

日本不妊学会雑誌

第 25 卷

第 1 号

昭和 55 年 1 月 1 日

— 目 次 —

原 著

抗精子抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響

1. 血中精子不動化抗体保有不妊婦人における頸管粘液

精子適合試験並びに頸管粘液中微量精子不動化試験……………伊熊 健一郎・他………… 1

Occurrence of Prolactin Binding Sites in Rabbit Ovary and Uterus

……………T. Tamaya・他………… 8

In Vitro Study of Bovine and Human Corpora Lutea in Cell Culture

—With Special Reference to Morphologic Evidences and the Secretion

of Progesterone and Estrogen—……………K. Yoshida…………13

LH- α , β subunit の Radioimmunoassay による妊娠時の

下垂体前葉機能の研究……………横 倉 恒 雄…………23

乳汁漏出を主訴としない無月経患者における

高プロラクチン血症スクリーニングの意義……………小 池 浩 司・他…………32

Studies on Structural Composition of the Human Cervix Uteri

Part 1. Structural Composition of the Human Cervix Uteri

in Nonpregnancy

Part 2. Structural Composition of the Human Cervix Uteri

During Pregnancy……………M. Nakanishi…………39

頸管粘液における Lysozyme……………須 藤 寛 人・他…………48

水素ガス・クリアランス法によるうさぎ卵管血流量の測定……………宮 崎 憲…………53

胚—子宮内膜相関について

—とくに着床期周辺の子宮内膜組織に発現する特異的蛋白—……………篠 塚 正 一…………62

Failure to Stop the Reduction of Blood Pressure in Pregnant

Spontaneously Hypertensive Rats Following Indomethacin

Treatment……………T. Nakada…………73

社会保険佐賀病院における不妊外来統計……………中 村 元 一・他…………78

当不妊外来における最近 5 年間の妊娠例の検討……………松 家 五 朗・他…………85

当大学病院家族計画外来開設後の臨床統計……………林 茂 興・他…………92

地方部会講演抄録……………97

第 25 回日本不妊学会総会および学術講演会予告 (第 1 回)

第 25 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。

記

会 期：昭和55年10月1日（水）2日（木）

会 場：渡辺翁記念館および宇部市文化会館（宇部市朝日町）

学術講演会：理事長講演・外人招請講演・会長要請講演・会長講演・シンポジウム（精液の性状と妊孕性）・一般講演

演題申込締切：昭和55年6月15日（当日消印有効）

演題申込み方法など詳細は次号でお知らせいたします。

第25回日本不妊学会総会会長

酒 徳 治 三 郎

連絡先 宇部市小串 1144

山口大学医学部泌尿器科学教室内

第25回日本不妊学会総会事務局

〒 755 TEL (0836)-31-3121

内線 281, 282

日本学術会議第78回総会報告

(昭54・10・24～26)

日本学術会議第78回総会は、10月24日、小雨にけむる同講堂において開催された。9時30分、議長の開会宣言がなされた直後、突然傍聴席にいた二十数名の者が事務局職員の制止を無視して議場に入り、議事を妨害した。議長は再三にわたり傍聴席へ戻るよう指示したが、これに従わないため、止むを得ず、10時30分休憩を宣言した。

この休憩中に各部会が開かれた。その後会長室前に座り込んでいた者達が庁舎外に退去したので、総会は14時30分に再開された。

まず、会長から事務局の人事異動が紹介され、次いで6月10日に逝去された、第2部故有倉遼吉会員の冥福を祈る黙禱を捧げ、会長報告に移った。

会長報告のうち、「米国スリー・マイル・アイランド原子力発電所事故の提起した諸問題に関する学術シンポジウム開催について」の追認については、翌日行うよう動議があり、投票の結果、これを賛成多数で可決した。また、有倉会員の死亡にともなう会員不補充問題については適宜処置することにした。

次いで運営審議会付置小委員会報告に移り、財務委員会、国際会議主催等検討委員会、広報委員会、日本学術会議改革検討委員会、勧告等委員会、沖縄学術連絡委員会の各委員会報告がなされ多端な第1日目の会議を終了した。このうち財務委員会報告において、昭和55年度予算に国際交流の相互的な促進のために、海外からの代表団の招へい費が要求されている点が注目された。

第2日は、前日のような混乱をさけるため、傍聴は報道関係者にとどめて9時30分に開会した。まず、スリー・マイル・アイランド原発事故に関するシンポジウムについて原子力政策に関する連絡会議世話人から開催予定に至る経緯について説明があつた。特に、このシンポジウムは原子力安全委員会の行う「公開ヒアリング」とは無関係であることが強調された。また安全委員会との共催は科学・技術を行政・国民生活に浸透するうえで有意義であると述べられた。種々の質問や意見が出され活発な討論が行われたが、賛成多数で追認された。

各部報告の後、発展途上国学術協力問題特別委員会の報告があり、本年8月ウイーンで開催された「発展のための国連科学技術会議(UNCSTD)」について3名の出席者からそれぞれ報告があつた。

午後には、まず第11期の活動取りまとめ委員会の報告があり、報告書の作成方針と構成について説明があつた。これに対して会員から種々の希望が述べられた。この後、各常置委員会報告が行われた。このうち、特に国際会議の代表派遣旅費、特定研究の採択などについては具体的に説明がなされた。続いて各特別委員会報告、中央選挙管理会の報告があつた。なお、前期からの懸案である科学者憲章についてはさらに検討し、次期総会に提案したい旨述べられた。

最後に「献体登録に関する法制化促進について」(勧告)の説明があり、これについて活発な討論を重ねたが、二、三の意見に基づき文案を修正して翌日に改めて提案することになった。

第3日は、引続き提案審議を行った。午前中は『基礎数理研究所』(仮称)の設置について(勧告)、『『新収洋書総合目録』の磁気テープ化について』(要望)、『日本学術会議の関与する二国間の学術交流について』(申合せ)、『体育学研究連絡会の新設及びこれに伴う『第11期における研究連絡委員会の組織・運営等の整備について』(第75回総会申合せ)の一部改正について』は賛成多数で可決された。しかし、「日本学術会議中国派遣代表団の任務について」(申合せ)は、その内容や必要性について多くの意見が述べられ、午後に再提案されることになった。

午後は、前日から引きついで「献体登録に関する法制化の促進について」(勧告)及び「日本学術会議会員選挙規則の一部改正について」、「学術刊行物の郵便料金について」(要望)、「原子力研究、利用三原則要求声明25周年に際しての声明」については賛成多数で可決し、再提案の「中国派遣団の任務について」(申合せ)は修正を加えたうえで「了解事項」として承認された。さらに「研究機関における地震による災害防止対策について」(要望)は説明文を追加することにして可決された。15時45分美しい夕映えの下で全日程を終え閉会した。

なお、本総会の出席率は、1日目87%、2日目84%、3日目83%であつた。

(日本学術会議広報委員会)

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 25, No. 1, 1980)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Effect of Sperm Immobilizing Antibodies on Sperm Penetration in the Cervical Mucus	
1. Sperm Penetration Test and Micro Sperm Immobilization Test in the Cervical Mucus from Sterile Women with Sperm Immobilizing Antibody in the Sera.....	
.....K. Ikuma, K. Kubota, Y. Takada, T. Kamata, K. Koyama & S. Isojima	1
Occurrence of Prolactin Binding Sites in Rabbit Ovary and Uterus.....	
.....T. Tamaya, Y. Ohono, N. Ide, T. Tsurusaki & H. Okada	8
In Vitro Study of Bovine and Human Corpora Lutea in Cell Culture — With Special Reference to Morphologic Evidences and the Secretion of Progesterone and Estrogen	
.....K. Yoshida	13
Study on Anterior-Pituitary Function during Pregnancy by Radioimmunoassay of LH α , β subunits.....	
.....T. Yokokura	23
Diagnostic Significance of Prolactin Assay in Amenorrheic Patients without Subjectively Complaining of Galactorrhea	
.....K. Koike, T. Aono, T. Shioji & K. Kurachi	32
Studies of Structural Composition of the Human Cervix Uteri	
Part 1. Structural Composition of the Human Cervix Uteri in Nonpregnancy	
Part 2. Structural Composition of the Human Cervix Uteri during Pregnancy	
.....M. Nakanishi	39
Lysozyme in Cervical Mucus.....	
.....N. Sudo & K. Morita	48
Measurement of Blood-flow of the Rabbit Oviduct by Hydrogen-Gas-Clearance Method	
.....K. Miyazaki	53
Some Aspects of Nidus-Endometrial Relationships : with Special Reference to the Uterine Specific Proteins which Appear in the Endometrial Tissue at the Initial Stage of Implantation	
.....M. Shinozuka	62
Failure to Stop the Reduction of Blood Pressure in Pregnant Spontaneously Hypertensive Rats Following Indomethacin Treatment	
.....T. Nakada	73
Statistical Studies on the Infertile Women in Saga Social Insurance Hospital	
.....G. I. Nakamura & H. Terashima	78
Clinical Observation on the Pregnant Cases in Our Infertility Clinic during 5 Years ..	
.....G. Matsuka, T. Masuda, K. Yoshizaki, Y. Inui, T. Mimura, S. Takeuchi, S. Yamano & H. Takahashi	85
Statistical Analysis on the Infertile Women in our Family Planning Clinic	
.....S. Hayashi, Y. Shiozuka, T. Yamato, M. Hayashi, K. Kobayashi, M. Inoue, T. Kenjo & A. Fujii	92

抗精子抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響

1. 血中精子不動化抗体保有不妊婦人における頸管粘液 精子適合試験並びに頸管粘液中微量精子不動化試験

Effect of Sperm Immobilizing Antibodies on Sperm Penetration in the Cervical Mucus

1. Sperm penetration test and micro sperm immobilization test in the cervical mucus from sterile women with sperm immobilizing antibody in the sera

兵庫医科大学産科婦人科学教室

伊 熊 健 一 郎 窪 田 耕 三 高 田 喜 嗣
Kenichiro IKUMA Kozo KUBOTA Yoshitsugu TAKADA
鎌 田 敏 雄* 香 山 浩 二 磯 島 晋 三
Toshio KAMATA Koji KOYAMA Shinzo ISOJIMA

Department of Obstetrics and Gynecology, Hyogo
Medical College, Nishinomiya, JAPAN.

抗精子抗体による不妊症発生機序解明の一助として、血中精子不動化抗体保有不妊婦人と非保有不妊婦人における頸管粘液 (CM) 内精子通過性を Huhner テスト (in vivo) 並びに Kremer テスト (in vitro) によつて比較検討し、合わせて微量精子不動化試験法を用いて CM 中の補体依存性精子不動化因子について検討した。

血中精子不動化抗体保有不妊婦人では明らかに非保有不妊婦人に比べて高頻度に CM 内精子通過性障害の起こることが Huhner 並びに Kremer テストにおいて認められた。排卵前 CM 中の補体依存性の精子不動化因子は、血中抗体保有不妊婦人では15例中13例 (86.7%) に認められ、また血中抗体非保有不妊婦人でも171例中26例 (15.2%) が陽性を示した。これらの精子不動化因子を含有する CM 中では精子の通過性が著しく障害されることが確認された。

以上の実験結果は血中精子不動化抗体保有婦人に於ける不妊症発生原因の一つとして、頸管内での精子通過性障害を強く示唆するものである。

緒 論

血中抗精子抗体の中でも精子不動化試験によつて検出される補体依存性精子不動化抗体は、精子凝集試験又は蛍光抗体法によつて検出される補体非依存性抗精子抗体に比べて、原因不明不妊婦人の血液中に特異的に見出されるという点で、不妊症の原因として臨床的には特に注

目すべきことを著者らは報告してきたが¹⁻⁴⁾、この結果は他の研究者によつても追認されつつある⁵⁻⁷⁾。一般に抗精子抗体によつて起こる女性不妊の原因として、1) 性器管分泌液中に移行する抗体による精子の運動障害^{8,9)}、2) 抗体結合精子の授精能障害^{10,11)}、3) 受精後着床迄の段階でみられる受精卵の抗体による障害^{12,13)}、あるいは4) 着床後の初期胎芽発育に対する抗体の影響の結果早期流産の起こってくる可能性^{13,14)}等が考えられているが、未だ臨床的には確証に乏しい。著者らはラットを用い

* 香川県坂出市、回生病院、産婦人科
Department of Obstetrics and Gynecology,
Kaisei Hospital, Sakaide, JAPAN.

た動物実験で、血中に注射した抗精子抗体 IgG が子宮腔内分泌液中に移行して、子宮内に存在する精子に特異的に結合することを二重標識抗体法¹⁵⁾によって証明し、臨床的には排卵直前婦人の頸管粘液中に補体成分の一つである C₃ 成分や免疫グロブリンである IgG, IgA, 稀に IgM が検出されることを報告しているが¹⁶⁾、更に我々が新たに考案した微量精子不動化試験法によって血中精子不動化抗体保有不妊婦人の頸管粘液中には補体依存性の精子不動化因子が検出されることを証明した^{17,18)}。Parish¹⁹⁾,²⁰⁾らも頸管粘液中に抗血液型抗体である抗 A, 抗 B 抗体を証明するとともに原因不明不妊婦人の頸管粘液中に精子凝集抗体、精子不動化抗体、あるいは精子細胞毒抗体の検出されることを報告しており、精子免疫によって発生する女性不妊の原因として頸管内に於ける精子障害作用が強く考えられている。Telang²¹⁾らも同様に Huhner テスト不良群の中に血中あるいは頸管粘液に精子凝集抗体保有不妊婦人の多い事を報告し、抗精子抗体の存在と頸管粘液内精子通過障害との相関を認めている。

本論文においては、in vivo 頸管粘液精子適合試験法である Huhner テスト²²⁾及び in vitro 頸管粘液精子適合試験法である Kremer テスト²³⁾を用いて血中精子不動化抗体保有不妊婦人の頸管粘液内精子通過性が如何なる傾向を示すかを抗体非保有不妊婦人を対照として比較検討し、あわせて両不妊婦人の頸管粘液に精子不動化抗体の有無につき微量精子不動化試験法を用いて検討し頸管粘液精子適合試験との相関を調べた。

実験材料及び方法

1. 不妊患者

当科不妊外来通院中の不妊婦人を対象とした。Huhner テストは血中精子不動化抗体の有無にかかわらず一般臨床検査で異常の認められない原因不明不妊患者、すなわち器質的疾患を有せず排卵を伴った正常月経周期婦人で頸管粘液の性状、卵管疎通性、夫精液所見に異常の認められない婦人に行った。又、Kremer テストに用いた頸管粘液は前述の原因不明不妊婦人と、他にも不妊原因を有するが頸管粘液の性状検査で異常の認められない不妊婦人より採取した。頸管粘液中の精子不動化抗体の有無については血中精子不動化抗体保有不妊婦人並びに血中抗体は陰性であるが Kremer テストで異常を示す症例につき検討した。

2. Huhner テスト

5日間以上の禁欲を行った後、基礎体温 (BBT) 測定により排卵前1～2日と考えられる日の午前7時頃性交を行わせた後、30分乃至1時間の仰臥位を保たせた後、来

院させた。検査は性交後3～4時間に行うのを原則としたが、先ず (i) 後陰門蓋部の分泌物をツベルクリン注射器で吸収採取し、次いで綿球で子宮腔部を清拭した後、(ii) 新たなツベルクリン注射器で外子宮口より頸管粘液を採取する。更に人工授精用の注入針を用いて、(iii) 内子宮口近くの頸管粘液を吸引し、最後に新たな人工授精用注入針を用いて、(iv) 子宮腔内分泌液を採取した。(i)～(iv)の検査材料はスライドガラス上に滴下し、顕微鏡下(400倍)で精子の数、運動性を検索し、一視野当りの全精子数に対する運動精子数を算定した。

Huhner テストの結果判定基準については未だ一定の見解はないが、今回の実験における最終判定は Dava-Jan²⁴⁾, Tradway²⁵⁾らの報告を参考にして内子宮口部頸管粘液中に検出された運動精子のみを判定規準に選んで以下の規準を設定した。

good: 5匹以上の運動精子

fair: 1～4匹の運動精子

bad: 運動精子が全く認められないもの

結果が“bad”の群については、再度検査を行い、一番良好な結果を以て最終判定とした。

3. Kremer in vitro 精子貫通試験

排卵前頸管粘液を採取し、水様透明、低粘稠性で量が0.2ml以上、牽糸性10cm以上、著明なシダ様結晶形式を示し pH が6.8以上のものを実験材料とした。採取した頸管粘液はプラスチック製小容器に入れ-20℃に凍結保存した。精液はすべて抗精子抗体を保有していない健康男子よりの Donor 新鮮精液を用いた。

試験方法は写真1に示すように、micro-capillary

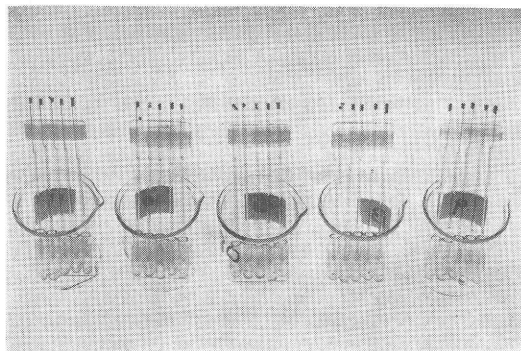


写真 1

tube (Hematocrit 用毛细管1.5×75mm)に頸管粘液を吸引し、一端はテルモシール (仁丹テルモ K.K.)で閉じ、他端を精液貯溜槽に浸して精子の時間的上昇距離、並びに精子数、運動率、生存時間などを顕微鏡下(100倍)で判定した。反応は恒温恒温(100%, 37℃)が最適であるが、判定時間が短い場合は室温で行っても影響

はない。

判定は前述の項目につき反応開始後30分, 1時間, 2時間, 3時間, 6時間, 12時間, 24時間, 48時間まで行ったが, 今回の集計には Ulstein^{26,27)}らの報告を参考に, 時間的精子上昇距離のみを判定規準に選び, 次の criteria を設定した。

good: 2時間以内に運動精子が5cm 以上上昇するもの。

fair: 2乃至6時間で運動精子が5cm 以上上昇しうるもの。

poor: 6時間で運動精子が1乃至4.9cm の範囲にとどまるもの。

negative: 6時間で運動精子の上昇は0.9cm 以下であるか, 又は全く運動精子を認めないもの。

Kremer 試験においても繰返し検査を行って一番良好な結果を以つて最終判定規準とした。

4. 精子不動化試験

すでに報告した方法^{1,2)}であるが, その要点は非働化(56°C, 30分)患者血清0.25ml, 補体(モルモット血清, 力価 200C'H₅₀ 以上でヒト精子に毒性のないもの)0.05ml, 洗滌精子浮遊液(10%非働化未婚女性血清含有生食水にて1回洗滌, 濃度40×10⁶/ml)0.025mlを小試験管に加え, 32°C, 60分間反応させた後, その一滴をスライドグラス上にとり, 顕微鏡下(200倍)で精子の運動率を算定する。対照未婚女性血清を用いて同様の反応を行った際の精子運動率(C%)を被検患者血清の精子運動率(T%)で割った値を精子不動化値(sperm immobi-

lization value: SIV)とし, これが2以上の場合, 即ち, 対照血清に比べて被検血清添加により精子運動率が半分以下になった場合を陽性と判定した。

5. 微量精子不動化試験

本法もすでに報告したが^{17,18)}, 本法を用いて頸管粘液中の精子不動化抗体の検出を行う際の要点について述べると, まず採取した頸管粘液に等量もしくは2倍量の未婚女性血清(前もって精子不動化抗体が陰性であることを確認したもの)を加えて攪拌後(overnight), 遠沈(9,700G 30分間)によりその上清を分離し, これを頸管粘液抽出液として56°Cで30分の熱処理により非働化した後実験に用いた。頸管粘液抽出液10μl, 精子浮遊液(40×10⁶/ml)1μlと, 補体源としてのモルモット血清2μlをmicrochamberの重層した流動パラフィン下に注入混合し, 32°Cで1時間, 2時間, 3時間と反応させ各反応時間に於ける精子運動率を倒立顕微鏡下(200倍)で算定する。対照として必ず補体を加えないもの(非働化モルモット血清を加えたもの)と頸管粘液抽出液の代わりに非働化未婚女性血清を加えたものを同時にを行い対照精子運動率を算定する。判定は前述の精子不動化試験と同様で, 実験群の精子運動率(T%)が対照群(補体を加えないもの)の精子運動率(C%)に比べて50%以下になった場合, すなわち C/T (SIV) が2以上の場合を陽性と判定した。

実験結果

117名の原因不明不妊婦人に行つた Huhner テストの結果を Table 1 に示した。血中精子不動化抗体保有不妊

Table 1 Comparative results of Huhner test in unexplained sterile woman with and without sperm immobilizing antibody in sera.

Sperm antibody	*No. of patients	Huhner test		
		Good	Fair	Bad
Positive	12	3(25.0%)	2(16.7%)	7(58.3%)
Negative	105	61(58.1%)	14(13.3%)	30(28.6%)

* Number of patients who had Huhner test

Table 2 Comparative results of Kremer test in sterile women with and without sperm immobilizing antibody in sera.

Sperm antibody	*No. of patients	Kremer test			
		Good	Fair	Poor	Negative
Positive	20	3(15.0%)	2(10.0%)	10(50.0%)	5(25.0%)
Negative	309	139(45.0%)	25(8.1%)	83(26.9%)	62(20.1%)

* Number of patients who had Kremer test

婦人は12名で3名(25.0%)が“good”2名(16.7%)が“fair”, 7名(58.3%)が“bad”であった。また105名の抗体非保有不妊婦人では“good”61名(58.1%), “fair”14名(13.3%), “bad”30名(28.6%)であり、前者で“bad”が50%以上を占めたのに比べて後者では50%以上が“good”を示し明らかに抗体保有不妊婦人に Huhner テスト不良群の多い事が判る。

正常月経周期を有ししかも頸管粘液の性状検査で異常の認められなかつた329名の不妊婦人について行った Kremer 試験の結果を Table 2 に示した。血清精子不動化試験で陽性を示した20名の不妊婦人の結果は“good”, “fair”, “poor”, “negative”がそれぞれ3名, 2名, 10名, 5名であった。また309名の血清精子不動化試験陰性不妊婦人では“good”139名, “fair”25名, “poor”83名, “negative”62名であった。後者において309名中164名(53.1%)が“good”あるいは“fair”を示したのに比べて、前者では20名中5名(25.0%)であり残りの15名(75%)は“poor”あるいは“negative”であった。抗体保有不妊婦人のなかで比較的多数を占める Kremer 試験“poor”と判定された頸管粘液中では反応6時間後に於ても3cm以上の精子上昇を示したものは1例もなかつた。これに比べて抗体非保有不妊婦人の“poor”群では反応6時間後に約半数(52.0%)が3cm以上の精子上昇を示した。

次いで15名の血中精子不動化抗体保有不妊婦人と171名の血中抗体非保有不妊婦人について検討した排卵前頸管粘液中での補体依存性精子不動化因子の検出率を示すと、Table 3 の如く前者に於いて15名中13名(86.7%)に、また後者に於いて171名中26名(15.2%)に陽性結果を得た。血中抗体保有不妊婦人では2名を除いてすべての婦人の頸管粘液中にも補体依存性の精子不動化因子が検出されたということは血中抗体の頸管粘液への移行を強く示唆するものであり、また、血中抗体非保有不妊婦人の15.2%に頸管粘液中にも補体依存性精子不動化因子の検出されたという事実は、抗精子抗体が局所性器管に於いても産生されうる可能性を示すものである。

最後に血中抗精子抗体の有無にかかわらず頸管粘液中に補体依存性精子不動化因子の検出された同じ頸管粘液

Table 3 Percentage of positive results by micro-SIT in CM-extracts from sterile women with or without sperm immobilizing antibody in sera.

SIT in serum	*No. of patients	No. of positive micro-SIT in CM-extracts
Positive	15	13(86.7%)
Negative	171	26(15.2%)

SIT: Sperm immobilization test

CM: Cervical mucus

* Number of patients who had micro-SIT

を用いて行った Kremer 試験の結果を Table 4 に示す。表より明らかなように補体依存性精子不動化因子含有頸管粘液はすべての症例が頸管粘液内精子通過障害を示し、Kremer 試験の結果が“poor”であった12症例の中でも3cm以上の精子上昇を示したものは血中抗体陰性群の2症例のみで残りはすべて3cm以下か、あるいは“negative”と判定された1cm以下の精子上昇しか示さなかつた。

考 察

1964年 Franklin^{28,29)}らによつて、原因不明不妊婦人の血中に高率に精子凝集抗体の検出されることが報告されて以来、多数の研究者によつて精子凝集試験³⁰⁻³⁴⁾あるいは精子不動化試験^{1,3,5,6,7)}などによる血中抗精子抗体と女性不妊の関係が検討されてきた。しかし、血中抗精子抗体保有不妊婦人の不妊症発生機序を究明するための研究はあまり行われておらず、現在検討が進められている段階にある。我々はすでに動物実験で、精子免疫を受けた雌動物の性器管内分泌液中に抗精子抗体が出現してくること³⁵⁾、又実際に抗精子抗体を雌動物に注射して、注射された抗精子抗体が、子宮内精子に特異的に結合されることを証明しており¹⁵⁾、おそらく血中抗精子抗体保有不妊婦人においても、子宮、卵管、頸管内分泌液中に抗精子抗体が移行し、上行精子に何らかの影響を与えることは想像に難くない。すでに血中抗精子抗体と、Huhner 試験との関係をみたいいくつかの報告がなされて

Table 4 Results of Kremer test by using cervical mucus which contained complement dependent sperm immobilizing factors.

SIT in serum	Micro SIT in CM-extracts	No. of patients	Kremer test			
			Good	Fair	Poor	Negative
Positive	Positive	12	0	0	2	10
Negative	Positive	23	0	0	10	13

いるが^{21, 36, 37)}、ほとんどがあまり不妊症発生に特異性のみられない血中精子凝集抗体との関係をみた報告であり、血中抗体の存在と Huhner 試験の障害性との間に相関は認められていない。ただ Telang²¹⁾らの報告では、Huhner 試験良好群での血中抗体検出率は 7%であるのに比べ Huhner 試験不良群では 52%に抗体が検出されたとして相関を認めている。又、Ansbacher³⁶⁾らは、血中精子不動化抗体保有不妊婦人の頸管粘液中で donor 精子の貫通性の悪いことを認めているが、症例数が少ない為、更に多数の症例を検討する必要があることを強調している。本論文で報告した著者らの結果でもやはり血中抗精子抗体保有不妊婦人では対照不妊婦人に比べて Huhner 試験並びに Kremer 試験において有意に精子の頸管粘液内通過性が障害されていた。抗体保有婦人でも少数例で Huhner 試験あるいは Kremer 試験が良好群に属する症例がみられたが、これは何回か行つた検査で一回でも良好な結果を示した場合に、これを良好群に入れた為であり、また同様に抗体保有婦人の大多數の症例が不良群であつたということは、これらの婦人では繰返し行つた検査で常に検査結果が不良であつたことを意味している。実際に血中抗精子抗体保有不妊婦人の排卵前頸管粘液中の精子不動化抗体の有無を微量精子不動化試験法によつて調べてみると、血中抗体保有婦人の大部分の症例 (15名中13名: 86.7%) に頸管粘液中にも補体依存性の精子不動化因子が検出されてくるが、この出現は必ずしもすべての性周期にみられるとは限らず、周期によつては検出されない時期のあることを認めており、このような頸管粘液中に出現してくる補体依存性の精子不動化因子の性周期による変動については別報で詳細に報告した¹⁹⁾。血中に精子不動化抗体が検出されず、頸管粘液の性状にも異常が認められない症例においてもかなりの割合で精子通過性障害が認められたが、これらの症例の中には、血中に抗体を持たないで、頸管粘液中にのみ補体依存性の精子不動化因子を保有している症例 (171名中26名: 15.2%) があり抗精子抗体の局所産生を示唆するものである。頸管粘液中に認められた補体依存性の精子不動化因子が血中抗体の移行であれ、または局所抗体産生によるものであつたとしても、このような補体依存性精子不動化因子を含有した頸管粘液中では例えその物理的性状に異常が認められなくても、精子の通過性が著しく障害されており (35 症例中 Kremer 試験により12名が “poor”, 23 名が “negative”) 不妊症発生の原因となつている可能性が強い。では頸管粘液中に抗精子抗体が存在した場合に、なぜ精子の通過性が障害されるのであろうか。一つの可能性として頸管粘液中には微量ながら補体成分の存在することが認められてお

り¹⁶⁾、補体依存性の精子不動化因子によつて精子の運動性そのものが障害される場合である。また他の可能性として Fjällbrant³⁹⁾ & Kremer⁴⁰⁾ らによつて示されているように、抗精子抗体保有不妊男性において、すでに精液中で抗精子抗体が精子に結合している場合には例え精子の運動性に支障が認められなくても正常な頸管粘液中での抗体結合精子の著しい通過性障害の起こることが認められており、婦人に於いても頸管粘液内に抗精子抗体 IgG が遊離状態で存在するとすると同様の機序により頸管粘液中の抗精子抗体が上昇してくる精子に結合して、二次的にその後の精子上昇が障害されるという可能性も考慮しておかなければならない。又頸管粘液中に移行してきた抗精子抗体 IgG が、粘液中の糖蛋白の IgG-Fc 受容体に結合したまま精子抗原との抗体結合基を遊離した状態で存在している時、進入してくる精子を結合して、粘液内上昇を阻止することも考えられる。

以上総括すると、血中精子不動化抗体保有不妊婦人の不妊原因の一つとして、頸管粘液内での精子通過性障害が大きな比重を占めていると考えられる。又頸管粘液性状検査で異常の認められないような症例でも Huhner 試験あるいは Kremer 試験が障害されている場合には、血中抗精子抗体の検索だけでなく頸管粘液中の抗精子抗体の検索と、夫の血中抗精子抗体検査を行う必要があると考えられる。

文 献

- 1) Isojima, S., Li, T. S. and Ashitaka, Y.: Immunological analysis of sperm immobilizing factor found in sera of women with unexplained infertility, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 101: 677, 1968.
- 2) 磯島晋三: 妊孕現象に関する免疫学的研究, 第23回日産婦総会宿題報告要旨, 1971.
- 3) Isojima, S., Tsuchiya, K., Koyama, K., Tanaka, C., Naka, O. and Adachi, H.: Further studies on sperm-immobilizing antibody found in sera of unexplained cases of sterility in women, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 112: 199, 1972.
- 4) Isojima, S., Koyama, K. and Tsuchiya, K.: The effect on fertility in women of circulating antibodies against human spermatozoa, *J. Reprod. Fert., Suppl.*, 21: 125, 1974.
- 5) Jones, W. R., Ing, R. M. Y. and Kaye, M. B.: A comparison of screening tests for anti-sperm activity in the serum of infertile women, *J. Reprod. Fert.*, 32: 357, 1973.
- 6) Ansbacher, R., Keung-Yeung, K. and Behrman, S. J.: Clinical significance of sperm antibodies in infertile couples, *Fertil. Steril.*, 24: 305, 1973.

- 7) Petrunia, D. M., Taylor, P. J., and Watson, J. I.: A comparison of methods of screening for sperm antibodies in the serum of women with otherwise unexplained infertility, *Fertil. Steril.*, 27 : 655, 1976.
- 8) McLaren, A.: Immunological control of fertility in female mice, *Nature (Lond.)* 201 : 582, 1964.
- 9) Bell, E. B. and McLaren, A.: Reduction of fertility in female mice iso-immunized with a sub-cellular sperm fraction, *J. Reprod. Fert.*, 22 : 345, 1970.
- 10) Metz, C. B. and Anika, J.: Failure of conception in rabbits inseminated with non-agglutinating, univalent antibody-treated semen, *Biol. Reprod.*, 2 : 284, 1970.
- 11) Russo, I. and Metz, C. B.: Inhibition of fertilization in vitro by treatment of rabbit spermatozoa with univalent iso-antibody, *J. Reprod. Fert.*, 38 : 211, 1974.
- 12) Menge, A. C., Kiddy, C. A., Stone, W. H. and Casida, L. E.: Immunological studies on fertility and sterility: V. Effect of antibodies against semen and erythrocytes on rabbit embryos, *J. Reprod. Fert.*, 4 : 87, 1962.
- 13) Menge, A. C.: Induced infertility in cattle by iso-immunization with semen and testis, *J. Reprod. Fert.*, 13 : 445, 1967.
- 14) Menge, A. C., Burkons, D. M. and Friedlander, G. E.: Occurrence of embryo motility in rabbits isoimmunized against semen, *Int. J. Fertil.*, 17 : 93, 1972.
- 15) Koyama, K., Isojima, S. and Adachi, H.: Direct proof of transmission of antibody against spermatozoa into the uterine cavity of the rat, *Proceeding of 7th World congress of Fertility and Sterility, Tokyo, 1971, Excerpta Medica*, p. 562.
- 16) 香山浩二: 頸管粘液の異常の診断から治療へ—特に精子適合について—, *臨産婦*, 29 : 373, 1975.
- 17) 香山浩二, 磯島晋三: 不妊婦人に存在する精子不動化抗体とその検出法, *ホルモンと臨床*, 24 : 617, 1976.
- 18) 香山浩二, 伊熊健一郎, 窪田耕三, 鎌田敏雄, 磯島晋三: 微量精子不動化試験法による頸管粘液内補体結合精子不動化因子の検索, *日産婦誌投稿中*.
- 19) Parish, W. E., Carron-Brown, J. A. and Richards, C. B.: The detection of antibodies to spermatozoa and to blood group antigens in cervical mucus, *J. Reprod. Fert.*, 13 : 469, 1967.
- 20) Parish, W. E. and Ward, A.: Studies of cervical mucus and serum from infertile women, *J. Obstet. Gynecol. Brit. Common.*, 75 : 1089, 1968.
- 21) Telang, M., Reyniak, J. V. and Shulman, S.: Antibodies to spermatozoa; VIII. Correlation of sperm antibody activity with postcoital tests in infertile couples, *Int. J. Fertil.*, 23 : 200, 1978.
- 22) Huhner, M.: Sterility in the male and female and its treatment; Rodman. New York, 1913.
- 23) Kremer, J.: A simple sperm penetration test, *Int. J. Fertil.*, 10 : 209, 1965.
- 24) Davajan, V. and Kunitake, G.: Fractional in vivo and in vitro examination of post-coital cervical mucus in the human, *Fertil. Steril.*, 20 : 197, 1969.
- 25) Tredway, C. R.: The interpretation and significance of the fractional postcoital test, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 124 : 352, 1976.
- 26) Ulstain, M.: Evaluation of a capillary tube sperm penetration method for fertility investigations, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 51 : 287, 1972.
- 27) Ulstain, M. and Fjällbrand, B.: Interrelation of different parameters at cervical mucus penetration of spermatozoa, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 52 : 295, 1973.
- 28) Franklin, R. R. and Dukes, C. D.: Anti-spermatozoal antibody and unexplained infertility, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 89 : 6, 1964.
- 29) Franklin, R. R. and Dukes, C. D.: Further studies on sperm agglutinating antibody and unexplained infertility, *J.A.M.A.*, 190 : 682, 1964.
- 30) Schwimmer, W. B., Ustay, K. A. and Behrman, S. J.: An evaluation of immunologic factors of infertility, *Fertil. Steril.*, 18 : 167, 1967.
- 31) Israelstam, D. M.: The incidence of sperm-agglutinating antibodies in the serum of infertile women, *Fertil. Steril.*, 20 : 275, 1969.
- 32) Glass, R. H. and Vaidya, R. A.: Sperm agglutinating antibodies in infertile women, *Fertil. Steril.*, 21 : 657, 1970.
- 33) Hanafiah, M. J., Epstein, J. A., and Sobero A. J.: Sperm-agglutinating antibodies in 236 infertile couples, *Fertil. Steril.*, 23 : 493, 1972.
- 34) Shulman, S., Jackson H., and Stone, M. L.: Antibodies to spermatozoa; VI. Comparative studies of spermagglutination activity in groups of infertile and fertile women, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 123 : 139, 1975.
- 35) Ashitaka, Y., Isojima, S. and Ukita, H.: Mechanism of experimental sterility induced in guinea pigs by injection of homologous

- testis and sperm; II. Relationship between sterility and the sperm immobilizing antibody, *Fertil. Steril.*, 15 : 213, 1964.
- 36) Wall, J. R., Harrison, R. F., Stedronska, J. and Lessof, M. H.: Antibodies against spermatozoa in infertile women with poorly invading spermatozoa on postcoital tests, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 121 : 198, 1975.
 - 37) Soffer, Y., Marcus, Z. H., Bukovsky, I. and Capsi, E.: Immunological factors and post coital tests in unexplained infertility, *Int. J. Fertil.*, 21 : 89, 1976.
 - 38) Ansbacher, R., Manarang-Panga, S. and Srivannaboon, S.: Sperm antibodies in infertile couples, *Fertil. Steril.*, 22 : 298, 1971.
 - 30) Fjällbrant, B.: Interrelation between high levels of sperm antibodies, reduced penetration of cervical mucus by spermatozoa, and sterility in men, *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, 47 : 102, 1968.
 - 40) Kremer, J. and Jager, S.: The sperm-cervical mucus contact test: A preliminary report, *Fertil. Steril.*, 27 : 335, 1976.

Effect of sperm immobilizing antibodies on sperm penetration in the cervical mucus

1. Sperm penetration test and micro sperm immobilization test in the cervical mucus from sterile women with sperm immobilizing antibody in the sera

**Kenichiro Ikuma, Kozo Kubota,
Yoshitsugu Takada, Toshio Kamata*,
Koji Koyama and Shinzo Isojima**

Department of Obstetrics and Gynecology
Hyogo Medical College, Nishinomiya,
JAPAN

*Department of Obstetrics and Gynecology
Kaisei Hospital, Sakaide, JAPAN

Since the sperm immobilizing antibody was found in the sera of some unexplained sterile

women by our sperm immobilization test, the relationships between sterility and the presence of the sperm immobilizing antibody were confirmed by many investigators. However, the mechanism of the sperm immobilizing antibody on sterility should further be studied.

In this report, the compatibility of spermatozoa to cervical mucus was investigated by Huhner's postcoital test and Kremer's in vitro sperm penetration test in the sterile women with the sperm immobilizing antibody and the results were compared with those in the sterile women without the antibody.

Complement dependent sperm immobilizing factors in cervical mucus were measured by micro-sperm immobilization test which was developed in our laboratory. The cervical mucus was taken from sterile women with and without the sperm immobilizing antibody in the sera.

The sterile women with sperm immobilizing antibody showed more poor results in both Huhner's and Kremer's tests compared with sterile women without the antibody. Thirteen out of 15 (89.7 %) women with sperm immobilizing antibody in serum contained the complement dependent sperm immobilizing factors in their cervical mucus, whereas 26 out of 171 (15.2 %) women without the antibody in serum contained them. The sperm penetration in cervical mucus was completely impaired in women with the complement dependent sperm immobilizing factors in their cervical mucus.

These results strongly suggest that one of the reasons to induce the sterility in women with sperm immobilizing antibody in their blood could be due to the presence of antibody in the cervical mucus which was transferred from blood or produced locally in the cervical canal.

(受付: 昭和54年8月27日)

OCCURRENCE OF PROLACTIN BINDING SITES IN RABBIT OVARY AND UTERUS

T. TAMAYA, Y. OHONO, N. IDE, T. TSURUSAKI and H. OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology, Kyoto Prefectural University
of Medicine, Kamikyo-ku, Kyoto 602, Japan

Abstract: The occurrence of prolactin (PRL) binding sites was demonstrated in the subcellular fractions of the rabbit ovaries and uteri of various reproductive states. The binding process was time—and temperature—dependent, being maximal at 37°C. The dissociation constant determined by Scatchard analysis was approximately 1.2×10^{-10} M at 37°C in both ovarian and uterine fractions. These results suggest that PRL gives its effect on rabbit ovary and uterus via its own membranous receptor.

Introduction

Prolactin (PRL) constituted a part necessary for maintaining the luteal function in the rabbit¹⁰ and inhibited contractility in the isolated myometrium of rabbit⁴. We have found that PRL demonstrated the co-operative effect on the uterine growth with estrogen in the rabbit⁵. Therefore in this paper we studied the occurrence of PRL binding sites in the ovary and uterus of the rabbit.

Materials and Methods

Hormones

Porcine growth hormone was obtained from Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo. Bovine PRL was a gift from Teikoku-zoki Chem. Co., Tokyo, Japan. Human chorionic gonadotrophin (hCG) was obtained from Mochida Pharm. Co., Tokyo, Japan. Human PRL (hPRL) iodinated with chloramine-T was obtained from CIS, France and the specific activity of [¹²⁵I] iodo-hPRL varied from 100 to 200 μ Ci/ μ g (not obtained details concerning the iodination or an appropriate reference). Shiu and Friesen⁹ demonstrated that ¹²⁵I-labelled human prolactin prepared by the enzymic iodination procedure with lactoperoxidase¹¹ bound better to receptors than does the preparation obtained by using chlo-

ramine-T as the oxidizing agent²). However the characterization of prolactin-binding activity could be determined using ¹²⁵I-labelled human prolactin prepared by chloramine-T.

Preparation of tissue homogenate

Ovaries and uteri were obtained from immature white rabbits (about 1 kg) and either untreated, pseudopregnant, or pregnant mature white rabbits (about 2 kg) after decapitation. Pseudopregnancy was induced by auricular intravenous injection of 200 IU hCG. Immediately tissues were kept at 4°C and weighted. All subsequent steps were performed at 4°C except as noted. The pellets containing plasma membranes were prepared according to the method of Saito and Saxena⁷). The tissues were minced with scissors, and homogenized with one burst of a polytron PT-10 (Kinematica) at power setting 6 at intervals of 30 sec in 5 volumes (v/w) of 10 mM tris-HCl buffer of pH 7.8 containing 1 mM dithiothreitol, 1 mM MgCl₂, and 0.25 M sucrose. The homogenate was centrifuged at 480×g for 20 min. The supernatant was recovered, and the pellet was re-suspended in the same buffer and centrifuged for another 20 min. The supernatants were pooled and centrifuged at 10,000×g for 1 h. The pellets containing plasma membranes from 10,000×g centrifuge of the 480×g supernatant were resuspended in 10

volumes (v/w) of the incubation buffer [10 mM Tris-HCl buffer of pH 7.0 containing 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$ and 0.1% (w/v) bovine serum albumin (BSA)]. The suspension was aliquoted and frozen at $-80^\circ C$ until use. One aliquot was taken for protein determination by the method of Lowry et al.³⁾ using BSA as the standard.

Binding of ^{125}I -hPRL to tissue homogenate

Fifty μl of the suspension of $10,000 \times g$ pellet and 100 μl of ^{125}I -hPRL (in increasing concentration) dissolved in the incubation buffer were incubated with 100 μl of the incubation buffer alone or containing unlabeled PRL (1 μg) at $37^\circ C$ for various periods, and at $4^\circ C$ and $20^\circ C$ for 120 minutes. The protein concentration of each suspension was different due to the dilution (71 to 220 μg). Then the incubates were cooled by the addition of 1 ml of the incubation buffer A of $4^\circ C$. Bound and free hormones were separated by centrifugation at $1,500 \times g$ for 20 min. at $4^\circ C$. The supernatant was aspirated, and the pellets were washed with 2 ml of the incubation buffer. The pellets contain-

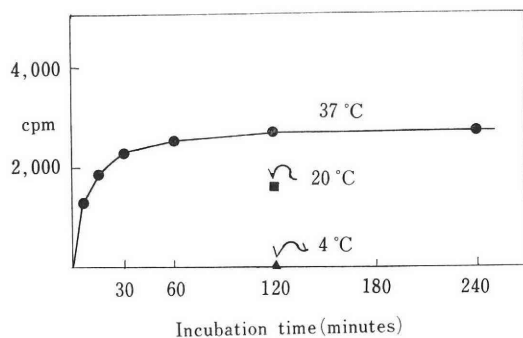


Fig. 1. Time course of prolactin binding to the ovarian subcellular fractions at $37^\circ C$. The ovaries were obtained from the pseudopregnant rabbits in 5 days after intravenous injection of 200 IU hCG together with daily intramuscular administration of 100 IU bovine PRL for 5 days. Specific binding was expressed as the difference of the bindings in each tube with and without unlabeled PRL. Values are the means of duplicate samples. Specific binding was also determined at $20^\circ C$ and $4^\circ C$ for 120 minutes. The subcellular fractions contained 71 μg of protein.

ing receptor bound hormone were counted in a Packard Autogamma Counter with a 50% efficiency for ^{125}I . Specific binding was expressed as the difference of the bindings in each tube with and without unlabeled PRL. The data were analyzed by a Scatchard plot⁸⁾.

