

内藤勝義, 杉本 修

(大阪医大産婦)

投稿規定

1. 本誌掲載の論文は、特別の場合を除き、会員のものに限る。
2. 原稿は、本会の目的に関連のある綜説、原著、論説、臨床報告、内外文献紹介、学会記事、その他で、原則として未発表のものに限る。
3. 1論文は、原則として印刷6頁（図表を含む）以内とし、超過頁並びに特に費用を要する図表および写真に対しては実費を著者負担とする。
4. 綜説、原著、論説、臨床報告等には必ず400字以内の和文抄録並びに、ダブルスペース2枚以内の欧文抄録（題名、著者名、所属を含む）を添付すること。
5. 図表並びに写真は稿末に一括して纏め、符号を記入しかつ本文中に挿入すべき位置を明示すること。
6. 記述は、和文又は欧文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
7. 外国の人名、地名等は原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの学会所定のものに従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
8. 文献は次の形式により、末尾に一括記載する。
 - a. 雑誌の場合
著者名：題名、誌名、巻数：頁数、年次
原則として、特に原著の場合は著者名を全員あげる。
誌名は規定または慣用の略字に従うこと。特に号数が必要とする場合は、巻数と頁数との間に入れて括弧で囲む。すなわち
著者名：題名、誌名、巻数(号数)：頁数、年次

編集会議からのお知らせ

1. 超過頁は全文刷り上りで10頁をこえない範囲で認める。
2. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編とする。
3. 内容について著者にアドバイスすることもある。
4. 著者校正は原則として初校のみ1回とする。
5. 受付年月日を論文の末尾に掲載する。

- 例1. Kilbourne, N. J.: Varicose veins of pregnancy. Amer. J. Obstet. Gynec. 25: 104, 1933
2. 足高善雄, 竹村喬, 美並義博: 最近1カ年間の我が教室に於ける外来不妊患者の統計的観察, 日不妊誌, 4: 13, 1959
3. 中島精, 中村正六, 角田英昭: 人工妊娠中絶と妊孕性, 日不妊誌, 2(4): 38, 1957
 - b. 単行本の場合
著者名：題名、巻数：頁数、発行所、年次
- 例1. Rovinsky, J. J., and Guttmacher, A. F.: Medical, Surgical and Gynecological Complications of Pregnancy, ed 2: p 68, Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1965
9. 原稿の採否、掲載順位その他編集に関する事項は編集会議で決定する。掲載は、原則として受付順による。
10. 特別掲載を希望する場合は、受付順序によらず、すみやかに論文を掲載する。この際は掲載に要する実費は全額著者負担としかつ特別掲載料を納付する。
11. 掲載の原稿に対しては、別冊30部を贈呈する。(但し、特に費用を要した場合は、その一部を著者負担とすることがある)
それ以上を必要とする場合は、原稿に総別刷部数を朱書すること。30部を越す分についての実費は著者負担とする。
12. 投稿先および諸費用の送付先は、東京都新宿区市ケ谷砂土原町1丁目1番 保健会館別館内
社団法人 日本不妊学会 事務所宛とする。

日本不妊学会雑誌 23巻1号

昭和52年12月25日印刷
昭和53年1月1日発行

編集兼 発行者	芦原慶子
印刷者	中村清雄
印刷所	東京都品川区上大崎3-12-15 一ツ橋印刷株式会社
発行所	東京都品川区上大崎3-12-15 社団法人 日本不妊学会 東京都新宿区 市ケ谷砂土原町1丁目1番 保健会館別館内 Tel (03) 267-4635 振替口座番号 東京 7-93207