Results

Effects of time and temperature on binding of prolactin to ovarian preparations

The binding of ^{125}I -labeled human prolactin was time-dependent (Fig. 1). At $37^\circ C$, equilibrium was attained after 2 hours incubation. At 2 hours incubation, the amount of bound ^{125}I -labeled human prolactin at

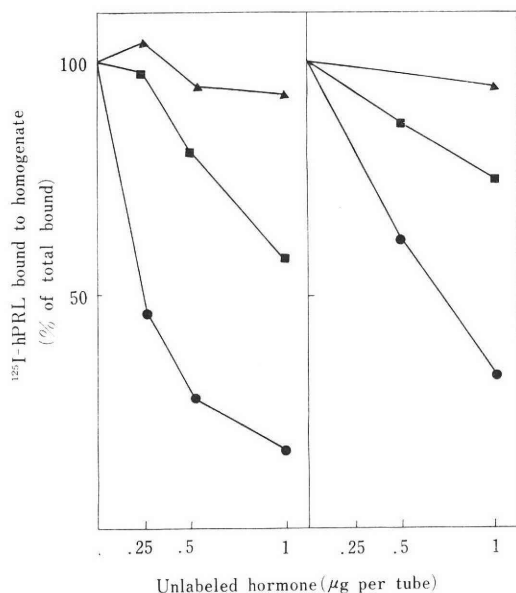


Fig. 2. Effect of various hormones on ^{125}I -hPRL binding to ovarian and uterine subcellular fractions. Hormones were incubated at various concentrations with the fractions at $37^\circ C$ for 2 h. Total bound is equivalent to ^{125}I -hPRL binding without unlabeled PRL. Left panel: whole ovaries of pseudopregnant rabbits in 15 days after intravenous injection of 200 IU hCG. The fraction contained 96 μg of protein. Right panel: pregnant uterus having fetus sized 2 cm. The fraction contained 119 μg of protein. $\bullet$: bovine PRL, $\blacksquare$: porcine growth hormone, $\blacktriangle$: hCG. Values are the means of duplicate samples.

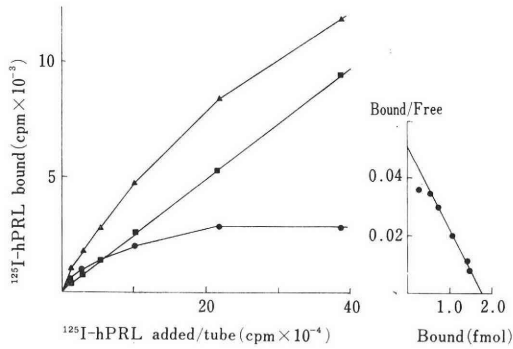


Fig. 3. Left panel: Binding of ^{125}I -hPRL to subcellular fractions of 2 whole ovaries of a pseudopregnant rabbit in 15 days after intravenous injection of 200 IU hCG. The fractions were incubated with increasing concentration of ^{125}I -hPRL at 37°C for 2 h, demonstrating total binding (Δ — Δ). Nonspecific binding ($\blacksquare$ — $\blacksquare$) was at the co-existence of unlabelled bovine prolactin. Specific binding ($\bullet$ — $\bullet$) was expressed as the difference of the bindings in each tube with and without unlabelled prolactin. Right panel: Scatchard plot analysis of the data presented in left panel. B_m (Maximal binding sites) was 15.6 fmol/mg of protein. The subcellular fractions contained 96 μg of protein.

37°C was much greater than that at 20°C . The binding at 4°C was scanty.

Specificity of binding of prolactin to ovarian and uterine preparations

Competition experiments performed with subcellular particles from whole ovaries of pseudopregnant rabbits and pregnant uterus are shown in Fig. 2. Bovine prolactin competed to a greater extent with ^{125}I -labeled human prolactin for the prolactin binding site. Porcine growth hormone was less potent. Human chorionic gonadotropin was absolutely non-competitor for the binding of prolactin.

Equilibrium analysis of the affinity of prolactin for ovarian and uterine binding sites

The specific binding of ^{125}I -labeled human prolactin to ovarian and uterine particles was a saturable process with respect to prolactin (Fig. 3, 4). The value of the dissociation

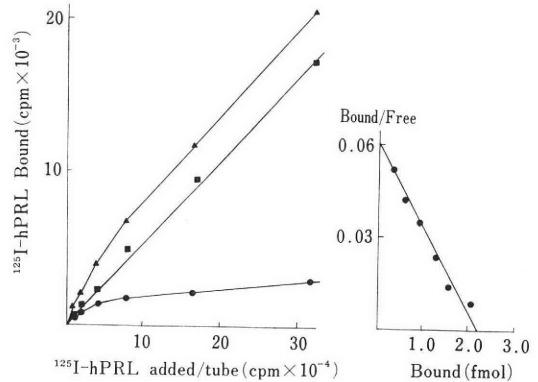


Fig. 4. Left panel: Binding of ^{125}I -hPRL to the subcellular fractions of the rabbit pregnant uterus having fruits of 2 cm length. Methods and symbol explanations are as same as those for Fig. 1. Right panel: Scatchard plot analysis of the data presented in left panel. $B_m = 13.4$ fmol/mg (the subcellular fractions contained 119 μg of protein).

constant calculated by Scatchard plot analysis of data was approximately $1.2 \times 10^{-10}\text{M}$ at 37°C either in whole ovaries of the pseudopregnant rabbits or in a corpus luteum of the pregnant rabbit having fetus of 2 cm.

Prolactin-binding activity in reproduction

The bindings of ^{125}I -labeled human prolactin to crude membrane fractions obtained from ovaries and uteri of various reproductive states were determined by the analysis described previously, and the maximal binding sites were summarized in Table 1. The specific binding of prolactin to various ovarian and uterine particles had a dissociation constant approximately of $1.2 \times 10^{-10}\text{M}$.

Discussion

This is the presentation of the occurrence of PRL receptor in the rabbit ovarian and uterine subcellular fractions. Shiu and Friese⁸⁾ demonstrated the ovary of the pregnant rabbit binds to prolactin. Prolactin receptors in the ovary have been identified in many species. However, uterine prolactin receptor was only detected in rat uterus^{1,12}. In the rabbit, mammary prolactin receptors have been characterized, where

Table 1. Prolactin binding sites of ovarian and uterine subcellular fractions in the various reproductive states.

status of rabbit		prolactin binding sites (Bm*)		
		ovary mean***		uterus mean***
immature		10.9	11.7±1.0	n.d.
		10.9		
		13.4		
mature	not treated	10.5 5.1	7.8	10.6
mature	days after hCG treatment**			
		13.5	14.9±1.6	0
		17.4		0
	5	17.6		5.2
		10.9		1.1
	10	21.2		n.d.
	15	15.6		n.d.
pregnant	fetal size 2cm	18.9****		18.1
	7cm	8.3****		2.8

Maximam binding sites were calculated by the Scatchard plot analysis. *Bm= maximal binding sites (fmol/mg) calculated by Scatchard plot analysis. Each value was obtained from either two ovaries or one didelphic uterus of one rabbit except one whole ovary containing corpora lutea (****). **intravenous (auricular vein) administration of 200 IU hCG. ***values are means±S.E.M. n.d.=not determined.

Kd value is $3.4 \times 10^{-10} \text{M}^9$ and $1.2 \sim 2.9 \times 10^{-10} \text{M}$ in a more recent report⁶). Similar result was obtained here in rabbit ovaries and uteri. These values are within the physiological concentration of prolactin frequently found in serum⁹). The ligand specificity of binding of ¹²⁵I-hPRL to rabbit ovarian and uterine homogenates was studied. This binding seemed to be specific for PRL receptor. The cross-reactivity of the growth hormone may be probably accounted for either by PRL contamination or by the similarity to aminoacid constituent to PRL. Prolactin binding sites were detected in the ovarian and uterine subcellular fractions of various reproductive states (Table 1). It is suggested that prolactin in the rabbit influences the luteal function¹⁰) via ovarian prolactin receptor, and demonstrates its biological effect on the uterus, for example, the uterine contractility⁴).

References

- 1) Asselin, J. and Labrie, F. (1978): Effects of estradiol and prolactin on steroid receptor

- levels in 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors and uterus in the rat. *J. steroid Biochem.* 9: 1079-1082.
- 2) Hunter, W. M. and Greenwood, F. C. (1962): Preparation of iodine 131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature (London)* 194: 495-496.
- 3) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- 4) Mati, J. K. G., Mugambi, M., Muriuki, P. B. and Thairu, K. (1974): Effect of prolactin on isolated rabbit myometrium. *J. Endocrinol.* 60: 379-380.
- 5) Ohono, Y., Tamaya, T., Motoyama, T., Furuta, N., Boku, S. and Okada, H. (1978): Direct effect of prolactin on rabbit uterus. *Folia Endocrinol. Jpn.* 54: 289.
- 6) Perry, H. M. and Jacobs, L. S. (1978): Rabbit mammary prolactin receptors. Demonstration of a late puerperal increase in affinity. *J. Biol. Chem.* 253: 1560-1564.
- 7) Saito, T. and Saxena, B. B. (1975): Specific receptors for prolactin in the ovary. *Acta endocrinol (Kbh)* 80: 126-137.
- 8) Scatchard, G. (1949): The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann.*

- NY. Acad. Sci. 51: 660-672.
- 9) Shiu, R. P. C. and Friesen, H. G. (1974): Properties of a prolactin receptor from the rabbit mammary gland. *Biochem. J.* 140: 301-311.
- 10) Spies, H. G., Hilliard, J. and Sawyer, C. H. (1968): Maintenance of corpora lutea and pregnancy in hypophysectomized rabbits. *Endocrinology* 83: 354-367.
- 11) Thorell, J. I. and Johansson, B. G. (1971): Enzymatic iodination of polypeptides with ^{125}I to high specific activity. *Biochim. Biophys. Acta.* 251: 363-369.
- 12) Williams, G. H., Hammond, J. M. and Weisz, J. and Mortel, R. (1978): Binding sites for lactogenic hormone in the rat uterus. *Biol. Reprod.* 18: 697-706.

ウサギ卵巣、子宮におけるプロラクチンレセプターの検索

玉舎輝彦, 大野洋介, 井出哲正,
鶴崎俊秀, 岡田弘二

(京都府立医科大学産婦人科学教室)

味がもたれ、PRL が標的組織、特に卵巣および子宮へ影響することが近年明らかとなってきた。そこでこれら組織に PRL が効果を及ぼすにはその組織への作用部位である膜レセプターが存在すると考えられるので、ウサギの卵巣子宮における PRL レセプターを検索し、特徴を明らかにし、ウサギの種々の状態においてレセプターの検索をおこなった。

h-PRL との特異的結合が卵巣子宮の $10,000 \times g$ pellet に存在し、これは 37°C で time-dependent なものであり、 37°C で 2 時間で平衡になり、この結合は 20°C や 4°C (ほとんど結合はない) の 2 時間における結合量より大きかった。この結合に対し牛 PRL は強い結合阻害を示し、また豚成長ホルモンも多少結合阻害を示した。Scatchard plot による解析により解離定数 (37°C) は約 $1.2 \times 10^{-10} \text{M}$ でほぼ一定し、最大結合部位数 (fmol/mg) は未熟ウサギ卵巣には 11.7 ± 1.0 ($n=3$)、成熟ウサギ (未処置) の卵巣では 7.8 ($n=2$)、子宮では 10.6 ($n=1$)、hCG 投与後の成熟ウサギ卵巣では 5 日目で 14.9 ± 1.6 ($n=4$)、10 日目で 21.2 ($n=1$)、15 日目で 15.6 ($n=1$)、子宮では 5 日目で 1.6 ± 1.4 ($n=4$) であり、また妊娠ウサギでは胎児長が 2 cm のとき卵巣では 18.9 ($n=1$)、子宮では 18.1 ($n=1$)、胎児長が 7 cm のとき、卵巣では 8.3 ($n=1$)、子宮では 2.8 ($n=1$) であった。

このように、ウサギにおいて PRL はそのレセプターを介して卵巣、子宮に効果を及ぼすものと考えられた。

プロラクチン (PRL) の生殖生理におよぼす影響に興

(受付: 昭和 54 年 6 月 21 日)

IN VITRO STUDY OF BOVINE AND HUMAN CORPORA LUTEA IN CELL CULTURE — WITH SPECIAL REFERENCE TO MORPHOLOGIC EVIDENCES AND THE SECRETION OF PROGESTERONE AND ESTROGEN —

Kohji YOSHIDA

Department of Obstetrics and Gynecology, Research Institute
of Balneotherapeutics, Kyushu University
(Director: Prof. T. Kadota)

Abstract: Primary cell cultures of bovine and human corpora lutea were performed in order to examine their morphologies and secretion of progesterone and estradiol-17 β in vitro. The procedures of cell dissociations and cultures using Dispase were modified techniques of Gospodarowicz, D. et al.²⁾.

Numerous lipid granules, round, vesicular nucleus with two or three rather prominent nucleoli, were seen in the cells in the presence of hCG. The superficial fine structures of those cells were characterized by mutual contacts with filopodia-like projections, small number of microvilli, and piling up tendencies. The mean progesterone production of control culture in bovine luteal cells is approximately 0.6 pg/cell/day. This is very near to the data of Gospodarowicz, D. et al.³⁾.

When hCG (varied from 5 to 50 IU/ml) were added in culture media, all mean values of progesterone productions are significantly higher than those of controls ($P < 0.001$).

However, the mean value of progesterone production at 100 IU/ml hCG concentration is significantly lower ($P < 0.001$).

On the other hand, the mean progesterone productions when prolactin concentrations varied from 0.1 to 100 ng/ml had a highly significant decrease than those of controls ($P < 0.001$).

This is the first report that, by using cell culture technique with Dispase, bovine luteal cells have a tonic dose-responsiveness between hCG and progesterone production, and have a significant decrease of progesterone production against prolactin.

The production of progesterone by human luteal cells appeared to be similar tendency to bovine luteal cells; however, the difference was not significant because of small number of samples.

Introduction

One of the difficulties in the study of hormonal responsiveness of endocrine tissue or tissue slice culture is the problem of gradient diffusion and the limited exposure of hormone sensitive cells to added tropic hormones.

In order to avoid this complication, I have adopted the primary cell culture technique of bovine and human corpora lutea. This communication describes briefly the results that they retain the biological capacity for steroid hormone production, responsiveness toward hCG and prolactin, and specific light and electron microscopic appearances.

Materials and Methods

1) Collection of luteal tissue for cell culture

Corpora lutea supuria from dairy cows of mixed breeds in estrous cycle and the human corpus luteum in menstrual cycle were used. Measurements of plasma progesterone and estradiol-17 β (E_2) and endometrial datings were also carried out in human for assessment of endocrine environment and luteal function²³⁾. Ovaries were collected as soon as possible following slaughter or operation and transported in ice-cold buffered Hanks' solution to the laboratory, where they were immediately dissected free from adventitial tissues. The dissociation of the tissue was carried out as already described²⁴⁾. Because of the variability in steroid synthetic capacities of corpora lutea from different cows, each hormone assay experiment described below was carried out with cells from single corpus luteum.

2) Preparation and the cell culture procedure of luteal tissue

Corpora lutea were dissected and minced aseptically with a scissors in the Clean Bench (Hitachi Horizontal Blower Type No. 1301).

The fragments were digested with 1,000 PU/ml bacterial neutral protease (Dispase¹²⁾) in Hanks' solution at 37°C on the magnetic stirrer for 30 minutes. Dispersed cells were calculated with trypan blue vital staining on the Burker-Turk hemocytometer under the phase contrast microscope. Cell viabilities of bovine and human luteal cell suspensions were good as about 80 percent for the total period of those experiments.

If the vital cell ratio was over 70 percent, those cells were diluted to the concentration from 1 to 100×10^4 cells/ml and transferred to Falcon tissue culture dish (No. 3001) or flask (No. 3012) or Lab-Tek four chamber slide in the incubator at 37°C in air containing 5 percent CO_2 . Observations with phase contrast microscope were performed everyday, when culture media were exchanged every one or two days. Giemsa or Sudan III fat staining preparations were made on the last culture day after 10 percent formaldehyde fixation for 30 minutes.

Monolayer cells of bovine corpora lutea

were also observed by transmission and scanning electron microscopes with the same methods as previously stated^{25,27)}.

3) Addition of stimulatory hormones and blocking agents

HCG (lot No. 46H-2H) and prolactin (lot No. J-5A) were obtained from Teikoku Hormone MFG. Co., Ltd. (Tokyo). Prolactin (J-5A) synthesized from the bovine pituitary gland was pure enough to use as a standard according to the evidences that analyses of ultraviolet absorption spectrum and disc electrophoresis demonstrated no other hypophyseal hormone contaminations¹⁵⁾.

Colcemid solution, Penicillin-Streptomycin solution, and Fungisone were all purchased from GIBCO (Grand Island, N. Y.). The last antibiotics concentrations of culture media were respectively, Penicillin-G-Sodium: 100 IU/ml, Streptomycin-Sulfate: 100 mcg/ml, and Fungisone: 10–15 mcg/ml. Tissue culture media which consisted of 10 percent fetal calf serum (GIBCO), 45 percent Leibovitz-15 medium, 45 percent F-10 medium, and approximately 0.2 percent sodium bicarbonate with antibiotics and some phenol red were prepared.

The pHs of culture media were corrected to 7.2 or some under with the digital pH meter (Model HG-3 made by Denki Kagaku Kogyo Co., Ltd., Tokyo) and the hue of phenol red.

4) Karyology of luteal cells

The seventh day culture of luteal cells proliferated by hCG (0.1 IU/ml) and fibroblast growth factor^{4,5)} (50 ng/ml) was utilized to chromosome analysis as the same technique of human lymphocyte karyotyping²²⁾. The culture medium was all exchanged for hypotonic (0.6 percent) sodium citrate solution after the 15 hour duration of colcemid (1 mcg/ml) induction synchrony. The following method of chromosome analysis was same as previously described²⁴⁾.

5) Radioimmunoassay of progesterone and E_2 in culture media

Both progesterone and E_2 were measured using highly specific radioimmunoassay kits developed in "Daiichi Radioisotope Laboratories. Ltd., Tokyo" as already described^{20,21)}.

Their contaminations of control cultures could be ignored because progesterone, E₂ and prolactin in the fetal calf serum (GIBCO) of culture media used in these experiments were all undetectable by each radioimmunoassay.

Results

1) Morphology of the luteal cells maintained in the presence and absence of hCG

Four to six hours after being seeded in tissue culture dishes, the luteal cells attached to them and spread out. Luteal cells in culture typically possessed a round, vesicular nucleus with two or three rather prominent nucleoli, and tended to take on a polygonal appearance; typical of epithelial cells in the presence of hCG (Figure-1, A, B).

In contrast, when the cells were maintained in the absence of hCG, they were elongated and tended to grow in a disorganized pattern (Figure-2).

Numerous lipid granules could be seen, in spite of absence of hCG, in the cytoplasm on Sudan III staining preparation (Figure-3).

When the cells were seeded at low density, clusters of cells displaying an epithelioid morphology were present as Gospodarowicz D. et al. described before¹⁾. Figure-4 is a scanning electron micrograph of luteal cells grown as monolayers in the presence of 10 percent fetal calf serum. The superficial fine structure of these cells has the features similar to those observed with phase contrast microscope. The appearance of piling up or mutual contacts with filopodia-like projections of those monolayer cells were found by scanning electron microscope not by light microscope. Luteal cells in monolayer culture have relatively small number of microvilli as compared with those of endometrial cells. The cytoplasm of those cells was well differentiated and has well developed agranular endoplasmic reticula, numerous lipid inclusions by transmission electron microscope as stated before²⁶⁾. Figure-5 shows human luteal cells in monolayer culture which have fusiform shaped cells, fibroblastic scattered proliferation, and low plating efficiencies. Figure-6 demonstrated the 60,XX karyotype

of bovine luteal cells. It showed the asymmetry of the 21st chromosome. These asymmetric chromosome cells were 3 from 24 karyotyped cells. There is no denying the fact that those cells in culture have a possibility to transform in vitro during long term incubation.

Gospodarowicz, D. and Bialecki, H. reported⁶⁾ that, in some cultures of bovine granulosa cells, a Robertsonian fusion was observed between chromosome 1 and 25. The karyotype of their culture remains relatively stable continuing it to proliferate beyond the 60th generation, as tetraploid cells amount to 15-25% of the total cell population, while all the other cells exhibit a chromosome number varying from 58-60.

2) The effects of hCG and prolactin on progesterone and E₂ secretion by cultured luteal cells

The correlation between hCG concentration and progesterone production of bovine and human luteal cells were found on Figure-7.

It can be seen in this Figure that bovine luteal cells produce progesterone best at 20 IU/ml hCG concentration in culture media. All mean values of progesterone productions when hCG concentrations vary from 5 to 50 IU/ml are significantly higher than those of controls indicated in Table-1, although the mean value of progesterone production at 100 IU/ml hCG concentration is significantly lower ($P < 0.001$).

The production of progesterone by human luteal cells appeared to have a similar tendency with bovine luteal cells; however, the difference did not have a meaning because of small number of samples (Figure-7).

It was thought at the time that, in bovine luteal cells, hCG receptors were all saturated over 20 IU/ml hCG concentration, and then the rest uncombined hCG would be toxic for those cells in such closed environment in vitro, so that progesterone production was reduced at the too high concentration.

As indicated in Figure-8 and Table-2, the correlation between prolactin concentration and progesterone production had not a significant dose-responsiveness; however, the mean progesterone productions when prolac-

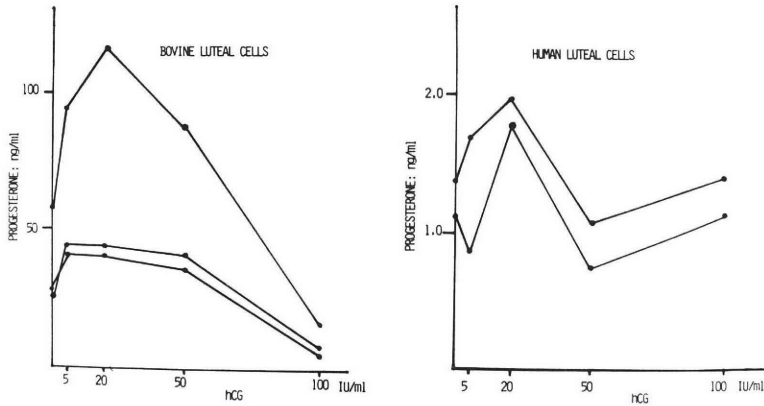


Fig. 7 Correlation between hCG concentration & progesterone production

Table 1 Correlation between hCG concentration & progesterone production in bovine luteal cells

hCG	p : Mean $\pm$ S.E. ng/ 7.5×10^4 cells/24 hrs.	
5IU/ml	59.47 $\pm$ 17.47 (n=3)	control < (P < 0.001) significant*
20 " "	67.19 $\pm$ 20.73 (n=3)	" " (P < 0.001) "
50 " "	55.38 $\pm$ 13.45 (n=3)	" " (P < 0.001) "
100 " "	10.90 $\pm$ 2.17 (n=3)	control > (P < 0.001) "
controls	44.29 $\pm$ 8.98 (n=9)	

* student's "t" test

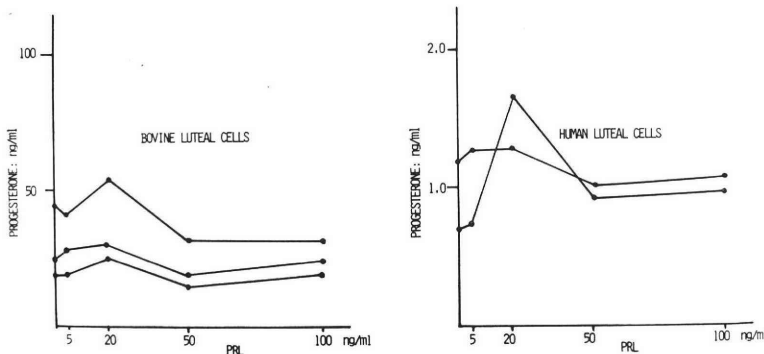


Fig. 8 Correlation between PRL concentration & progesterone production

Table 2 Correlation between prolactin concentration & progesterone production in bovine luteal cells

PRL	p : Mean S.E. ng/ 7.5×10^4 cells/24 hrs.	control >
0.1ng/ml	29.34 $\pm$ 6.36 (n=3)	P < 0.001 significant*
5 " "	29.36 $\pm$ 4.80 (n=3)	" " "
20 " "	35.46 $\pm$ 7.36 (n=3)	" " "
50 " "	21.75 $\pm$ 3.81 (n=3)	" " "
100 " "	24.98 $\pm$ 2.72 (n=3)	" " "
controls	44.29 $\pm$ 8.98 (n=9)	

* student's "t" test

Table 3 The daily decreases of progesterone & estradiol-17 β productions in bovine luteal cells in the presence or absence of hCG

(A) : in the absence of hCG

	p (Mean $\pm$ S.E.) ng/7.5 $\times$ 10 ⁴ cells/24 hrs.	E ₂ (Mean $\pm$ S.E.) pg/7.5 $\times$ 10 ⁴ cells/24 hrs.
the 1st day	80.00 $\pm$ 5.45	38.19 $\pm$ 3.09
the 2nd day	30.70 $\pm$ 5.93	31.58 $\pm$ 1.71
the 3rd day	22.15 $\pm$ 3.29	23.15 $\pm$ 2.83

(B) : in the presence of hCG

1) progesterone production : ng/7.5 $\times$ 10⁴ cells/24 hrs.

hCG (IU/ml)	0.1	5	20	50	100
the 1st day	59.49	94.36	117.95	88.18	16.21
the 2nd day	26.49	43.43	43.22	41.49	8.60
the 3rd day	28.23	40.61	40.40	36.27	7.90

2) estradiol-17 β production : pg/7.5 $\times$ 10⁴ cells/24 hrs.

hCG (IU/ml)	0.1	5	20	50	100
the 1st day	41.54	52.44	45.97	34.05	43.92
the 2nd day	24.10	11.38	10.71	14.73	30.12
the 3rd day	21.42	16.06	9.37	16.06	20.75

tin concentrations varied from 0.1 to 100 ng/ml had a highly significant decrease than those of controls applied with student's "t" tests ($P < 0.001$).

It was made clear in Table-3 that progesterone and E₂ produced by bovine luteal cells daily decreased irrespective of presence or absence of hCG. But human luteal cells did not show the significant decrease as those of bovine luteal cells. The hormonal data of human luteal cells will be sure to express in detail at another paper. Neither bovine nor human luteal cells manifest the significant dose-responsiveness between E₂ production and hCG and/or prolactin concentration. In bovine luteal cells, as also discussed at the last paragraph, sum total stimulations of both 5 ng/ml prolactin and 5 IU/ml hCG made progesterone best of each condition with single tropic hormone²⁷⁾. The moderate combination of hCG and prolactin seemed to be the best stimulation for cultured luteal cells.

Discussion

There have been many reports of short term incubation of corpora lutea in human or animals^{7,10,11)}, but there exist few reports of them used cell culture technique. It is said that experiments of short term incubation of sliced or dispersed corpora lutea have great differences from those in vivo.

Firstly, in those of sliced or dispersed corpora lutea, cell viabilities were always neglected. In this point, cell culture technique has an advantageous merit because of their viability in vitro which can be seen by phase contrast microscope.

Secondly, as stated in the introduction, it was almost ignored that there are problems of gradient diffusion and limited exposure of hormone sensitive cells to added tropic hormones. The addition of them to culture media on monolayered dishes was ideally homogeneous in the respect.

Thirdly, the secretion of sex steroid hormone from those short term conditions, it did not seem to be a production of hormones,

but seemed to be merely a release of cytoplasmic stored steroid¹⁴⁾. Cell cultures were more similar to the condition in vivo than those of short term incubation systems, though experiments have many technical difficulties. In the meanwhile, Papaionannou and Gospodarowicz¹⁶⁾ (1975) showed that bovine luteal cells by treatment of proteolytic enzymes (e.g. collagenase, trypsin) retain the kinetic characteristics of the binding of hCG to the receptor sites. After the treatment with Dispase, they have also maintained the capacities of progesterone production and responsiveness to hCG for about a week as showed in the result of this paper.

Of course, Gospodarowicz, D. et al. already reported²⁾ the technique for the isolation of bovine luteal cells and its application to metabolic sites of them. In that paper, they stated that the proteolytic enzymes which they used were, collagenase, hyaluronidase, trypsin and DNase, and the viability after the treatment of them was over 90 % with trypan blue exclusion test, and those cells were sensitive to LH. Lemon, M. et al. reported⁹⁾ the steroid release in vitro by two luteal cell types in the corpus luteum of the pregnant sow. The method of enzymatic cell dissociation was same as Gospodarowicz, D. et al.²⁾. They noticed that there were two cell types: one, large cells, probably derived from granulosa lutein cells, the other small cells, from theca lutein cells. In bovine luteal cells, this phenomenon is not clear at this time. Simmons, K. R. et al. also showed¹⁹⁾ a single method for preparing suspensions of ovine luteal cells using a crude collagenase. Those of ewes synthesized progesterone and responded to the addition of LH or hCG, but not prolactin.

The mean progesterone production of control culture in bovine luteal cells in my experiment, is approximately 0.6 pg/cell/day; however, Gospodarowicz, D. et al. reported³⁾ that it was 3 pg/cell/day in the same condition. Both data are very near in spite of discrepancies between methods of progesterone assays; namely, my data were obtained by radioimmunoassay, when theirs by competitive protein binding assay.

On the other hand, this is the first report that, by using the cell culture technique,

bovine luteal cells have an arc shaped, namely tonic inhibitory dose-response curve between hCG and progesterone production, and have a significant decrease of progesterone production against the prolactin which is varying from 0.1 to 100 ng/ml. As for prolactin, in human granulosa cells in culture, McNatty, K. P. et al. reported¹³⁾ that the production of progesterone in vitro requires low physiological concentrations of the hormone whereas high concentrations are inhibitory. In human or bovine luteal cells in culture, prolactin may have the similar activities owing to the result of this paper.

It should be recognized⁸⁾ that the cow differs from primates and rodents in at least two important respects. The ovaries of cow and other large domestic animals all lack the relatively large amount of steroid secreting interstitial tissue so prominent in the ovaries of rodents. In addition, the cow differs from primates in that the presence of the uterus is required for normal regression of the corpus luteum. Hysterectomy greatly prolong the life span of the cyclic corpus luteum and thus causes prolonged anestrus in the cow. In primates, hysterectomy does not prolong corpus luteum function, and the influence of prostaglandin $F_2\alpha$ on the corpus luteum would appear to be negligible¹⁷⁾. However, in man, high amounts of prolactin inhibit progesterone secretion by granulosa cells in culture¹³⁾, and ergocriptine has been used to suppress prolactin levels in patients with galactorrhea associated amenorrhea. LH or hCG and prolactin are established as to important intrinsic factors controlling the formation and function of the young corpus luteum, but the part played by other known luteotropic substances which now include various steroids, prostaglandins, etc., remains conjectural.

Saito, T. and Saxen, B. B. reported¹⁸⁾ the presence of specific prolactin receptors in ovarian tissues of rat, cow, and human. They said that it was likely that estrogen plays a role in the regulation of prolactin secretion and prolactin binding at the ovarian level. It is full of interests to the author that too high concentrations of hCG paradoxically reduce the progesterone production in bovine luteal cells in culture, and sum

total stimulation of both moderate hCG and prolactin seems to be best as the luteotropic condition. Therefore, it is tempting to speculate that an early pregnant state when a corpus luteum verum is stimulated by prolactin, hCG, and other unknown placental hormones would have a key to elucidate the mechanism of the luteal function. Further experiments designed to examine this speculation are now in progress.

Presented before the 31st Annual Scientific Meeting of Japan Society of Obstetrics and Gynecology, Tokyo, April 4, 1979.

Acknowledgement

Grateful acknowledgement is made to Professor T. Kadota for his constant interest and guidance in this study.

References

- 1) Gospodarowicz, D., Gospodarowicz, F.: Bovine luteal cells in tissue culture, *Exp. Cell Res.* 75: 353-362, 1972.
- 2) Gospodarowicz, D., Gospodarowicz, F.: A technique for the isolation of bovine luteal cells and its application to metabolic sites of luteal cells in vitro, *Endocrinol.* 90: 1427-1434, 1972.
- 3) Gospodarowicz, D., Gospodarowicz, F.: The morphological transformation and inhibition of growth of bovine luteal cells in tissue culture induced by luteinizing hormone and dibutyl cyclic AMP, *Endocrinol.* 96: 458-467, 1975.
- 4) Gospodarowicz, D., Ill, C. R., Birdwell, C. R.: Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro, I. characterization of the response of granulosa cells to FGF and EGF, *Endocrinol.* 100: 1108-1120, 1977.
- 5) Gospodarowicz, D., Ill, C. R., Birdwell, C. R.: Effects of fibroblast and epidermal growth factors on ovarian cell proliferation in vitro, II. proliferative response of luteal cells to FGF but not EGF, *Endocrinol.* 100: 1121-1128, 1977.
- 6) Gospodarowicz, D., Bialecki, H.: The effects of the epidermal and fibroblast growth factors on the replicative life span of cultured bovine granulosa cells, *Endocrinol.* 103: 854-865, 1978.
- 7) Hansel, W.: Survival and gonadotropin responsiveness of luteal cells in vitro, in "Karolinska Symposia on Research Methods in Reproductive Endocrinology. 3rd Symposium, in vitro Methods in Reproductive Cell Biology" (E. Diczfalussy, ed.): page 295-317, 1971.
- 8) Hansel, W., Concannon, P. W., Lukaszewska, J. H.: Corpora lutea of the large domestic animals, *Biol. Reprod.* 8: 222-245, 1973.
- 9) Lemon, M., Loir, M.: Steroid release in vitro by two luteal cell types in the corpus luteum of the pregnant sow, *J. Endocrinol.* 72: 351-359, 1977.
- 10) Ling, W. Y., Marsh, J. M.: Reevaluation of the role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and protein kinase in the stimulation of steroidogenesis by luteinizing hormone in bovine corpus luteum slices, *Endocrinol.* 100: 1571-1578, 1977.
- 11) Mason, M. R., Savard, K.: Specificity of gonadotropin stimulation of progesterone synthesis in bovine corpus luteum in vitro, *Endocrinol.* 74: 664-668, 1964.
- 12) Matsumura, T., Yamanaka, T., Hashizume, S., Irie, Y. and Nitta, K.: Tissue dispersion, cell harvest and fluid suspension culture by the use of bacterial neutral protease. *Japan. J. Exp. Med.* 45: 377-382, 1975.
- 13) McNatty, K. P., Sawers, R. S., McNeilly, A. S.: A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle, *Nature.* 250: 653-655, 1974.
- 14) Nakashima, S.: Effects of human chorionic gonadotropin on cyclic AMP accumulation and steroidogenesis in human corpora lutea, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 31: 178-186, 1979. (in Japanese)
- 15) Ogano, A.: The standard of prolactin: J-5A, with special reference to the analysis of its purity by the ultraviolet absorption spectrum and disc electrophoresis, Personal Communication from Teikoku Hormone MFG. Co., Ltd.: unpublished, 1979.
- 16) Papaionannou, S., Gospodarowicz, D.: Comparison of the binding of human chorionic gonadotropin to isolated bovine luteal cells and bovine luteal plasma membranes, *Endocrinol.* 97: 114-124, 1975.
- 17) Robinson, J. S., Challis, J. R. G., Furr, B. J. A., Louis, T. M., Thorburn, G. D.: Is the sheep corpus luteum subject to tonic inhibition during the luteal phase of the estrous cycle?, *Europ. J. Obstet. Gynec. Reprod. Biol.* 6/4: 191-199, 1976.
- 18) Saito, T., Saxena, B. B.: Specific receptors for prolactin in the ovary, *Acta Endocrinol.* 80: 126-137, 1975.
- 19) Simmonds, K. R., Caffrey, J. L., Phillips,

- J. L., Abel, J. H. Jr. Niswender, G. D.: A single method for preparing suspensions of luteal cells, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149: 366-371, 1976.
- 20) Utsunomiya, T., Kajiwar, K., Tateyama, H., Kadota, T.: The basic investigation of ^{125}I -progesterone radioimmunoassay kit and its clinical applications, *Jap. J. Clin. Endocrinol.* 25: 569-575, 1977. (in Japanese)
- 21) Utsunomiya, T., Tateyama, H., Yamaguchi, S., Kajiwar, K., Kadota, T.: The basic investigation of ^{125}I -estradiol radioimmunoassay kit and its clinical applications, *Jap. J. Clin. Endocrinol.* 25: 1131-1136, 1977. (in Japanese)
- 22) Yoshida, K., Tateyama, H., Utsunomiya, T., Yamaguchi, S., Kajiwar, K., Kadota, T.: Endocrinologic aspects with the patient of Turner's syndrome, *Bul. Inst. Balneother.* 26: 65-73, 1977. (in Japanese)
- 23) Yoshida, K., Kajiwar, K., Tateyama, H., Utsunomiya, T., Kadota, T.: Correlation of endometrial dating and plasma sex steroids, Abstracts of 6th Asia and Oceania Congress of Endocrinology: page 198-199, 1978.
- 24) Yoshida, K., Okuma, S., Adachi, N., Katagiri, H., Kadota, T.: Tissue culture of human ovarian cells, *Bul. Inst. Balneother.* 30: 15-20, 1978.
- 25) Yoshida, K., Katagiri, H., Utsunomiya, T., Yamaguchi, S., Adachi, N., Kadota, T.: Tissue culture of ovarian follicular and luteal cells, *Bul. Inst. Balneother.* 30: 139-151, 1978. (in Japanese)
- 26) Yoshida, K., Adachi, N., Katagiri, H.: Tissue culture of bovine luteal cells with special reference to the observation by scanning electron microscope, *Bul. Inst. Balneother.* 30: 199-205, 1979. (in Japanese)
- 27) Yoshida, K., Katagiri, H., Utsunomiya, T., Yamaguchi, S., Kadota, T.: Effects of hCG and prolactin on cultured bovine and human luteal cells, *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 31: 2030, 1979.

細胞培養法による牛及びヒト黄体の in vitro に於ける研究

吉 田 耕 治

九州大学温泉治療学研究所産婦人科
(主任: 門田 徹教授)

牛及びヒトの黄体細胞の初代培養を行い、それらの in vitro に於ける progesterone(p) や estradiol- 17β (E_2) の産生, hCG や prolactin に対する反応を検討した。黄体を蛋白分解酵素 (Dispase) で消化させ、初代単層培養する方法は Gospodarowicz, D. et al.²⁾ の方法を一部改変して行つた。牛黄体細胞は、hCG 存在下では、多数の脂肪滴、丸い囊胞状の核とその中の 2~3 個の明らかな核小体を有していた。走査電子顕微鏡による表面微細構造は、少数の microvilli と、細胞相互間の filopodia 様構造による連絡などが特徴的所見であつた。初代培養 1 週間目までの one point で培地に産生された p 量は radioimmunoassay で測定して 0.6 pg/cell/day と、Gospodarowicz, D. et al.³⁾ の CPBA 法で測定した値とよく近似していた。培地に hCG を 5-50 IU/ml の間で添加した時、p 産生は対照群より有意に ($P < 0.001$) 高かつたが 100 IU/ml の高濃度では p 産生は対照より低下した。一方培地中に prolactin が 0.1-100 ng/ml の間で添加された時 p 産生は対照群より抑制された。 E_2 産生と hCG, prolactin 濃度との間では p 産生ほどの有意な相関は認められなかつた。

牛黄体細胞を Dispase で分解して初代培養した in vitro 系で hCG と p 産生間に tonic な刺激・抑制関係があり、prolactin は p 産生に抑制的に作用することを明らかにしたのは本論文が嚆矢である。ヒト黄体細胞でも牛のそれと類似の傾向を認めたが有意なものではなかつた。黄体の in vitro 研究は、従来から short term incubation 実験が多いが、それには、細胞の生存性や均質性に対する配慮が欠けている点、また slice を用いるものでは添加された種々のホルモンが必ずしも一様に細胞に浸透しない点、最後に最も本質的な難点として、媒質中へのホルモン分泌が単に細胞内に蓄積されていたホルモンの放出に過ぎずホルモンの産生ではないのではないかといつた欠点が多い。細胞培養法はこれに比してより in vivo に近い点で有利であるといえる。

(本論文の要旨は 1979 年 4 月の第 31 回日本産科婦人科学会総会に於いて発表した。)

(受付: 昭和 54 年 9 月 11 日)

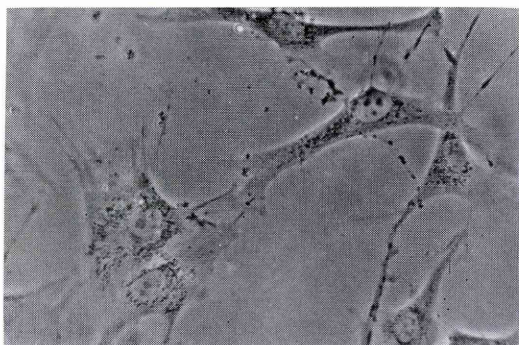
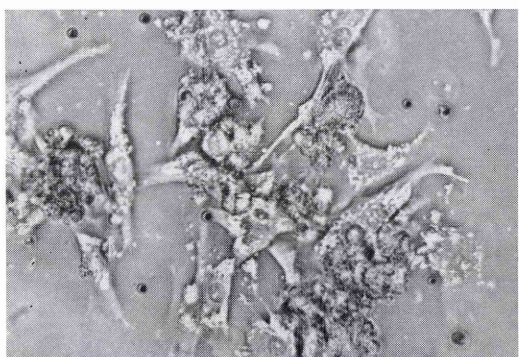


Fig. 1 Bovine luteal cells in culture in the presence of hCG.

(A): high power view; luteal cells possessed a round, vesicular nucleus with two or three rather prominent nucleoli.



(B): low power view; they tended to take on a polygonal appearance, typical of epithelioid cells.

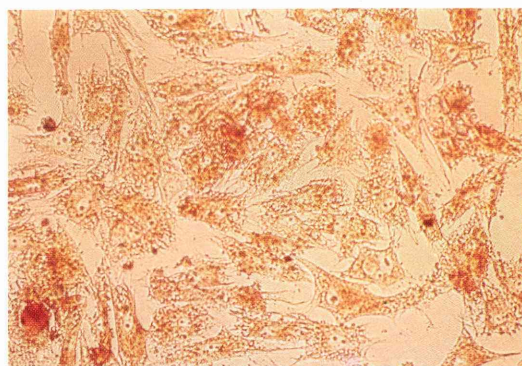
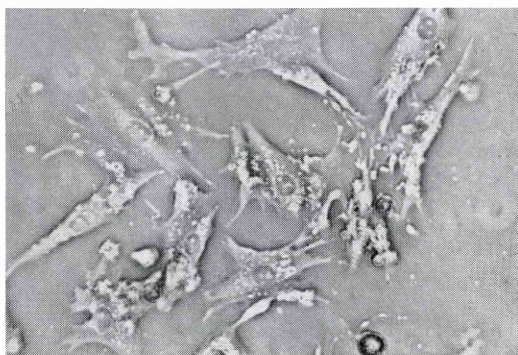


Fig. 3 Bovine luteal cells in culture in the absence of hCG; numerous lipid granules could be seen in the cytoplasm on the Sudan III staining preparation.

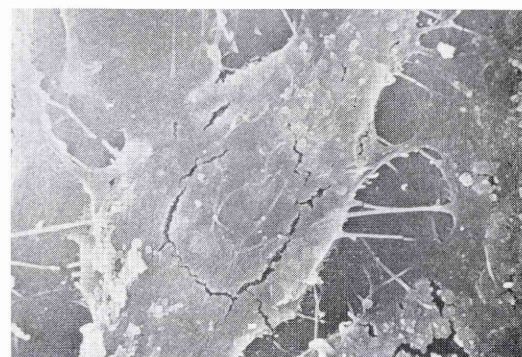


Fig. 4 A scanning electron micrograph of bovine luteal cells grown as monolayers in the presence of 10 percent fetal calf serum. Small number of microvilli and cellular mutual contacts with filopodia-like projections were found.



Fig. 2 Bovine luteal cells in culture in the absence of hCG; they were elongated and tended to grow in a disorganized pattern.

Fig. 5 The colony of human luteal cells in culture; it has fusiform shaped cells, fibroblastic scattered proliferation, and low plating efficiencies. Giemsa staining.

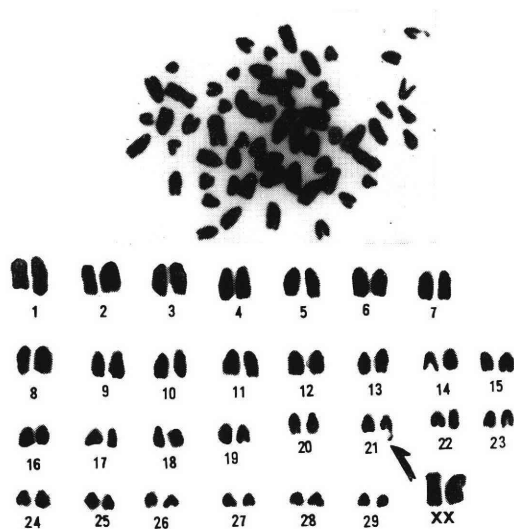


Fig. 6 The 60,XX karyotype of bovine luteal cell; the asymmetry of the 21st chromosome was shown. Its details were seen in the body of this paper.

LH- α , β subunit の Radioimmunoassay

による妊娠時の下垂体前葉機能の研究

Study on Anterior-Pituitary Function during Pregnancy
by Radioimmunoassay of LH α , β subunits

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

横 倉 恒 雄

Tsuneo YOKOKURA

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

妊娠時の下垂体前葉の機能を臨床、基礎両面より検討する目的で、① human LH- α , β subunit, ② rat LH, rat LH- β subunit の動態を分析した。対象は年齢19~34歳、性周期27~30日型の正常妊婦128例および正常非妊婦人74例で、基礎実験では SD 系妊娠ラットを用いた。ホルモン測定は米国 NIAMDD より提供された各ホルモンを Chloramine T 法により放射性ヨードで標識し、通常の二重抗体法により測定した。各抗血清の特異性を検討した後のヒト妊娠時の妊娠6~40週の hLH- β の測定値は 9.82~14.55 ng/ml serum, hLH- α は 16.87~26.98 ng/ml serum, 正常非妊婦人の hLH- β は 246.25~632.71 ng/ml serum であった。ラット妊娠モデルの妊娠4~23日の rLH の測定値は 30~160 ng/ml serum, rLH- β は 8~11 ng/ml serum であった。一方ラット妊娠モデルに LH-RF 1 μ g 負荷し、負荷後の rLH- β の上昇は妊娠前半で 4.4~4.5 ng/ml serum, 後半では 1.2 ng/ml serum の上昇がみられた。

以上の研究結果により妊娠時において下垂体前葉の機能とくに gonadotropin の放出が抑制されていることが観察された。

緒 言

妊娠時における内分泌機能の中枢とくに脳下垂体の機能は、下垂体前葉 gonadotropin と胎盤の絨毛性 gonadotropin の化学構造が類似し、免疫学的交叉性を示すためにホルモン測定による解明が困難とされてきた。しかし近年各ホルモンの subunit の研究が進むにつれ、各 gonadotropin 間において化学構造が類似する α subunit と、ホルモン特異性を示す β subunit の存在が認められてきた。すなわち Papkoff (1967)¹⁾らにより羊および牛の黄体化ホルモン (LH) の α および β subunit が得られ、さらに Hartree (1971)²⁾, Closset (1975)³⁾らによりヒト LH- α , β subunit (hLH- α , β subunit) を得るにいたった。また Vandalem (1975)⁴⁾, Hagen (1975)⁵⁾, Loeber (1978)⁶⁾らにより LH- β

subunit の radioimmunoassay が開発された。一方 Vaitukaitis (1972)¹⁰⁾, Ashitaka (1974)¹¹⁾, 牧野 (1975)¹²⁾らにより hCG- β subunit の radioimmunoassay が開発あるいは測定され、妊娠時における各 gonadotropin が特異的に測定されるようになった。しかしヒト妊娠初期より産褥期にいたる全経過の下垂体 LH を統計的に充分処理しうる多数の対象を一貫して観察した報告は少ない。一方 Smith (1954)¹³⁾により妊娠時の赤毛猿より下垂体を摘出した報告によると、下垂体摘出後も妊娠を継続し分娩したと報告されており、妊娠時における下垂体の役割を今一度検討することは意義あるものと思われる。本研究はヒト妊娠時において妊娠6週より産褥期まで、さらに正常性周期を hLH- β subunit および α subunit の radioimmunoassay にて血中 LH を測定し、あわせてラット妊娠モデルを対象に

LH-RF を負荷させラット妊娠時の下垂体予備能を検討し、妊娠時における下垂体前葉の機能をヒトおよびラットにて検討した。

研究対象および方法

1) hLH- β subunit, hLH- α subunit

対象は慶応義塾大学病院および群馬県太田総合病院の産婦人科外来を訪れた年齢19~34歳、性周期27~30日型を有した正常妊婦128例、その後正常分娩した褥婦21例および挙児希望で通院し、婦人科的疾患のない正常婦人74例である。原則として採血は1名1回に限ったが、一部の妊婦については2回または分娩後に1回採血した。全資料は採血後速やかに遠沈し血清を分離し、 -20°C に保存した。

放射性ヨードの標識: hLH- β subunit および hLH- α subunit, またそれらの抗血清は米国 NIH の NIAMDD より提供を受けた radioimmunoassay kit を使用した。放射性ヨードの標識は Chloramine T 法 (Greenwood et al, 1963)¹⁴⁾の一部変法を用いた (図1)。すなわち

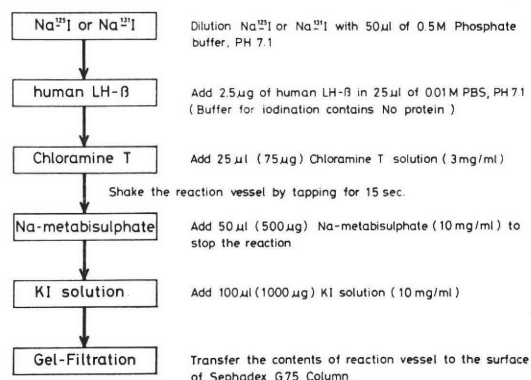


図1 Chloramine T 法による hLH- β subunit への放射性ヨードの標識の方法。

Chloramine T 25 μ l (75 μ g) を15秒間作用

0.5M 磷酸緩衝液 (pH 7.1) 50 μ l 中にて Na-¹²⁵I または Na-¹³¹I 1 mCi を用い hLH- β subunit 2.5 μ g に Chloramine T 25 μ l (0.01 M 磷酸緩衝液 3 mg/ml) を15~30秒間作用させ、Na-metabisulphate 50 μ l (0.01M 磷酸緩衝液 10mg/ml) にて反応を停止させ KI 溶液を100 μ l (0.01M 磷酸緩衝液 10mg/ml) を添加した。標識したホルモンは直ちに Sephadex G75 の Column (0.8 $\times$ 10cm) にて organic と inorganic fraction に分離し、fraction tube No. 7 を測定に使用した (図2)。

抗体の力価の検討: 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.1, 1 %ゼラチンを含む) を使用し、抗 hLH- β subunit 血清

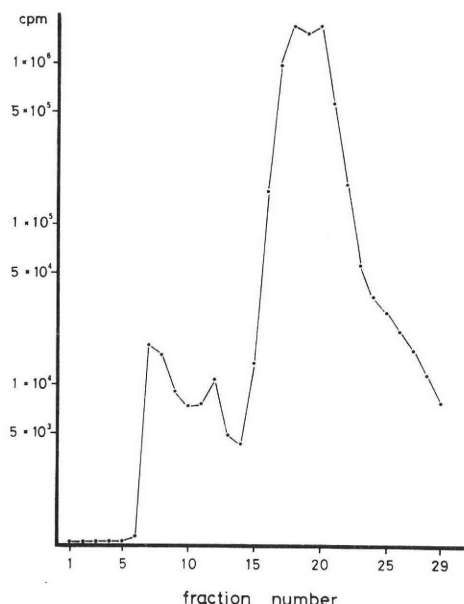


図2 Sephadex G 75 の column による標識ホルモンの分離 (column size 0.8 $\times$ 10cm) fraction tube No. 7 を標識ホルモンとして使用

を 1 : 5000, 1 : 10000, 1 : 20000, 1 : 50000, 1 : 100000 の各濃度に希釈し各試験管に200 μ l を加え、標識したホルモンを100 μ l (10000cpm/tube) および EDTA 100 μ l (1 % NRS を含む) とともに24~48時間4 $^{\circ}\text{C}$ で incubation をした後、過剰の羊抗家兎 γ -グロブリン (群大、若林克己博士提供) を加えた。

抗体の特異性の検討: 抗 hLH- β subunit 血清を 1 : 10000 に希釈し各試験管に200 μ l を加え、hLH- β subunit, hCG- β subunit, hLH- α subunit, LER 907 の各ホルモンを0.1~500ng 用いて用量曲線を表わした。

抗体と hCG の結合能: 1 : 10000 に希釈した抗 hLH- β subunit 血清に hCG 0.1, 1.0, 10, 50, 100, 300IU の各濃度を加え、いかなる量で結合能が平衡に達するかをみた。

radioimmunoassay の実際: 0.01M 磷酸緩衝液 (pH 7.1, 1 %ゼラチンを含む) を使用し、hLH- β subunit および抗 hLH- β subunit 血清を用い、通常の二重抗体法により測定した。すなわち 1 : 10000 に希釈した抗 hLH- β subunit 血清を各試験管に200 μ l を加え全試験管に hCG 5IU を添加し反応させた後に標準の hLH- β subunit を0.1~300ng 加え標準曲線とした。標識したホルモン100 μ l (10000cpm/tube) および0.05M EDTA (1 % NRS を含む) を加え4日間4 $^{\circ}\text{C}$ にて incubation をした後、過剰の羊抗家兎 γ -グロブリンを加え遊離の

hLH- β subunit を除いた。資料中の hLH- β subunit は ng/ml serum で表わした。

hLH- α subunit も hLH- β subunit と同様に Chloramine T 法により標識し、抗体の特異性を hCG- β subunit, hLH- β subunit, LER 907 と検討したうえで、二重抗体法により radioimmunoassay にて測定した。資料中の hLH- α subunit は ng/ml serum で表わした。

2) rLH, rLH- β subunit

妊娠時の下垂体前葉の視床下部放出因子 (LH-RF) に対する反応を以下の実験動物により行つた。80~100 日齢の Sprague-Dawley 系成熟雌ラットを室温 23°C, 照明時間 5:00~19:00 時にコントロールし、発情期に交尾させ精子が腔内に認められた日を妊娠第 1 日目 (Day 1) とした。1 μ g の LH-RF (三共製薬株式会社) をラット妊娠モデルの妊娠前半の 4 日目 (7 例), 8 日目 (7 例) および妊娠後半の 17 日目 (6 例), 20 日目 (6 例) の 4 群に静注し、静注前および静注後 30 分に血液を採取した。対照群として他のラット妊娠モデルの妊娠 4 日目より分娩にいたる毎日採血し、採血後直ちに遠沈し -20°C に凍結保存した。

標識および測定: ラット LH (rLH) (NIAMDD rat LH 1-3) およびラット LH- β subunit (rLH- β subunit) は米国 NIH の NIAMDD より提供された radioimmunoassay kit を用い、Greenwood et al (1963)¹⁴⁾ の一部変法による Chloramine T 法により、1.0~1.5 mCi の Na-¹²⁵I を 2 μ g の rLH および rLH- β subunit に標識した。Chloramine T の作用時間は 15~20 秒間とし、標識したホルモンは直ちに Sephadex G75 の Column (0.8×10cm) に通した。実際の測定は 4 日間 4°C にて incubation をした後、過剰の羊抗家兔 γ -グロブリンを加え通常の二重抗体法によつた。資料中の rLH および rLH- β subunit は ng/ml serum で表わした。

研究結果

1) hLH- β subunit, hLH- α subunit

hLH- β subunit の放射性ヨードの標識において、Chloramine T の作用時間が 15 秒間では B/T が 70.08 %, 20 秒間では 43.50 %, 30 秒間では 19.23 % であり、以後 Chloramine T は 15 秒間作用させることにより hLH- β subunit に放射性ヨードを標識した。抗 hLH- β subunit 血清の力価は 1:5000 では B/T が 22.77 %, 1:10000 では 21.31 %, 1:20000 では 18.12 %, 1:50000 では 15.87 %, 1:100000 では 9.93 % であり、以下抗 hLH- β subunit 血清は 1:10000 に希釈したものを使用

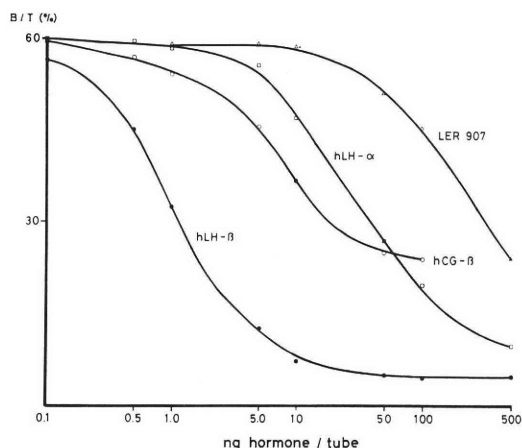


図 3 抗 hLH- β subunit 血清の特異性。
hLH- β subunit との反応を 100% とすると
hCG- β subunit との交叉反応率は 7.9%

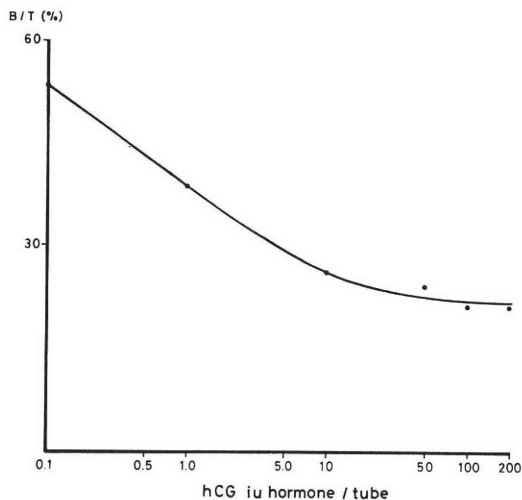


図 4 抗 hLH- β subunit 血清 (1:10000) の
hCG 添加による結合能の変化。
hCG 5IU 以上の濃度では結合能は平衡
に達する

した。抗 hLH- β subunit 血清の特異性は図 3 の如く抗 hLH- β subunit 血清と hLH- β subunit の反応率を 100 % とすると hCG- β subunit とは 7.9 %, hLH- α subunit とは 3.4 %, LER 907 とは 0.41 % の交叉反応率を示した。図 4 には抗 hLH- β subunit 血清と hCG との結合能の変化を示した。hCG 5IU 以上の濃度ではほぼ直線的な結合能の変化が得られた。図 5 および 6 には hLH- β subunit の radioimmunoassay の標準曲線を示した。図 5 は測定前に全試験管内において抗 hLH- β subunit 血清に hCG 5IU を吸収させた際の標準曲線であり、B/T は 26.63~4.56 % の間にあり、0.5~100ng

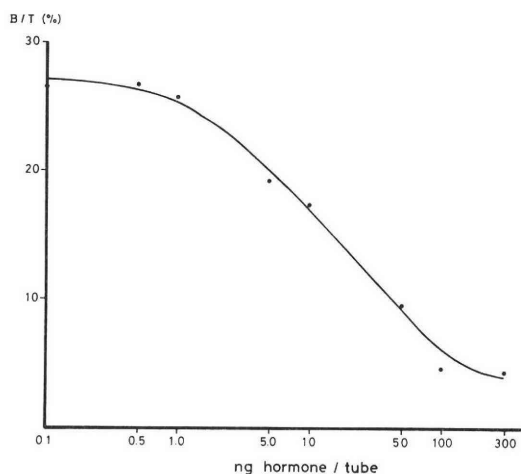


図5 hLH- β subunit の radioimmunoassay における標準曲線。
抗 hLH- β subunit 血清に hCG 5IU を吸収させ使用

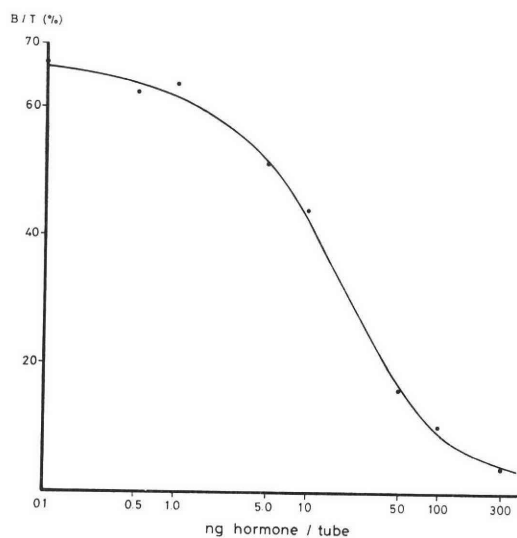


図6 hLH- β subunit の radioimmunoassay における標準曲線。
hCG 非添加の抗血清を使用

表1 ヒト妊娠時(妊娠6~40週)における血清 hLH- β subunit の変動。
抗 hLH- β subunit 血清に hCG 5IU を吸収させ使用

weeks of pregnancy	No. of Samples	serum hLH- β levels mean $\pm$ SE.(ng/ml serum)
6 ~ 10	16	14.41 $\pm$ 2.58
11 ~ 15	30	9.82 $\pm$ 1.70
16 ~ 20	10	10.05 $\pm$ 2.78
21 ~ 25	8	10.54 $\pm$ 2.56
26 ~ 30	11	14.55 $\pm$ 3.58
31 ~ 35	34	12.96 $\pm$ 2.50
36 ~ 40	19	10.86 $\pm$ 1.63

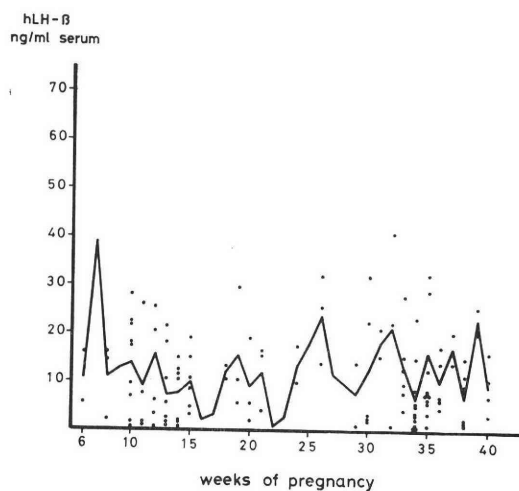


図7 妊娠中の hLH- β subunit の変動

表2 ヒト妊娠時(妊娠6~40週)における血清 hLH- β subunit の変動。
hCG 非添加の抗血清を使用

weeks of pregnancy	No. of Samples	serum hLH- β levels mean $\pm$ S.E. (ng/ml serum)
6 ~ 10	8	370.00 $\pm$ 56.19
11 ~ 15	10	482.00 $\pm$ 113.59
16 ~ 20	9	598.22 $\pm$ 98.34
21 ~ 25	10	427.60 $\pm$ 71.31
26 ~ 30	10	902.00 $\pm$ 107.93
31 ~ 35	9	780.00 $\pm$ 85.70
36 ~ 40	10	491.20 $\pm$ 117.00

の hLH- β subunit の間で直線的用量曲線が得られた。一方図6は hCG 非添加の抗血清を使用した標準曲線であり、B/T は67.04~3.96%の間にあり、0.5~100ngの間で直線的用量曲線を得た。図5および6の測定系によるヒト妊娠時の母体末梢血中 LH を表1、図7および表2に示した。妊娠6週より40週までの5週毎の平均値は抗血清に hCG を添加させた図5の測定系では表1の如く妊娠前半(妊娠6~15週)では9.82~14.41ng/ml serum 妊娠中期(妊娠16~30週)では10.05~14.55ng/ml

表 3 ヒト産褥期の血清 hLH-β subunit の測定値. 抗 hLH-β subunit 血清に hCG 5IU を吸収させ使用

days of postpartum	No. of samples	serum hLH-β levels mean±S.E.(ng/ml serum)
1 ~ 5	13	13.94 ± 1.21
29 ~ 33	6	6.90 ± 1.58
40 ~ 44	2	13.60 ± 3.40

表 4 正常非妊婦人の性周期における血清 hLH-β subunit の動態.
hLH-β subunit は妊娠時に比べ高値を示す

days of menstrual cycle	No. of Samples	serum hLH-β levels mean ± S.E. (ng/ml serum)
1 ~ 4	8	296.25 ± 79.44
5 ~ 8	11	414.45 ± 81.18
9 ~ 12	14	517.86 ± 81.10
13 ~ 16	21	632.71 ± 75.09
17 ~ 20	0	
21 ~ 24	12	246.25 ± 52.75
25 ~ 28	8	277.00 ± 90.82

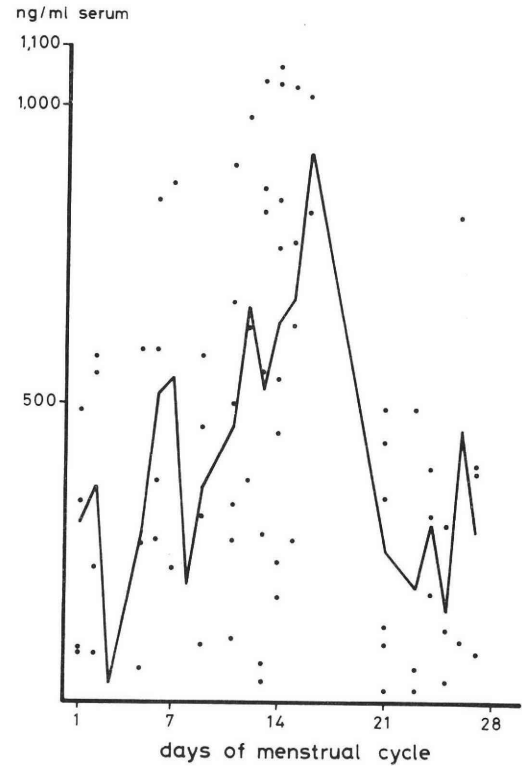


図 8 性周期における hLH-β subunit の動態

serum, 妊娠後半(妊娠31~40週)では10.86~12.96ng/ml serum であり, 妊娠全期間を通じて有意なピークは認めれず, かつ低値を示した. 一方 hCG 非添加の抗血清を用いた図6の測定系では表2の如く妊娠前半(妊娠6~15週)では370.00~482.00ng/ml serum, 妊娠中期(妊娠16~30週)では427.60~902.00 ng/ml serum, 妊娠後半(妊娠31~40週)では491.20~780.00ng/ml serum であり高値であつた. 表3は褥婦末梢血中 LH を図5の測定系で測定した結果である. 分娩後1~5日では13.94ng/ml serum, 29~33日では6.90ng/ml serum, 40~44日では13.60ng/ml serum とヒト妊娠時母体末梢血中 LH と同様低値を示した. 一方非妊時における末梢血中 LH を図5の測定系で測定すると表4, 図8の如く卵胞期では296.25~517.86 ng/ml serum, 排卵期では632.71ng/ml serum, 黄体期では246.25~277.00ng/ml serum と高値を示した.

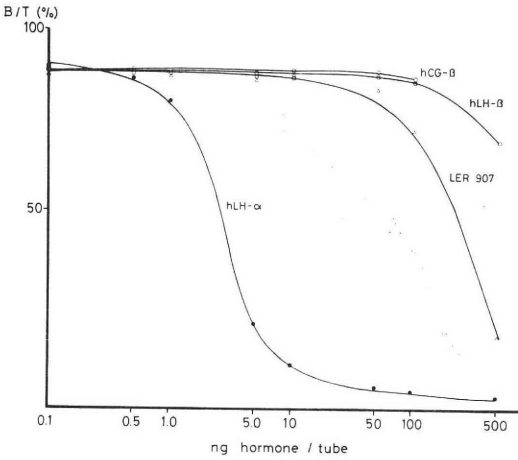


図 9 抗 hLH-α subunit 血清 (1 : 10000) の特異性.
hLH-α subunit との反応を100%とすると LER 907との交叉反応率は1.11%

図9には抗 hLH-α subunit 血清の特異性を示した. 抗 hLH-α subunit 血清と hLH-α subunit の反応率を100%とすると LER 907 とは1.11%, hLH-β subunit とは0.33%の交叉反応率を示し, hCG-β subunit とはほとんど交叉性を示さなかつた. hLH-β subunit と同様に正常妊婦末梢血中 LH を hLH-α subunit の radio-immunoassay にて測定した結果は表5の如く妊娠6~40週の5週毎の平均値は妊娠前半(妊娠6~15週)では23.45~26.98ng/ml serum, 妊娠中期(妊娠16~30週)では18.46~20.70ng/ml serum, 妊娠後半(妊娠31~40週)では16.87~21.50ng/ml serum であつた.

表5 ヒト妊娠時(妊娠6~40週)における血清 hLH- α subunit の変動

weeks of pregnancy	No. of Samples	serum hLH- α levels mean $\pm$ S.E. (ng/ml serum)
6 ~ 10	9	26.98 $\pm$ 1.30
11 ~ 15	10	23.45 $\pm$ 1.48
16 ~ 20	8	20.70 $\pm$ 0.87
21 ~ 25	10	20.26 $\pm$ 1.00
26 ~ 30	10	18.46 $\pm$ 1.39
31 ~ 35	10	21.50 $\pm$ 1.45
36 ~ 40	11	16.87 $\pm$ 1.95

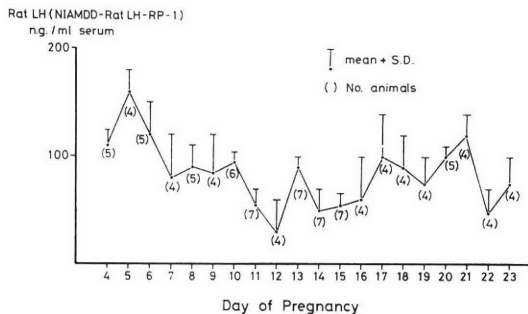


図10 ラット妊娠モデルにおける通常の radioimmunoassay による血清 rLH の動態. 特異的なピークはみられない

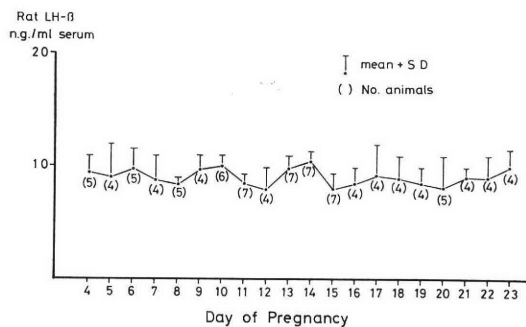
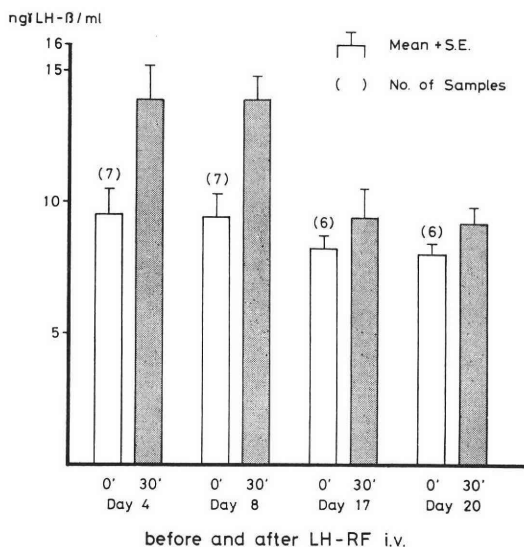
図11 ラット妊娠モデルにおける radioimmunoassay による血清 rLH- β subunit の動態. 妊娠全経過を通じ著明な変化がみられない2) rLH, rLH- β subunit

図10はラット妊娠モデルにおける通常の rLH の radioimmunoassay による測定値を示した. 妊娠4日目より分娩にいたる全経過を通じ測定結果は30~160ng/

図12 ラット妊娠モデルにおける LH-RF 負荷後の rLH- β subunit の上昇. (負荷前—白柱, 負荷後30分後—黒柱) 妊娠後半に著明な抑制をみとめる

ml serum であった. 一方, 図11には特異性の高い rLH- β subunit の radioimmunoassay による測定値を示した. 測定値は妊娠全経過を通じ8~11ng/ml serum であり, 両者とも有意なピークは観察されなかった. 図12には妊娠前半の妊娠4日目, 8日目および妊娠後半の妊娠17日目, 20日目の4群のラット妊娠モデルに LH-RF を静脈投与し, 投与前の rLH- β subunit の測定値を白柱, 投与後30分後の測定を黒柱で示した. 妊娠前半の妊娠4, 8日目の2群では LH-RF 投与後には4.4~4.5 ng/ml serum の rLH- β subunit の有意な上昇が認められたが, 妊娠後半の妊娠17, 20日目では1.2ng/ml serum の上昇を認めたにすぎなかった.

考 察

妊娠時の下垂体機能について, 猿では下垂体摘出後も妊娠の維持およびそれに続く分娩は可能であると報告されている¹⁸⁾. ヒトにおいては転移性乳癌の妊婦の下垂体摘出の報告が Little (1958)¹⁵⁾ らによりなされている. 彼らによれば妊娠26週に癌治療として下垂体を全摘出し乳房に放射線照射を施行し, さらに cortisone, thyroid, pitressin を補充しつつ妊娠36週にて分娩誘導し, 生児を得たと報告している. これらの報告は下垂体が妊娠維持とくに妊娠後半には必ずしも必要ではないことを示唆するものと思われる. 一方ホルモン測定においては近年 Closset (1975)³⁾, Hagen (1975)^{7,8)}, Vaitukaitis (1972)¹⁰⁾ らによつて hLH および hCG の α および β subunit の分離, radioimmunoassay の開発が行わ

れるにいたり、ヒト妊娠時の hLH および hCG を特異的に測定することが可能となつた。本研究では hLH- β subunit および α subunit の標識を Greenwood (1963)¹⁴⁾らの一部変法を用い、Chloramine T により放射性ヨードを標識し、その反応時間を検討したところ 15~30秒間の間に有意差を生じた。このことは hLH- β subunit の iodination が通常の hLH の iodination に比べ、より慎重さを要求されることを意味する。またホルモンの subunit が Loeber(1978)¹⁹⁾らの報告に指摘されている如く温度、時間、pH に影響を受けやすく不安定なものであることを裏付けるものと思われる。本研究の抗 hLH- β subunit 血清は 1 : 10000 に希釈し使用した。本抗体と他の gonadotropin との交叉反応率をみると hCG- β subunit との交叉反応率が高く、これは Vandalem (1975)¹⁶⁾、Hagen (1975)⁹⁾らの報告とも一致した。抗 LH- β subunit 血清と各濃度の hCG との結合能の変化では hCG 5 IU 以上の濃度で反応は平衡に達したので、以後の測定では全試験管で抗 hLH- β subunit 血清に hCG 5 IU を吸収させた後抗体として使用した。さらに本研究では抗 hLH- β subunit 血清に hCG 5 IU を吸収させた抗血清と hCG 非添加の抗血清 2 つを用い、ヒト妊娠時の母体末梢血中 LH を測定することも試みた。hCG にあらかじめ反応させた抗血清を用いた測定系では hCG 非添加の抗血清の測定系に比べ LH の測定値が有意に低値を示した。これは hCG を吸収させていない抗血清では資料中に同時に存在する hCG が免疫学的に干渉していることを意味するものと思われる。Hagen (1975)^{7,9)}、Thorell (1976)¹⁶⁾らのヒト妊娠時における末梢血中の hLH- β subunit の radioimmunoassay の結果とも一致した¹⁷⁾。かつ Ashitaka (1974)¹¹⁾、牧野 (1975)¹²⁾、Dattatreyaumurty (1975)¹⁸⁾らのヒト妊娠時における hCG- β subunit の radioimmunoassay による hCG の動態と本研究の hLH- β subunit の動態は相関を示さなかつた。また本研究における非妊時の測定値に比べ妊娠時の hLH- β subunit の測定値が有意に低値であることから、ヒト妊娠時においては中樞とくに下垂体前葉の機能は hCG、胎盤の steroid hormone などの影響を受け抑制されているものと思われる。また分娩後の血中の hLH- β subunit は妊娠時と同様低値を示し、分娩後も長きにわたり下垂体前葉の gonadotropin とくに LH の分泌が抑制されている事が推察された。一方 Parlow (1975)¹⁹⁾らにより精製された hLH- α subunit に対する抗体を用いて他の gonadotropin との交叉反応を検討したところ hCG- β subunit とは 0.1~100ng ではほとんど交叉性を示さず Hagen (1975)²⁰⁾らの報告とも一致した。本研究

においては hLH- β subunit に比較して hLH- α subunit の測定値は妊娠全期間を通じ高値を示した。これは妊娠時の血中 hCG がきわめて高濃度であり上記の非交叉の量をはるかに越えて測定系に作用したものと思われる。

またラット妊娠モデルにおいて下垂体の LH 値は通常の rLH の radioimmunoassay 系に比較し、特異性の高い rLH- β subunit の radioimmunoassay 系を用いるとその値は低値を示したが、妊娠全期間を通じ測定可能であつた。これはラット下垂体前葉より妊娠時も LH の分泌が行われていることを示すものと思われる。Madhwa Raj (1971)²¹⁾らによりラットでは下垂体性 LH が妊卵の維持に luteotropic factor の 1 つとして重要な役割のあることを報告しており、ラット下垂体性 LH は本研究の測定では低値ではあるが妊娠を維持する luteotropic factor の 1 つとして作用していることがうかがわれる。一方ヒトにおいては妊卵着床後早期より hCG が分泌され、妊娠時の黄体機能と下垂体 LH との関連は不明の点も少なくない。ヒト妊娠時の下垂体予備能では下垂体前葉が抑制されているにもかかわらず、Reyes (1976)²²⁾らはヒト妊娠時において LH-RF を負荷し hLH- β subunit の短期間の上昇を認め、Nakano (1974)²³⁾らは FSH のわずかな上昇を認めている。いずれにしてもヒトの場合は妊娠時に下垂体前葉の LH 分泌と LH 分泌予備能が低下していることを示唆する結果と思われる。本研究ではラット妊娠モデルで妊娠後半では前半に比べ LH-RF 負荷後 rLH- β subunit の上昇がわずかであつたことから、ラット妊娠モデルでは妊娠前半よりむしろ後半に下垂体予備能が抑制されていることが観察された。

結 論

1. hLH- β subunit の radioimmunoassay において放射性ヨードの標識、抗体の力価・特異性、測定感度などを検討し、hCG の干渉をうけない測定系の開発ができた。
2. 上記測定系を用いヒト妊娠時、非妊時の下垂体 LH を測定したところ、妊娠時における測定値は非妊時に比べ有意な低値を示し、ヒト妊娠時における下垂体前葉の機能は妊娠 6 週以後では抑制されていることが判明した。
3. radioimmunoassay において hLH- α subunit では hCG の免疫学的干渉をうけ、ヒト妊娠時の測定値は hLH- β subunit に比べ高値を示した。
4. ラット妊娠モデルにおいて rLH- β subunit を用いた測定系でヒト妊娠時同様下垂体 LH の分泌を認め

たが低値を示した。

5. 視床下部放出因子 (LH-RF) による同モデルの負荷実験では下垂体前葉は妊娠前半よりむしろ後半に強く抑制されていることが示唆された。

稿を終るにあたり御懇篤な御指導、御校閲を賜った飯塚理八教授に深甚なる謝意を表します。また御指導頂いた牧野恒久講師に感謝の意を表わします。また本研究に御協力頂いた東京歯科大学市川病院産婦人科学教室大野虎之進教授、群馬県太田総合病院産婦人科山口慎章院長に心より感謝いたします。さらに各ホルモンの提供を受けた米国 NIAMDD および第二抗体を提供下さいました群馬大学若林克巳博士に深謝いたします。本研究の一部は三菱化成中央研究所生体制御助成金によったことを付記します。(なお本論文の要旨は第2回神経科学学術集会、第52回日本内分泌学会総会および第24回日本不妊学会総会にて発表した)

文 献

- 1) Papkoff, H. and Samy, T. S.: Isolation and partial characterization of the polypeptide chains of ovine interstitial cell-stimulating hormone. *Biochim. Biophys. Acta.* 147: 175, 1967.
- 2) Hartree, A. S., Thomas, A., Braikévitch, M., Bell, E. T., Christie, S. W., Spaul, G. V., Tylor, T. and Pierce, J. G.: Preparation and properties of subunit of human luteinizing hormone. *J. Biol. Chem.* 246: 866, 1971.
- 3) Closset, J., Vandalem, J. L. and Hennen, G.: Human luteinizing hormone. Isolation and characterization of the native hormone and its α and β subunits. *Eur. J. Biochem.* 57: 325, 1975.
- 4) Prentice, L. G. and Ryan, R. J.: LH and its subunits in human pituitary, serum and urine. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40: 303, 1975.
- 5) Shome, B. and Parlow, A. F.: The primary structure of the hormone-specific beta subunit of human pituitary luteinizing hormone (hLH). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 36: 618, 1973.
- 6) Vandalem, J. L., Pirens, G., Closset, J. and Hennen, G.: Selective radioimmunoassays for human luteinizing hormone (hLH) and human chorionic gonadotropin (hCG). *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie.* 83: 753, 1975.
- 7) Hagen, C. and McNeilly, A. S.: Identification of human luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone β -subunit and gonadotropin α -subunit in foetal and adult pituitary glands. *J. Endocr.* 67: 49, 1975.
- 8) Hagen, C. and McNeilly, A. S.: The gonadotropic hormones and their subunits in human maternal and fetal circulation at delivery. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 121: 926, 1975.
- 9) Loeber, J. G., Nabben-Fleuren, J. W. G. M., Elvers, L. H., Segers, M. F. G. and Lequin, R. M.: Spontaneous dissociation of human pituitary luteinizing hormone in solution. *Endocrinology.* 103: 2240, 1978.
- 10) Vaitukaitis, J. L., Braunstein, G. D. and Ross, G. T.: A radioimmunoassay which specifically measures human chorionic gonadotropin in the presence of human luteinizing hormone. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 113: 751, 1972.
- 11) Ashitaka, Y., Nishimura, R., Endoh, Y. and Tojo, S.: Subunits of human chorionic gonadotropin and their radioimmunoassays. *Endocrinol. Japon.* 21: 429, 1974.
- 12) 牧野恒久, 椎名正樹, 大野虎之進, 飯塚理八: β -subunit hCG の Radioimmunoassay によるヒト着床期より分娩後にいたる血中 hCG の動態, 日産婦誌, 27: 373, 1975.
- 13) Smith, P. E.: Continuation of pregnancy in rhesus monkeys (macaca mulatta) following hypophysectomy. *Endocrinology* 55: 655, 1954.
- 14) Greenwood, F. C. and Hunter, W. M.: The preparation of ^{131}I -labelled human growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* 89: 114, 1963.
- 15) Little, B., Smith, O. W., Jessiman, A. G., Selenkow, H. A., Van't Hoff, W., Eglin, J. M. and Moore, F. D.: Hypophysectomy during pregnancy in a patient with cancer of the breast. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 18: 425, 1958.
- 16) Thorell, J. I., Jeppson, S. and Holmström, B.: Production of specific antisera for radioimmunoassay of human luteinizing hormone (LH) in the presence of human chorionic gonadotropin (hCG). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 43: 708, 1976.
- 17) Kaplan, S. L., Grumbach, M. M. and Aubert, M. L.: α and β glycoprotein hormone subunits (hLH, hFSH, hCG) in the serum and pituitary of human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42: 995, 1976.
- 18) Dattatreya-murty, B., Smeth, A. R., Joshi, L. R. and Rao, S. S.: Changes in the ratio between serum and specific levels of human chorionic gonadotropin in different trimesters of pregnancy. *Am. J. Obstet. Gy-*

necol, 121 : 300, 1975.

- 19) Parlow, A. F. and Shome, B.: A highly immunoreactive peptide fragment of human luteinizing hormone alpha subunit, discerned with new, "sequence-specific" radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 41 : 195, 1975.
- 20) Hagen, C. and McNeilly, A. S.: The specificity and application of a radioimmunoassay for the α -subunit of luteinizing hormone in man. *Acta Endocrin.* 78 : 664, 1975.
- 21) Madhwa Raj, H. G. and Moudgal, N. R.: Hormonal control of gestation in the intact rat. *Endocrinology.* 86 : 874, 1970.
- 22) Reyes, F. I., Winter, J. S. D. and Fairman, C.: Pituitary gonadotropin function during human pregnancy: Serum FSH and LH levels before and after LHRH administration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42 : 590, 1976.
- 23) Nakano, R., Kayashima, F., Katayama, K., Mizuno, T., Washio, M. and Tojo, S.: The radio-immunoassay of follicle-stimulating hormone (FSH) during human pregnancy: Serum concentration and response to luteinizing hormone releasing factor (LRF). *Acta. Obstet. Gynec. Scand.* 53 : 259, 1974.

Study on anterior-pituitary function during pregnancy by radioimmunoassay of LH- α , β subunits

Tsuneo Yokokura

Department of Obstetrics and Gynecology
School of Medicine, Keio University

To investigate the anterior-pituitary function during pregnancy, several approaches were made by measuring blood levels of hLH- β subunit (hLH- β), hLH- α subunit (hLH- α), rLH and rLH- β subunit (rLH- β). The immunological affinity of hLH- β antiserum was 7.9 % with hCG- β 3.4 %

with hLH- α and 0.41 % with LER907 as compared to 100 % with hLH- β . In subsequent hLH- β assay 5IU of hCG was added to each reaction tube in order to diminish potential cross-reactivity of antiserum to hCG. Serum hLH- β levels in normal pregnancy through 6 to 40 weeks in 128 women were between 9.82 to 14.55 ng/ml serum when absorbed antiserum by hCG was employed. There was no significant peaks in these periods. The hLH- β levels, in contrast, were between 370.00 to 902.00 ng/ml serum by the assay with non-absorbed antiserum. Serum hLH- β concentrations through 1 to 40 days in postpartum were between 6.90 to 13.94 ng/ml serum. Serum hLH- β values in women with 28 days menstrual cycle were between 246.25 to 632.71 ng/ml serum, indicating that hLH- β levels were significantly decreased through pregnancy and postpartum as compared to the values from non-pregnant women.

The cross-reactivity of anti hLH- α serum was 1.11 % with LER907, 0.33 % with hLH- β and not reacted with hCG- β at the dose of 0.1 to 100 ng as compared to 100 % with hLH- α . Serum hLH- α levels in normal pregnancy were between 16.87 to 26.98 ng/ml serum.

Serum rLH levels in the intact pregnant rats from Day 4 to parturition were between 30 to 160 ng/ml serum. Serum rLH- β concentration measured by specific rLH- β assay in the intact pregnant rats were between 8 to 11 ng/ml serum. The increases of rLH- β per ml serum were 4.4 to 4.5 ng on Day 4 and 8 after intravenous administration of 1.0 μ g of synthetic LH-RF. In contrast only slight responsiveness to the hormone was observed on Day 17 and 20 in these animals.

The data suggest that the anterior-pituitary function in terms of LH secretions is depressed during pregnancy and puerperium in both women and rats.

(受付 : 昭和54年 9 月26日)

乳汁漏出を主訴としない無月経患者における 高プロラクチン血症スクリーニングの意義

Diagnostic Significance of Prolactin Assay in Amenorrheic
Patients without Subjectively Complaining
of Galactorrhea

大阪大学医学部産科婦人科学教室

小 池 浩 司 青 野 敏 博

Koji KOIKE Toshihiro AONO

塩 路 武 徳 倉 智 敬 一

Takenori SHIOJI Keiichi KURACHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Osaka
University, Medical School, Osaka, Japan

乳汁漏出を主訴とする各種疾患群の診断・治療にとって近年開発されたラジオイムノアッセイによるプロラクチン (PRL) の測定は必須のものとなっている。今回我々は乳汁漏出を主訴としない多数の月経異常例について血中 PRL を測定し、排卵障害例に占める高 PRL 血症の頻度を調べ、間脳・下垂体・卵巣系機能障害例におけるスクリーニングとしての PRL 測定の必要性について検討した。神経性食思不振症 16 例、Kallmann 症候群 2 例、Sheehan 症候群 6 例、多嚢胞卵巣 (PCO) 症候群 31 例、Turner 症候群 7 例においては血中 PRL 値は正常範囲にあり、早発閉経症 19 例中 1 例に高 PRL 血症が発見された。一方上記特殊疾患を除く、乳汁漏出を主訴としない機能性無月経患者 207 例中 18 例 (8.7%) に高 PRL 血症が発見された。そのうち続発第 2 度無月経群では 63 例中 10 例 (15.9%) に高 PRL 血症が認められ、血中 LH が正常範囲を示す群には 57 例中 11 例 (19.3%) に高 PRL 血症が認められた。一方挙児希望例 84 例に対してクロミフェンまたはクロミフェン-HCG 療法を行なっていたが、クロミフェンに無反応の群 53 例中 10 例 (18.9%) に高 PRL 血症が発見された。また乳汁漏出を主訴として来院した 45 例の高 PRL 血症患者を対照として、今回のスクリーニングにて発見された高 PRL 血症患者 18 例の病因を比較検討すると、対照群では Chiari-Fro-mmell 症候群が 48.9% を占めるのに比し、スクリーニング群では、下垂体腫瘍が 50%、Argonz-del Castillo 症候群が 33.3% を占めていた。高 PRL 血症を呈した 63 例中 1 例を除いて全例に多少なりとも乳汁漏出を認めた。

以上の検討成績から、無月経患者を診療するにあたり乳房の検査とともに、高 PRL 血症をスクリーニングすることが望ましいことが明らかとなった。

緒 言

近年のプロラクチン (PRL) のラジオイムノアッセイ (RIA) 系の確立により、PRL が性周期に密接な関係を持っていることが明らかとなった。乳汁漏出無月経症

候群や PRL 産生性下垂体腫瘍の診断や治療効果の判定に今や血中 PRL の測定は必須のものとなっている。しかし最近まで我が国で利用していた PRL の RIA キットはその多くが米国 NIH から提供を受けてきたため、測定できるのは一部の研究室に限られ、広く臨床応用され

るまでには至っていなかった。近年、我が国でも PRL の RIA キットが開発され、一般診療機関での実用化も普及しつつある。

現在までに乳汁漏出無月経症候群における血中 PRL の動態および PRL とゴナドトロピンとの相互関係については、ほぼ明らかにされてきた^{2,3)}。今回我々は乳汁漏出を主訴としない多数の月経異常例において第一ラジオアイソトープ研究所より提供を受けたキットを用いて血清中 PRL を測定し、排卵障害例に占める高 PRL 血症の頻度を調べ、間脳下垂体卵巣機能障害例におけるスクリーニングとしての PRL 測定の必要性を検討した。

研究対象および方法

1. PRL スクリーニングの対象

神経性食思不振症16例、Kallmann 症候群 2 例、Sheehan 症候群 6 例、多嚢胞卵巣 (PCO) 症候群 31 例、早発閉経症19例、Turner 症候群 7 例を含む、間脳・下垂体・卵巣系疾患による排卵障害例81例の血清 PRL の基礎分泌値を測定して各疾患群に占める高 PRL 血症の頻度を調べた。なお今回対象とした PCO 症候群とは第 1 度無月経でクロミフェンに反応せず、血中 LH がやや高値で FSH が正常域の、いわゆる内分泌学的に PCO パターンを示す症例と定義した。

また上記特殊疾患を除く、乳汁漏出を主訴としない、年齢16~41歳の機能性無月経患者 207 例を対象として血中 PRL の基礎分泌値を測定した。そして原発無月経と続発無月経、あるいは第 1 度無月経と第 2 度無月経に分けて高 PRL 血症の出現頻度を検討した。さらに挙児希望例84例に対しクロミフェン及びクロミフェン-HCG 療法を行ない、クロミフェン療法による排卵の有無と高 PRL 血症の頻度との関係を検討した。

さらに乳汁漏出を主訴として来院した 45 例の高 PRL 血症患者を対照として、今回のスクリーニングにて発見された高 PRL 血症患者の病因および乳汁漏出程度を比較検討した。

2. ホルモン測定法

血清中の LH と FSH は既に我々が報告した 2 抗体法を用いる RIA で測定した⁴⁾。また今回の血中 PRL のスクリーニングには第一ラジオアイソトープ研究所より提供を受けた、プロラクチンキット「第一」を用いた。なお今回の無月経症に対するスクリーニングに先だって、PRL RIA キットに対する基礎的検討を加え、また正常月経周期を有する婦人の血中 PRL を多数測定し、正常値を定めた。

1) プロラクチン測定用 RIA キットの検討

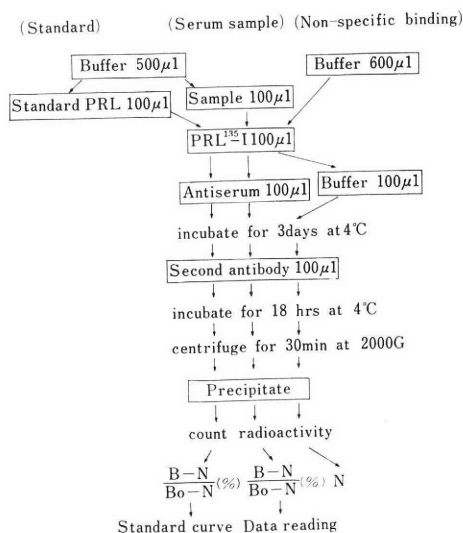


図 1 Radioimmunoassay procedure for prolactin

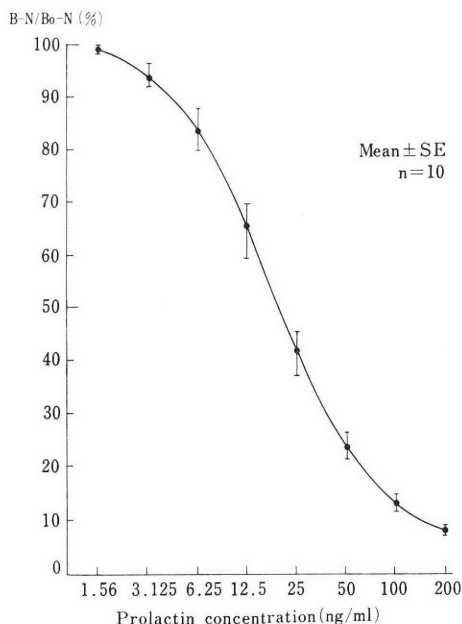


図 2 Standard curve for prolactin

プロラクチンキット「第一」について、標準ヒト PRL を用いた標準曲線、添加回収試験、再現性について検討した。なお測定操作の概略は図 1 に示した通りである。

i) 標準曲線

本キットによつて得られた標準曲線の平均値と標準誤差を図 2 に示した。1.56~200ng/ml の範囲で良好な標準曲線が得られ、最小検出量は 1.56ng/ml であった。

ii) 添加回収試験

PRL 濃度の分っている 健康人血清に 12.5, 25, 50 ng/ml の PRL を添加し, その回収率を調べた. その結果, 回収率は平均 $97.3 \pm 10.9\%$ とほぼ満足すべき値を得た.

iii) 再現性

同一キット内で 10 回測定して得た測定内の 変異係数 (C.V.) は 10.5% , また 2 種類のサンプルについて 6 回測定した測定間の変異係数はそれぞれ 11.1% および 11.6% であった.

2) 正常月経周期婦人の血中 PRL 値

正常月経周期を有する婦人 5 例を対象として卵胞期, 排卵期, 黄体期の月経周期の各時期にそれぞれ連続する 3 日間にわたり早朝空腹時に採血し, 血中 PRL 値を測

定し平均値 $\pm$ 標準誤差を求めた. その結果は卵胞期 10.5 ± 2.0 ng/ml, 排卵期 10.0 ± 2.2 ng/ml, 黄体期 11.9 ± 2.3 ng/ml であった. また全測定値の平均値は 10.8 ± 1.2 ng/ml であった.

結 果

1. 間脳・下垂体・卵巣系疾患における高 PRL 血症の頻度

間脳・下垂体・卵巣系の既知の疾患による排卵障害例における高 PRL 血症の頻度を検討した結果, 神経性食思不振症 16 例, Kallmann 症候群 2 例, Sheehan 症候群 6 例, PCO 症候群 31 例, Turner 症候群 7 例においては血中 PRL 値は正常範囲を示し, 全く高 PRL 血症は認められなかった. 早発閉経症 19 例中 1 例に高 PRL

表 1 Incidence of hyperprolactinemia in various anovulatory conditions

Etiology	No. of patients examined	No. of patients with hyperprolactinemia	Serum PRL Mean $\pm$ SD (ng/ml)
Anorexia nervosa	16	0	6.6 ± 1.1
Kallmann's syndrome	2	0	8.4 ± 0.6
Sheehan's syndrome	6	0	5.4 ± 1.2
PCO syndrome	31	0	8.2 ± 0.8
Menopause praecox	19	1	9.3 ± 2.1
Turner's syndrome	7	0	6.6 ± 1.7
Functional amenorrhea	207	18(8.7%)	

表 2 Incidence of hyperprolactinemia in patients with functional amenorrhea complaining of no galactorrhea

	No. of patients examined	No. of patients with hyperprolactinemia	(%)
Primary amenorrhea	21	0	0
Secondary amenorrhea	160	16	10.0
Am. 1°	88	6	6.8
Am. 2°	63	10	15.9

表 3 Gonadotropin levels and incidence of hyperprolactinemia

Gonadotropin (mIU/ml)	No. of patients examined	No. of patients with hyperprolactinemia	(%)
LH			
>19.0	80	4	5.0
$19.0 \sim 4.6$	57	11	19.3
< 4.6	29	3	10.3
FSH			
>14.0	35	4	11.4
$14.0 \sim 6.4$	73	9	12.3
< 6.4	58	5	8.6

表 4 Incidence of hyperprolactinemia and response to clomiphene

Response to clomiphene	No. of patients examined	No. of patients with hyperprolactinemia	(%)
Responders to clomiphene	31	1	(3.2)
Nonresponder to clomiphene	53	10	(18.9)

表 5 Etiological classification of hyperprolactinemic patients with amenorrhea

Etiology	Pt. complained of galactorrhea	Pt. diagnosed by PRL screening
Pituitary tumor	5(11.1)	9(50.0)
Argonz-del Castillo syndrome	4(8.9)	6(33.3)
Chiari-Frommel syndrome	22(48.9)	1(5.6)
Primary hypothyroidism	4(8.9)	0(0)
Due to drug	6(11.3)	0(0)
Others	4(8.9)	2(11.1)
Total	45(100%)	18(100%)

血症が発見された。なお上記疾患群の血中 PRL の平均値を表 1 に示した。

2. 機能性無月経患者における高 PRL 血症の頻度

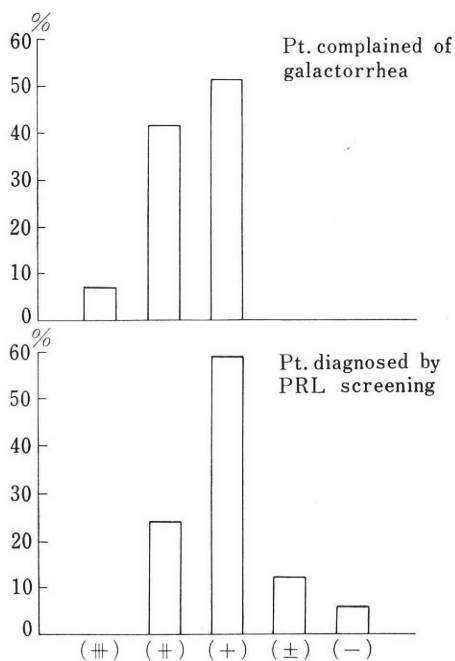
乳汁漏出を主訴としない機能性無月経患者 207 例中 18 例 (8.7%) に高 PRL 血症が発見された。そのうち原発性無月経群では 21 例中 0 例であるのに比し、続発性第 2 度無月経群では 63 例中 10 例 (15.9%) と高 PRL 血症が高率に発見された (表 2)。

また血中ゴナドトロピンの基礎分泌値と高 PRL 血症の頻度との関係を検討すると、血中 LH が正常範囲を示す群に 57 例中 11 例 (19.3%) と高い傾向がみられたが、血中 FSH との間には相関関係がみられなかった (表 3)。

一方挙児希望例に、クロミフェン及びクロミフェン—HCG 療法を行ない、クロミフェン療法に対する反応と高 PRL 血症の頻度との関係を検討すると、クロミフェンに反応する群では 31 例中 1 例 (3.2%) と低率であるのに比し、クロミフェンに無反応の群では 53 例中 10 例 (18.9%) と高率に高 PRL 血症が発見された (表 4)。

3. PRL スクリーニングにて発見される高 PRL 血症患者の特徴の検討

乳汁漏出を主訴として来院した 45 例の高 PRL 血症患者を対照として選び高 PRL 血症を示す機能性無月経患者の病因および乳汁漏出の程度について比較検討した。病因は乳汁漏出を主訴とする群においては Chiari-Frommel 症候群が 48.9% と大部分を占めているのに対し、スクリーニングにて発見された群においては下垂体腫瘍が 50%、Argonz-del Castillo 症候群が 33.3% と多くみられた (表 5)。また乳汁漏出の程度についてみる



(卅) Spontaneous lactation (++) Easily spouting by expression but not spontaneous (+) Several drops by expression (±) Slightly oozed by expression (-) No lactation by expression

図 3 Grade of galactorrhea observed in hyperprolactinemia

と、スクリーニング群は全般に乳汁漏出の程度が少ない傾向を示した (図 3)。スクリーニングにより発見された下垂体腫瘍患者の乳汁漏出の程度は + ~ ± が 89% を占め、原発性不妊症が 89% を占めていた。なお、高 PRL

血症を呈した63例中1例を除いて全例に多少なりとも乳汁漏出を認めた。

考 案

高 PRL 血症は間脳・下垂体・卵巢系の機能障害を招くことが知られている。機能性無月経例における高 PRL 血症の占める割合については従来より諸家の報告があり、Glass ら⁹⁾は6.6% (45例中3例)、Bohnet ら⁶⁾は10% (118例中12例)、Strauch ら⁷⁾は20% (189例中38例)、Seppälä ら⁸⁾は28% (25例中7例)と、報告している。しかしこれら対象者の中には乳汁漏出を主訴とする無月経患者も多数含まれており、本来 PRL スクリーニングの対象となるべき、乳汁漏出を主訴としない患者における頻度を表わしたものではない。今回の我々の結果をみると、乳汁漏出を主訴としない機能性無月経患者の8.7% (207例中18例)に高 PRL 血症が発見されている。

Bohnet ら⁶⁾は17例の高 PRL 血症患者を検討して、その内分泌学的特徴は、①黄体ホルモンによる消退出血を認める、②血中エストラジオール値は正常かやや低値、③クロミフェンに対して無排卵、④ LH 低値、⑤ FSH 正常値、⑥ LH の律動性分泌の欠如、などの諸点であると報告している。しかし今回の我々の成績では第2度無月経群(15.9%)や血中 LH 値の正常範囲を示す群に高率に高 PRL 血症が発見された。この成績は、高 PRL 血症の90% (31例中27例)は第2度無月経で、血中エストラジオールは低レベルであるにもかかわらず、血中ゴナドトロピンは上昇していないという Franks ら⁹⁾の報告と一致し、ネガティブ・フィードバックの障害を示唆している。またクロミフェンに無反応群 (18.9%)に高 PRL 血症が多く発見された成績は諸家の成績^{6,9)}と一致する。高 PRL 血症患者がクロミフェンに反応を示しにくい原因としては、高 PRL 状態では LH の律動性分泌が欠如していることやプロモクリプチンにより PRL 値を低下させるとクロミフェンに対する反応性が回復してくることから⁶⁾、おそらく内因性ゴナドトロピン放出ホルモン (Gn-RH) が減少しているためと考えられる。

多毛を伴う無月経や PCO 症候群にも高 PRL 血症が発見されることが報告されている^{10,11)}。Thorner ら¹²⁾は高 PRL 血症患者の16% (44例中7例)に PCO 症候群が発見されたと報告している。しかし今回の我々の成績においては PCO 症候群31例中1例も高 PRL 血症は発見されなかった。その理由は PCO 症候群の診断基準の違いによるものと思われる。すなわち我々はクロミフェンに無反応で、Yen ら¹³⁾が報告したように血中 LH

が中等度上昇し、FSH が正常範囲内にあるものを PCO 症候群とした。しかし PCO 症候群の一部は血中 LH、FSH は正常値を示すが高 PRL 血症の結果、副腎由来のアンドロゲンが増加し¹⁴⁾、二次的に PCO 症候群を呈するものがある。今回の調査で高 PRL 血症の見つからなかったのは後者に属するものが PCO 症候群に含まれなかったことによるものと考えられる。

高 PRL 血症に乳漏症が発生する率については諸家の報告は一致していない。Franks ら¹⁵⁾は高 PRL 血症の35%に、Bohnet ら⁶⁾は53%に、Thorner ら¹²⁾は80%に、Bergh ら¹⁶⁾は87%にそれぞれ乳汁漏出を認めている。今回の成績では、高 PRL 血症を呈した63例中1例を除いて全例に多少なりとも乳汁漏出を認めた。この我々の成績は、無月経婦人において、たとえ少量であつても、乳汁漏出を認めれば病因として重要であることを示している。また、おそらくこうした諸家の報告の不一致は乳房診察の徹底の程度や触診の技術および、乳漏症に対する関心の程度にもとづくものと思われる。今回の成績は乳房診察の重要性を示すとともに PRL 測定成績との一致を示している。

Jones ら¹⁷⁾は無月経患者中の下垂体腫瘍の頻度は2.2% (177例中4例)と報告している。今回の我々のスクリーニングにおいても2.9% (207例中6例)とほぼ同程度の症例が発見された。また Strauch ら⁷⁾は高 PRL 血症患者中12% (119例中14例)に下垂体腫瘍を発見したと報告している。この成績は乳汁漏出を主訴として来院した高 PRL 血症患者群における下垂体腫瘍の占める率が11.1%である我々の成績とほぼ一致する。これらの成績に比べて、今回の PRL スクリーニングにて発見された高 PRL 血症患者群においては、下垂体腫瘍が50%、Argonz-del Castillo 症候群が33.3%を占めていた。今回発見された下垂体腫瘍患者の89%が未妊婦人であり、乳汁漏出の程度も(+)~(±)が89%を占めていたため、乳汁漏出を主訴とすることは少なく、また問診や乳房の軽い圧迫のみでは乳漏症を確認することが困難な状態にあつた。このように、乳汁漏出を主訴としない無月経婦人中に発見される高 PRL 血症患者に下垂体腫瘍が高率に発見されたので、下垂体腫瘍の早期発見には PRL スクリーニングが最も有効な手段であると考えられる。

稿を終るに臨み、ヒト PRL のラジオイムノアッセイキットを提供された第一ラジオアイソトープ研究所および 2nd IRP-HMG を下さった National Institute for Medical Research, London 各位に感謝します。

なお本論文の要旨は第52回日本内分泌学会総会 (昭和

54年6月, 京都) および第24回日本不妊学会総会シンポジウム (昭和54年9月, 札幌) において発表した。

文 献

- 1) Shinha, Y. N., F. W. Selby, U. J. Lewis and W. P. Vander Laan, A homologous radioimmunoassay for human prolactin, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 36 : 509, 1973.
- 2) Aono, T., A. Miyake, T. Shioji, T. Kinugasa, T. Onishi and K. Kurachi, Impaired LH release following exogenous estrogen administration in patients with amenorrheagalactorrhea syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 42 : 696, 1976.
- 3) Aono, T., T. Shioji, T. Kinugasa, T. Onishi and K. Kurachi, Clinical and endocrinological analyses of patients with galactorrhea and menstrual disorders due to sulpiride or metoclopramide, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47 : 675, 1978.
- 4) 青野敏博, 南川淳之祐, 河村憲一, 谷沢 修, 倉智敬一 : ヒト下垂体性 FSH および LH の radioimmunoassay による測定, *日産婦誌*, 24 : 821, 1972.
- 5) Glass, M. R., J. W. Williams, W. R. Butt, R. L. Edwards and D. R. London, Basal serum prolactin values and responses to the administration of thyrotrophin releasing hormone (TRH) in women with amenorrhoea, *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 83 : 495, 1976.
- 6) Bohnet, H. G., H. G. Dahlen, W. Wuttke and H. P. G. Schneider, Hyperprolactinemic anovulatory syndrome, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 42 : 132, 1975.
- 7) Strauch, G., S. Bonnefous, B. Paulian, P. Zaks, J. P. Pages and H. Bricaire, Study on epidemiology and mechanism of hyperprolactinemic anovulation, In *Progress in prolactin physiology and pathology*, C. Robyn and M. Harter eds, Elsevier/North-Holland Press p. 267, 1978.
- 8) Seppälä, M., E. Hirvonen, T. Ranta, P. Virkkunen and J. Leppäluoto, Raised serum prolactin levels in amenorrhea, *Brit. Med. J.* 2 : 305, 1975.
- 9) Franks, S. and H. S. Jacobs, Characterization and management of hyperprolactinemic amenorrhea, In *Prolactin and human reproduction*, Crosignagni, P. G. and C. Robyn eds, Academic Press, p. 245, 1977.
- 10) Seppälä, M. and E. Hirvonen, Raised serum prolactin levels associated with hirsutism and amenorrhea, *Brit. Med. J.* 4 : 144, 1975.
- 11) Thorner, M. O., A. S. McNeilly, C. Hogan and G. M. Besser, Long-term treatment of galactorrhea and hypogonadism with bromocriptine, *Brit. Med. J.* 2 : 419, 1974.
- 12) Thorner, M. O. and G. M. Besser, Hyperprolactinemia and gonadal function : results of bromocriptine treatment, In *Prolactin and human reproduction*, Crosignagni, P. G. and C. Robyn eds, Academic Press, p. 285, 1977.
- 13) Yen, S. S. C., P. Vela and J. Rankin, Inappropriate secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in polycystic ovarian disease, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 30 : 435, 1970.
- 14) Giust, G., F. Bassi, G. Forti, P. Giannotti, E. Calabresi, M. Pazzagli, G. Fiorelli, M. Mannelli, N. Misciglia and M. Serio, Effects of prolactin on androgen secretion by the human adrenal cortex, In *Progress in prolactin physiology and pathology*, C. Robyn and M. Harter eds Elsevier/North-Holland Press, p. 293, 1978.
- 15) Franks, S., M. A. F. Murray, A. M. Jequier, S. T. Steele, J. D. N. Nobarro and H. S. Jacobs, Incidence and significance of hyperprolactinemia in women with amenorrhea *Clin. Endocrinol.* 4 : 597, 1975.
- 16) Bergh, T., S. J. Nillius and L. Wide, Hyperprolactinemia in amenorrhea, incidence and clinical significance, *Acta endocrinol.* 86 : 683, 1977.
- 17) Jones, J. R. and E. Kemman, Sella turcica abnormalities in an anovulatory population, *Obstet. Gynecol.* 48 : 77, 1976.

Diagnostic significance of prolactin assay in amenorrheic patients without subjectively complaining of galactorrhea

Koji Koike, Toshihiro Aono,
Takenori Shioji and Keiichi Kurachi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Osaka University, Medical School,
Osaka, Japan

In order to study the incidence rate of hyperprolactinemia, serum prolactin (PRL) level was assayed in 288 patients with amenorrhea, of whom, 81 cases had known etiology in the hypothalamus, pituitary or ovarian system and remaining 207 cases had no known causal factors. All of the patients had not subjectively complained of galactorrhea.

Hyperprolactinemia was not found in any patients with anorexia nervosa, Kallmann's syndrome, Sheehan's syndrome, polycystic ovary syndrome and Turner's syndrome. Whereas, one

out of 19 patients with menopause praecox had raised PRL levels. Eighteen hyperprolactinemic women were discovered by screening test in 207 patients with functional amenorrhea. By breast expression, galactorrhea was confirmed in 62 out of 63 women. Hyperprolactinemia was found in relatively high rate especially in patients with secondary amenorrhea who did not respond to progestogen administration, and patients who failed to show ovulation by clomiphene treatment. Study on the etiologic factor of hyper-

prolactinemia revealed high incidence of pituitary adenoma in patients with functional amenorrhea. On the other hand, Chiari-Frommel's syndrome was found to be the main factor among 45 patients who subjectively complained of galactorrhea.

From the present results, it is suggested that both breast examination and PRL screening are indispensable for the diagnosis of the etiologic factors in amenorrheic patients.

(受付: 昭和54年10月5日特掲)

STUDIES ON STRUCTURAL COMPOSITION OF THE HUMAN CERVIX UTERI

PART 1. STRUCTURAL COMPOSITION OF THE HUMAN CERVIX UTERI IN NONPREGNANCY

PART 2. STRUCTURAL COMPOSITION OF THE HUMAN CERVIX UTERI DURING PREGNANCY

Masami NAKANISHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Aichi Medical University

Abstract: The cervical structural composition was investigated histologically by use of Hansen's modified stain method and histoplanimetric procedure from the sexually mature nonpregnant women, the normal pregnant women and the cervical incompetent patients.

There were little individual variation of structural component in the nonpregnant cervix. In the nonpregnant cervix the value of collagen content was significantly dominant than that of muscle content, which decreased from the upper portion of the cervix downward. The differences of structural component were not significant between the anterior wall, the lateral wall and the posterior wall. The middle-anterior was nearly similar to the mean value of all portions in the cervix.

The value of muscle in the cervix during early pregnancy was greater than in the nonpregnant group. Conversely, collagen content was less than that of the nonpregnant group. The pregnant cervix near term contained more other contents than that of the first trimester. Changes of collagen fiber in early pregnancy and changes of ground substances near term seem to be concerned with ripening of the cervix.

In all study groups the highest percentage of muscle of the cervix was obtained from the incompetent cervix. These findings suggest that disproportion of structural composition of the cervix may be a factor in production of cervical incompetency.

Introduction

It is well-known that the human cervix uteri is rigid, but during pregnancy it must retain the conceptus in the uterine cavity and near term it may become softer and shorter, beginning labor the cervical canal can be dilated to 10 cm in diameter without injury. These specific actions of the cervix uteri have been interesting for obstetricians, but little has been known about the mechanism of alterations of the cervical structural composition. Danfoth and coworkers^{1,2)} have attempted to show that the human cervix uteri is composed mainly of fibrous connec-

tive tissue containing little muscle. Therefore it seems clear that dynamic changes in the cervix during pregnancy and in labor are based on changes of the structures of the cervix, especially on those of the connective tissue. On the other hand, it is fact that the sphincter like activity of the cervix has been observed by use of balloons³⁾, radiographies⁴⁾ or cervical insufflation method⁵⁾. Most investigations of the structure of the cervix have depended upon histological and histochemical methods. Recently chemical studies have been made especially for the connective tissue in the cervix.

The purpose of the present studies is to

estimate histologically the structural composition of the nonpregnant cervix (Part 1.), and the pregnant cervix, further to compare the structure of normal pregnant cervix with that of the clinically incompetent cervix (Part 2.).

Part 1. Structural Composition of the Human Cervix Uteri in Non-pregnancy

Materials and Methods

The materials were obtained from the cervix uteri of six patients who had undergone total hysterectomy. The reasons for operation were leiomyoma of the corpus uteri without abnormalities in the cervix. The patients were sexually mature nonpregnant women

and aged 29 to 42 years. The clinical details of the subjects in this study are shown in Table 1.

Immediately after hysterectomy the cervix was amputated as far as the internal os and the endocervix was excised. Each cervix was then divided into 9 portions, namely, the upper portion, the middle portion and lower portion of the anterior wall, posterior wall and left lateral wall of the cervix (Fig. 1).

Then all cervical tissues were fixed immediately in 10% formalin solution for 48 hours or more, and paraffin blocks were prepared, from which sections of 5 μ thickness were cut. After deparaffinisation and dehydration, all specimens were stained by Hansen's modified method (haematoxy-picro-fuchsin method).

Table 1 Proportions of structural composition in the cervix

No. of case	1	2	3	4	5	6	Mean $\pm$ s.d.
Age	42	40	38	41	29	38	38
Gravida-para	5-2	2-1	3-2	5-2	5-2	3-3	
Structural composition							
Muscle (%)	4.8	3.7	5.0	5.6	7.1	4.1	5.1 $\pm$ 1.2
Collagen (%)	74.8	76.1	79.2	74.6	75.9	80.1	77.0 $\pm$ 2.3
Blood vessels (%)	11.8	16.3	11.7	12.1	11.7	11.0	12.4 $\pm$ 1.9
Others (%)	8.6	3.9	4.1	7.7	4.5	4.8	5.8 $\pm$ 2.0

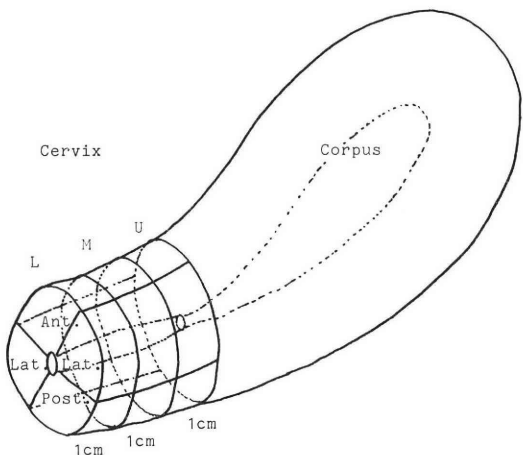


Fig. 1 Portions of the cervix uteri
L : Lower portion of the cervix
M : Middle portion of the cervix
U : Upper portion of the cervix

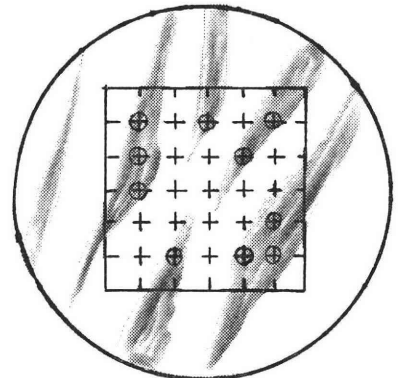


Fig. 2 Determination of percentage of muscle content with the integration ocular. The highest possible number of "hits" is 25. With 10 "hits" there is a muscle content of 40%.

The distribution of the tissue components was determined by use of a Zeiss integrating eyepiece^{6,7)}, which replaced one of the eyepiece of a standard microscope. This device is etched with 25 intersecting crosshair (Fig. 2). This method serves to determine the volume percentage of the stained components. To each of the grid squares, the muscle cells which happen to lie beneath are apportioned as "hits". Percentage composition can be determined by dividing the total "hits" scored for the each stained tissue element by the total 25 "hits" scored.

For example, if 10 "hits" are found in a field, the percentage proportion of the muscle in each field is 40 per cent (10/25) (Fig. 2). In this study a magnification of $\times 400$ was found to be convenient, and successive 30 fields of a tissue section analyzed were examined. The total for the 9 portions of one cervix uteri provided 6750 grid readings (25 $\times$ 30 $\times$ 9).

Results

The each structural composition, namely muscle, collagen, blood vessels and others was colored clearly by the Hansen's modified stain method, to be well distinguished.

The results for the different subjects by use of the integrating eyepiece are summarized in Table 1. Percentage of structural compositions in the different portions of the cervix is recorded in Table 2. and 3. No significant differences of the percentage of structural content were detected between the six patients, and a standard deviation in each mean of percentage of structural content was smaller than 2.3% (Table 1).

The value of each structural composition in the cervix was as follows: The value of muscle ranged from 3.7 to 7.1%, with a

mean value of 5.1%, and the value of collagen varied between 74.6 and 80.1%, with an average of 77.0%, blood vessels had a mean value of 12.4% (range 11.0~16.3%) and, others had a mean value of 5.8% (range 3.9~8.6%) (Table 1).

The lower portion of the cervix seemed to contain less muscle than the middle portion and the upper portion of the cervix, then the muscle content of the cervix increased from the lower part upward, whereas the value for collagen of the upper portion were lower than those of the lower portion (Table 2). The value of blood vessels and others seemed to show a small difference

Table 2 Proportions of structural composition in the lower, middle, and upper portion

Portion in the cervix Structural composition	Lower	Middle	Upper	Mean $\pm$ s.d.
Muscle (%)	0.2	4.3	10.6	5.1 $\pm$ 1.2
Collagen (%)	81.4	77.6	71.9	77.0 $\pm$ 2.3
Blood vessels (%)	12.3	13.3	11.7	12.4 $\pm$ 1.9
Others (%)	6.0	5.4	5.8	5.8 $\pm$ 2.0

Table 3 Proportions of structural composition in the anterior, lateral, and posterior portion

Portion in the cervix Structural composition	Anterior	Lateral	Posterior	Mean $\pm$ s.d.
Muscle (%)	4.6	4.5	5.5	5.1 $\pm$ 1.2
Collagen (%)	77.4	76.9	76.0	77.0 $\pm$ 2.3
Blood vessels (%)	11.9	12.6	12.0	12.4 $\pm$ 1.9
Others (%)	5.5	6.1	5.7	5.8 $\pm$ 2.0

Table 4 Proportions of structural composition in the middle-anterior portion

No. of case Structural composition	1	2	3	4	5	6	Mean $\pm$ s.d.
Muscle (%)	6.4	3.7	1.8	5.6	7.4	7.6	5.4 $\pm$ 2.3
Collagen (%)	74.5	77.4	82.7	74.6	76.8	77.0	77.2 $\pm$ 3.0
Blood vessels (%)	11.6	13.9	12.2	13.4	11.8	11.7	12.4 $\pm$ 1.0
Others (%)	7.5	4.9	3.4	6.4	4.0	3.6	5.0 $\pm$ 2.1

between the lower, the middle and the upper portion of the cervix.

The results for the anterior wall, the left lateral wall and the posterior wall were nearly similar (Table 3). The value of each structure in middle anterior portion coincided closely with the mean of all portion in the cervix (Table 4). Therefore the value of the middle anterior portion of the cervix was adopted as representative value for each patient in Part 2. of this study.

Discussion

The Hansen's modified stain method employed in our studies could distinguish collagen fibers from muscle fibers more intensely than the Van Gieson method. The distribution of muscle, collagen, blood vessels and others in the cervix uteri was determined by use of an integrating eyepiece, which conforms to the standardized point count method of quantitative morphologic analysis⁶⁾, and its reliability may be increased by scanning a larger area of the section in the field.

In our investigation the human cervix contained small amount of muscle component but a rich content of collagen element. This finding conformed to those of Danforth^{1,2)}, Buckingham⁸⁾, Schwalm⁷⁾, and others^{9,10,11,12)}. No significant differences in the mean proportion of structural composition were found between each of the cervix. On the basis of our investigation it is reasonable to presume that the muscle content of the cervix decreases gradually by aging. This findings are essentially similar to those of Schwalm⁷⁾ who reported that the menopausal uterine cervix contained appreciably less muscle than those of the cervix in the period of sexual maturity. The proportions of structural composition in the anterior wall, the lateral wall and the posterior wall of the cervix were almost the same pattern in all six cases. This is agreement with Schwalm's⁷⁾ report, which further showed that the difference was not significant between the inner layer and the outer layer in the cervix.

The upper portion of the cervix seemed to contain more muscle (10.6%) than that of the middle (4.3%) and that of the lower (0.2%). The each value is smaller than that

in Duane's¹¹⁾ report, but its decrease of muscle content from the upper to the lower portion of the cervix shows same tendency. Therefore these facts suggest that function of muscle element in the upper portion, especially internal os, can not be ignored, but alteration of collagen seems to have implications of considerable for cervical functions during pregnancy and in labor.

The author will attempt to report in Part 2. the investigations made on the cervix during pregnancy by technique similar to those adopted here, and the author determined to select the critical zone of the middle-anterior portion of the cervix, because the percentage of structural component in this portion was shown very similar to the average of all portions in the cervix and it was easy to obtain such tissue from the cervix at operation.

Summary

The cervical structural compositions were investigated histlogcally by use of Hansen's modified stain method and histoplanimetric procedure from the sexually mature nonpregnant women. This stain method could clearly distinguish collagen fibers from muscle fibers.

There were little individual variation in proportion of cervical structural component.

In the cervix the value of collagen content was significantly dominant than that of muscle content, which decreased from the upper portion of the cervix downward.

The differences of structural component were not significant between the anterior wall, the lateral wall and the posterior wall. The value for the middle-anterior portion was nearly similar to the mean value of all portions in the cervix.

Part 2. Structural Composition of the Human Cervix Uteri During Pregnancy

In our observations of Part 1. the nonpregnant human uterine cervix was confirmed to be composed predominantly of the connective tissue, mainly collagen fibers, with an average of only about five percent smooth

muscle.

The purpose of the present studies is to estimate histologically the structural composition of the pregnant cervix uteri and to compare the incompetent cervix with the early pregnant or near term pregnant cervix. The cervix uteri of 31 sexually mature non-pregnant women were examined as control.

Materials and Methods

The materials were obtained from the cervix uteri of 16 pregnant women who ranged from 22 to 41 years of age. The 12 patients were near term, the two patients were in the first trimester of normal pregnancy and the remaining two were in the second trimester of pregnancy with clinical cervical incompetency characterised by the cervix being dilated more than 2 cm without any symptoms.

The two patients in the first trimester of pregnancy were multipara, whose cervical tissues were removed after total hysterectomy. The reasons for operation were complication with leiomyoma of the corpus uteri, and the middle-anterior portion in the cervix was examined.

Six of the 12 patients near term were

multipara and the remaining six were nullipara, of which five were nulligravida. The materials near term were obtained from the middle-anterior portion of the cervix at the time of cesarean section.

The two patients with cervical incompetency had undergone Shirodkar's operation, at the operation the cervical tissues were taken from the middle-anterior wall.

Additionally the control materials were obtained from the middle-anterior portion of the cervix of 31 patients who had undergone total hysterectomy, of which reasons were leiomyoma of the corpus uteri without abnormalities in the cervix. The technics employed have been described in Part 1.

Results

The results and clinical details of the four study groups are listed in Tables 5, 6, 7 and 8. In the control nonpregnant biopsies, the percentage of muscle content varied from 1.3 % to 11.0 % with mean percent of 5.1. The percentage of collagen content varied from 69.7 % to 82.7 %, with mean per cent of 76.9. Blood vessels had a mean of 12.6 % and others had a mean value of 5.3 % (Table 5).

Table 5 Proportions of structural composition in the four study groups

Structural composition Study groups	No. of cases	Muscle(%)	Collagen(%)	Blood vessels (%)	Others(%)
Nonpregnant group (as control)	31	5.1±2.6	76.9±3.3	12.6±1.4	5.3±1.4
First trimester pregnant group	2	11.2±3.2	68.4±1.4	11.5±1.2	8.9±0.6
Near term group	12	12.6±4.1	56.5±2.8	12.7±1.6	18.3±2.9
Cervical incompetent group	2	15.4±0.8	60.6±3.1	15.6±1.7	8.3±0.6

Table 6 Clinical details and proportions of structural composition of the first trimester pregnant group

Clinical details						Proportions of structural composition(%)			
No. of case	Gravida /Para	Gesta- tional weeks	Dilatation of cervical canal (cm)	Labor pain	Procedure Indication	Muscle	Collagen	Blood vessels	Others
1	5/3	8	0	(-)	hysterectomy myoma ut. corp.	8.6	69.5	12.5	9.4
2	3/3	15	0	(-)	hysterectomy myoma ut. corp.	13.1	67.6	10.8	8.5
Mean±s.d.						11.2±3.2	68.4±1.4	11.5±1.2	8.9±0.6

Table 7 Clinical details and proportions of structural composition of the near term group

Clinical details								Proportions of structural composition (%)			
No. of case	Age	Gravida /Para	Gesta-tional weeks	Dilata-tion of cervical canal (cm)	Labor pain	Proce-dure	Indication	Muscle	Collagen	Blood vessels	Others
1	32	0/0	41	1.5	—	c.s.*	c.p.d.	10.6	56.3	12.0	21.1
2	30	3/1	36	2.0	—	c.s.	placenta previa	6.3	58.0	14.9	20.9
3	26	1/1	39	3.0	+	c.s.	c.p.d. previous c.s.	13.3	56.9	15.1	14.7
4	31	2/1	39	4.0	—	c.s.	c.p.d.	18.8	54.5	13.5	13.3
5	25	0/0	42	3.0	+	c.s.	c.p.d. p.r.m.*	16.0	55.7	10.9	17.3
6	22	0/0	40	1.5	—	c.s.	c.p.d. b.p.*	14.5	56.0	12.3	17.2
7	31	2/1	40	1.5	—	c.s.	c.p.d.	9.0	54.6	13.2	23.2
8	27	1/1	40	1.5	—	c.s.	c.p.d. previous c.s.	17.3	52.7	12.0	18.0
9	30	2/1	39	1.0	—	c.s.	c.p.d. previous c.s.	8.3	62.7	10.4	18.7
10	24	0/0	39	0	—	c.s.	c.p.d. p.r.m.	7.8	59.8	11.8	20.6
11	23	0/0	42	1.0	—	c.s.	c.p.d.	14.0	58.0	12.0	16.0
12	25	1/0	40	1.5	+	c.s.	c.p.d.	15.6	53.6	13.6	17.3

Mean±s.d. 12.6±4.1 56.5±2.8 12.7±1.6 18.3±2.9

* c.s. : cesarean section, p.r.m. : premature rupture of membranes, b.p. : breech presentation,

Table 8 Clinical details and proportions of structural composition of the cervical incompetent group

Clinical details								Proportions of structural composition (%)			
No. of case	Age	Gravida /Para	Gesta-tional weeks	Dilata-tion of cervical canal (cm)	Labor pain	Procedure	Indication	Muscle	Collagen	Blood vessels	Others
1	41	2/0	25	2.0	—	Shirodkar's cervical operation	cervical incompetency	15.9	58.9	16.5	8.7
2	30	3/0	21	3.0	—	Shirodkar's cervical operation	cervical incompetency	14.8	63.2	14.2	7.8

Mean±s.d. 15.4±0.8 60.6±3.1 15.6±1.7 8.3±0.6

The value of each structural composition in the first trimester pregnant group was as follows (Table 6): The muscle content (11.2%) was greater than that of the control group, and the the mean of collagen content decreased to 68.4%, and the blood vessels element had a mean value of 11.5%, and the other element had a mean value of 8.9%.

The results of the near term group were as follows (Table 7): the muscle content

(12.6%) was greater than that of the first trimester pregnant group, and the mean value of collagen content decreased markedly to 56.5%, the blood vessels had a mean value of 12.7% and the other element (18.3%) rose to a level which is about four times the control level. In the value of near term group no significances were detected between multipara and nullipara, but the mean value of muscle content (15.9%) in three cases at term when the cervical canal was dilated

3 cm or more increased more extremely than in the nine cases (11.5%) whose cervical canal was slightly dilated.

The value of the cervical incompetent group was follows (Table 8): the highest value of muscle in the four study groups was obtained from this group (15.4%). The mean value of collagen content (60.6%) was smaller than that of the first trimester pregnant group, and the blood vessels element had a mean value of 15.6%, and the other content was 8.3%.

Discussion

In this study the proportion of structural composition of the pregnant cervix uteri were investigated histologically, and it was observed that the pregnant cervix uteri contained muscle content much more than in nonpregnant cervix, conversely collagen element in the pregnant cervix was less than that of the nonpregnant cervix. The pregnant cervix had more other content than in the control group. Such changes in proportion of structural component of the cervix during pregnancy were most remarkable at term. This findings conformed to those of Schwalm et al.⁷⁾, Dubranszky¹⁰⁾ and Strauss¹²⁾.

There exists a considerable literature on the proportion of structural composition in the cervix uteri, but little work has been done to study on significance of cervical muscle element which is less than collagen content. In previous studies contractility of the cervix was demonstrated by use of balloons³⁾, radiographies⁴⁾ or in vitro and cervical insufflation⁵⁾. Ichizo⁵⁾ reported that muscular resistance was called cervical spasm and that sphincter-like activity of the cervix was affected by administration of some drugs. On the other hand, Danforth²⁾ claimed that the contractile ability of the cervix was negligible when compared with that of the corpus. In our investigation muscle content in the cervix increased during early pregnancy. This finding conformed with those of Schwalm⁷⁾. These results apparently indicate that muscle fiber enlarges during early pregnancy. Except other element, no significant difference in the composition of the cervix between the early pregnant group

and the near term group was seen.

The structure and role of the connective tissue in the cervix have been observed by many investigators. In previous papers, Danforth¹³⁾ and Buckingham¹⁴⁾ described that the basic structure of the human cervix was mainly the connective tissue, of which the outstanding components was collagen.

Moreover their studies showed that during pregnancy and prior to labor, the collagen fibers appeared to be swollen and enlarged, but the integrity of the fiber bundles was not otherwise changed, and that the collagen fibers post partum were smaller and very highly branched, and they gave the impression of dissociation of the component fibrils one from another. Uneki¹⁵⁾ reported that collagen fiber bundles of the cervix became looser and separated more widely through gestation in the rats. In our investigation the percentage of collagen content decreased from 77% in nonpregnant cervix to 57% in near term. This finding was in agreement with Harkness's¹⁶⁾ report described that total volume of collagen increased as development of pregnancy, but its concentration declined because enlargement of cervical volume. It is clear that the result is closely concerned with dissociation of collagen fibers.

On the other hand, Danforth¹³⁾ suggested that the fundamental change in the connective tissue might concern the ground substance rather than the collagen itself. Therefore he reported that ground substance mass (evidenced by water concentrations) appeared to increase significantly during pregnancy, reaching a maximum at term and immediately after delivery. The ground substance is composed of mucopolysaccharides, plasma protein, noncollagenous protein, electrolyte and water. By histochemical method, Kon-do¹⁷⁾ described that the value of acid mucopolysaccharides in women during pregnancy was greater than in nonpregnant patients. Nakaya¹⁸⁾ investigated chemically that the value of hyaluronic acid was higher in early pregnancy and at term, then the value at term was highest of all groups. In our histological observation the ground substance during pregnancy appeared to be other element, which was higher than in nonpregnant group and the highest value of other

content was obtained from near term group.

By the rate of S^{35} uptake, Richard¹⁹⁾ observed that the rate of chondroitin sulfate synthesis increased near term and he suggested that alteration in the rate of chondroitin sulfate synthesis due to changes in the progesterone-estrogen ratio may be involved in the mechanism of cervical dilatation and effacement. It is accordingly considered that the changes in collagen and ground substance in the cervix uteri are concerned with the cervical ripening during pregnancy, and dilatation of the cervical canal in labor.

It was expected that the proportion of muscle content in the cervical incompetent group might indicate an intermediate value between that in the first trimester and that near term, but contrary to expectation, the proportion of muscle content in this group increased mostly all the groups. In other words, the value of collagen content decreased.

From this finding it appears that cervical incompetency has an abnormal proportion of structural composition of the cervix when it happen to become soft and swollen and dilate without any symptoms in the second trimester. In previous paper, Buckingham⁸⁾ described histologically the collagen-muscle ratio in clinically incompetent cervices, and he reported that the percentage of muscle in the cervical incompetent group was higher than in the control group, but there were some exceptions. Therefore, he suggested that the lack of correlation of cervical structure might be a factor in production of cervical incompetency. These findings seem to well coincide with our observation. In case report, Roddick²⁰⁾ pointed out that the muscle tissue of the incompetent cervix was abnormally abundant, and the connective tissue was abnormally scanty, and this disproportion was presumed to be the defect which prevented the cervix from carrying out its proper function. Danforth²¹⁾ has attempted to classify the cervical incompetent patient to three groups as follows :

The first group includes the cases in which the cervix is mechanically injured, this group conforms to opinion of Lash²²⁾. The second group includes the cases in which there is no injury and the cervical contours are nor-

mal, but the structure is defective, it is so called muscular cervix. In the third group there is no prior injury and the structure is normal, but the cervical barrier is rendered incompetent by premature triggering of factors normally producing softening, effacement and dilatability at term. Kondo¹⁷⁾ observed a remarkably high value of acid mucopolysaccharides in the cervical incompetent group, and suggested that acid mucopolysaccharides might play important roles in the ripening and dilatation of the cervix. In this series the value of other content in the second trimester with cervical incompetency, being concerned with value of ground substance was nearly similar to that of the first trimester. Based on these findings the following estimations are drawn : During early pregnancy changes of collagen fiber occur very slowly in the cervix, contrary ground substances change acceleratively near term, further such changes seem to result from various collagenases and estrogens increasing as development of pregnancy. Structural disproportion of the cervix may stimulate to render incompetent.

Summary

The cervical structural composition was investigated histologically by use of Hansen's modified stain method and histoplanimetric procedure from the pregnant women.

The value of muscle in the cervix during early pregnancy was greater than in the non-pregnant group. Conversely collagen content was less than that of the nonpregnant group. The pregnant cervix near term contained more other content than that of the first trimester.

Changes of collagen fiber in early pregnancy and changes of ground substances near term seem to be concerned with ripening of the cervix.

In all study groups the highest percentage of muscle of the cervix was obtained from the second trimester with cervical incompetency. These findings suggest that disproportion of structural composition of the cervix may be a factor in production of cervical incompetency.

References

- 1) Danforth, D. N.: The fibrous nature of the human cervix, and its relation to the isthmic segment in gravid and nongravid uteri. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 53: 541-561, 1947.
- 2) Danforth, D. N.: The distribution and functional activity of the cervical musculature. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 68: 1261-1271, 1954.
- 3) Nixon, W. C. W.: Uterine action, normal and abnormal. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 62: 964-984, 1951.
- 4) Youssef, A. F.: The uterine isthmus and its sphincter mechanism, a radiographic study. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 75: 1305-1319, 1958.
- 5) Ichijo, M. et al.: On the sphincter-like function of the uterine cervix during the pregnancy and labor. *Acta Obst. Gynec. Jpn.*, 13: 1213-1220, 1961.
- 6) Chalkley, H. W.: Method for the quantitative morphologic analysis of tissues. *J. Nat. Cancer Inst.*, 4: 47-53, 1943.
- 7) Schwalm, H. and Dubrausky, V.: The structure of the musculature of the human uterus-muscles and connective tissue. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 94: 391-404, 1966.
- 8) Buckingham, J. C. et al.: Collagen-muscle ratio in clinically normal and clinically incompetent cervixes. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 91: 232-237, 1965.
- 9) Hughesdon, P. E.: The fibromuscular structure of the cervix and its changes during pregnancy and labour. *J. Obstet. Gynec. Brit. Emp.*, 59: 763-776, 1952.
- 10) Dubrausky, V.: Wieviel Muskulatur enthält die Gebärmutter (korpus, cervix). *Geburtsh. u. Frauenheilk.*, 22: 1022-1026, 1962.
- 11) Duane, K. R. and Michael, N.: Histologic and chemical studies of the human cervix and uterus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 99: 466-469, 1967.
- 12) Strauss, G.: Histoplanimetrische Untersuchungen am menschlichen Uterus. *Arch. Gynäk.*, 207: 572-600, 1969.
- 13) Danforth, D. N. et al.: Connective tissue changes incident to cervical effacement. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 80: 939-945, 1960.
- 14) Buckingham, J. C. et al.: Connective tissue changes in the cervix during pregnancy and labor. *Annals New York Academy of Sciences* 97: 733-742, 1962.
- 15) Uneki, K.: Studies on the softening of the cervix during gestation. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.*, 29: 927-934, 1977.
- 16) Harkness, M. L. R. and Harkness, R. D.: Changes in the physical properties of the uterine cervix of the rat during pregnancy. *J. Physiol.*, 148: 524-547, 1959.
- 17) Kondo, T.: Histochemical studies on the human cervix uteri. *Nagoya Med. J.*, 17: 103-121, 1972.
- 18) Nakaya, T.: Studies on acid mucopolysaccharides in the human cervix during pregnancy. *Nagoya Med. J.*, 18: 296-319, 1973.
- 19) Richard, P. D.: Rate of chondroitin sulfate synthesis in the cervix during pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 95: 40-45, 1966.
- 20) Roddick, J. W. et al.: The muscular cervix—A cause of incompetency in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 17: 562-565, 1961.
- 21) Danforth, D. N. and Buckingham, J. C.: Cervical incompetence—A reevaluation. *Postgrad. Med.*, 32: 345-351, 1962.
- 22) Lash, A. F. and Lash, S. R.: Habitual abortion; The incompetent internal os of the cervix. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 59: 68-76, 1950.

人子官頸部の構成組織に関する研究

中西正美

愛知医科大学産婦人科学教室

性成熟非妊婦人、正常妊婦（初期、末期）および頸管不全症患者の子宮頸部についてヒストプラニオメーターをもちいてその組成を筋肉、コラーゲン、血管、その他の4成分に分け組織学的に研究を行ない、次の結果を得た。

非妊子宮頸の組織比には個人差を殆んど認めず、コラーゲンの占める割合は筋肉成分に比し明らかに優勢であった。その筋肉成分は子宮頸部の上方より下方に向うに従い減少を示した。子宮頸の前壁、側壁、後壁における組成比には差がなかった、また子宮頸中部前壁の組成比は頸全体の平均値と最も近似の値をとつたので Part 2. ではこの部を検索の対象とした。

妊娠初期には子宮頸は一段と筋肉成分の割合を増し、コラーゲン成分の減少を認めた。一方、妊娠末期にはその他の成分（基質を意味する）の著増を認め、これらの変化が頸部の成熟に大きく関与していると考えられる。

頸管不全症患者頸部の筋肉成分比は妊娠初期、末期に比し高値を示し、こうした頸部の組成の不均衡は頸管不全症発生の一つの因子であると推論される。

(受付: 54年7月27日)

頸管粘液における Lysozyme

Lysozyme in Cervical Mucus

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任：竹内正七教授）

須藤 寛 人 森 田 和 雄
Norihito SUDO Kazuo MORITA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Shoshichi Takeuchi)

原因不明不妊症患者の真の原因追求に興味を抱いている著者らは、頸管粘液におけるライソザイムに関して検討を加え、以下の結果と示唆を得た。

1) 頸管粘液のライソザイム含有量はほぼ20~25 μ g/ml（分布5~60 μ g/ml）であり、血清中より多量であった。2) 頸管上皮組織のライソザイム含有量は、卵管上皮組織の約5倍、子宮内膜、子宮筋層組織の約10倍であった。3) 1), 2) より頸管腺なかんづく頸管粘液中ライソザイムの静菌作用（non-specific defence mechanism）の重要性が示唆された。4) 原因不明不妊症婦人におけるライソザイムの分泌傾向はコントロール群と差はなかった。5) ライソザイムには精子凝集作用や精子不動化作用は有しないと判断された。6) 5) より頸管粘液中に稀れに認めうる精子凝集作用、精子不動作用は抗原抗体反応によると考えうる余地を残した。

緒 言

1922年 Fleming は種々の器官や組織の中に自然免疫の因子である物質を発見し、これを Lysozyme（ライソザイム）と名づけた¹⁾。本物質は β -Glucosamidase 又は Muramidase と別称される分子量約 14,000 の129個のアミノ酸残基よりなる polypeptide の加水分解酵素（Muramic acid と N-acetyl glucosamine を切断する物質）である²⁾。本物質は、グラム陽性群およびグラム陰性群の細菌に対して、静菌作用や溶菌作用を示すことが早くから知られていた。ヒトにおいては、唾液や涙などの外界に接する粘膜を洗う液体中に多量に含有されていて、生体を細菌からまもる非特異的抵抗性（non-specific defence mechanism）因子として重要視されている²⁾。

子宮頸管部は、子宮体部や卵管を無菌状態にしておくための大切な関門（Barrier）とみなされる。頸管腺より分泌される頸管粘液は、精子の上行性を助けるという作用の他に、各種細菌、マイコプラズマ、ウィルス等の上行感染を阻止している作用があると考えられる。

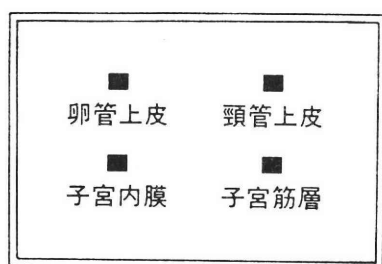
不妊症と免疫の関連性に興味を抱いている著者らは、①頸管粘液中にはどのくらいのライソザイムが含まれているか、②原因不明不妊症婦人患者に、ライソザイムの低分泌傾向や逆に高分泌傾向が認められるか、③ライソザイムが精子凝集作用や精子不動化作用を有しているかという点に焦点をしばり検討を加え、若干の興味ある知見を得たので報告する。

実験材料と実験方法

1. 頸管粘液検体：1978年に当科不妊外来を受診した患者で、原因不明不妊症と診断された婦人、夫が無精子症と診断された婦人およびその他の原因による不妊症婦人の排卵日頃の頸管粘液を採取した。無精子症不妊症の妻は健康婦人とみなしえることからコントロール群と考えて取扱った。これらの頸管粘液検体の一部について、①原液中にあるライソザイム量を測定し、②著者らの行う頸管粘液抽出法³⁾にて得られた頸管粘液抽出液（Soluble fraction）におけるライソザイム測定を行った。③-20°C に1週間、2週間および1カ月保存した頸管粘液抽出液のライソザイムを測定し、凍結融解の本物質へ

の影響を調べた。

2. 内性器組織検体：子宮筋腫で子宮および卵管全摘出術を受けた2症例の摘出物の一部を測定に供した。即ち、子宮頸管上皮、子宮内膜、卵管上皮、子宮筋層を長さ約5mm×5mm、厚さ1mmで切片をとり、重量を測定し、これらの検体をライソプレートの中に埋没させた。8時間後に溶菌直径を測定し、各組織についてmgあたりのライソザイム量を比較した(図1)。



■ 組織片 5mm×5mm、厚さ1mm
重量測定

図1 内性器組織中のライソザイム量の測定法

3. ライソザイム測定法：Osserman の lysoplate⁴⁾の変法である渡辺の方法⁵⁾を用いた。即ち、Micrococcus Lysodeikticus を基質とした1%アガロースプレートを作成し、直径2.5mmの穴をあけ、検体5μlを注入した。incubation は予備実験より4°C、8~12時間とした。ライソザイムのスタンダードとして Neuzym®（エーザイ）を溶解希釈して用いた。予備実験より、スタンダードの溶菌直径は、1μg/ml から50μg/mlの間では、片対数グラフ上、直線を示した。

4. ライソザイムの精子に対する影響：3名の健康男子から用手的に採取された精液を用いた。精子数を40×10⁶/mlにPBSで調整し、Neuzyme®の各種希釈液と37°Cでincubation後、精子凝集作用、精子不動化作用の有無を検索した。当科で行う微量血清精子凝集試験および微量血清精子不動化試験⁶⁾に準ずるマイクロテストとして検索した。

実験結果

1. 頸管粘液原液におけるライソザイム量

無精子症不妊症婦人(11名)の頸管粘液原液におけるライソザイム量は平均21.4±18.7μg/mlで、原因不明不妊症婦人(5名)での平均は24.6±16.9であった(図2)。最低は5μg/ml、最高は65μg/mlとかなりのばらつきがあり、この両群での有意差はなかった。不妊症婦人(10名)の血清中のライソザイム値は平均10.5±1.8μg/mlであった。

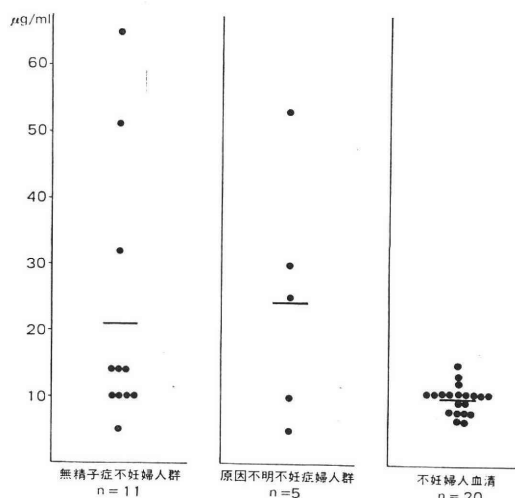


図2 頸管粘液原液および血清におけるライソザイム量

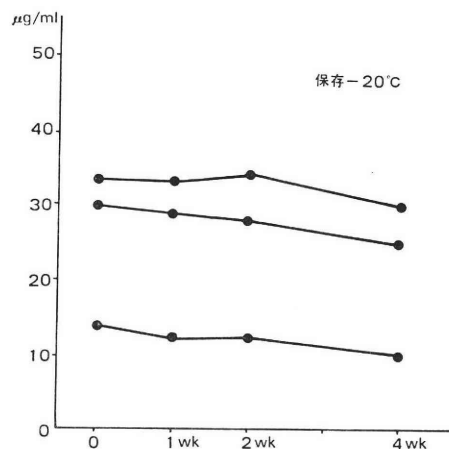


図3 凍結融解によるライソザイムの失活性

2. 凍結融解によるライソザイムの失活性

3検体の頸管粘液抽出液中におけるライソザイムを測定し、凍結融解後の測定値と比較したところ、2週間までの凍結では全く活性の低下は認められず、1カ月では若干の活性の低下が認められたに過ぎなかった(図3)。

3. 頸管粘液抽出液におけるライソザイム量

無精子症不妊婦人(15名)のライソザイム量は21.5±12.7μg/ml、原因不明不妊症婦人(13名)では24.1±12.5、その他の不妊症婦人(9名)では18.6±8.6であった(図4)。最低は5.0μg/mlで、最高は51μg/mlとばらつきが大きい、3群での統計上の有意差はなかった。

4. 内性器組織中のライソザイム量の比較

頸管上皮組織中のライソザイム量は10.8μg/ml、およ

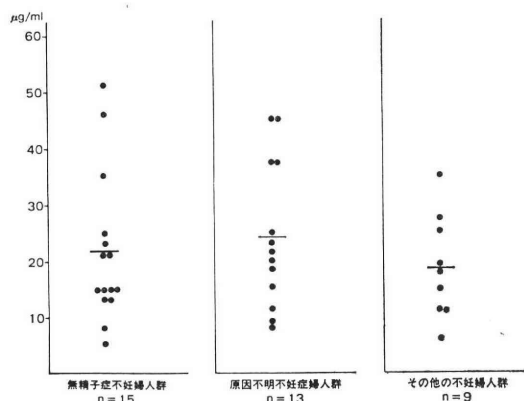


図4 頸管粘液抽出液におけるライソザイム量

表1 内性器組織中のライソザイム量

症 例	1	2
組 織		
頸管上皮	10.8	16.5
子宮内膜	0.9	0.9
子宮筋層	1.2	0.8
卵管上皮	2.9	2.8

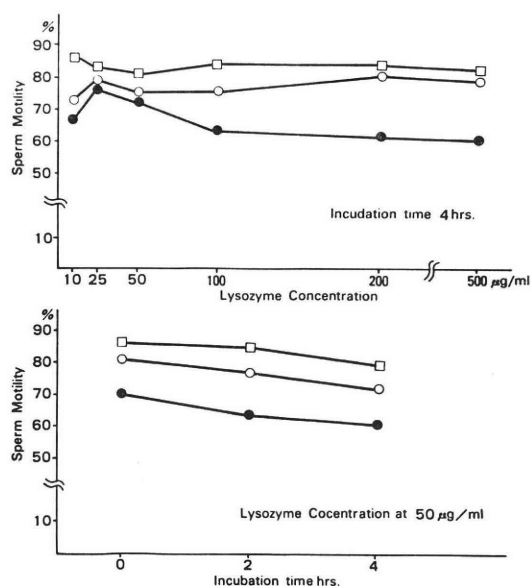
単位 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 

図5 Neuzyme® の精子運動率におよぼす影響

5. ライソザイムの精子凝集作用および精子不動化作用

ライソザイム濃度 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ~ $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ における精子凝集作用は全く認められなかった。また精子不動化作用もないことが分った (図5)。

考 察

ライソザイムに関する研究は、Fleming の発見以来、膨大な数にのぼる⁷⁾。抗生物質の発見以前には抗炎症剤として臨床応用もなされ、この流れは現在にまで至っている。最近の話題は①本物質に抗ウイルス作用⁷⁾、抗腫瘍作用⁸⁾の認められること、②免疫学上、白血球の貪食能を抗進させる機序の解明の参考となつたこと⁸⁾、③単球白血病の補助診断に用いられる可能性のあること⁹⁾などがあげられよう。

子宮頸管部、なかんずく頸管粘液は生理的状态において、常時外界からの異物に対して、防御的な働きを有しているだろうことは容易に考えられる。またこの防御機構の破綻が不妊症と関係していることも予想できる。しかるに、これらの点を考慮したうえで、頸管粘液中のライソザイムの研究は意外と少なく、わずかに Schumacher 一派の論文⁹⁾をみるにすぎないと思われる。しかし彼の論文では、本物質の不妊症成因との関連における検討はなされていないと言えよう。

ライソザイムの定量法としては3~4種の方法があるが、著者らはライソザイム活性を微量定量したいという目的で、Micrococcus Lysodeikticus を溶解した寒天平板にライソザイムを作用させて溶菌の度合を計る方法を採用した。

頸管粘液中の物質を全く正しく定量することは至難であろう。著者らが一応行いえた、頸管粘液原液検体における定量、および抽出操作を経て得た液体検体における定量の結果から、本物質は血清中濃度を越える多量であることが判明した。

頸管上皮、子宮内膜、子宮筋層、および卵管上皮の各組織中のライソザイム含有量の比較において、頸管上皮組織に最も多く含まれていることが分り、改めて、頸管腺の自然静菌作用の重要性が強調できた。

原因不明不妊症婦人群とコントロール群における量的比較においては特に有意な差は認められなかった。原因不明不妊症婦人群の中で、 $45 \mu\text{g}/\text{ml}$ の高分泌症例が認められたが、コントロール群においても同程度の症例が認められた。また異常低値を示す症例を発見することはできなかった。このことから、原因不明不妊症婦人には頸管部の防御機能が低下していて、感染症が起りやすく、そのために不妊症になっているという推察は成し難いと

び $16.8 \mu\text{g}/\text{ml}$ と最も高く、卵管上皮組織中の約5倍、子宮内膜や子宮筋組織の約10倍であることが分った (表1)。

いう示唆を得た。

頸管粘液における細菌等に対する防御機能を有する物質としては、ライソザイムの他にラクトフェリンが知られている⁹⁾。前者が細菌膜の電気的価電を変えることによって、後者は鉄イオンをキレートすることによって細菌の増殖を抑え、かつ溶菌的に作用しているらしい。頸管粘液における免疫学的防御機能、換言すれば Specific defence mechanism には Secretory IgA が主役をなしていると考えられる¹⁰⁾。この点に関する著者らのこれまでの検索においては、原因不明不妊症婦人の一部において、Secretory IgA の多量分泌症例があることを認めている¹¹⁾。それでは Secretory IgA の増加は何に起因したものであるか、各種細菌等に対する総抗体量として増加しているのか、あるいは精子局所抗体として増加しているのかは現在のところ不明である。

Schumacher の論文¹²⁾、1%ライソザイム液は精子を非特異的に凝集させたという写真入りの記載がなされている。原因不明不妊症患者の頸管粘液に in vitro で精子凝集作用のあることを初めて詳細に記載した著者らは¹³⁾、この点に興味を感じた。しかし、著者らの本実験結果では、生理的レベルの約10倍以上の濃度におけるライソザイム液中でも、精子凝集作用は認められなかった。ライソザイムの精子不動化作用も同様にして全く認められなかった。このことは、頸管粘液における精子凝集作用、精子不動化作用には特異的精子免疫が関与しているのではないかという、著者らの仮説を支持しつづける意味を持つものと思われた。

(なお本論文主旨は第24回日本不妊学会において発表した)。

文 献

- 1) Fleming, A.: On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc. Roy. Soc. B.*, 93: 306, 1922.
- 2) Zhukovskaya, N. A., Likina, T. N.: The problem of non-specific protective effect of Lysozyme, 日本語訳 Eisai Research Laboratories, 文献番号 B-00-01.
- 3) 須藤寛人, 森田和雄, 吉沢浩志, 高橋威, 竹内正七: 頸管粘液抽出液における精子不動化作用, 日不妊誌, 23: 51, 1978.
- 4) Osserman, E. F. and Lawlor, D. P.: Serum and urinary lysozyme in monocytic and monomicrocytic leukemia, *J. Exp. Med.* 124: 921, 1966.
- 5) 渡辺泰男: リゾチームの簡易測定法について, 新潟県衛生検査技師会誌, 13: 536, 1973.
- 6) 須藤寛人, 森田和雄, 吉沢浩志, 高橋威: 当科で行う精子抗体の検索手技について, 日産婦会

新潟地方部会会誌, 10: 63, 1977.

- 7) 辻 孝夫: 肝疾患に対するリゾチーム療法の考察, Eisai Research Laboratories, 文献番号 A-02-61.
- 8) Meldolesi, M. F.: Estratto Digliatti de II Symposium Internazionale sul Lisozima di Fleming, Milano, 3-5 April, 1959. 日本語訳 Eisai Research Laboratories, 文献番号 B-00-05.
- 9) Schumacher, G. F. B. and Pearl, M. J.: Muramidase in cervical secretions, proteins of the biological fluids, vol 16, Peeters, H.: ed., p. 525. Pergamon Press, Oxford, 1969.
- 10) Sinha, D. P., Holborow, E. J. and Nandakumar, V. C.: Local immunological factors as a possible cause of reduced sperm motility in the cervical mucus of infertile women. *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 84: 948, 1977.
- 11) 森田和雄, 須藤寛人, 吉沢浩志, 高橋 威, 竹内正七: 原因不明不妊症婦人の頸管粘液における局所免疫能の臨床的意義, 第31回日産婦会総会, 1979. 4. 3-6. 東京.
- 12) Schumacher, G. F. B.: Soluble proteins in cervical mucus. in the Biology of the cervix, Blandau, R. J. and Mogghissi, K., eds., University of Chicago Press, 1968.
- 13) Sudo, N., Shulman, S. and Stone, M. L.: Antibodies to spermatozoa IX. Spermagglutination phenomenon in cervical mucus in vitro: A possible cause of infertility, *Am. J. Obstet. Gynecol.* 129: 360, 1977.

Lysozyme in cervical mucus

Norihito Sudo and Kazuo Morita

Department of Obstetrics and Gynecology
Niigata University School of Medicine
(Director: Professor, Shoshichi Takeuchi)

The clear mid-cycle cervical mucus were obtained from patients visited to our infertility clinic in 1978. Lysozyme concentration was assayed in the fresh cervical mucus as well as in the extracted supernatants by modified Osserman's lysoplate method. The following results were obtained.

1) The average concentration of lysozyme in cervical mucus was 20-25 $\mu\text{g/ml}$ (ranged 5-60 $\mu\text{g/ml}$). This is much higher than the average value in sera. 2) The concentration of lysozyme in the cervical epithelial tissue was approximately 5 times higher than that in tubal epithelial tissue and 10 times higher than that in endometrial/myometrial tissue. 3) No significant difference of average lysozyme concentration was observed between a group of women with unexplained

infertility and a group of supposedly fertile women. 4) Commercially available lysozyme (Neuzyme®) showed no agglutinating or immobilizing effect to spermatozoa.

The obtained results suggest that lysozyme in genital tract especially in cervical mucus can be regarded as quite important being non-specific local defence mechanism in women. The abnormal hyper-secretory or hypo-secretory states which possibly could suggest the local occult

infection among infertile women, were not demonstrated in this limited study. The sperm agglutinating phenomenon in cervical mucus in vitro, reported by us previously, was probably not influenced by lysozyme. This study left a possibility to consider that the agglutinating activity could be due to the antigen-antibody reaction to spermatozoa.

(受付: 昭和54年10月18日)

水素ガス・クリアランス法によるうさぎ 卵管血流量の測定

Measurement of Blood-flow of the Rabbit Oviduct
by Hydrogen-Gas-Clearance Method

東邦大学医学部産婦人科学教室

宮 崎 憲

Ken MIYAZAKI

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

水素ガス・クリアランス法を用いて、うさぎ卵巣内および卵管、子宮筋層内の血流量を測定し、以下の成績を得た。

発情期においては卵巣血流量がもつとも大であり、以下、卵管膨大部、卵管峡部、子宮角上部、子宮角中部の順であつた。

交尾後24時間においては卵巣および卵管膨大部血流量は著明に増加したが、卵管峡部以下には有意の変動は認められなかつた。

交尾後72時間では卵巣、卵管膨大部血流量は減少の傾向を示し、卵管峡部血流量が著増して膨大部より大となつた。

交尾後120時間では卵巣、卵管の血流量は減少してほぼ発情期の状態に戻り、子宮角中部の血流量がやや増加を示した。

交尾後240時間においては子宮、とくに子宮角中部の血流量の増加が著明となつた。

以上の如く妊娠の成立過程においてうさぎ内性器血流量には微妙な局所的変動があることが証明されたが、とくに卵管膨大部と峡部の血流が交尾後の時間にともなつて異つた変動を示すことは従来全く注目されなかつた点であり、卵管機能解明への一つの手掛りになるものと思われる。

緒 言

排卵後の卵は卵管に摂取され子宮まで移送されるが、この間に卵管内においては受精および受精卵の初期分割が行われ、子宮内においては胞胚期に達した受精卵と母体組織との直接の interaction, すなわち着床が起こる。卵が子宮内に到達するには通常排卵後数日を要するが、この間卵輸送の原動力になるものは卵管の線毛運動と卵管壁の蠕動運動であり、また着床に到るまでの受精卵に対する栄養素や酸素の供給には卵管および子宮の分泌物が関与するものとされている^{1,10)}。したがって性器各部位における筋収縮や粘液分泌等の機能は排卵後の時間あ

るいは卵移動の経過に従つて微妙に変化するものと考えられ、それにともなつて各部の血流量にも変動を生ずることが予想されるが、これに関する詳細な研究はほとんど見られない。

今回水素ガス・クリアランス法を用いて雌うさぎ内性器血流量の変化を交尾後経的に測定し興味ある結果を得たが、本法は組織に径0.01 mmの細いセンサーを刺入し、水素ガスを吸入させるのみで血流量測定が可能で、生体に対する侵襲が極めて軽いことが特徴であり、すでに脳、心筋、腎、肝、脾、胎盤などで微小な組織レベルの血流量測定に用いられている。

実験対象および方法

ニュージーランドホワイト種の成熟雌うさぎを使用し、発情期群(13匹)、交尾後24時間群(9匹)、72時間群(7匹)、120時間群(6匹)、240時間群(6匹)の計6群41匹につき測定を行なった(図1)。

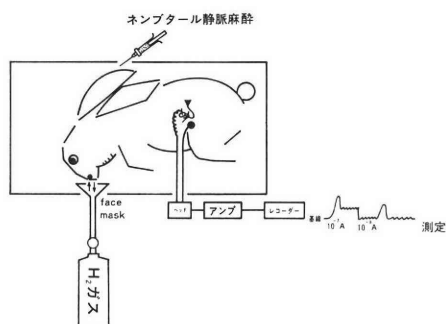


図1 実験配置図

ネンプタル2.5mg/kg 静注による麻酔後開腹して所定の各部位にセンサーを刺入し、呼吸数、心拍数、四肢麻痺、瞳孔散大などを参考にして全身状態が安定してから face mask により100%水素ガスを30秒間吸入させ、組織内の水素ガス濃度を測定する。吸入停止後の組織内水素ガス濃度の減衰曲線よりその半減時間 ($T_{1/2}$) を求め、Kety and Aukland⁽¹⁾の次式により血流量 (F) を算出した。

$$F = \frac{0.693}{T_{1/2}} - \text{ml/min/gr} \quad (1) \text{ 式}$$

吸入水素ガスとしてはヒト、イヌにおいて、5%あるいは10%水素ガスを用いている報告もあるが、予備実験によりうさぎの呼吸数、心拍数、血液性状に及ぼす影響を検討した結果、100%水素ガスを0.5l/minの流量で30秒吸入される方法を採用した。

センサーは径0.01mmの白金電極の中央に1mmの幅に白金黒処理を施したもので(写真1)、刺入部位は卵巣では卵巣間膜に近い卵巣門部(写真2)、卵管では

采より3cm内側(卵管膨大部)および子宮卵管接合部より3cm外側(卵管峡部)、子宮では子宮卵管接合部より1cm下方(子宮角上部)および5cm下方(子宮角中部)とした。卵管、子宮の刺入部は間膜附着の反対側とし、刺入の深さは約1mmである。不関電極は銀-塩化銀電極で腹直筋内に刺入した。測定装置はPHG 300型(エム・ティ技研製)、レコーダーは幅広2チャンネルレコーダー(大倉製)を用い、関電極への負荷電圧は0.1Vとした。

血流量測定後は、卵管血管の透徹標本作成のため日本光電製MPU-0.5型血圧トランスデューサーにて注入圧をモニターしつつ墨汁を腹大動脈に注入してから内性器を摘出し、flushing methodにより卵の存在を確認した。交尾後24時間群では卵はすべて卵管内より回収され、交尾後72時間群では一部子宮内にあるものもあったが、こ

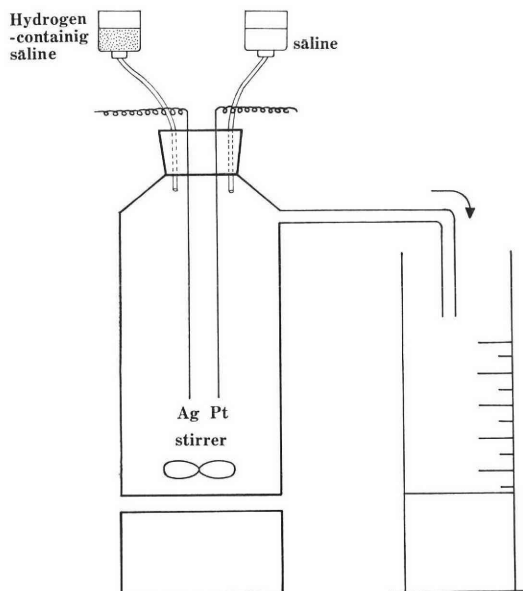


図2 Test Chamberの実験配置図

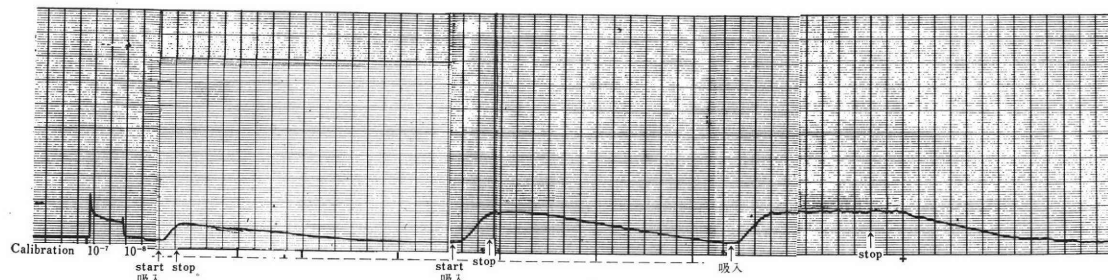


図3 卵管間膜における純水素ガス吸入時間と減衰曲線

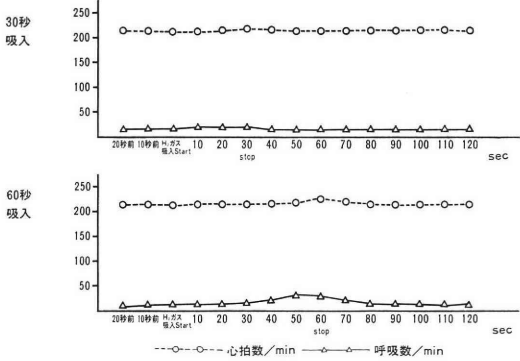


図 4 水素ガス吸入時 (0.5l/min) の呼吸数と心拍数の変化

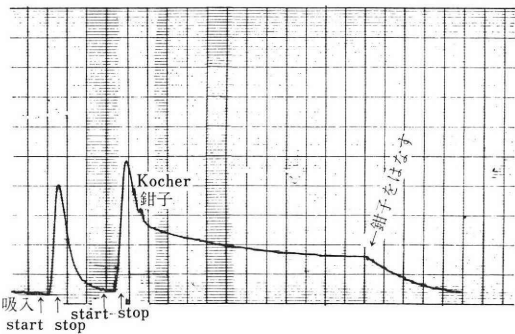


図 6 卵巣血流阻止実験

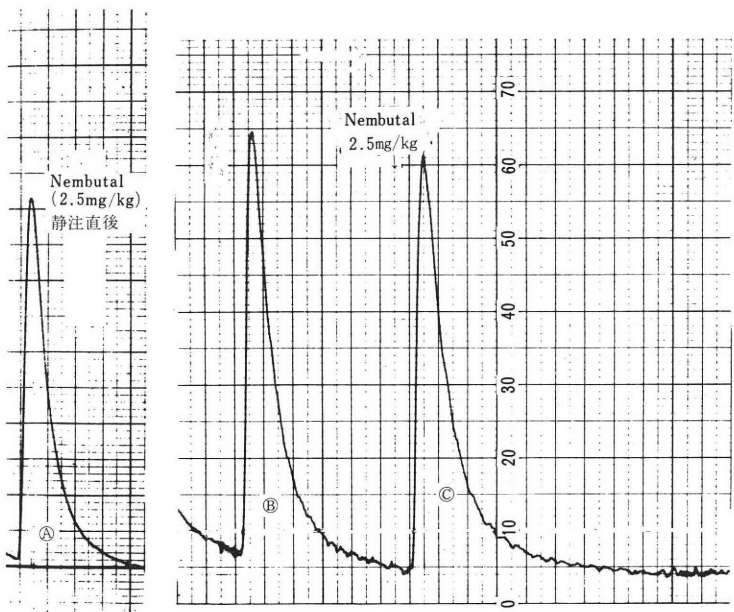


図 5 卵管血流量に対する麻酔剤の影響

- ① : Nembutal 静注直後
- ② : Nembutal 静注後30分
- ③ : Nembutal 再度静注直後

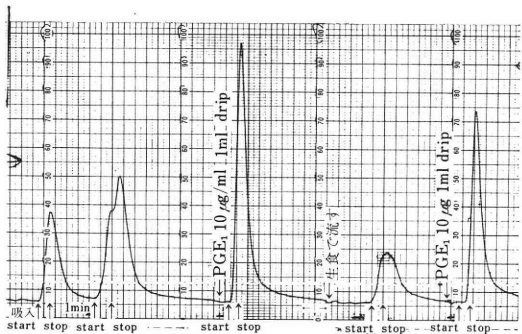


図 7 PG E₁ による卵管膨大部血流量の変化

れは対象から除外した。交尾後 120 時間群では全例子宮内より回収された。交尾後 240 時間群はすべて着床を完了し、子宮の念珠状腫大が認められた。

実験成績

1. 基礎実験

1) Test chamber による測定

内容が100ml になると自然に流出するような2孔式のtest chamber (図2) に電極を挿入し、水素ガスを溶解させた生食水で満たしておく。ついで magnet-stirrer で攪拌しつつ、流入口から水素ガスを含まない生食水を定

流量で注入し, chamber 内の水素ガス濃度を測定して行くとき液の流出とともに水素ガス濃度の減衰曲線が描かれる. その半減時間を測定して (1) 式により計算した値を流量として流出孔からの実際の流出量と比較したところ, 両者は極めてよく一致した. またうさぎ生血を用いても同様の結果を得た.

2) 水素ガス吸入時間

100%水素ガスを流量0.5l/min で30秒, 1分半および5分間吸入させた場合の組織内濃度を卵管間膜において測定したところ, 間膜組織内濃度は1分半でほぼ飽和に達するが, 3者はほぼ同様の減衰曲線を描き, 半減時間にも相異は認められなかった(図3). すなわち, 組織内水素濃度は必ずしも飽和に達しないでも, 血流量測定には差しつけないものと考えられた. また30秒および60秒の吸入例について呼吸数および心拍数を測定したところ, 30秒では anoxia による影響は全く見られなかったが, 60秒吸入ではともに軽度ながら増加が認められた(図4).

以上により 本実験では水素ガス0.5l/min の流量で吸入時間をすべて30秒とした.

3) 麻酔剤の影響

ネンプタール2.5mg/kg を30分間隔で2回静注し, 第1回注射の直後と, 第2回注射の直前と直後に卵管膨大部の血流量を測定したが, 変動は認められなかった(図5). この程度の量のネンプタール使用は性器の血流量には影響を与えないものと考えられる.

4) 血流阻止実験

水素ガス吸入後に卵巣組織内水素濃度を測定しつつ卵巣間膜をコッヘル鉗子にて挟圧し, 短時間後にこれを解除する実験を行ったところ, 急激に減衰しつつあった曲線は挟鉗後はほぼ平行状態を保ち, 挟鉗解除後に再び下降しはじめた(図6). 組織内水素濃度が血流量に応じて減少することは明らかである.

5) 薬剤投与による血流量の変化

末梢血管の弛緩あるいは収縮作用を有する薬剤を使用した際の卵管膨大部血流量の変化を測定した. 血管拡張薬である acetyl-choline 2 μ g/kg 静注および prostaglandin E₁, 10 μ g/ml 生食水の1ml局所滴下により血流量の増加が認められ(図7), 収縮薬である epinephrine 1 μ g/kg 静注および norepinephrine 5~10 μ g/kg 静注にて血流量の減少が認められたが, prostaglandin F_{2 α} 10 μ g/ml 生食水の1ml局所滴下では影響が認められなかった.

2. 内性器血流量

各実験群における内性器各部の血流量測定の結果は表1~5に示す如くである.

表1 発情期群の内性器血流量(単位 ml/min/gr)

部位 個体番号	卵 巣	膨大部	峽 部	子宮角上部	子宮角中部
1	2.57	1.65	1.20	0.69	
2	2.89	1.73	0.35	0.46	
3		2.31		1.08	
4		1.54		0.77	
5		1.39		0.70	
6	3.08	3.65	1.78	1.43	0.63
7	2.31	1.25	1.50	1.27	
8	2.80	1.73		1.16	0.46
9	2.95	3.47	0.55	0.69	1.39
10			1.38		0.68
11	2.17	2.20	1.23		0.59
12	2.15				
13	1.20	3.00			
Mean±SD	2.46±0.55	2.17±0.80	1.14±0.48	0.92±0.31	0.75±0.33

表2 交尾後24時間群 (単位 ml/min/gr)

部位 個体番号	卵 巣	膨大部	峽 部	子宮角上部	子宮角中部
14	5.05	4.05	0.30	0.52	
15	4.11	3.72		0.45	0.45
16	3.50	2.90	0.77		0.23
17	3.80		1.12		0.77
18		2.95	1.10		0.80
19	4.15	4.00		0.46	0.35
20		3.25	1.52		
21	4.00		1.35	1.52	
22	4.62	3.50	1.20	0.82	0.52
Mean±SD	4.24±0.49	3.47±0.47	1.05±0.37	0.75±0.41	0.52±0.20

表3 交尾後72時間群 (単位 ml/min/gr)

部位 個体番号	卵 巣	膨大部	峽 部	子宮角上部	子宮角中部
23	3.01		3.65	0.54	0.87
24	3.33	4.15	2.13	0.85	1.10
25	3.15		3.75		
26	2.27	2.89	3.75	0.32	0.16
27		1.10	1.60	0.85	
28	3.27	3.10	2.90	0.45	
29	3.00	2.50	2.85	0.52	0.85
Mean±SD	3.00±0.35	2.75±0.99	2.94±0.78	0.59±0.20	0.75±0.35

表4 交尾後120時間群 (単位 ml/min/gr)

部位 個体番号	卵 巣	膨大部	峽 部	子宮角上部	子宮角中部
30	1.52		1.32	0.71	1.24
31	2.70	2.04	2.15	1.87	0.87
32	2.20	2.31	1.03		0.75
33	4.00	3.01	3.08	0.58	0.82
34	0.90	1.82	0.90	0.60	0.98
35	1.50	2.20	1.50	0.85	1.20
Mean±SD	2.14±1.01	2.28±0.40	1.66±0.75	0.92±0.48	0.98±0.19

表5 交尾後240時間群 (単位 ml/min/gr)

部位 個体番号	卵 巣	膨大部	峽 部	子宮角上部	子宮角中部
36	3.50	4.46		1.05	2.07
37	3.00	2.60	2.20	1.20	1.95
38	2.77	2.00	1.00		2.30
39	1.20		1.03		1.30
40		1.90	0.80	0.70	1.50
41	2.10	2.05	1.50		
Mean±SD	2.52±0.80	2.60±0.96	1.30±0.50	0.98±0.21	1.82±0.37

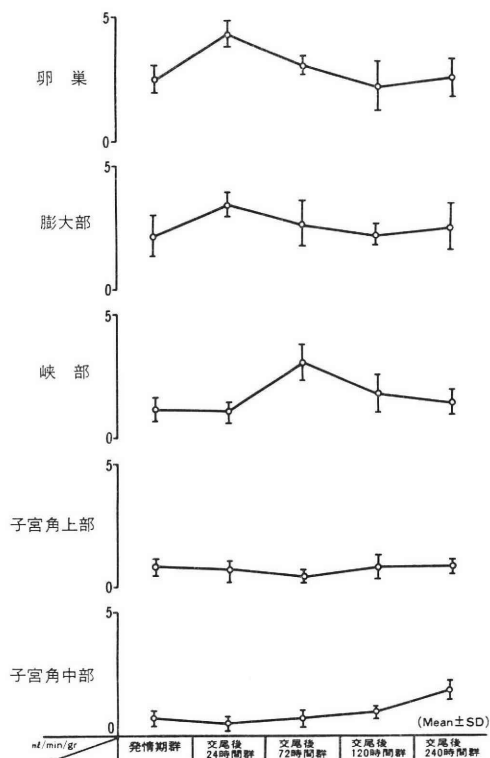


図8 着床前期における家兎内性器血流量の経時的変動

1) 発情期群 (表1)

卵巣血流量は $2.46 \pm 0.55 \text{ ml/min/gr}$ で最も大であり、以下卵管膨大部 2.17 ± 0.80 、卵管峡部 1.14 ± 0.48 、子宮角上部 0.92 ± 0.31 、子宮角中部 0.75 ± 0.33 であった。卵巣および膨大部血流量は峡部以下に比し有意差をもつて大である ($p < 0.01$)。

2) 交尾後24時間群 (表2)

卵巣 4.24 ± 0.49 、卵管膨大部 3.47 ± 0.47 、卵管峡部 1.05 ± 0.37 、子宮角上部 0.75 ± 0.41 、子宮角中部 0.52 ± 0.20 で、卵巣および卵管膨大部は発情期に比し著明な血流量の増加を示している ($p < 0.01$)。峡部以下は発情期よりやや減少を示すが有意な変動ではない。

3) 交尾後72時間群 (表3)

卵巣 3.00 ± 0.35 、卵管膨大部 2.75 ± 0.99 と24時間群よりやや低下しているが、発情期群に比べればなお高値を示している。卵管峡部においては 2.94 ± 0.78 と膨大部をやや上廻り卵巣に匹敵する血流量を示し、発情期群、24時間群より2.5倍以上の増加である ($p < 0.01$)。子宮角上部は24時間群よりさらに低下、子宮角中部はやや増加し発情期群と同様の値を示すが、いずれも卵巣、卵管に比し有意に低値である ($p < 0.01$)。

4) 交尾後120時間群 (表4)

卵巣 2.14 ± 1.01 、卵管膨大部 2.28 ± 0.40 と72時間群よりさらに低下し、発情期群との間に有意差を認めない。卵管峡部も 1.66 ± 0.75 と低下し、ふたたび膨大部より小となるが、なお発情期群、24時間群よりはやや高値である。子宮角上部は 0.92 ± 0.48 とやや増加して発情期群と同様の値を示し、子宮角中部も 0.98 ± 0.19 と前期に比し増加の傾向が見られる。

5) 交尾後240時間群 (表5)

卵巣 2.52 ± 0.80 、卵管膨大部 2.60 ± 0.96 と120時間群よりやや大であるが有意の変動ではない。卵管峡部は 1.30 ± 0.50 とさらに低下して発情期の値に近づき、子宮角上部は 0.98 ± 0.21 で120時間群と有意差を見ない。子宮角中部は 1.82 ± 0.37 と120時間群に比しても2倍近い著増を示し、子宮角上部との間にも有意の差が見られた ($p < 0.05$)。

6) 卵管以下の血流量の変動を各部位ごとにまとめて見ると、卵管膨大部では交尾24時間、峡部では72時間にピークを有し、子宮角上部は明瞭ではないが240時間後、子宮角中部では240時間後に明らかに最大値を示す。これは排卵後の卵の性管内移動状況との関連を示唆する興味ある所見である (図8)。

3. 卵管血管の形態的变化

卵管血流量の経時的変化の裏づけとして、卵管壁内微小血管の形態的变化を検討するため、墨汁注入標本作製し実体顕微鏡下で観察した。

発情期の卵管膨大部では外径の太い血管が網目状構造を形成し、さらにこれが微小な樹枝状血管に分枝して血管密度は大であった (写真3) が、峡部ではこれに比して極めて血管に乏しく、少数の微細血管が散在するのみであった (写真4)。

交尾後24時間群においては膨大部、峡部ともに発情期とほぼ同様の所見であった。

交尾後72時間群においては膨大部では発情期群とほぼ同様であったが、峡部においては発情期に比しはるかに血管が豊富となり、網目状を呈する太い血管、樹枝状の微小血管が存在して膨大部に近い形態を示していた (写真5)。

交尾後240時間群では膨大部、峡部ともに発情期群とほぼ同様の所見であった (写真6)。

考 察

血流量の測定法¹⁷⁾としては radioisotope で標識した microsphere の静注法、電磁血流計、主として四肢の血流量測定に使用される指尖脈波法、水素ガス・クリアランス法と同じく組織レベルでの血流量測定に用いられる

交叉熱電対法, また近年では超音波ドップラー法などが行われている. 今回著者が用いた水素ガス・クリアランス法は Kety¹⁶⁾, Aukland¹⁷⁾らにより開発されたもので, 組織レベルでの血流量測定には最適とされており, 本邦でも最近富永¹⁸⁾がイヌの骨格筋血流量測定に, 鈴木¹⁹⁾が悪性腫瘍の微小循環測定に, 森²⁰⁾が局所心筋血流量測定に應用しており, また臨床的にも筋ジストロフィーの血流量測定に用いられている.

本法の原理は次の如くである. 動物に水素ガスを吸入させ組織内の水素ガス濃度を適当に高めた後に水素の供給を止めると, 組織中の水素ガス濃度は組織血流量に応じて減少して行くが, この際の血流量 F と水素ガス濃度の半減に要する時間 $T_{1/2}$ の間には, Kety¹⁶⁾ により $F = \lambda \cdot \frac{0.693}{T_{1/2}} \text{ ml/min/gr}$ という理論式が成立し, $T_{1/2}$ を測定することにより F を算出できることが知られている. 但しこの式が成立するためには, 1) 組織内動脈血流入量と静脈血流出量とが等しい, 2) 組織が均質で, 3) ガスが組織内に均等に分布する, 4) ガスの組織内濃度と組織静脈側毛細血管内濃度の間に瞬間的に拡散平行状態が成立する, 5) ガスの動脈血による再循環がないという仮定が必要であるが, 水素ガスについては脂溶性で拡散性が極めて大であり, また水/水素ガス分配係数が 0.018 と低いことから, 少なくとも 3), 4), 5) の条件はほぼ満たされるとされている. また Aukland¹⁷⁾ により λ は水素ガスでは 1 としてよいとされている.

組織中の水素ガス濃度の測定は次の如く行われる. すなわち組織内に細い白金-白金黒電極を刺入して適当な負荷電圧を加えると, 電極表面では水素が電解され周囲組織との間に濃度勾配を生ずるため水素ガス分子の拡散により拡散電流が発生する. この電流は水素ガス濃度勾配に比例するが, 電極表面の水素濃度は 0 と見なしてよいので結局組織中の水素濃度に比例することになり, 水素供給停止後の電流を連続的に増幅記録することにより水素濃度の半減時間を知ることが出来る.

実際の測定はエム・ティ技研製水素ガスクリアランス式組織血流計 (PHG-300) を用いたが, この装置が理論通り水素ガス濃度に比例した電流を検出するかどうかを立木²¹⁾に準じて test chamber にて検討したところ, 電流減衰曲線より算出した流量と流量実測値はよく一致した. また生体内における卵巣間膜挟鉗実験で, 血流阻止後の卵巣内水素濃度が平行状態になり, 挟鉗解除後直ちにもとの減衰曲線を描いたこと, および血管拡張剤, 収縮剤の使用によりそれに伴う組織内血流量の増減が見られたことは本装置による測定値が生体内においても実際の血流量をよく反映することを示すものと考えられる.

内性器組織内血流量について Blasco²²⁾らは非妊発情

期家兎で RI 法 (⁸⁵St, ¹⁴¹Ce) による測定を行ない, 卵巣 1.40 ± 0.14 , 卵管 1.44 ± 0.13 , 子宮角部 0.75 ± 0.06 , 腔壁 $0.30 \pm 0.04 \text{ ml/min/gr}$ で左右差はなかったと述べている. 今回の成績と比較すると卵巣血流量はかなり小であり, 卵管, 子宮の血流量はそれぞれ今回の卵管峡部, 子宮角中部に相当している. Duncan¹³⁾は同じく RI 法により分娩期近くのうさぎ性器の血流量を測定し, 卵巣 4.6 ± 0.7 , 卵管 1.0 ± 0.3 , 子宮筋 $6.7 \pm 0.8 \text{ ml/min/gr}$ としており, 子宮筋層内血流には部位による一定の変化はなかったと述べている. 水素ガス・クリアランス法を用いた測定では Dickson¹²⁾が発情期¹⁾うさぎにおいて卵管 0.588 ml/min/gr , 子宮 0.584 ml/min/gr としており, これは今回の測定値よりかなり低い.

内性器組織内循環血液量を著者の如く交尾後の時間的経過とともに測定している報告は未だ見当たらないが, 性器各部における血流量が交尾後の時間によりそれぞれ特有な変化をすることは極めて興味深い. 卵巣および卵管膨大部はともに交尾後 24 時間目に最大値を示すが, これはおそらく排卵および卵摂取時における卵巣, 卵管膨大部の機能亢進を裏付けるものであろう. 排卵は交尾後約 11 時間で起こるので, その前後においては卵巣血流量はさらに大きいのではないかと考えられるが今後なお検討したい. 今回は卵管内における卵の存在位置までは確認していないが, Boiling¹⁹⁾はうさぎ卵が膨大部-峡部接合部までは速かに運ばれ, ここで 24~48 時間停滞し受精を行なうとしている. 交尾後 72 時間においては卵はすでにかかなり子宮内に到達しているとされており, 事実子宮内から回収される例も見られたが, 今回の 72 時間群としたものはこれを除いて卵管内のみから卵が回収されたものに限った. したがってこの群においては卵はおそらく大部分峡部に存在したものと思われるが, 峡部血流量はこの群で最も大であつた. 120 時間群では卵はすべて子宮内にあつたが着床は完了しておらず洗滌により容易に回収された. この時期においては卵巣, 卵管の血流量は既に減少しており, 一方子宮においてはやや増加の傾向が見られるが著明ではない. 着床の完了した 240 時間群になると子宮とくに子宮角中部において著明な血流量増加が見られた.

この様に卵の存在部位に応じて性器各部の血流量が増加する機序については明らかではないが, 卵管壁の血管形態を墨汁注入標本で観察した結果から, 卵管峡部においては 72 時間群で血流量増加を裏づけられると思われる血管の拡張, 血管密度の増加が見られた. ただし膨大部においてはこの関係は明らかでない. Bodkhe²³⁾, 齊藤²⁴⁾らは家兎卵管峡部の noradrenalin 量は非妊時には膨大部より高く, 排卵後 3~5 日頃までは減少するとしているが,

これにより卵管壁の運動性の低下、血管の拡張が起こり血流量の増加を来すという可能性も考えられる。ただし卵管の運動性については必ずしも一致した見解は得られておらず、Aref⁶⁾らは膨大部一峽部接合部において交尾後運動性が亢進するが次第に減弱して72時間後に安定すると述べているのに対し、貴家らは峽部において交尾後60~70時間で運動が活発になったとしており、是永¹⁾も摘出卵管峽部の自発運動が交尾後48時間で一旦減弱するが、その後恢復するといっている。一方 prostaglandin の卵管運動に及ぼす影響についても最近若干の興味ある文献^{10,11,20)}が見られ、今回の基礎実験において PGE₁ が明らかに卵管血流量を亢進させていることと関連して興味ある問題であり今後なお検討したい。

ま と め

水素ガス・クリアランス法によりうさぎ内性器の血流量を測定し、卵の存在部位において血流量が増加すると思われる興味ある成績を得た。Glass¹⁵⁾, Freese¹⁴⁾, Roy¹⁸⁾らは embryo-environmental interaction すなわち卵の存在が卵管内膜の活動性に影響を及ぼすという現象を指摘しているが、血流量に関しても同様の現象が存在するものと想定される。妊娠成立機序の解明、不妊原因の追求に関して今後生殖器組織内血流量測定が大きな意義を持つものと期待される。

本稿の要旨は第57回日産婦関東連合部会、第79回日不妊学会関東部会、第24回日不妊学会総会において発表した。

稿を終るに臨み、御指導御校閲いただいた木下佐教授、百瀬和夫助教授に感謝いたします。さらに御助言をいただいた第1生理学教室島居鎮夫教授、第1解剖学教室橋本長助教授、衛生学教室大本美称子助教授に感謝致します。尚、共同研究者であり、直接御指導下さいました黒沢忠彦講師に感謝します。また御協力をいただいた動物センター前原時司氏、藤枝志太病院病理市沢末広技師、エム・ティ技研清村孝一郎氏並びに御鞭撻を賜った産婦人科教室員各位に深謝致します。

文 献

- 1) 是永迪夫ら：排卵後のウサギ卵管輪状平滑筋の機能的変化，日不妊誌，24：175，1979。
- 2) 森 渥視ら：大動脈バルーンパンピング法の局所心筋血流に対する効果，日胸外会誌，27：1013，1979。
- 3) 斉藤真一ら：家兎卵管組織における Catecholamine の推移について，日不妊誌，24：70，1979。

- 4) 鈴木磨郎ら：悪性腫瘍と微小循環，脈管学誌，19：233，1979。
- 5) 富永詩郎ら：骨格筋血流量に対する血管拡張剤の動的評価，脈管学誌，18：29，1978。
- 6) Aref, I.: Utero-oviductal motility, egg transport and implantation in PG treated rabbit, *Biology of Reproduction* 14: 658, 1976。
- 7) Aukland, K.: Measurement of local blood flow with hydrogen gas, *Cir. Res.*, 14: 164, 1964。
- 8) Blasco, L.: Blood flow to the reproductive organs of the estrus rabbit, *Gynec. Invest.*, 4: 270, 1973。
- 9) Bodkhe, R. R. and Harper, M. J. K.: Change in the amount of adrenergic neurotransmitter in the genital tract of untreated rabbits given reserpine or iproniazid during the time of egg transport, *Biol. Reprod.*, 6: 288, 1972。
- 10) Coutinho, E. M. et al.: The influence of the ovarian steroids on the response of the human fallopian tubes to neuro-hypophyseal hormones in vivo., *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 108: 194, 1970。
- 11) Coutinho, E. M. et al.: Contractility of the Fallopian tube, *Gynec. Invest.*, 6: 146, 1975。
- 12) Dickson, W. M. et al.: Blood flow of the oviduct of nonpregnant rabbit, *Biol. Reprod.*, 10: 335, 1974。
- 13) Duncan, S. L. B.: The partition of uterine blood flow in the pregnant rabbit, *J. Physiol.*, 204: 421, 1969。
- 14) Freeze, U. E.: An autoradiographic investigation of epithelium-egg interaction in the mouse oviduct, *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 117: 364, 1970。
- 15) Glass, L. E.: in Hafez and Blandau, *The mammalian oviduct*, University of Chicago Press, Chicago, 1969。
- 16) Kety, S. S.: The theory and applications of the exchange of inert gas at the lungs and tissues, *Pharmacol. Rev.*, 3: 1, 1951。
- 17) Neutze, J. M. et al.: Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits, *Amer. J. Physiol.*, 215: 486, 1968。
- 18) Roy, S. K. Jr. et al.: Studies on physiology and biochemistry of the fallopian tube, utero-tubal junction, uterus, cervix, vagina, *Indian. J. Exp. Biol.* 10: 26: 1972。
- 19) Shermann, A. I.: *Pathways to conception*, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, U. S. A. Publisher, 1971. より引用
- 20) Spilman, C. H. et al.: Effect of PG on oviductal motility and egg transport, *Gynec. Invest.*, 6: 186, 1975。

Measurement of blood-flow of the rabbit oviduct by hydrogen-gas-clearance method

Ken Miyazaki

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

Blood flow of the internal reproductive organs in nonpregnant and pregnant rabbits were studied by hydrogen-gas-clearance method.

1) In nonpregnant rabbit, the ovarian blood flow was 2.46 ± 0.55 ml/min/g (mean $\pm$ SD), the ampullary 2.17 ± 0.80 , the isthmic 1.14 ± 0.48 , the cornual 0.92 ± 0.31 and the corporeal 0.75 ± 0.33 respectively.

2) In pregnant rabbit at 24 hrs. post coitum (p. c.), the ovarian blood flow was 4.24 ± 0.49 , the ampullary 3.47 ± 0.47 , the isthmic 1.05 ± 0.37 , the cornual 0.75 ± 0.41 , the corporeal 0.52 ± 0.20 ml/min/g.

3) At 72 hrs p. c., the ovarian blood flow 3.00 ± 0.35 , the ampullary 2.75 ± 0.99 , the isthmic 2.94 ± 0.78 , the corporeal 0.75 ± 0.35 ml/min/g.

4) At 120 hrs. p. c., the ovarian blood flow 2.14

± 1.01 , the ampullary 2.28 ± 0.40 , the isthmic 1.66 ± 0.75 , the cornual 0.92 ± 0.48 , the corporeal 0.98 ± 0.19 ml/min/g.

5) At 240 hrs. p. c., the ovarian blood flow 2.52 ± 0.80 , the ampullary 2.60 ± 0.96 , the isthmic 1.30 ± 0.50 , the cornual 0.98 ± 0.21 , the corporeal 1.82 ± 0.37 ml/min/g.

6) There were significant differences in blood flow between the ampulla and isthmus in both nonpregnant and pregnant rabbits at 24 hrs. p. c. There was also significant difference between the ovarian and ampullary flows in nonpregnant rabbit.

The blood flows of ovary and ampulla increased up to 24 hrs. p. c. during pregnancy, but no differences were noted between the ovary and ampulla at 72 hrs., 120 hrs. and 240 hrs. p. c.

The isthmic blood flow at 72 hrs. p. c. was greater than that of nonpregnancy, at 240 hrs. p. c.

These data suggest that distinct functional regions of oviduct exist and that the tubal blood flows are segmentally variable according to the gestational age, especially during preimplantation stage in which embryo-tubal interaction is operative.

(受付: 昭和54年10月30日)

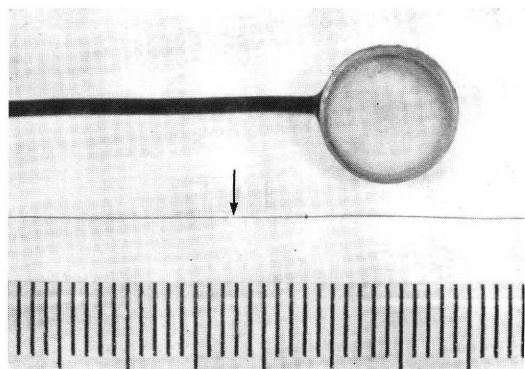


写真 1 センサーと不関電極
(スケール 1 mm)

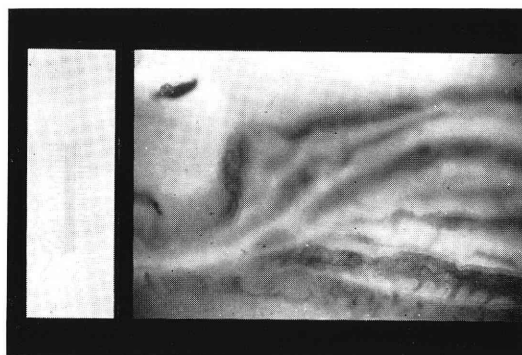


写真 4 発情時の峽部, ×40

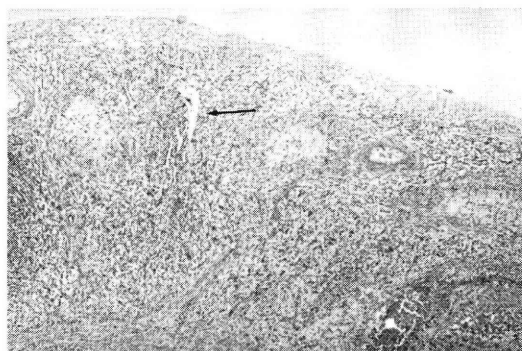


写真 2 卵巣のセンサー刺入部位

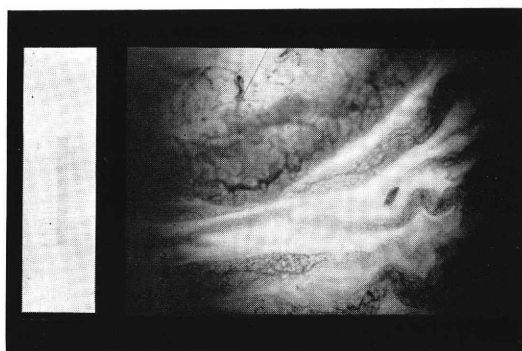


写真 5 交尾後72時間の峽部, ×40



写真 3 発情時の膨大部, ×40
(スケール 1/100mm)

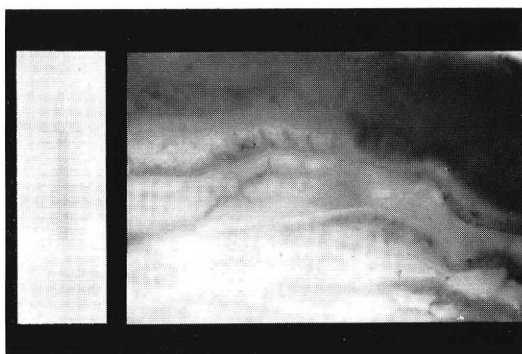


写真 6 交尾後 240 時間の峽部, ×40

胚—子宮内膜相関について

——とくに着床期周辺の子宮内膜組織に発現
する特異的蛋白——

Some Aspects of Nidus-Endometrial Relationships: with Special Reference to the Uterine Specific Proteins which Appear in the Endometrial Tissue at the Initial Stage of Implantation

東京慈恵会医科大学第1産婦人科学教室 (主任: 蜂屋祥一教授)

篠 塚 正 一

Masakazu SHINOZUKA

1st. Department of Obstetrics and Gynecology,
The Jikei University School of Medicine
(Director: Prof. Shoichi Hachiya)

卵分割制御機構解明の一助としてラット着床期周辺での子宮内膜組織の生化学的推移を SDS gel-electrophoresis により検討し、さらに、それらの血清蛋白画分との比較を行なった。

1) 実験動物は、Wistar-Imamichi 系雌性ラットを片側卵管結紮、交配、妊娠せしめ、D_{3.5} より D_{7.5} に至る血清、ならびに子宮内膜蛋白を得、これを SDS gel-electrophoresis に供した。

2) 非結紮側子宮、即ち妊娠側子宮の蛋白画分を結紮側子宮の画分と比較すると、D_{3.5}、D_{4.5} では差異を示していないが、D_{5.5}~D_{7.5} では異なった泳動パターンを示していた。

3) 非結紮子宮に発現する特異的蛋白画分は、同一個体より得られた血清蛋白画分とは明らかに異なっていた。

4) D_{5.5} における特異的蛋白画分の分子量は41,000. D_{6.5} では16,500. 22,000. 26,000. 38,000. 71,000. 89,000. 140,000. D_{7.5} では28,000. 43,000. 46,000. 82,000. 108,000. 138,000を示していた。

5) 以上の特異的蛋白画分は、内膜において新しく生成されたものと考えられ、さらに卵の発育に対応して異なった性質を示しており、このことは、これらの子宮内膜に発現している画分が卵の発育に段階的に重要な役割を果している と推察された。

結 言

ヒト成熟卵と精子の合胞、すなわち受精は卵管膨大部において成立し、さらに排卵7日目に至り子宮内腔に到達したのち着床が成立することはよく知られた事実であるが、この受精より着床までの7日間、受精卵は卵管分泌液、および子宮内分泌液によって灌流され数回の細胞

分裂ののち、胚盤胞 (もしくは胞胚) へと発育しつつ、ある種の内因性もしくは外因性の蛋白分解酵素の作用を受けて孵化と透明帯の除去ののち、着床準備状態ののちのつた内膜に対して attachment が開始され、続いて invasion が起こるとされている。

これら卵の発育過程において卵の発育を支配している因子としては、その一つとして内分泌因子が大きな意義

本文中においては次の略語を用いている。

U. F. : Uterine Fluid

U. S. P. : Uterine Specific Protein(s) in uterine tissue

S. P. : Specific Protein(s) in uterine fluid

Ra. : Rabbit

Mo. : Mouse

Ham. : Hamster

を果していることは疑いもない事実であるが、卵に対するより直接的な意味をもっているのは子宮内膜であり、またその分泌する子宮内分泌液 (uterine fluid, 以下 U. F. と略記) の果す機能を見逃すことは出来ないといえよう。

現在では、この U. F. についての概念はよく知られて、それに関する報告は枚挙にいとまがないが、卵の発育環境にこの U. F. が大きな意義を持つているとする 1965 年の Kunitake et al (rat)³⁴⁾ の報告をもって U. F. の概念の嚆矢とする。Kunitake 等は妊娠ラット血清ならびに U. F. の gel-electrophoresis により少なくとも 9 種の蛋白画分が存在し、かつまたこれら画分は血清中には存在しないと報じている。

近年 Tucker & Schultz (Ra)⁵⁶⁾等は抗家兎血清抗体を妊娠家兎より得、そのうちで血清とは異なつた少なくとも 5 種の物質の存在を U. F. 中に確認し、これらがおそらくは子宮内膜由来であろうとしている。このように妊娠時 U. F. 中に特異的に発現する画分を木下、木村³⁰⁾は specific protein (以下 S. P. と略記) と称しているが、このような卵の発育に直接的に関与されると考えられる U. F. 中の S. P. の由来を明らかにし、さらには卵分割制御機構、着床機構解明の追求の一助として木下等²⁹⁾の片側妊娠ラットを用いて行ない、着床期子宮内膜に発現する蛋白、特にそのうちでも特異的組織蛋白 (uterine specific protein 以下 U. S. P. と略記) を SDS gel-electrophoresis を用いて検出し得たので、この U. S. P. と U. F. 中の S. P. との関連性について考察した。

実験方法

I. Reagents

Tris (hydroxymethyl) aminomethane, Glycine, EDTA- Na_2 , Acrylamide (monomer), Bis-Acrylamide, Sodium Dodecyl Sulfate, Dithiothreitol (D. T. T.), N, N, N', N'-Tetramethyl-ethylenediamine (TEMED) は半井試薬, Ammonium Persulfate は関東化学, Coomassie Brilliant Blue (R-250) は Bio Rad Lab., Bromophenol Blue は Sigma より, gamma-globulin, Ovalbumin, Cytochrome C, Chymotripsinogen, Albumin, Myoglobin は Schwarzman, Albumin Stock Standard (bovine albumin 5 mg/ml) は第一化学薬品より入手した。

II. Stock solutions

0.04M Tris, 0.02M sodium acetate ならびに 1 mM EDTA- Na_2 を含む acetic phosphate buffer (pH 7.4) を緩衝原液とし、これを 10 倍希釈し電気泳動用緩衝液に

供した。

5% disc gel の作成には acrylamide 40mg, bis-acrylamide 1.5g を水にて溶解 100ml とし、この acrylamide 2.5ml に acetic phosphate buffer (pH 7.4) 原液 2.0ml, 10% SDS 0.2ml, 1.5% $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ 2.0ml, 0.5% TEMED 1.0ml, さらに H_2O 12.3ml を加えた。

sampling buffer は 0.4% SDS を含む 200mM Tris-HCl (pH 8.0) に bromophenol blue ならびに dithiothreitol (DTT) を溶解した。

III. 実験動物

Wistar-Imamichi 系雌性成熟処女ラット (体重 180~220gm) をクレア動物より入手、飼育した。飼育条件は室温 24°C, オリエンタル飼料および水を自由に摂取せしめ、日照時間は朝 7 時より 13 時間とした。性周期を陰スメアーにて確認ののち、右背部切開を加え右側子宮を牽出、血管損傷なきよう注意しつつ utero-tubal junction を 2 号絹糸またはテフロン糸にて結紮し、腹膜ならびに腹腔を縫合、約 2 週間後、陰スメアーにて排卵性周期を確認、発情前期または発情期夕刻、成熟雄ラットと同居、交尾せしめ、翌朝、陰栓ならびに陰スメアーによる腔内精子確認の日をもって妊娠第 1 日、D₁ (以下 D₁, D_{1.5}, D_{2.5} ... D_n と略記) とした。妊娠第 3 日の午後 (D_{3.5} とする) から D_{7.5} の片側結紮ラットを断頭、完

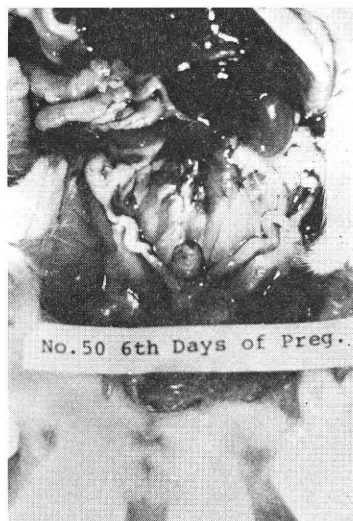


写真 1 Macroscopic finding of the pregnant (right) and non-pregnant (left) uteri on the 6th days of pregnancy.

全な瀉血により血清を採取、開腹すると、結紮側は妊娠していないが、処理を行なわなかつた左側子宮のみが妊娠状態を呈することになる (写真 1)。

a) 組織蛋白液の抽出と処理

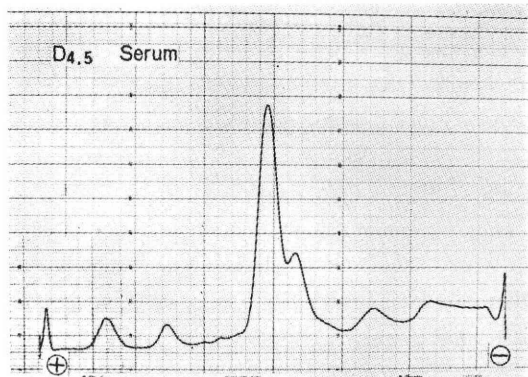


Fig. 1-a

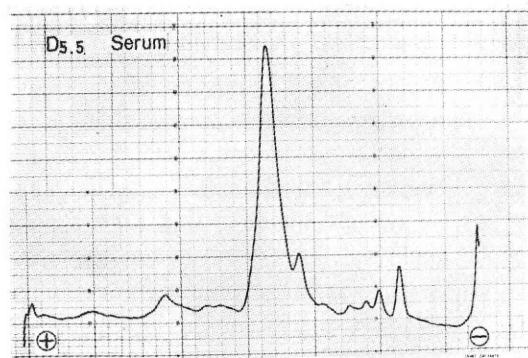


Fig. 1-b

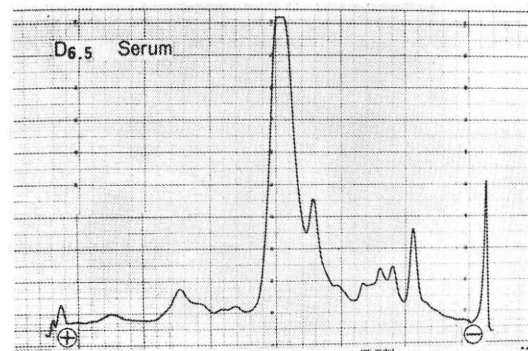


Fig. 1-c

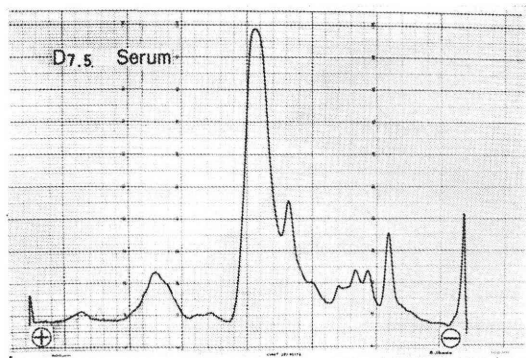


Fig. 1-d

Fig. 1 (a-d) SDS-gel electrophoretic patterns of serum obtained from the each day of pregnancy

を 2 ml の 200mM Tris-HCl をもって、ホモジネーション、さらに30秒間の超音波処理を行なった。

この組織ホモジネートを日立分離用超遠心器 rotater R. 65を用い、4°C、12,000×g の遠沈を行ない組織蛋白試料とし、使用前まで-20°C の氷冷下に保存した。

組織抽出液を二波長法による蛋白定量を行ない、また、Weber & Osborn⁵⁷⁾ならびに、Surani⁵⁸⁾の行なった方法の SDS polyacrylamide gel electrophoresis を行なった、すなわち、既に stock solution として作成されている40mM DTT ならびに BPB を含む 200mM Tris-HCl に protein solution を添加、60°C 30分間、または 95°C 5分間の incubation を行ない、sample 中の S-S 結合を離断せしめ、これを 5% polyacrylamide gel に apply した。その際、蛋白量は計算により 25~50μg を gel disc に apply した。gel 作成の方法は既に述べた通りである。

電気泳動は ATTO 社製、冷却型電気泳動装置に泳動カラム (5 mmφ×70mm) を装置、M. S. 社製定電圧電流装置 (Model 30-SR) をもって 6 μA/tube 250V の条件にて泳動を続け、泳動距離約 55mm の位置に達したことを tracking dye により確認し、通電中止、gel をカラムより取り出し、陽極の tracking dye の位置をロットリング用インキをもつて標識したのち 0.25% coomassie brilliant blue(R-250), 45% ethanol を含む 7% acetic acid の染色液にて染色を行なった。さらに 7% acetic acid にて脱色し、これらを島津社製、UV-190 double beam spectrophotometer に、同社製の gel scanner GSL-3 を装置、550nm の波長で scanning を行ない、記録紙に描記せしめ、gel 全長 (tracking dye の位置) に対する、それぞれの画分の R. f. を計算により求めた。

これらの D3.5, D4.5, D5.5, D6.5 ならびに D7.5 の結紮ならびに非結紮側の子宮を摘出した。

非妊娠子宮、すなわち結紮側子宮の一方の断端より 4°C、2 ml の 200mM Tris-HCl (pH 8.0) を注射器をもつて U. F. を回収、また妊娠側子宮においては卵の回収と U. F. の回収ののち、氷冷下において、間膜縁長軸に沿って子宮内腔を展開、濾紙をもつて過剰の緩衝液ならびに U. F. を除去、子宮内膜のみを採取し、それ

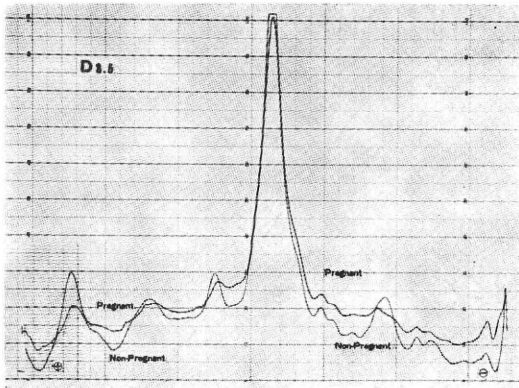


Fig. 2-a

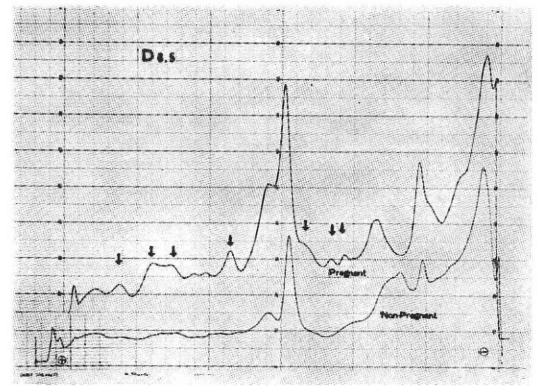


Fig. 2-d

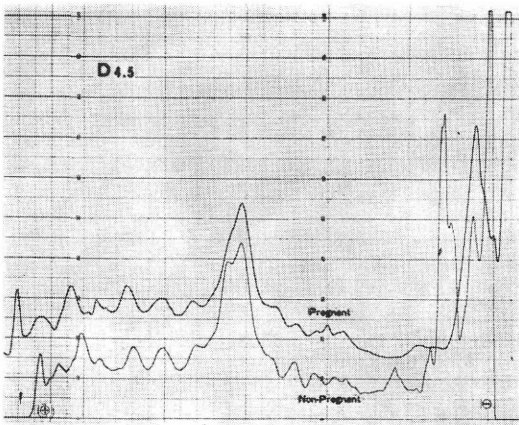


Fig. 2-b

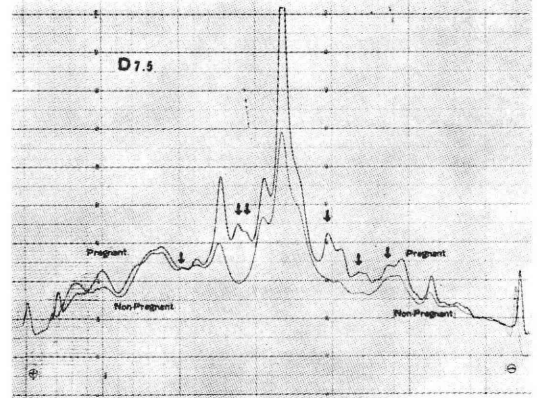


Fig. 2-e

Fig. 2 (a-e) SDS-gel electrophoretic patterns obtained from each day of pregnant endometrium.

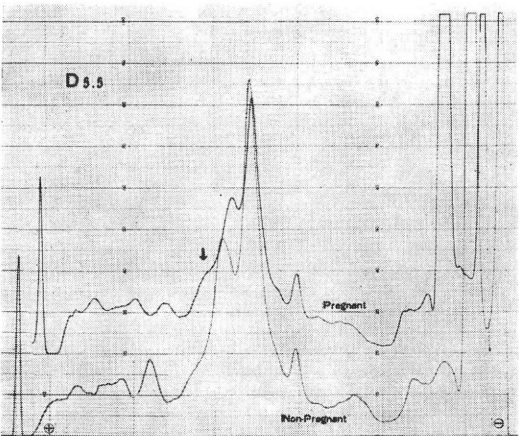


Fig. 2-c

b) 血清蛋白の処理

実験ラット断頭の際に得られた血液を1,500rpm, 10分間の遠沈により血清を得, これを200mM tris-HCl をもって150~200倍に希釈, Lowry 法により蛋白濃度を

決定し, これを前項に述べたと同様の方法で DTT 処理, 25 μ g の蛋白量を電気泳動に供した。

IV. 分子量の測定

組織ならびに血清を電気泳動法によつて得られた画分の分子量測定のため, Schwarzmann 社より入手せる標準蛋白 (albumin, γ -globulin, ovalbumin, cytochrome C, chymotrypsinogen, myoglobin) に DTT 処理を行ない, 5% gel に apply, 5% SDS gel-electrophoresis における calibration curve を得た。

結 果

I 5% gel による血清蛋白の経日的推移

Fig 1-a~1-d は 5% SDS gel-electrophoresis により得られた血清蛋白の densitogram である。D4.5~D7.5 (Fig 1-a~1-d) 至る densitogram はそれぞれ殆んど差異は認められない。

II 結紮側 (非妊娠側) と非結紮側 (妊娠側) 子宮組

組織蛋白の経日的推移

Fig 2-a~2-e は、各妊娠日数における妊娠側と非妊娠側子宮組織蛋白の densitogram である。D_{3.5}~D_{4.5} (Fig 2-a~2-b) では相互に差程の差異は明らかでなく、ほぼ同一のパターンを示している。D_{5.5} (Fig 2-c) の densitogram の比較では、妊娠側に albumin 画分よりの陽極側、R. f. 0.62の位置に軽度の shoulder が発現していることが明らかとなつてきている。D_{6.5} (Fig 2-d) では妊娠側と非妊娠側との差異は更に明らかとなつてきており、非妊娠側では認めることのない R. f. 0.27, 0.40, 0.46, 0.63, 0.77, 0.82, 0.90の7つの画分(矢印)が発現していることが明らかである。さらに、D_{7.5} (Fig 2-e)においては、特異的に発現する画分数(U. S. P)はR. f. 0.28, 0.36, 0.44, 0.60, 0.62, 0.73の6コに減少したにもかかわらず、それらは D_{5.5}に比較すると、より高分子の画分へと推移していることが確認された。

III U. S. P. と血清との densitogram の比較

血清と組織蛋白の電気泳動は全く同一条件で行なっているため、その中に含まれている蛋白は同じ条件で泳動されると考えられる。したがって、同一個体の前項Iの結果によつて得られた血清の densitogram とIIの結果によつて得られた妊娠子宮組織蛋白中 U. S. P. の比較検討を行なつたが、U. S. P. として検出された画分は血清中に存在しない画分であることを明らかとし得、このことは、U. S. P. が妊娠子宮内膜組織において生成されたものであるといえる。

IV 5% SDS-gel の検討

5% SDS-gel が cover し得る分子量の範囲を検討した。この際の gel も、血清、ならびに組織蛋白を行なつた gel と同一の条件で作成したものである。標準蛋白としては γ -globulin (M. W. : 160,000) albumin (M. W. : 62,000) chymotrypsinogen (M. W. : 25,700) myoglobin (M. W. : 17,200) cytochrome C (M. W. : 11,700) を泳動した。これらの標準蛋白泳動後の R. f. を算出し、それらの R. f. を横軸に、分子量を縦軸として、分子量に対する R. f. をプロットすると、M. W. : 160,000の γ -globulin より、M. W. : 11,700の cytochrome C に至る範囲において5% gel はほぼ直線関係を示すことが明らかであり (Fig. 3), 未知試料を泳動した場合、分子量160,000~11,700の間ではこの表を用いて、分子量の推定が可能であることが明らかとなつた。

V U. S. P. の分子量

Fig. 4 上段は既に述べたごとく、各妊娠日数において特異的に発現する U. S. P. の R. f. を示し、下段にはIVの項で述べた standard curve である。この表によつて、U. S. P. として発現した画分の分子量を求

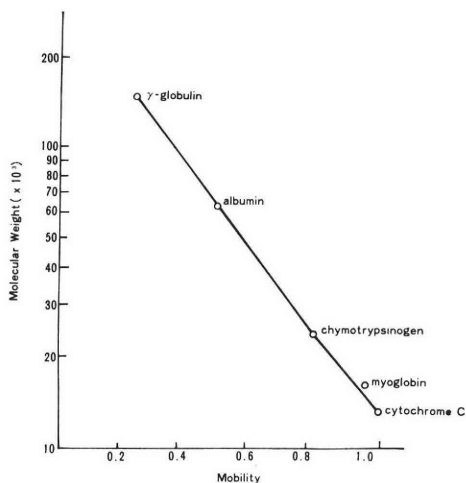


Fig. 3 The standard curve for SDS-GELS containing 5% acrylamide

めると、D_{3.5} から D_{4.5} の間では U. S. P. は認められなかつたが、D_{5.5} では M. W. : 41,000. D_{6.5} では M. W. : 16,500. 22,000. 26,000. 38,000. 71,000. 89,000. 140,000. D_{7.5} では M. W. : 28,000. 43,000. 46,000. 82,000. 108,000. 138,000 と各妊娠日数で異なつた分子量の画分が発現していた。すなわち、D_{5.5} では低分子であつたものが、D_{6.5}, D_{7.5} においては、U. S. P. はより高分子の物質として発現してきたとの事実が明らかとなつた。

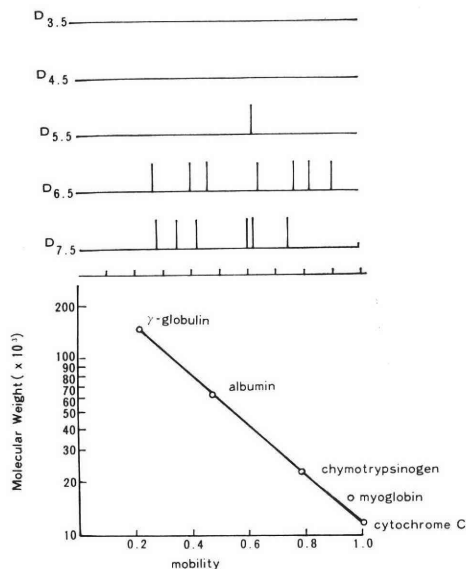


Fig. 4 Calibration of uterine specific proteins appeared in the each day of pregnancy

考 察

子宮内膜組織の妊娠時、とくに妊娠成立期周辺における形態的、機能的变化はきわめて多彩である。従来よりその代謝回転、酵素活性の推移等から分子生物学的レベルに至るまでの報告はきわめて多く、また形態的に、酵素組織化学的、超微形態的な観察も多い。

このうちでも脱落膜細胞の形成機転、ならびに、その意義に関する研究も多いが、その実験系の一つとして去勢ラットに対する steroid hormone 投与による実験、すなわち、偽妊娠状態もしくは、子宮内膜に pseudo-decidua を形成せしめ、これを脱落膜と同一の性格として解釈し報告している文献も多い。

木下他²⁹⁾、遠藤¹⁸⁾は、この偽脱落膜と脱落膜とは形態的な類似性を認め得たとしても、本質的に異質のものであることを片側妊娠ラットをもつて証明し、さらに、その核酸代謝、酵素活性の面より追求してきている。

彼等によれば、ラットの片側の卵管を結紮し、妊娠せしめた場合、当然、非結紮側の子宮には妊娠が成立するが、他方、結紮側では妊娠を認めないのみならず、それが、妊娠側子宮と同一内分泌環境にありながら脱落膜形成を認めないことより、妊娠成立に不可欠な脱落膜形成には内分泌的因子のみならず、それに加えて卵が子宮内膜に存在することが子宮内膜にある作用を及ぼした結果として脱落膜形成が誘発されたと報じている。山本等⁶⁰⁾もまた C¹⁴-Glycine を片側妊娠ラットに投与して、妊娠側に蛋白合成と合成率の亢進したことを報告し、また、最近、木下、木村³⁰⁾も同様、妊娠側子宮組織で産生される蛋白画分中に妊娠に伴う蛋白物質の存在を検出して

今回の成績は、卵分割制御機構と子宮内膜機能との関連性を解明する一つとして、そこで産生される特異的蛋白の変化を経日的に検討するとともに、U. F. ならびに、S. P. との関連性について検討したものである。

U. F. 中にみられる S. P. については Arthur & Daniel (Ra)⁴⁾、Beier (Ra)⁷⁾等により、blastokinin, uteroglobin という名称で研究され、これが多くの研究者により卵分割、着床に際して、何らかの制御因子であるとの報告も多い。また、rabbit にかぎらず、mouse⁴¹⁾、roe deer¹⁾、fur-seal¹⁵⁾、pig、rat⁵²⁾、等々の多くの種について S. P. の報告がある。

従来よりの報告の傾向について、木下、木村³⁰⁾は

- ① 血清中に認められず、子宮腔内に特異的に認められることを証明したもの^{47,49)}
- ② U. F. 画分のうち、経日的に増加する画分を証明し、これを S. P. としたものの^{34,47,54)}

③ S. P. が何らかの biological activity をもつことを証明したもの (denudation, 卵分割など)^{40,45,54)}

④ S. P. の生化学的性状 (ホルモン結合性⁵⁾、酵素活性⁴⁸⁾、分子量⁴²⁾など)

の4つに要約するとともに、さらに、

⑤ S. P. が子宮内膜において U. S. P. として産生され子宮腔に放出されること、

も着床の機序解明に大きな意義があることを提唱しているが、とくにこの⑤についての問題を中心として血清から子宮細胞への蛋白の入る機序と U. S. P. から U. F. への生成機序を実験結果とあわせて文献的考察を行ないたい。

1. 血清蛋白成分の子宮内腔への輸送

従来より U. F. と血清蛋白との比較、特に電気泳動法ならびに免疫電気泳動法による両者の検討が、Schwick (Ra)⁵⁰⁾、Kunitake et al. (Rat)³⁴⁾、Beier (Ra)⁶⁾、Iritani et al. (Ra)²⁶⁾、Kirchner (Ra)³¹⁾、Hamana & Hafez (Ra)²⁴⁾、Dies (Ra)¹⁶⁾ ならびに Surani (Rat)^{52,53,54,55)}等により、また Beier (Ra)¹⁰⁾ は子宮腔内への血清蛋白の選択的透過性ととともに S. P. の発現は子宮内膜分泌機能の亢進によるとしている。とくに U. F. 生成の最初の段階である血管より子宮内膜組織に入る機序については Cline et al. (Mo)¹³⁾、Shapiro (Ra)⁵¹⁾、Hanscom (Ra)²⁵⁾、Restal (Sheep)⁴⁶⁾、Iritani et al. (Ra)²⁶⁾ ならびに Oliphant (Ra)⁴³⁾ 等により明らかにされてきており、また、Martin (Mo)³⁹⁾、Pappas⁴⁴⁾、Hamana & Hafez (Ra)²⁴⁾、Kunitake (Rat)³⁴⁾等は、estradiol-17 β により子宮内血管の透過性の亢進することを報じている。

Aizawa & Meuller³⁾の報告したごとく、estrogen が細胞合成を亢進させることとあわせて考察すると、今回の実験結果において、血清と異なつた画分が子宮内膜組織に出現した事実は estrogen の作用により血管の透過性亢進→血清蛋白の子宮組織への透過→子宮内膜組織での蛋白合成とその蓄積という一連の過程が存在することを示唆するものである。

Finn & Martin (Mo)²¹⁾、Lundkvist (Rat)³⁷⁾等は estradiol-17 β と胚との作用により、子宮内膜組織、特に脱落膜細胞が形態的变化を示すということや、Kirchner (Ra)³²⁾が家兎の S. P. すなわち uteroglobin 抗体を用いて、蛍光抗体法によつて estrus phase の初期よりこの uteroglobin が内臓膜上皮において形成されはじめる過程を報じていることから、妊娠時にある種の物質が子宮内膜組織で形成されることは形態的にも既に裏付けられている。

Aitken (roe deer)¹⁾はこのように estrogen の作用を

受けて生成された蛋白は、さらに次の章で述べるとく、再び *estrogen* 作用のもとに子宮内膜上皮細胞の活発な分泌亢進作用の結果、子宮腔内に放出される過程を報告している。

2. U. S. P. の子宮内膜での産生機序

estrogen による子宮内膜での蛋白合成誘導作用と、その機序については既にその一部について触れたが、とくに妊娠時に子宮内膜に発現する U. F. ならびに S. P. の子宮内膜での生成機序については内分泌因子由来するとの多くの実験的事実が知られている。

Aitken(Mo)²⁾, Beier(Ra)⁹⁾, Pratt(Mo)⁴⁵⁾は *estradiol-17 β* を遅延着床動物に投与することにより、蛋白合成が促進され、U. F. 中に S. P. が発現することを報告している。

形態的裏付けとして Beier(Ra)⁹⁾, Finn & Martin(Mo)²¹⁾ は去勢マウスに対して同様に *estradiol-17 β* を投与することによって、腺の分泌が亢進すること、ならびにこの反応は *progesterone* 投与よりも強いことから、*estrogen* が S. P. の産生に関与すると報告した。

このような *estrogen* 説に対して Arthur & Daniel(Ra)⁴⁾は去勢家兎に胚を移植し、同時に *progesterone* を投与すると U. F. の産生の増大と同時に、その中の S. P. (uteroglobin) が生成されるとしている。

以上のように、*estrogen* もしくは *progesterone* いずれかの *steroid* により S. P. が誘導されるという説に対して、Feigelson et al.(Ra)¹⁹⁾, Surani(Rat)^{53,54,55)}等は *estrogen*, *progesterone* 双方の *steroid* に依存して産生されるとしている。

以上のごとく、S. P. の生成が単一のホルモンによるものか、または、2種のホルモン作用に依存するかについては対象とする動物の種により、またその研究方法により不明な部分が多いといえよう。

冒頭において述べたごとく、木下等(Rat)²⁹⁾, Lundkvist(Rat)³⁷⁾により、子宮内膜の形態変化は妊卵の有無に依存するという事実、さらには今回の実験により得られた知見は、U. F. そのものを検討したのではなく、子宮内膜における U. S. P. を検討したものであるが、少なくとも U. S. P. の産生には内分泌因子に加えて、妊卵の有無に深い依存性があることを示した結果といえよう。

3. 子宮組織からの U. S. P. の分泌機序

このように子宮組織で産生される物質 (U. S. P.) が、続いていかなる機序で子宮腔内へ S. P. として分泌されるのかについて文献的考察を加えてみたい。

Aitken(roe deer)¹⁾, Beier(Ra)¹⁰⁾は *estrogen* 作用により血管から子宮内膜組織を経由して内膜細胞から子

宮腔への *selective transport* が存在することを報じている。すでにその一部をのべたごとく家兎の S. P. (uteroglobin) は Gulyas & Krishnan(Ra)²²⁾および Johnson(Ra)²⁸⁾により精製されており、*anti-uteroglobin* を用いた蛍光抗体法によるその内膜での局在性をみると、主に子宮内膜上皮細胞に限局することが知られている。Kirchner(Ra)³²⁾もまた *estrus phase* の初期に特異的蛋白が内膜腺上皮細胞に認められ、D₃~D₄において最高に達し、その後は次第に *trophoblast* へと拡散する状態を観察している。

Beier(Ra)⁹⁾は家兎の *estrogenic phase* ではその内膜上皮は何らの分泌性を示さないが、妊娠の D₅~D₆にかけて、腺上皮刷子縁に多数の分泌顆粒が存在し、これが腺腔内に向かい細胞突起の形をとって U. F. として放出されることを報じ、さらにこの現象は *estrogen* 投与によりさらに強調されるが、また逆に過剰の *estrogen* 投与によって抑制されることをも報じている。

このような細胞内物質の分泌とその制御機構については現在まだ不明の部分が多いが、私見を加えるならば、*estrogen* 作用によって産生された物質が、さらに *estrogen* による子宮内膜細胞膜透過性の亢進という条件のもとで分子量60,000~80,000程度までの蛋白が分泌される可能性は十分推察される。

4. U. F. の生物学的性質

卵の分割、発育、孵化、透明帯の除去、着床という一連の *reproductive process* に関しては従来より幾多の報告があるが、U. F. ならびに S. P. もこれら *process* の中で重要な意義があると考えられている。

従来より卵の発育をつかさどる栄養源として、古くは Zondek (human) により *glycoprotein* の存在が、また Leatham et al.(Rat)³⁶⁾, Finn & Bradl(Mo)³⁰⁾, Finn & Martin(Mo)²¹⁾ならびに Mauer & Beier(Ra)⁴⁰⁾等により子宮内膜で産生される蛋白の存在が重要な意義を持つことが指摘されてきている。

Kirton & Hafez(Ra)³³⁾, Iritani et al.(Ra)²⁷⁾, Lewis & Ketchel(Ra)³⁵⁾等は U. F. が精子の *capacitation* に関連するとし、Surani(Rat)⁵²⁾は S. P. が卵の *denudation* と *attachment* に、さらに Lutwak-Mann(Ra)³⁸⁾は胚の代謝と、*expansion* に関与すると報じている。その後も Arthur & Daniel(Ra)⁴⁾, El-Banna & Daniel(Ra)¹⁷⁾, Finn & Martin(Mo)²¹⁾, Pratt(Mo)⁴⁵⁾等により種々の動物において、その生物学的意義は認められてきているが、さらに詳細な検討として、Weitlauf(Mo)⁵⁹⁾は U. F. が卵の *diapause* からの分裂に関連すること、Böving¹¹⁾, Roberts & Parker(Cow)⁴⁸⁾等は U. F. 中の *glycosidase activity*,

特に β -N-acetylglucosaminidase, β -N-acetylgalactosaminidase, α -fucosidase 等の活性が、卵の接着と関連性があること、このような glycoprotein の catabolic なメカニズムと lysosome 活性化との関連性についても追求されてきている。

この卵の活性化と卵の接着という一連の過程のうちでも、S. P. とその time specific な性格については多くの事実が知られている。

El-Banna & Daniel (Ra)¹⁷⁾は、ホルモン投与をした家兎子宮内膜の sephadex G-200 により得られた 6 種の画分を用いて、そのそれぞれを種々の段階の卵と培養し、観察した結果、彼等によつて blastokinin 又は、uteroglobin と称せられる S. P. は、これがすべての時期の卵に対して、DNA 合成促進作用を示すことを報告しているが、特に time specific effect の点については論じてはいなかった。これに対して、Hall, et al (Ham)²³⁾は糖蛋白の一種と考えられる S. P. を経目的に gel-electrophoresis により検討し、D₂ において発現した S. P. は D₄ においてはより高分子の物質に変化してくるとし、Tucker & Schlutz (Ra)⁵⁶⁾は、このような S. P. が一種の polypeptide であり卵分割の stage によつてその生物学的、生化学的性質が異なるとしている。Petzoldt (Ra) は pH や、Na, K, Ca. 等の電解質の経目的変化を報じている。

Lutwak-Mann (Ra)³⁸⁾や Kirchner (Ra)³²⁾は小分子物質の同様の推移を証明している。

今回の結果において、D_{7.5} に発現する U. S. P. はこの時期のみ特異的に発現しており、D_{6.5} とは異なる分子量の画分が認められた。妊娠日数を追つて観察すると、経目的に画分数も増加し、また大きな分子量へと推移していく過程が存在していた。

このように子宮内の代謝相が妊娠早期、とくに着床期周辺において変化するという事実は、rabbit^{7,12,14,40,56)}, mouse⁴¹⁾, fur-seal¹⁵⁾, pig, rat, dog 等において報じられているが、このように経目的に推移する U. F. 中の S. P. の性格はどのような意味を有するのであろうか。

Mauer & Beier (Ra)⁴⁰⁾は *in vitro* にて D₆ より得られた未分画の U. F. を 8-cell stage の卵に加えても発育しないにもかかわらず、morulae に対して同様の条件で培養を行なうと、やや発育は遅延するが、胞胚まで分裂することを報告している。遅延着床動物に対する estrogen の投与で静止状態にあった卵を活性化させることも、Weitlauf (Rat & Mo)⁵⁸⁾, Aitken (roe deer)¹¹⁾により知られている。Surani (Rat)⁵²⁾は遅延着床ラットを用いて progesterone 投与期間中、卵100-cell stage まで分裂と発育が進行するにもかかわらず、その後

estrogen の投与がなければ卵の分裂が誘発されない事実を報告している。同様の結果は Roberts & Parker (Cow)⁴⁷⁾によつても得られている。

Weitlauf (Mo)⁵⁹⁾は、遅延着床ラット中の U. F. 画分中には卵分割抑制物質の存在を示唆する報告をしている。

卵分割制御機構に関しては不明な点が多いが、文献的考察ならびに今回の結果とをあわせて考えると、子宮内膜と卵の代謝の同調性が存在することが確かめられた。

ま と め

今回の研究は U. F. の生物学的、生化学的性格を検討する前段階として、U. F. の由来を子宮内膜と血中蛋白中に存在する画分を比較することにより検討したものであるが、血中に存在しない蛋白が、子宮内膜組織蛋白中に発現したという事実は、それらの蛋白が、卵ならびに内分泌的環境を受けて内膜細胞で U. S. P. として産生されたという事実を証明したものであり、かつまた、それらが経目的推移を示していることは、それら U. S. P. が卵の発育段階に応じて性格を変え、さらに次の卵の発育に影響を及ぼしていることを証明しているといえよう。

しかしながら、このように産生された U. S. P. が U. F. として子宮内膜にどのような機序で放出されるかについては不明な点が多い。もとより、胚一内膜の相互関係は、相互の相互作用により刻々と変化するものと考えられるが、着床前には卵の発育は子宮内分泌液により灌流され、またそれに依存している状態であることに反し、着床後の卵は子宮内膜とより密接な相互関係を形成させるといえるが、これらの問題は U. S. P. の研究を通じて今後の課題としたい。

結 論

U. F. ならびにその画分に存在する S. P. の由来を追求する目的で、片側妊娠ラットを実験モデルとして用い、次の結論を得た。

1. 血清蛋白ならびに子宮内膜組織蛋白を分画し比較した結果、血清とは異なつた蛋白画分が U. S. P. として子宮内膜蛋白中に存在することが確認された。このことはまた、U. S. P. が子宮組織において産生されることを推察させた。

2. U. S. P. 画分は従来より考えられているごとく、単一の画分ではなく、また、妊娠の進行にともない次第に多くの高分子の画分へと推移してくる過程が明らかとなつた。

3. U. S. P. の生物学的意義は不明であるが、その

画分の経日的推移より考察すると、卵の発育段階に応じて生物学的に異なった作用機序を段階的に持つものと推察された。

稿を終るに臨み、本研究を終始御指導、御校閲を賜わりました蜂屋祥一主任教授ならびに直接御指導いただきました木下英夫講師に深甚の謝意を表します。

なお本論文の要旨は第24回不妊学会総会において発表した。

文 献

- 1) Aitken, R. J.: Delayed implantation in roe deer. *J. Reprod. Fert.*, 39: 225-233, 1974.
- 2) Aitken, R. J.: Changes in the protein content of mouse uterine flushings during normal pregnancy and delayed implantation, and after ovariectomy and oestradiol administration. *J. Reprod. Fert.*, 50: 29-36, 1977.
- 3) Aizawa, Y. & Meuller, G. G.: The effect in vivo and in vitro of estrogens on lipid synthesis in the rat uterus. *J. Biol. Chem.*, 236: 381-389, 1961.
- 4) Arthur, A. T. & Daniel, J. C. Jr.: Progesterone regulation of blastokinin production and maintenance of rabbit blastocysts transferred into uteri of castrated recipients. *Fertil. Steril.*, 23: 115-121, 1972.
- 5) Arthur, A. T. et al.: Steroid binding to blastokinin. *Fertil. Steril.*, 23: 85-92, 1972.
- 6) Beier, H. M.: Veränderungen am Proteinmuster des Uterus bei dessen Ernährungsfunktion für die Blastocyste des Kaninchens. *Verh. dt. Zool. Ges.* 31: 139-143, 1967.
- 7) Beier, H. M.: Uteroglobulin: a hormone-sensitive endometrial protein involved in blastocyst development. *Biochem. Biophys. Acta.*, 160: 289-295, 1968.
- 8) Beier, H. M.: Protein patterns of endometrial secretion in the rabbit in: *Ovo-Implantation, Human gonadotropins and prolactin*, p. 157, eds. Hubiont, P. O., Leroy, F. Boby, C. and Leleux, P., Karger, Basel, 1970.
- 9) Beier, H. M.: Oviductal and uterine fluids. *J. Reprod. Fert.*, 37: 221-237, 1974.
- 10) Beier, H. M. et al.: Endometrial secretion and early mammalian development. in: 21st. *Coll. Ges. Biol. Chem. Mosbach*, p. 264, Eds. Gibian, H. and Plotz, E. J. Springer Verlag, Berlin, 1970.
- 11) Böving, B. G.: Implantation mechanisms, in *Mechanisms concerned with conception* p. 321, ed. Hartman G. G., Pergamon Press, N. Y. 1963.
- 12) Bryan, D. C. and Daniel, J. C.: Difference in electrophoretic mobility between the albumin of rabbit uterine fluid and serum albumin. *Fertil. Steril.* 23: 81-84, 1972.
- 13) Cline, E. M. et al.: Hormonal-mediated oviductal influence on mouse embryo development. *Fertil. Steril.*, 28: 766-771, 1977.
- 14) Daniel, J. C.: Comparison of electrophoretic patterns of uterine fluid from rabbits and mammals having delayed implantation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 24: 297-299, 1968.
- 15) Daniel, J. C.: Blastokinin in the northern fur seal. *Fertil. Steril.*, 23: 78-84, 1972.
- 16) Dies, R.: Hormonale Beeinflussung des Sekretproteinmusters und der Keimesentwicklung im Genitaltrakt von *Oryctolagus Cuniculus*. *Naturwiss. Diss.*, Marburg, 1972.
- 17) El-Banna, A. A. & Daniel, J. C.: The effect of protein fractions from rabbit uterine fluids on embryo growth and uptake of nucleic acid and protein precursors. *Fertil. Steril.* 23: 105-114, 1972.
- 18) 遠藤 守: 胞胚の子宮組織に及ぼす作用について—一片側妊娠ラットを実験モデルとして—(Some informations from the blastocyst to the endometrial cell), *日不妊誌*, 23(4): 426-434, 1978.
- 19) Feigelson, M. et al.: Reproductive tract fluid proteins and their hormonal control. *Anal. N. Y. Acad. Sci.*, 286: 273-286, 1977.
- 20) Finn, C. A. and Bredl, J. C. S.: Studies on the development of the implantation in the mouse uterus: Influence of actinomycin D. *J. Reprod. Fert.*, 34: 247-253, 1973.
- 21) Finn, C. A. Martin, L.: Hormonal control of the secretion of the endometrial glands in the mouse. *J. Endocr.*, 71: 273-274, 1976.
- 22) Gulyas, B. J. & Krishnan, R. S.: The biology of the blastocyst, p. 261 ed. Blandau, R. J. The University Press, Chicago and London, 1971.
- 23) Hall, J. L. et al.: Hormonal dependence of cyclic patterns in hamster uterine fluid proteins. *Biol. Reprod.*, 17: 738-744, 1977.
- 24) Hamana, K. & Hafez, E. S. E.: Disc electrophoretic patterns of uteroglobulin and serum proteins in rabbit blasocoelic fluid. *J. Reprod. Fert.*, 21: 555-558, 1970.
- 25) Hanscom, D. R. & Oliphant, G.: Hormonal regulation of incorporation of ^{35}S into macromolecules of oviduct fluid. *Biol. Reprod.*, 14: 599-604, 1976.
- 26) Iritani, A. et al.: Secretion rates and chemical composition of oviduct and uterine fluids in rabbits. *J. Ani. Sci.* 33: 829-835, 1969.
- 27) Iritani, A. et al.: The effect of whole dialysed and heated genital tract fluids on re-

- spiration of rabbit and ram spermatozoa. Biol. Reprod., 1 : 77-82, 1969.
- 28) Johnson, M. H. : Immunology in obstetrics and gynecology. eds. Centaro, A & Carretti, N. (Excerpta Medica, Amsterdam) p 123, 1974.
- 29) 木下他 : 着床期周辺における胞胚の子宮内膜間質細胞に及ぼす作用—片側妊娠ラットを実験モデルとして—, 不妊会誌, 22 : 67-77, 1977.
- 30) 木下, 木村 : 着床期周辺において子宮組織で産出される特異的蛋白について—Uterine Fluidとの関連性—, 医学のあゆみ, 110 : 92-95, 1979.
- 31) Kirchner, C. : Untersuchungen an uterus-spezifischen Glycoprotein während der frühen Gravidität des Kaninchens *Oryctolagus Cuniculus*. Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org. 164 : 97-103, 1969.
- 32) Kirchner, C. : Immune histologic studies on the synthesis of a uterine specific protein in the rabbit and its passage through the blastocyst coverings. Fertil. Steril., 23 : 131-136, 1972.
- 33) Kirton, K. T. & Hafez, H. D. : Sperm capacitation by uterine fluid or beta amylase *in vitro*. Sci. N. Y. 150 : 618-619, 1965.
- 34) Kunitake, G. M. et al. : Studies on uterine fluid I. Disc electrophoretic and disc-gel Ouchterlony analyses of rat uterine fluid, Fertil. Steril., 16 : 120-124, 1965.
- 35) Lewis, B. K. & Ketchel, M. M. : Effects of female reproductive tract secretions on rabbit sperm. 3. Acrosomal enzyme changes on related to capacitation. Proc.Soc.Exp.Biol. Med., 143 : 540-544, 1973.
- 36) Leatham, J. H. et al. : Protein nutrition and the biochemical composition of the uterus. Fertil. Steril., 19 : 206-212, 1965.
- 37) Lundkvist, O. : Ultrastructural studies of the endometrial stromal cells in rats during estradiol-induced implantation after an experimental delay. Biol. Reprod., 18 : 306-316, 1978.
- 38) Lutwak-Mann, C. et al. : Blastocyst-uterine relationships; uptake of radioactive ions by the early rabbit embryo and its environment. J. Reprod. Fertil., 1 : 169-195, 1960.
- 39) Martin, L. : Involvement of the uterine blood vessels in the refractory state of the uterine stroma which follows oestrogen stimulation in progesterone-treated mice. J. Endocr., 56 : 309-314, 1973.
- 40) Maurer, R. R. & Beier, H. M. : Uterine proteins and development *in vitro* of rabbit preimplantation embryos. J. Reprod.Fertil., 48 : 33-41, 1976.
- 41) Minz, B. : Advances in the Biosciences 6 : 191 ed. Raspe G., Pergamon, Vieweg.
- 42) Murray, F. A. et al. : Blastokinin : its size and shape, and an indication of the existence of subunits. Fertil. Steril., 23 : 69-77, 1972.
- 43) Oliphant, G. et al. : The permeability of rabbit oviduct to proteins present in the serum. Biol. Reprod., 18 : 516-520, 1978.
- 44) Pappas, G. D. & Blanchette, E. J. : Transport of colloidal particles from small blood vessels correlated with cyclic changes in permeability. Invest. Ophthal., 4 : 1026-1036, 1965.
- 45) Pratt, H. P. M. : Uterine porteins and the activation of embryos from mice during delayed implantation. J. Reprod. Fertil., 50 : 1-8, 1977.
- 46) Restall, B. J. & Wales, R. G. : The fallopian tube of the sheep. III. The chemical composition of the fluid from the fallopian tube. Aust. J. Biol. Sci., 19 : 687-698, 1966.
- 47) Roberts G. P. & Parker, J. M. : Macromolecular components of the luminal fluid from the bovine uterus. J. Reprod. Fertil., 40 : 291-303, 1974.
- 48) Roberts, G. P. & Parker, J. M. : An investigation of enzymes and hormone binding proteins in the luminal fluid of the bovine uterus. J. Reprod. Fert. 40 : 305-313, 1974.
- 49) Roberts, G. P. et al. : Proteins in the luminal fluid from the bovine oviduct. J. Reprod. Fert., 45 : 301-303, 1975.
- 50) Schwick, H. G. : Chemisch-entwicklungs-physiologische Beziehungen von Uterus zu Blastocyste des Kaninchens (*Orcyt Cuniculus*). Wilhelm Roux Arch. Entw. Mech. Org., 156 : 283-293, 1965.
- 51) Shapiro, S. S. et al. : Protein composition of rabbit oviductal fluid. J. Reprod. Fert., 24 : 403-412, 1971.
- 52) Surani, M. A. H. : Zona pellucida denudation, blastocyst proliferation and attachment in the rat. J. Embryol. Exp. Morph., 33 : 343-353, 1975.
- 53) Surani M. A. H. : Hormonal regulation of proteins in the uterine secretion of ovariectomized rats and the implications for implantation and embryonic diapause. J. Reprod. Fert., 43 : 411-417, 1975.
- 54) Surani, M. A. H. : Uterine luminal proteins at the time of implantation in rats. J. Reprod. Fert., 48 : 141-145, 1976.
- 55) Surani, M. A. H. : Radiolabelled rat uterine luminal proteins and their regulation by oestradiol and progesterone. J. Reprod. Fert. 50 : 289-296, 1977.
- 56) Tucker, E. B. & Schultz, G. A. : Temporal

- changes in proteins of oviduct and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit. Biol. Reprod. 17 : 749-759, 1977.
- 57) Weber, K. & Osborn, M. : The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244 : 4406-4412, 1969.
- 58) Weitlauf, H. M. : Metabolic changes in the blastocysts of mice and rats during delayed implantation. J. Reprod. Fert., 39 : 213-224, 1974.
- 59) Weitlauf, H. M. : Factors in mouse uterine fluid that inhibit the incorporation of ^3H -Uridine by blastocysts *ni vitro*, J. Reprod. Fert., 52 : 321-325, 1978.
- 60) 山本育代・他 : 妊娠子宮組織における妊卵の蛋白合成におよぼす効果—片側卵管結紮妊娠ラットを実験モデルとして—, 第21回日本不妊学会総会発表要旨, 1976.

Some aspects of nidus-endometrial relationships with the special reference to the uterine specific proteins which appear in the endometrial tissue at the initial stage of implantation

Masakazu Shinozuka

1st. Department of Obstetrics and Gynecology
The Jikei University School of Medicine
(Director : Prof. Shoichi Hachiya)

The characters of rat uterine endometrium on the initial stage of pregnancy (from D_{3.5} to D_{7.5} of pregnancy) were discussed using the unilaterally pregnant rat by the method of SDS gel-electrophoresis.

The following results were obtained to elucidate the origin of pregnancy specific proteins and these biological characters.

1. Several specific uterine proteins which had different R. f. to each others from that of serum proteins were detected. These results are indicating that these fractions may be synthesized in the uterine tissue components corresponding to endocrine and nidus factors.

2. On the day of D_{5.5}, a uterine specific protein (M. W : 41,000) appeared.

3. On the D_{6.5} and D_{7.5}, seven or six specific proteins ranging from 16,500 to 140,000 M. W. were detected.

4. Those results indicate that the electrophoretical characters of those specific proteins are different to each another corresponding to ovum development, and that these fractions are originated from endometrium which may play a important role for nidus development and attachment to endometrium.

(受付 : 昭和54年11月7日)

FAILURE TO STOP THE REDUCTION OF BLOOD PRESSURE IN PREGNANT SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS FOLLOWING INDOMETHACIN TREATMENT

Teruhiro Nakada*,**

*Section on Biochemical Pharmacology, Hypertension-Endocrine Branch,
National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes
of Health, Bethesda, Maryland 20014 U. S. A.

**Department of Urology, Faculty of Medicine, Toyama Medical &
Pharmaceutical University, 2630 Sugitani, Toyama, Japan

Abstract: The blood pressure declining effect of pregnancy was observed in spontaneously hypertensive rats (SHR) and Wistar Kyoto rats (WKY). To evaluate whether prostaglandin is involved in reduction of blood pressure in SHR before delivery, 2.5 mg/kg body weight of indomethacin was given to animals intraperitoneally three times daily on late gestational term. Such treatment delayed the date of delivery for 2 days, but the pressor response was similar in indomethacin-treated rats and control rats. Whilst, neither single injection of indomethacin (5 mg/kg body weight) nor oral administration of it (2.5 mg/kg body weight, twice daily for consecutive 4 days) lowered the blood pressure of nonpregnant SHR. Though magnitude was low, similar pressor response has been obtained in WKY.

Thus, the possibility that prostaglandin plays an important role for ameliorating the high blood pressure in pregnant SHR or reduction of blood pressure in pregnant WKK appears to be less likely.

Introduction

In a stem colony of spontaneously hypertensive rats (SHR), the average blood pressure of female rats are lower than that of age-matched male animals¹⁾. Recently, lowering effect of pregnancy in blood pressure of SHR was reported²⁾, however there is still a matter of dispute³⁾. The cause of such phenomenon is not known, but presumed to be due to an abnormal secretion of progesterone or prostaglandins.

To investigate whether prostaglandins is one of the involved factors in the hypotensive process of pregnant SHR, indomethacin was administered to pregnant animals.

Materials and Methods

Rats from the NIH strain, SHR/N, of spontaneously hypertensive rats (SHR), initially separated by Okamoto and Aoki⁴⁾ and normotensive NIH Wistar Kyoto (WKY/N) rats from the parent colony of SHR in Kyoto, Japan, were obtained from the Animal Production Section of the National Institutes of Health. Female animals were used through the present studies except mating period.

Eighteen female WKY/N and 17 female SHR/N, 20-22 weeks of age, were successively dated pregnancy with male animals of the same strain in divided cages in isolators after vaginal smears proved to be estrus. After removing male animals, female rats of each strain were divided into two groups for following treatment: vehicle-treated WKY/N¹⁰⁾, indomethacin-treated WKY/N⁸⁾,

KEY WORDS: prostaglandin, hypotension, delivery

vehicle-treated SHR/N⁸⁾ and indomethacin-treated SHR/N⁹⁾. Intraperitoneal injection of 2.5 mg/kg body weight of indomethacin, three times daily, started in the 19th gestational day and continued until the onset of delivery. Indomethacin (Merck, Sharpe & Dohme, Rahway, N. J.) was supplied in a solution of 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) and 4% ethanol (95:5, v/v). Each control rat was given an equal volume of the vehicle. Systolic blood pressure and heart rate in these conscious rats were determined by Physiograph (Desk Model, Type DMP-4A, E & M Instrument Co. Inc. Houston, Texas) repeatedly from 9 a.m. to 11 a.m. by minor modification of Pfeffer et al.⁵⁾. In pilot studies to check the pressor response, single injection of indomethacin (5 mg/kg body weight, i. p.) or oral administration of it (2.5 mg/kg body weight twice daily for consecutive 4 days) in addition to control vehicle treatments were performed in nonpregnant female rats. The former experiment included 16 WKY/N and 21 SHR/N at 3 months of age and the latter one consisted of 21 WKY/N and 21 SHR/N at 5 weeks of age

as depicted in Table 2 and 3.

Student's t-test was applied to analyze the significance of differences between means,

Results

1) EFFECTS OF DELIVERY AND INDOMETHACIN ON BLOOD PRESSURE OF PREGNANT RATS.

Reduction of blood pressure could be observed in vehicle-treated WKY/N and -SHR/N already on the 19th gestational day, and the blood pressure dropped maximally on the 21th gestational day. The average systolic blood pressure on the day of delivery of the former group being 100 ± 2 (SE) mm Hg and the latter disclosed 115 ± 6 (SE) mm Hg. Suppressed pressor level of each strain continued 1 day post parturition (Table 1).

Treatment of indomethacin delayed the date of delivery for 2 days, however similar hypotensive patterns were observed in each strain. The blood pressure of the indomethacin-treated WKY/N and -SHR/N on the days of delivery disclosed 105 ± 4 and 113 ± 4 mm Hg (mean $\pm$ S. E.), respectively. These

Table 1 Effect of indomethacin on blood pressure and heart rate of pregnant-WKY/N and -SHR/N

Animal treatment		Systolic blood pressure (mm Hg) and heart rate (beat/min)						
		Days prior to delivery			Day of delivery	Days post parturition		
		3	2	1		1	2	3
Systolic blood pressure (mm Hg)	Vehicle-treated WKY/N (10)	$123 \pm 3^{***}$	$119 \pm 4^{***}$	103 ± 3	100 ± 2	$116 \pm 4^{**}$	$120 \pm 3^{***}$	$124 \pm 2^{***}$
	Indomethacin-treated WKY/N (8)	$122 \pm 3^{**}$	$121 \pm 4^*$	$115 \pm 3^*$	105 ± 4	$118 \pm 4^*$	$122 \pm 4^{**}$	$125 \pm 2^{***}$
	Vehicle-treated SHR/N (8)	$159 \pm 3^{***}$	$149 \pm 4^{***}$	$131 \pm 5^*$	115 ± 6	$143 \pm 5^{**}$	$159 \pm 5^{***}$	$161 \pm 3^{***}$
	Indomethacin-treated SHR/N (9)	$162 \pm 3^{***}$	$158 \pm 3^{***}$	$146 \pm 3^{***}$	113 ± 4	$127 \pm 3^*$	$140 \pm 3^{***}$	$161 \pm 3^{***}$
Heart rate (beat/min)	Vehicle-treated WKY/N (10)	$419 \pm 13^{**}$	$406 \pm 15^*$	$412 \pm 13^*$	372 ± 8	383 ± 18	382 ± 13	401 ± 17
	Indomethacin-treated WKY/N (8)	$433 \pm 16^*$	$415 \pm 4^*$	400 ± 14	362 ± 20	$416 \pm 17^*$	$431 \pm 7^{**}$	$428 \pm 10^*$
	Vehicle-treated SHR/N (8)	$437 \pm 8^*$	$457 \pm 19^*$	$447 \pm 13^*$	389 ± 16	421 ± 20	424 ± 26	425 ± 14
	Indomethacin-treated SHR/N (9)	$445 \pm 9^*$	$442 \pm 12^*$	428 ± 14	391 ± 17	423 ± 20	$433 \pm 14^*$	$441 \pm 16^*$

Indomethacin (2.5 mg/kg body weight) was given intraperitoneally before delivery. See details in MATERIALS AND METHODS. (): number of animals. Comparisons are made between the values obtained at various days and the ones obtained at the day of delivery: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0025$. Values are expressed as mean $\pm$ SEM.

Table 2 Effect of intraperitoneal injection of indomethacin (5 mg/kg body weight) on blood pressure of nonpregnant 3-month-old WKY/N and age-matched SHR/N

Animal treatment	Systolic blood pressure (mm Hg) minutes post i. p. injection		
	0	20	40
Vehicle-treated WKY/N (11)	121±2	125±3	124±3
Indomethacin-treated WKY/N (5)	121±6	124±5	117±3
Vehicle-treated SHR/N (15)	155±2	157±2	155±1
Indomethacin-treated SHR/N (6)	163±5	165±6	170±4

Values are expressed as mean±SEM. () : number of animals.

Significance of the difference of blood pressure in each group : $p>0.1$

Table 3 Effect of oral administration of indomethacin (2.5 mg/kg. body weight twice daily) on blood pressure of 5-week-old nonpregnant WKY/N and age-matched SHR/N

Animal treatment	Systolic blood pressure (mmHg) days post per os administration				
	0	1	2	3	4
Vehicle-treated WKY/N (10)	120±3	114±3	119±2	120±2	125±4
Indomethacin-treated WKY/N (11)	122±3	125±4	123±3	127±3	124±3
Vehicle-treated-SHR/N (10)	129±4	129±4	124±3	129±3	130±3
Indomethacin-treated SHR/N (11)	128±2	123±4	132±4	133±4	133±4

Blood pressure of each rat was determined from 9 a.m. to 11 a.m. See details in MATERIALS AND METHODS. Values are expressed as mean±SEM. () : number of animals.

Significance of the difference of systolic blood pressure in each group : $p>0.1$.

values contrasted with 121 ± 4 and 158 ± 3 mm Hg (mean±S.E.), respectively 2 days prior to delivery, and 122 ± 4 and 140 ± 3 mm Hg (mean±S.E.), respectively 2 days post parturition (Table 1).

Though magnitude was low, bradycardia was accompanied by delivery in each strain (Table 1).

2) EFFECT OF INDOMETHACIN ON BLOOD PRESSURE OF NONPREGNANT RATS.

Intraperitoneal injection of 5 mg/kg of indomethacin caused no significant change of blood pressure in 3-month-old female WKY/N and age-matched SHR/N after 20 and 40 minutes (Table 2). Vehicle treatment to WKY/N or SHR/N did not alter the pre-drug value on the blood pressure of each rat strain. Thus, the possibility that the stimulus of i. p. injection might alter the blood pressure can be excluded.

Oral administration of indomethacin, 2.5 mg/kg twice daily for consecutive 4 days, had no significant effect on blood pressure of

5-week-old WKY/N and age-matched SHR/N (Table 3).

Discussion

Though the possible role of indomethacin repression of acetylation of cyclo-oxygenase by [acetyl- 3 H] aspirin was not so rapid or complete as inhibition of enzyme activity⁶⁾, the half-life of indomethacin as a prostaglandin synthesis inhibitor in plasma in rat was relatively long⁷⁾. In addition, intravenous, subcutaneous, per os or intraperitoneal administration of indomethacin proved to be effective to inhibit the biosynthesis of prostaglandins if moderate dosage of indomethacin can be applied^{3, 8-12)}.

The results reported here may help to elucidate the problems of conflicting reports concerning antihypertensive effects of pregnancy in hypertensive animals^{2, 3)}. It is well known that prostaglandins are essential for the expedient onset and regular process of parturition. Administration of indomethacin, sufficient to inhibit the synthesis of

prostaglandins, holds over gestation in the rats⁸⁾ and rhesus monkeys¹³⁾. This study showed similar result that pregnancy in WKY/N and SHR/N was prolonged by the intraperitoneal injection of indomethacin (Table 1).

According to Chester et al.⁸⁾, indomethacin, $2\text{ mg}^{-1}\text{ days}^{-1}$ given by mouth on gestational days 20 and 21, caused delays of delivery for 16–25 h in rats. In pilot studies, the administered dosages, 2.5 mg/kg body weight twice daily for consecutive 4 days and 5 mg/kg body weight (i. p.) seems to be enough to inhibit the prostaglandin synthesis of the nonpregnant rats. Non-hypotensive effect of indomethacin was clarified by the acute or chronic experiment (Table 2 and 3).

Whilst renomedullary prostaglandins with marked hypotensive and natruretic requisities have been regarded as renewed interest in the fields of experimental hypertension, the data presented in Table 1 appeared to show prostaglandins provoked noblood pressure reduction prior to the delivery in WKY/N and SHR/N. On the basis of available evidence, the possibility that a decrease of plasma progesterone concentration before parturition¹⁴⁾ might be related to the reduction of blood pressure in the pregnant rats cannot be denied. Mechanism which underlies this physical phenomenon remains unresolved.

Acknowledgment

Cordial thanks are made to Dr. Walter Lovenberg, Section on Biochemical Pharmacology, Hypertension-Endocrine Branch, National Heart, Lung and Blood Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20014 U. S. A. for his constant help in this study.

References

- 1) Ooshima, A., Yamori, Y. and Okamoto, K.: Cardiovascular lesions in the selectively-bred group of spontaneously hypertensive rats with severe hypertension. *Jap. Cir. J.*, 36: 797–812, 1972.
- 2) Aoi, W., Gable, D., Cleary, R. E., Young, P. C. M. and Weinberger, M. H.: The anti-hypertensive effect of pregnancy in spontaneously hypertensive rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 153: 13–15, 1976.

- 3) McCarty, R. and Kopin, I. J.: Pregnancy: Its effects on blood pressure, heart rate and sympatho-adrenal activity in spontaneously hypertensive rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 158: 242–244, 1978.
- 4) Okamoto, K. and Aoki, K.: Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jap. Circ. J.*, 27: 282–293, 1963.
- 5) Pfeffer, J. M., Pfeffer, M. A. and Frohlich, E. D.: Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J. Lab. Clin. Med.*, 78: 957–962, 1971.
- 6) Rome, L. H., Land, W. E. M., Roth, G. J. and Majerus, P. W.: Aspirin as a quantitative acetylating reagent for the fatty acid oxygenase that forms prostaglandins. *Prostaglandins*, 11: 23–30, 1976.
- 7) Yesair, D. W., Remington, L., Callahan, M. and Kensler, C. J.: Comparative effects of salicylic acid, phenylbutazone, probenecid and other anions on the metabolism, distribution and excretion of indomethacin by rats. *Biochem. Pharmacol.*, 19: 1591–1600, 1970.
- 8) Chester, R., Dukes, M., Slater, S. R. and Walpole, A. L.: Delay of parturition in the rat by anti-inflammatory agents which inhibit the biosynthesis of prostaglandins. *Nature*, 240: 37–38, 1972.
- 9) Ikeda, K., Tanaka, K. and Katori, M.: Potentiation of bradykinin-induced vascular permeability increase by prostaglandin E_2 and arachidonic acid in rabbits skin. *Prostaglandins*, 10: 747–758, 1975.
- 10) Manaugh, L. C. and Novy, M. J.: Effects of indomethacin on corpus luteum function and pregnancy in rhesus monkeys. *Fertil. Steril.* 27: 588–597, 1976.
- 11) Kadowitz, P. J. and Hyman, A. L.: Influence of a prostaglandin endoperoxide analogue on the canine pulmonary vascular bed. *Circ. Res.*, 40: 282–287, 1977.
- 12) Bay, W. H., Mishkind, M. H., Lane, G. E. and Ferris, T. F.: The effect of prostaglandin-synthesis stimulation and blockade on sodium excretion at a fixed renal perfusion pressure. *J. Lab. Clin. Med.*, 93: 78–84, 1979.
- 13) Novy, M. J., Thomas, C. L. and Lees, M. H.: Uterine contractivity and regional blood flow responses to oxytocin and prostaglandin E_2 in pregnant rhesus monkeys. *Trans Pac. Coast Obst. Gynecol. Soc.*, 42: 8–21, 1975.
- 14) Grotta, L. J. and Eik-Nes, K. B.: Plasma progesterone concentrations during pregnancy

and lactation in the rat. J. Reprod. Fertil.,
13 : 83-91, 1967.

高血圧自然発症ラットの妊娠時の血圧変動
—とくにインドメサシン投与の
影響を中心として—

中 田 瑛 浩

Section on Biochemical Pharmacology Hyper-
tension-Endocrine Branch, National Heart,
Lung and Blood Institute, National
Institutes of Health, Bethesda,
Maryland 20014 U. S. A.

(1) ウィスター京都ラット (WKY), およびその選択

的兄妹交配により作製された高血圧自然発症ラット (SHR) では出産前後に著しく血圧が下降した。(2) インドメサシン 2.5 mg/kg 体重を 1 日 3 回, 妊娠後期の WKY, SHR に投与すると, それぞれ出産日は 2 日間遅延するが, 両者の降圧の程度はインドメサシン非投与の対照妊娠動物のそれとほぼ同じである。(3) 非妊娠 WKY, SHR にインドメサシンを急速に腹腔内投与 (5 mg/kg 体重) しても, 消化管内投与 (2.5 mg/kg 体重, 1 日 2 回, 4 日間) を行っても血圧は下降しない。

以上の成績より, WKY, SHR の出産前後の急激な血圧下降に, プロスタグランディン過分泌が関与していないことが判明した。

(受付: 昭和45年 9 月 7 日)

現住所 富山医科薬科大学医学部泌尿器科学教室

社会保険佐賀病院における不妊外来統計

Statistical Studies on the Infertile Women in Saga Social Insurance Hospital

九州大学医学部産科婦人科学教室（主任：滝一郎教授）

中 村 元 一
Gen-ichi NAKAMURA

Department of Obstetrics and Gynecology,
Faculty of Medicine, Kyushu University,
Fukuoka

(Director: Professor Ichiro Taki)

社会保険佐賀病院産婦人科

寺 島 溥
Hiroshi TERASHIMA

Saga Social Insurance Hospital, Saga

昭和50年4月より昭和52年3月までの2年間に社会保険佐賀病院産婦人科不妊外来を初診した 挙児希望夫婦155例につき統計的観察を行った。

- 1) 不妊外来患者の頻度は2.76%であり、原発不妊57.4%、続発不妊42.6%であった。
- 2) ほぼ完全な検査、治療を行い得た113症例の妊娠率は49.6%の高率であった。
- 3) 初診時年齢は原発不妊で27~28歳にピーク（33.7%）を形成し、続発不妊では、23~32歳の間に平均化していた。初診時年齢と妊娠率との関係は認めなかった。続発不妊では不妊期間の短い程妊娠しやすい傾向がみられた。5年以上不妊の15例では1例の妊娠もみなかった。
- 4) 虫垂切除等の開腹術の既往のある例の妊娠率は低く、続発不妊の最終妊娠との関係では人工流産後の妊娠率が低かった。
- 5) 不妊因子では原因不明の機能性不妊が最も多く、排卵障害がこれに続いた。妊娠率との関係では卵巣因子が最も高く（66.7%）、機能性不妊がこれに続き（65.9%）、黄体期の治療も高率（41.1%）であった。
- 6) 流産率は比較的低率（11.4%）であり、児の性別では男児が多かった（58.8%）。

I 結 言

最近の不妊領域における検査や治療の進歩は著しいものがあり、また同時に児を欲して外来を訪れる夫婦の頻度も増加の傾向にある。今日、一般病院においても不妊領域に対する最低限の検査治療は必須の時代であると考えられる。我々は昭和50年4月より社会保険佐賀病院に不妊外来を開設し、以来今日まで4年が経過したのでこ

の間の臨床統計的検討を妊娠成功例を中心として行った。

II 対象ならびに方法

昭和50年4月より昭和52年3月までの2年間に社会保険佐賀病院不妊外来を初診した155例を対象とし、昭和53年10月まで追跡調査した。なお妊娠例の検討を行う際の対象としては上記155例中、1年未満の不妊や、充分

Table 1 Infertile women and pregnancy rate

	No. of cases	control	preg. cases	preg. rate
Prim. inf.	89(57.4)	70	34	48.5%
Sec. inf.	66(42.6)	43	22	51.2%
Total	155(100)	113	56	49.6%

な検査治療を行い得なかつた症例等を除外した 113 例を対象とした。

不妊検査としては、基礎体温、頸管粘液検査、Hühner Test、子宮内膜生検、テレビ透視下の子宮卵管造影法、月経血培養、HAR による尿中 LH 半定量等である。また男性の精液所見としては、精子数 $40 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 80% 以上を正常とした。

III 結 果

1) 頻度：この間の外来新患者総数は 5,617 名であり不妊外来患者 155 名はその 2.76% にあたる。

2) 原発不妊、続発不妊の割合：原発不妊 89 例 (57.4%)、続発不妊 66 例 (42.6%) で原発不妊がやや多かった。妊娠率は Table 1 のごとく前記の 113 例を対象とすると原発不妊 70 例中 34 例 (48.5%)、続発不妊 43 例中 22 例 (51.2%) 全体として 113 例中 56 例 (49.6%) の高率であった。

3) 初診時年齢と妊娠率：Fig. 1 に示すごとく原発不妊では 27~28 歳にピークがあり、25~28 歳の間に過半数 (64.0%) が占められた。これに対し続発不妊では 25 歳から 31 歳の間にゆるやかな山を作り、平均化していた。年齢と妊娠率の関係は Fig. 2 のごとくで、原発不

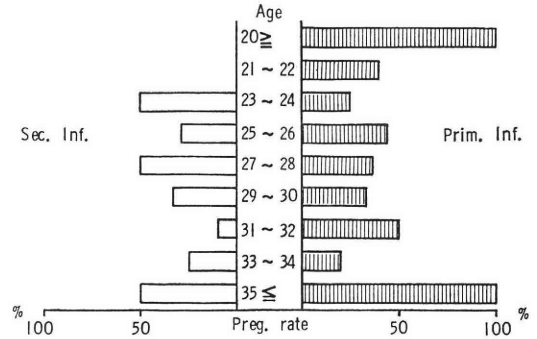


Fig. 2 Relationship between the pregnancy rate and the age on first visit

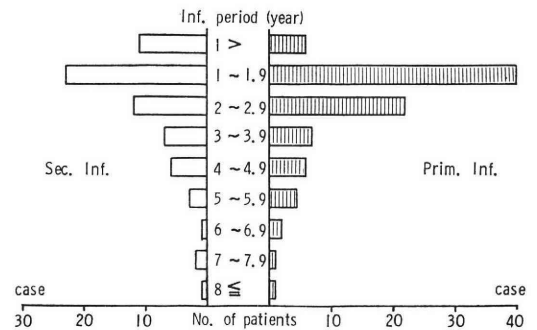


Fig. 3 Infertile period distribution

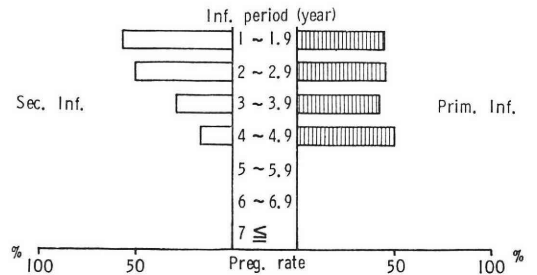


Fig. 4 Relationship between the pregnancy rate and the infertile period on first visit

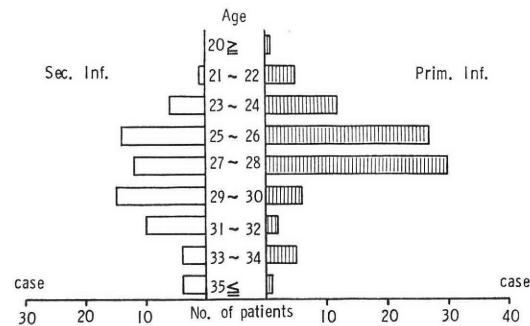


Fig. 1 Age distribution on first visit

妊、続発不妊ともに特に年齢との関係は認められなかつた。

4) 不妊期間と妊娠率：不妊期間は Fig. 3 に示すように、原発不妊、続発不妊ともに 1~1.9 年にピークがあり、その後徐々に減少していく傾向がみられた。結婚

後 1 年未満の初診例も合計 17 例あり早期受診の傾向がうかがわれた。不妊期間と妊娠率との関係は Fig. 4 のごとく、原発不妊では不妊期間が 1~5 年未満の例では不妊期間との間に相関は認められず 42.9~50.0% の妊娠率

Table 2 Previous treatment

Previous treatment	Prim. inf.		Sec. inf.		Total	
	Case	Preg. Case	Case	Preg. Case	Case	Preg. Case
Yes	24(27.0)	7(20.6)	13(19.7)	3(13.6)	37(23.9)	10(17.9)
No	65(73.0)	27(79.4)	53(80.3)	19(86.4)	118(76.1)	46(72.1)

() : %

であり、続発不妊では不妊期間の短い程妊娠しやすい傾向が認められた。一方、不妊期間5年以上の15例では、原発不妊、続発不妊ともに1例の妊娠も認められなかった。

5) 他院受診の有無と妊娠率：Table 2のごとく原発不妊で27%，続発不妊で19.7%が他院を受診し何らかの治療を受けていた。しかし妊娠例においては他院受診例は、原発不妊、続発不妊でそれぞれ20.6%，13.6%を占めるに過ぎなかった。

6) 既往手術と妊娠率：不妊外来患者のうち虫垂切除術を既往にもつ患者は Table 3のように155例中39例

Table 3 Relationship between past history of operation and pregnancy

	Infertile women	Pregnant cases
Appendectomy	39(25.2)	8(14.3)
Operation of ovary	6(3.9)	1(1.8)
R-v-f uteri	3(1.9)	
Ectopic pregnancy	3(1.9)	
Re-laparotomy	2(1.3)	
Others	3(1.9)	2(3.6)
None	103(66.5)	45(80.4)

(25.2%)であり、それに対し不妊患者妊娠例では56例中8例(14.3%)に過ぎなかった。また開腹例全体をとってみれば Fig. 5のごとく不妊患者全体に対する割合

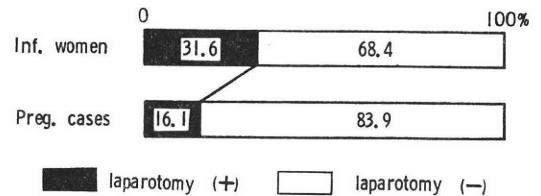


Fig. 5 Past history of laparotomy

(31.6%)に比べて妊娠例(16.1%)は有意に少なかった。

7) 不妊因子分類：ルーチンの検査で不妊因子が見つからなかったものを「機能性不妊」とし、このうち基礎体温表で黄体機能不全が疑われるものを「黄体機能不全疑い」として分類した。また全ての検査を終了し得なかったものを「不明」として不妊因子別に分析した。Table 4のように原発不妊、続発不妊とも機能性不妊が最も多く、それぞれ24例(34.3%)、17例(39.6%)を示し、排卵障害のある卵巣因子が原発不妊で18例(25.7%)、続発不妊で15例(34.9%)と続いた。男性因子は原発不妊で11例(15.7%)、続発不妊で3例(7.0%)と少なかった。また複数の不妊因子をもつ混合因子は合計9例にみられたが今回は主たる原因と考えられる因子に分類した。

8) 不妊因子と妊娠率：Table 5に示すように卵巣因子の妊娠率が33例中22例(66.7%)と高いのが特徴的であり、また、機能性不妊41例中27例(65.9%)も高率を

Table 4 Incidence of the causal factors of infertility

	Prim. inf.(%)	Sec. inf.(%)	Total (%)
Ovulatory disturbance	18(25.7)	15(34.9)	33(29.2)
Tubal factor	1(1.4)	5(11.6)	6(5.3)
Uterine factor	1(1.4)	1(2.3)	2(1.8)
Endometrial factor	3(4.3)	0(0.0)	3(2.7)
Functional infertility (CLI susp.)	24(34.3)	17(39.6)	41(36.3)
Male factor	15(21.4)	11(25.6)	26(23.0)
Unknown	11(15.7)	3(7.0)	14(12.4)
Unknown	12(17.1)	2(4.7)	14(12.4)
Total	70(100.0)	43(100.0)	113(100.0)

Table 5 Causal factors and pregnancy rate

	Prim. inf.(%)	Sec. inf.(%)	Total (%)
Ovulatory disturbance	12/18(66.7)	10/15(66.7)	22/33(66.7)
Tubal factor	0/ 1(0.0)	2/ 5(40.0)	2/ 6(33.3)
Uterine factor	1/ 1(100.0)	1/ 1(100.0)	2/ 2(100.0)
Endometrial factor	1/ 3(33.3)	0/ 0	1/ 3(33.3)
Functional infertility (CLI susp)	18/24(75.0)	9/17(52.9)	27/41(65.9)
Male factor	12/15(80.0)	6/11(54.5)	18/26(69.2)
Unknown	2/11(15.7)	0/ 3(0.0)	2/14(14.3)
	0/12(0.0)	0/ 2(0.0)	0/14(0.0)
Total	34/70(48.6)	22/43(51.2)	56/113(49.6)

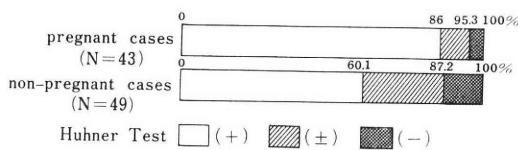


Fig. 6 Huhner test and pregnancy

示した。一方、男性因子は14例中2例(14.3%)と低率であった。

9) Huhner Test と妊娠率：各種検査のうち Huhner Test と妊娠との関係を調べてみた。対象は Huhner Test を行った全例とした。当院における Huhner Test の判定基準は鏡検(400倍)にて運動精子数10以上を陽性(+), 1~9を疑陽性(±), 0を陰性(-)とした。なお陰性または疑陽性の場合は3周期以上検査を繰返しその中で最も良い判定をとった。Fig. 6に示すように妊娠例中37例(86%)は Huhner 陽性であったが、4例(9.3%)は疑陽性であり、2例(4.7%)は陰性例であった。逆に Huhner 陽性例の妊娠率は67例中37例(55.2%), 疑陽性例は17例中4例(23.5%)であったが陰性例でも8例中2例(25.0%)の妊娠

成立が認められた。

10) 妊娠への有効療法：Table 6のごとくで、最も多かったのは排卵誘発の19例(33.9%), 次いで黄体刺激療法の15例(26.8%), 黄体ホルモン補充療法8例(14.3%)と続き、黄体期の治療が合計23例(41.1%)の多くを占めた。その他、Asherman 症候群の癒着剝離術で1例、子宮内膜症に対する6カ月間の偽妊娠療法で1例の妊娠をみた。HSG, 通水後の妊娠(施行と同一周期)は9例(16.0%), また無治療妊娠は18例(32.1%)であった。このうち黄体期の治療について検討してみた。Fig. 7は基礎体温表上黄体機能不全疑い例と、正常例とで治療周期(黄体刺激療法または黄体ホルモン補充療法)の妊娠の成立をみたものである。黄体機能不全疑い例では34.1%が治療周期に妊娠しているのに対し、正常周期では治療周期妊娠は9.1%に過ぎなかった。また黄体刺激療法で36.1%, 黄体ホルモン補充療法では29.2%の妊娠率であり、黄体刺激療法の方がやや有効であった。

11) 初診より妊娠までの期間：初診から半年以内に全体の62.5%にあたる35例が、また1年以内には83.9%

Table 6 Successful treatment in pregnancy

	Prim. inf.(%)	Sec. inf.(%)	Total (%)
Ovulation induction	11(32.4)	8(36.4)	19(33.9)
Corpus luteum stimulation	12(35.3)	3(13.6)	15(26.8)
Replacement therapy	3(8.8)	5(22.7)	8(14.3)
Operation	0(0.0)	1(4.5)	1(1.8)
Pseudopregnancy therapy	1(2.9)	0(0.0)	1(1.8)
AIH	0(0.0)	1(0.0)	1(1.8)
Hydrotubation	3(8.8)	2(9.1)	5(8.9)
HSG	1(2.9)	3(13.6)	4(7.1)
Huhner test	9(26.5)	2(9.1)	11(19.6)
No therapy	11(32.4)	7(31.8)	18(32.1)

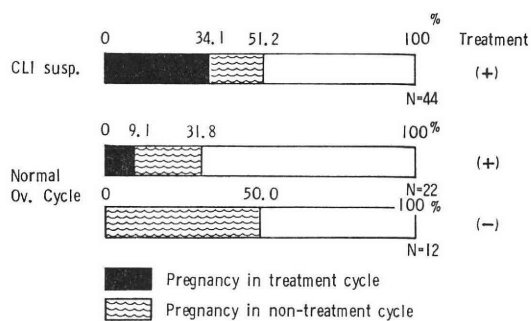


Fig. 7 Treatment during luteal phase and pregnancy

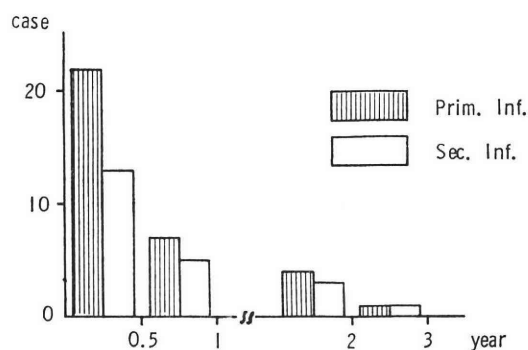


Fig. 8 Periods from first visit to pregnancy

にあたる47例が妊娠しており、原発不妊、続発不妊には差は認められなかった (Fig. 8)。

12) 続発不妊の最終妊娠と妊娠率：最終妊娠で最も多かったのは自然流産の22例 (33.3%)、次いで満期産の21例 (31.8%)、人工流産の17例 (25.8%) であった。妊娠率との関係では、満期産の38.1%、自然流産の40.9%に比べて人工流産では23.5%と妊娠率の低下がみられた (Table 7)。

13) 妊娠成立後の経過：56例の妊娠のうち転院等による不明の10例、現在妊娠中の2例を除く44例についてみると、Table 8のごとく36例 (81.8%) が満期分娩、クロミッド妊娠の双胎例1例を含む3例 (6.8%) が早産で、流産は5例 (11.4%) に過ぎなかった。児の

Table 7 Antecedent pregnancy of secondary infertile women

	No. of cases (%)	Pregnancy (%)
Full term delivery	21 (31.8)	8 (38.1)
Premature delivery	1 (1.5)	1 (100.0)
I. U. F. D.*	2 (3.0)	0 (0.0)
Spontaneous abortion	22 (33.3)	9 (40.9)
Artificial abortion	17 (25.8)	4 (23.5)
Ectopic pregnancy	3 (4.5)	0 (0.0)

* Intra Uterine Fetal Death

性別では、40例中23例 (57.5%) が男児、17例 (42.5%) が女児であった。男児が多いと言われるクロミッド妊娠例17例をとつてみると男児10例 (58.8%)、女児7例 (41.2%) であり総計との間に有意差はなかった。児の体重では満期産児36例の平均は 3046.7 ± 401.6 (SD) grであり、このうち妊娠中毒症等の異常のなかった28例のみでは 3117.0 ± 378.2 grであった。

IV 考 按

外来患者に対する挙児希望者の割合は各施設で異なり、約2%から約30%までの幅がみられるが、一般病院における最近の報告では、稲葉⁶⁾ 3.5%、古賀⁷⁾ 2.2%、品田⁸⁾ 2.05%、秦¹⁰⁾ 3.55%等の報告のように2~4%程度であり当院における2.76%は平均的な値と思われる。

不妊症の定義として不妊期間をどの位にするかも報告^{1,6,7,15)}により異なるが、我々はアメリカ不妊学会の定義のごとく1年以上を不妊期間とした。原発不妊、続発不妊の割合は原発不妊の割合でみると当院の57.4%に対し、三上¹⁾ の66.4%、東出³⁾ の72.7%、稲葉⁶⁾ の70.5%、品田⁸⁾ の61.4%、加藤¹⁵⁾ の72.8%等の報告があり、やはり続発不妊より多い傾向がみられた。

妊娠率は全体として49.6%の高率であったがこれは対象を①昭和52年3月までの初診者に限り、少なくとも1年7カ月間追跡調査した事、②当科で十分な検査治療を受けた者に限った事、③大学病院等と異り、一次患者が

Table 8 Outcome of pregnancy

	Prim. inf. (%)	Sec. inf. (%)	Total (%)
Full term delivery	24 (85.7)	12 (75.0)	36 (81.8)
Premature delivery	2 (7.2)	1 (6.3)	3 (6.8)
Spontaneous abortion	2 (7.2)	3 (18.7)	5 (11.4)
Total	28 (100.0)	16 (100.0)	44 (100.0)
Pregnancy at present	1	1	2
Unknown	5	5	10

多く、また難治性のものが少なかった事、④地方病院のため患者との密着が強く、充分な追跡調査が出来た事等によるものと思われた。これは古賀⁷⁾の諸検査終了者の妊娠率40%、品田⁹⁾の34.4%等一般病院からの報告で妊娠率が高いのとよく一致する。原発不妊、続発不妊別にみると、各施設の報告は続発不妊の妊娠率が高く、特に稲葉⁶⁾、古賀⁷⁾、伊東¹²⁾、上田¹³⁾らで続発不妊の占める割合がかなり高いが、当科では原発不妊の妊娠率がやや高いものの有意差は無く、ほぼ等しい結果であった。

初診時年齢では原発不妊が27~28歳にピークを作り、続発不妊では特にピークを作る事なく平均化しているが、これは小畑¹⁸⁾、品田⁹⁾、伊東¹²⁾、三浦¹⁴⁾ら多くの報告者も述べているところである。初診時年齢と妊娠率との関係では両者間に特別な関係を認めないという興味深い結果が得られたが、秦¹⁰⁾も35歳以上の群においても妊娠率の落ち込みが無いという同様の結果を報告している。

不妊期間と妊娠率の関係では原発不妊、続発不妊ともに不妊期間5年以上の例では妊娠を見なかったが、東出³⁾、秦¹⁰⁾、白川¹¹⁾、伊東¹²⁾らも5年以上の不妊期間は妊娠率が特に低下すると報告しており、5年間という時期に一つの critical period を置いてもいいように思われる。しかし、一方では三上¹¹⁾は不妊期間7年までは年毎に妊娠率の低下をみるものの、8年以上の原発不妊13例中6例(46.2%)の妊娠を見たと言っている。

他医受診の有無については、原発不妊27%、続発不妊19.7%であったが、当院と似た環境と思われる伊勢崎病院⁹⁾でもそれぞれ24%、19%と報告しており同様の結果であった。他医受診例では妊娠率が低下しているのは難治例の多い事をよく物語っている。しかしながら他医で無意味なホルモン療法を受け、当院でその治療を中止した途端に妊娠した例もあり、患者の正しい把握と適切な治療の必要性を痛感させられる。

既往手術と妊娠との関係では、不妊患者全体と妊娠例における虫垂切除術患者の占める割合はそれぞれ、25.2%、14.3%であり、妊娠例では有意に少なかった。これは既往開腹手術例全体でも同様の傾向であった。手術後の炎症、癒着等が卵管、卵巢等の因子に影響を及ぼしているものと考えられる。

不妊因子と妊娠率の関係では卵巣因子が33例中22例(66.7%)と高い妊娠率を示したのが注目されるが、これは最近の排卵誘発剤、誘発法の進歩によるものと推察される。また藤村⁹⁾、品田⁹⁾、白川¹¹⁾ら多くの報告とも一致する。これに対し男性因子によるものの妊娠率は14.3%の低率であり、治療法の困難さを示している。

Huhner Test と妊娠との関係をみてみると陰性例8

例中2例(25%)に自然妊娠が成立しており、Huhner Test が必ずしも妊娠性を反映しているとも言えないようであり、その判定基準とともに、判定法そのものも再考する余地があるように思われる。

妊娠への有効療法では先に述べた治療法の進歩を反映し、排卵誘発法が最も有効であったがこれは多くの報告^{4,5,8,9,11,12)}とも一致する。今回の調査で特徴的であったのは黄体期の治療により多くの妊娠をみた事である。地方病院の性格上詳しいホルモン測定や、内膜日附診を併用出来なかったが、基礎体温表上の黄体機能不全例で、黄体刺激療法や黄体ホルモン補充療法が妊娠へ有効な治療法の一つである事が示唆された。しかしながら逆に基礎体温表上では正常と思われた患者の場合は、無治療周期に比べても妊娠率が向上しているとは思われなかった。いわゆる機能性不妊患者に対して外来でやみくもに黄体刺激療法や、黄体ホルモン補充療法を繰り返すのは、我々不妊外来にたずさわるものとして厳にいましめねばならないと思われる。

続発不妊における最終妊娠では、自然流産(33.3%)、満期産(31.8%)、人工流産(25.8%)の順であったが、自然流産が最も多いという報告は東出³⁾、伊東¹²⁾、上田¹³⁾らにも見られ、一方、三上¹¹⁾、稲葉⁶⁾、三浦¹⁴⁾らは正常産を第1位に挙げている。しかしながら妊娠率という点からみると満期産の38.1%、自然流産の40.9%がほぼ同じ数値なのに対し、人工流産は23.5%と低下しているのが特徴的であり、やはり安易な中絶は後々悔いを残す結果になり易い事を示唆した。

妊娠後の経過では流産率は11.4%に過ぎず、正常妊娠に比べてほぼ同程度の流産率であった。不妊患者の流産率に関しては、小畑¹⁸⁾の原発不妊で33%、続発不妊で25%、品田⁹⁾の21%、東出³⁾の19.2%等やや流産し易い傾向にあるようであるが、当科では、古賀⁷⁾の6.2%、稲葉⁶⁾の11.4%等の報告と同様低い値が得られた。これは妊娠後、積極的な安静療法を勧めた事も一つの要因であったかと思われる。

児の性別では男児57.5%、女児42.5%と男児が多かったが、白川¹¹⁾も男児63%、女児37%と報告している。ただし男児が多いと言われるクロミッド妊娠のみをとりあげても男女の比は変わらず、この結果が全くの偶然なのか、または何かの要因が存在するのか、興味ある所見と思われた。

稿を終わるに臨み、御校閲頂いた滝一郎教授、御指導頂いた楠田雅彦助教授、永田行博講師に深謝致します。

本論文の要旨は、第23回日本不妊学会九州支部総会、1978、鹿児島、並びに日本産科婦人科学会佐賀地方部会、

1979, 佐賀において発表した。

統計学的考察, 日不妊会誌, 18(3): 188, 1973.

文 献

- 1) 三上正憲, 植村次雄, 鈴木直行, 高口二郎, 塩島令儀: 当教室における不妊クリニック統計, 日不妊会誌, 22(3): 203, 1977.
- 2) 白水 功, 鈴木直行, 植村次雄, 塩島令儀: 不妊外来妊娠成功例の妊娠, 分娩経過の検討, 日不妊会誌: 23(2): 193, 1978.
- 3) 東出香二, 下須賀洋一, 万羽 進, 成田 収: 最近の当教室における不妊外来統計, 日不妊会誌, 22(3): 208, 1977.
- 4) 東出香二, 成田 収, 万羽 進, 下須賀洋一, 木村 隆, 中西 勉, 友田 豊: 最近の不妊外来における妊娠成功例の検討, 日不妊会誌, 23(3): 354, 1978.
- 5) 藤村健次, 相良祐輔, 野上一郎, 秋本暁久, 関場 香: 当教室における不妊外来統計, 日不妊会誌, 24(1): 74, 1979.
- 6) 稲葉芳一, 鈴木崇夫, 黒木脩爾, 岩垣重秋: 不妊症患者の原因分析と妊娠率, 日不妊会誌, 16(2): 138, 1971.
- 7) 古賀詔子, 永井 泰, 永井 宏: 最近六年間の当院不妊症クリニックの現況, 日不妊会誌, 23(3): 367, 1978.
- 8) 小畑 義, 石原貞尚, 東山秀声, 村上 旭, 岡田弘二: わが教室における昭和41~45年の外来不妊統計, 日不妊会誌, 18(1): 44, 1973.
- 9) 品田孝夫, 竹中恒久, 横田佳昌, 大和田信夫, 阿美邦榮: 不妊外来における臨床統計的観察, 日不妊会誌, 24(1): 80, 1979.
- 10) 秦 喜八郎, 有住 裕, 上笹貫 修, 浜田政雄: 当科における不妊症の臨床統計, 日不妊会誌, 21(3): 438, 1976.
- 11) 白川光一, 熊本有宏, 丸木陽子, 昇 幹夫: 当科不妊外来における妊娠例の臨床的分析, 日不妊会誌, 23(3): 361, 1978.
- 12) 伊東武久, 宮内文久, 木戸雄一, 右田満明, 福田榮: 最近2年間の当科不妊症クリニックの現況, 日不妊会誌, 21(2): 188, 1976.
- 13) 上賀一之, 宮内文久, 伊東武久, 藤野俊夫, 山下三郎, 森岡 均: 最近4年間の当科不妊症クリニックの現況, 日不妊会誌, 23(3): 127, 1978.
- 14) 三浦清麿, 松本 勝, 田川博之, 石丸忠之, 加瀬泰昭, 自見昭司: 最近の我が教室における不妊外来の臨床統計, 日不妊会誌, 16(4): 357, 1971.
- 15) 加藤 俊, 岡本 元, 宮原通義, 井手ノ橋, 松尾雅治: 女性不妊症の外来臨床統計と妊娠成功例の検討, 日不妊会誌, 16(4): 362, 1971.
- 16) 楠田雅彦, 立山清道, 熊本照史, 中村正彦: 教室不妊外来における妊娠成功例の検討, 日不妊会誌, 17(4): 273, 1972.
- 17) 植村次雄, 鴻崎次夫, 塩島令儀, 鈴木直行, 吉川絹子: 不妊患者の結婚年齢, 既往妊娠に関する

Statistical studies on the infertile women in saga social insurance hospital

Gen-ichi Nakamura

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

Hiroshi Terashima

Saga Social Insurance Hospital, Saga

The statistical studies were performed on 159 infertile women who visited out-patient clinic for infertility of Department of Obstetrics and Gynecology, Saga Social Insurance Hospital from 1975 to 1977.

1. Of 159 infertile women, 89 (57.4%) were primary infertility and 66 (42.6%) were secondary infertility. The incidence of infertile women to total outpatients of this department was 2.76%.

2. Ages of women with primary infertility ranged from 20 to 36 years with a peak at 27 to 28 years. In secondary infertility, ages ranged from 23 to 32 years equally.

3. Infertile periods were for 1 to 8 years with a mean of 2 years, and 65 (45.0%) visited our clinic within 2 years.

4. The highest rate of successful pregnancy was observed in functional infertile group categorized by the cause of infertility, then followed by ovarian dysfunction and tubal obstruction.

5. Fifty six (49.6%) of 113 women with complete examination for infertility became pregnant after treatments, and 47 (83.9%) became pregnant during the first year.

6. Pregnancy rate of women with ovarian dysfunction was 66.7% and that of unexplained infertility was 65.9%.

7. There was no relationship between pregnancy rate and age, however, women with infertile period of more than 5 years did not succeed in pregnancy. The pregnancy rate of women with a history of appendectomy or artificial abortion was lower than that of others.

8. As clinical outcome of 56 pregnant cases, 36 women (81.8%) had mature infants with normal deliveries. There were 5 cases (11.6%) of abortions.

(受付: 昭和54年8月11日)

当不妊外来における最近5年間の妊娠例の検討

Clinical Observation on the Pregnant Cases in Our Infertility Clinic during 5 Years

徳島大学医学部産科婦人科学教室

松 家 五 朗 増 田 歳 久 吉 崎 健 一
Goro MATSUKA Toshihisa MASUDA Kenichi YOSHIZAKI

乾 泰 延 三 村 経 夫 竹 内 悟
Yasunobu INUI Tsuneo MIMURA Satoru TAKEUCHI

山 野 修 司 高 橋 久 寿
Shuji YAMANO Hisatoshi TAKAHASHI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokushima University, Medical School

昭和49年1月から昭和53年12月までに当不妊外来へ挙児を希望し訪れた患者数は766名で、延べ不妊患者数は外来患者総数の8.0%にあたり、うち165名が妊娠した。妊娠165名の約半数(79名)は不妊期間2年以内であり、初診時年齢分布では、26~30歳群に最も妊娠率が高かった。

症型別にみると、散発性無排卵周期症(71.4%)、機能性子宮出血(44.4%)、卵管因子(43.5%)、機能性不妊症(43.1%)、無排卵周期症(39.2%)などに多く妊娠がみられた。治療内容の主なもの、clomipheneによる排卵誘発(17.1%)及び黄体機能賦活(13.5%)、卵管疎通性検査後(14.7%)、卵管通水法(8.8%)などであるが、有効治療不明が24名(14.1%)も占めていた。

また clomiphene による排卵誘発成績では、276名に投与し230名、即ち1145投与周期中840周期に排卵があり、73.4%の排卵率で、うち52名、18.8%が妊娠に成功している。

転帰は、満期分娩75.4%、流産20.3%、妊娠継続中4.3%であり、流産率が高かった。

はじめに

近年、特に排卵誘発剤の開発には目をみはるべきものがあり、一般臨床への応用にともない、不妊に関する一般の知識普及および治療の必要性が認識されるようになり、結婚後間もない婦人でも挙児を希望して、受診する機会が増加している。

また各種ホルモンの微量測定法の進歩により、系統的検査、さらにより詳細な病態把握が可能となり、かつては排卵誘発することが不可能と考えられていた患者でも、妊娠の可能性が見出せるようになってきた。

加えて不妊症治療の究極の目的は、妊娠の成立から満期分娩によって健児を得ることにあり、不妊症治療後妊

娠例について、retrospective に分析検討を加えることは、今後の不妊症診断、治療の上で有意義であるので過去5年間の不妊外来における妊娠例の分析検討を試みた。

1. 不妊患者数と妊娠率

徳島大学医学部産科婦人科不妊外来へ昭和49年1月より昭和53年12月までの5年間に挙児を希望して来院した患者は表1の如くである。即ち5年間の挙児希望者数は766名(新患数674名)で、このうち不妊外来を訪れた延べ患者数は1269名であつた。挙児希望者数766名中、原発不妊は529名(69.1%)で、237名(30.9%)が続発不妊であつた。そして各年度別の不妊患者頻度をみると、年々増加の傾向があり、結局5年間では、外来患者総数

表 1 不妊外来患者頻度と妊娠率

	外来患者総数	挙児希望者数	新患者数	不妊頻度	妊娠数	妊娠率	原発不妊	続発不妊
昭和49年	3188	221	135	6.9%	23	10.4%	18	5
50	3140	236	138	7.5%	29	12.3%	15	14
51	3221	259	137	8.0%	35	13.5%	20	15
52	3217	278	125	8.6%	46	16.5%	24	22
53	3073	275	139	8.9%	32	11.6%	18	14
合 計	15839	1269	674	8.0%	165	13.0%	95 (529)	70 (237)

註 48年以前からの患者数は92名であり、従つて挙児希望患者数は49年以後の新患者674名を加えた766名となり、補正妊娠率は $165/766 \times 100 = 21.5\%$ となる。

表 2 不妊患者年齢分布と妊娠率

	～25歳	26～30歳	31～35歳	36歳～	合 計
不妊患者数	194(25.3%)	424(55.4%)	125(16.3%)	23(3.0%)	766
妊娠例数	38(23.0%)	107(64.9%)	17(10.3%)	3(1.8%)	165
妊 娠 率	19.6%	25.2%	13.6%	13.0%	

表 3 初診時不妊期間と妊娠率

	1年未満	1～2年	2～3年	3～4年	4～5年	5年以上	合 計
不妊患者数	91	164	136	116	66	193	766
妊娠例数	31	48	33	30	9	14	165
妊 娠 率	34.1%	29.3%	24.3%	25.9%	13.6%	7.3%	

15,839名の8.0%を占めている。不妊患者頻度は不妊期間のとり方、報告機関の性格などにより、かなりの幅がみられており、各大学病院の報告では、楠田¹⁾の10.9%、加藤²⁾の6.3%、小畑³⁾の7.6%、東出⁴⁾の11.6%などであり、このほぼ中間に位置している。

また不妊患者延総数1269名のうち、5年間で165名が妊娠に成功しており、妊娠率は13.0%、各年度別でも毎年10%以上を示している計算となるが、実際は挙児希望者数766名中165名が妊娠しており、妊娠率は21.5%となる。そして原発不妊における妊娠率は18.0%、続発不妊では29.5%となっており、明らかに後者の方が高く、これは伊東⁵⁾、高田⁶⁾、東出⁷⁾らの報告と同じ傾向を示している。

2. 初診時年齢分布と妊娠率

挙児を希望し来院した766名の初診時年齢分布をみると、表2のように、25歳以下194名(25.3%)、26～30歳が424名(55.4%)、31～35歳125名(16.3%)、36歳以上が23名(3.0%)であり、26～30歳群のみで約半数以上を占めている。これに妊娠例をあてはめてみると、やはり26～30歳群が107名(64.9%)と約2/3を占めており、次いで25歳以下、31～35歳、36歳以上の順となつてい

る。これは初診時年齢分布と同じ分布をしており、一般には、初診時年齢が若いものほど妊娠率が高く、加齢に伴つてそれが低くなると報告^{8,9)}されているが、今回の調査では、25歳以下の群が、26～30歳群に劣っている。これは挙児希望の熱意の差によって、通院治療を中止するものが多かつたことによるものであろう。

3. 初診時不妊期間と妊娠率

表3は初診時不妊期間と妊娠率をみたものであるが、不妊期間5年以上で外来を訪れたものが193名と最も多く、また4～5年で訪れたものが66名と最も少なかった。これは大学病院の特徴によるものではないかと思われる。また妊娠例数を見ると、不妊期間1～2年のものが48名と最も妊娠例が多く、結局不妊症とは健全な夫婦が2年以上経過しても妊娠しないものとする定義からは、不妊症とは診断できないものが79名、47.9%も妊娠していることになる。これは医学的知識の普及と共に結婚後間なくとも婦人科を訪れるものが多くなつたことを示しており、逆に不妊症における不妊期間についても、よく考えねばならないことを示唆している。

そして妊娠率からみると、不妊期間の短いものほど妊娠率が高いという傾向がみられており、特に不妊期間4

表 4 妊娠成立までの治療期間と年齢

	～25歳	26～ 30歳	31～ 35歳	36歳～	合計
0～3カ月	9	28	4	1	42
3～6カ月	5	25	1	0	31
6カ月 ～1年	12	19	3	1	35
1～2年	7	25	7	1	40
2～3年	4	9	1	0	14
3～4年	1	1	1	0	3
合 計	38	107	17	3	165

年以上になると、加速度的に妊娠率は悪くなっている。

4. 初診から妊娠までの治療期間

妊娠 165 名の初診より妊娠までの治療期間を分類する

と、表 4 のような成績であつた。初診から 1 年以内の妊娠が 108 名、1～2 年の妊娠が 40 名で、結局 2 年以内の治療期間で 148 名、約 90 % が妊娠している。楠田⁹⁾も不妊婦人の中で比較的容易に治療可能な症例は、大半が通院 2 年以内で妊娠に成功すると述べており、従つて、2 年以上にわたる治療での妊娠は少なく、逆に不妊症治療としては、最低 2 年間の治療を続ける必要があるといえる。

治療期間の最も長いものは、3 年 5 カ月の治療によつて妊娠している。

5. 症型別分類と妊娠率

挙児希望者 766 名中確定診断し得た 581 名の症型を分類し、更にそれぞれの妊娠率を示したものが、表 5 である。残りの 185 名は確定診断を下し得ないまま、途中より治療中断をした症例であるが、約 1/4 を占めており、

表 5 不妊因子別頻度と妊娠率

不 妊 因 子		例数	頻 度	妊娠例数	妊娠率	原発不妊	続発不妊
内 分 泌 ・ 卵 巢 因 子	第一度無月経	64		19		11	8
	第二度無月経	30		1		1	0
	無排卵周期症	51		20	72	11	9
	散発性排卵	7	(29.6%)	5	(31.7%)	1	4
	乳汁漏出症	3		2		2	0
	機能性子宮出血	9		4		1	3
	黄体機能不全	63		21		15	6
卵 管 因 子	卵管閉塞、狭窄	29	92	15	40	8	7
	卵管癒着	38	(12.0%)	0	(43.5%)	0	0
	仮性卵管閉塞	25		25		14	11
子 宮 因 子	子宮發育不全	10		0		0	0
	子宮奇型	15		0		0	0
	子宮筋腫	9	71	4	5	3	1
	子宮内膜因子	16	(9.3%)	1	(7.0%)	1	0
	子宮内膜症	15		0		0	0
	子宮内腔癒着	6		0		0	0
頸 管	フーナー異常	8	9	1	1	1	0
	頸管無力症	1	(1.2%)	0	(11.1%)	0	0
男 性 因 子	乏精子症	64		6		5	1
	無精子症	41	117	2	8	2	0
	精子無力症	9	(15.3%)	0	(6.8%)	0	0
	精子死滅症	2		0		0	0
	逆行性射精	1		0		0	0
機能性不妊症		65	(8.5%)	28	(43.1%)	16	12
確定診断未定 検査不充分例		185	(24.1%)	17	(9.2%)	6	11
合 計		766		171		98	73

これが不妊外来の大きな問題点の1つであり、かつ又妊娠率を低下させる原因ともなっている。

不妊因子別分類では、内分泌・卵巣因子が227名と29.6%を占めており、次いで男性因子117名15.3%、卵管因子92名12.0%、子宮因子71名9.3%、機能性不妊症65名8.5%、頸管因子9名1.2%の順となっている。

機能性不妊症は、本来黄体機能不全症の一部も含むが、今回は明らかに BBT と血清プロゲステロン^{10,11)}より黄体機能不全症としたものとは別に扱い、排卵性月経があり、両側卵管が疎通し、子宮にも筋腫その他の異常を認めず、精液検査所見も正常なるものを、機能性不妊症として分類した。

また卵管因子中、仮性卵管閉塞が25名あるが、これは卵管疎通性の検査施行後、妊娠した症例であり、HSG や通気が単なる検査だけではなく治療としても十分意義があるということを示している。

男性因子中、無精子症が41名もあり、これは絶対的な不妊であり、本来の不妊症治療という面からは除外すべきものかもしれない。また精子無力症9名、精子死滅症2名、逆行性射精1名が男性因子に含まれている。

次いで、妊娠成功例165名を因子別にみると、黄体機能不全症、無排卵周期症、第一度無月経など内分泌・卵巣因子が72名と最も多く、卵管因子40名、機能性不妊症28名、男性因子8名、子宮因子5名、頸管因子1名の順となるが、これを因子別の妊娠率でみると、卵管因子が43.5%と最も多くなり、次いで機能性不妊症の43.1%、内分泌・卵巣因子31.7%などの順となる。

また直接積極的な治療を行なうことなく、妊娠した17名は、本来機能性不妊症に入るべきものかもしれない。なお習慣性流産の症例は除外してある。

さらに原発、続発不妊別でみると、男性因子、子宮因

表6 妊娠成功例の治療内容

Clomid+hCG	46
Clomid+Et	6
Sexovid	3
hCG	8
HMG+hCG	3
Clomid+HMG+hCG	1
Kaufmann, Holmstrom	3
Premarin	1
CB 154	2
Clomid 休業中	18
Sexovid 休業中	1
子宮卵管造影後	23
卵管通気後	2
卵管通水	15
子宮内膜搔爬	1
子宮筋腫核出術	4
AIH	6
AID	2
夫のホルモン療法	1
その他	24
合 計	170

子などは当然のことながら原発不妊に多く、その他の因子も、既に報告^{8,9)}されている如く原発不妊に多い傾向がみられた。

6. 妊娠例における有効治療法

妊娠165名に有効であつた治療内容を列記すると表6の如くであつた。

排卵障害群においては、clomiphene, cyclofenil, CB-154, HMG-HCG, clomiphene-HMG-HCG 療法などを行い、rebound 療法としては、Kaufmann 療法、

表7 月経異常患者の妊娠例におけるホルモン療法

	第一度無月経		第二度無月経		無排卵周期症		散発性排卵		機能性子宮出血		合 計
	原発	続発	原発	続発	原発	続発	原発	続発	原発	続発	
Clomid+hCG	6	3	0	0	5	7	1	2	0	2	26
Clomid+Et	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3
Sexovid	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
hCG	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
HMG+hCG	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	3
Clomid+HMG+hCG	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Kaufmann, Holmstrom	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	3
Premarin	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
CB 154	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
合 計	11	6	1	0	10	7	1	2	1	2	41

表 8 Clomid による排卵誘発成績と妊娠率

	投与例数	排卵例数	投与周期数	排卵周期数	排 卵 率	妊 娠 数	妊 娠 率
第一度無月経	67	51	343	185	53.9%	10	14.9%
第二度無月経	30	3	111	12	10.8%	0	0
無排卵周期症	51	49	201	168	83.6%	14	27.5%
散発性排卵	7	7	29	26	89.7%	3	42.9%
機能性不妊症	112	112	447	436	97.5%	23	20.5%
機能性子宮出血	9	8	14	13	92.9%	2	22.2%
合 計	276	230	1145	840	73.4%	52	18.8%

Holmstrom 療法, premarin, E-P injection などを行い排卵を誘発しその結果41名が妊娠に成功した。

その内訳を症型別に分類したものが表7であり、第一度無月経17名、第二度無月経1名、無排卵周期症17名、散発性無排卵周期症（以後散発性排卵と略）3名、機能性子宮出血3名の41名で、この殆どが、無排卵周期症と第一度無月経で占められており、第二度無月経は HMG-HCG 療法で1名が妊娠しているのみであり、治療の非常に困難なことがわかる。

その他の療法として通水法にて15名が妊娠しているが、通水療法の内容は、ウロキナーゼ3600IU、デキサメサゾン2mg、抗生物質を生食水20mlに溶かして1周期1～2回施行、6カ月間で一応のクールとしている。また先に述べた如く、HSG, Rubin test 後妊娠した、いわゆる卵管仮性閉塞が25名もあり、この検査法は治療効果もかなり期待でき、大切といえる。子宮因子では子宮筋腫核出術後4名が、子宮内膜搔爬後1名が妊娠しており、頸管因子の1名と乏精子症の6名は AIH にて妊娠している。

しかし有効治療不明が24名（14.1%）もあり、不妊症治療のむずかしさを象徴しているようである。

7. clomiphene による排卵誘発成績、妊娠率

clomiphene による各症型別の排卵誘発成績、妊娠成功率をまとめたものが表8である。

clomiphene を投与した276名の患者のうち230名（83.3%）即ち1145投与周期中840周期（73.4%）に排卵し、18.8%の妊娠率であった。

倉智¹²⁾は clomiphene による排卵率は59.5%、妊娠率は12.1%と述べており、野口¹³⁾の排卵誘発率70.4%、妊娠率33.3%という良い成績の報告もあるが、今回の成績は、投与例あたり82.6%、周期あたり66.6%、妊娠率22.9%と報告している金岡¹⁴⁾の成績とよく一致しており、また高い排卵率を示したのも、後述するように、積極的に機能性不妊症などに投与した為であろう。

各症型別にみると、当然のことであるが、機能性不妊

症が112名中112名、447周期中436周期、97.5%と最も高い排卵率を示し、次いで機能性子宮出血の92.9%、散発性排卵の89.7%、無排卵周期症の83.6%の順となつていゝが、第一度無月経においては53.9%、さらに第二度無月経では10.8%という低い排卵率であった。

その結果、52名（18.8%）が妊娠した訳であるが各症型別では、散発性排卵が7名中3名（42.9%）と高率の妊娠率を示し、次いで無排卵周期症の順と続いている。

また排卵性周期を有している機能性不妊症及び黄体機能不全症に対しても、当科では既報¹⁵⁾の如く、積極的に clomiphene を投与しており、その結果23名（20.5%）が妊娠した。

機能性不妊に clomiphene 療法が有効である理由としては、clomiphene 投与により卵胞期の gonadotropin の分泌増加、卵胞成熟の促進がおこり、その結果黄体機能の活発化が引き起こされるためとか、clomiphene 投与によつて true ovulatory cycle が得られるためなどが考えられる。

また更に投与次周期から休薬6カ月以内の無処置期間に19名が妊娠しており興味深い。これは clomiphene の持ち越し効果 (carry over effect) であることが示唆されるが、休薬することにより clomiphene の抗エストロゲン作用も解除されることになり、妊孕性の亢まつたことによることも考えられる。

以上のことより clomiphene をやたらに長期間投与することは、かえつて頸管粘液量の減少、子宮内膜腺の発育遅延をおこすので、連続投与は3回程度とし、必ず数カ月間の休薬期間をおくことが必要である。

8. ゴナドトロピン療法と妊娠

表9のように昭和50年1月から54年7月までの4年7カ月間の治療患者数は40名、117周期であった。排卵周期は第一度無月経で66%、第二度無月経で49%で、6大学の集計¹⁶⁾では各々75.2%、63.1%であり、当科ではやや悪い成績であった。妊娠例は8例（20%）で2例の双胎妊娠と2例の流産を認めた。尚、卵巢過剰刺激症候群は

表 9 HMG-hCG 療法と卵巣過剰刺激症候群 (OHS)
(S. 50. 1-S. 54. 7)

	投 与 例		排 卵 例		妊 娠 例	OHS 例	
	症例数	周期数	症 例 数	周 期 数		軽 度	中 等 度
第一度無月経	17	51	8(47%)	25(49%)	2	0	0
第二度無月経	21	64	16(79%)	42(66%)	5	3	2
無排卵周期症	2	2	2(100%)	2(100%)	1	1	1
合 計	40	117	26 (65%)	69 (59%)	8 (20%)	4 (18%)	3

表10 妊娠の予後

	分 娩	頻 度	流 産	頻 度	妊娠継続中	頻 度	転 医	合 計
原発不妊	60	79.0%	14	18.4%	2	2.6%	19	95
続発不妊	44	71.0%	14	22.5%	4	6.5%	8	70
合 計	104	75.4%	28	20.3%	6	4.3%	27	165

Jewelewicz¹⁷⁾の criteria による “mild” が 4 例, “moderate” が 3 例の計 7 例 18% で 第二度無月経には 1 例もみられなかった. Jewelewicz らの報告¹⁷⁾の “mild” が 20%, “moderate” が 7%, “severe” が 1.8% に比べやや低い.

9. 妊娠成功例の臨床経過

一般的に不妊婦人においては, 妊娠に成功しても, 流産率が高いといわれている. 今回の成績でも表 10 の如く, 他医紹介などの転医例が 27 名もあり, これを除くと, 満期分娩は 138 名中 104 名, 75.4% であるのに対し, 流産例が 28 名, 20.3% もみられている. 楠田⁹⁾は分娩 52.6% に対し 16.7% の流産率, 東出¹⁰⁾も分娩 51.3% に対し 13.5% の流産率を, また高野¹⁸⁾は 25.6% の流産率を報告している.

今回の流産例の中には 2 名の子宮外妊娠, 2 名の人工中絶を含んでいるが, これらを考慮しても, 自然妊娠例の流産率は 10~11% と報告¹⁹⁾されているので, やはり高い流産率といえる. そして原発, 続発不妊別についてみると, 続発不妊の方にやや流産率の高い傾向がみられた.

また多胎妊娠に関しては, clomiphene 投与にて妊娠した 52 名中 4 名に双胎妊娠がみられ, うち 1 名が流産に終っている. そしてゴナドトロピンを投与した 4 名中 2 名にも双胎妊娠がおこっており, うち 1 名は妊娠 27 週流産している.

分娩出産した 104 名のうち 1 例も奇形は認められなかった.

10. 症型別妊娠経過

表11 不妊因子別妊娠の予後

	分娩	流産	妊 娠 継続中	合計
内分泌・卵巣因子	44	14	1	59
卵 管 因 子	21	9	1	31
子 宮 因 子	3	2	0	5
頸 管 因 子	1	0	0	1
男 性 因 子	7	0	0	7
機能性不妊症	20	4	2	26
そ の 他	12	1	2	15
合 計	108	30	6	144

妊娠例 171 (重複診断 6 例含む) 中転医 27 例を除く

妊娠経過を各症型別にみると, 表 11 のようであつた. この表からは症例数にかなりの差があり, この比率から比較するのは適当でないと思われるが, 傾向としては, 子宮因子, 卵管因子, 内分泌・卵巣因子, 機能性不妊症の順に流産が多くみられた. これを更に詳しく述べると, 子宮筋腫 4 名中 2 名 (50.0%), 卵管因子 31 名中 9 名 (29.0%), 黄体機能不全症 19 名中 5 名 (26.3%), 第一度無月経 17 名中 4 名 (23.5%), 機能性不妊症 26 名中 4 名 (15.4%) などが主なものであつた.

また男性因子, 頸管因子においては流産はみられなかった.

稿を終るにあたり, 不妊外来の診療に携わっていただいた, 坂出回生病院産婦人科部長吉本忠弘博士, 森下一講師, 奈賀助助手に感謝致します.

文 献

- 1) 楠田雅彦, 納島廉正, 熊本照史, 福嶋恒彦: 教室における不妊婦人の統計的観察, 日不妊誌, 14: 95, 1969.
- 2) 加藤 俊, 岡本 元, 宮原通義, 井手ベ橘, 松尾雅彦: 女性不妊症の外來臨床統計と妊娠成功例の検討, 日不妊誌, 16: 362, 1971.
- 3) 小畑 義, 石原貞尚, 東山秀声, 村上 旭, 岡田弘二: わが教室における昭和41~45年の外來不妊統計, 日不妊誌, 18: 44, 1973.
- 4) 東出香二, 下須賀洋一, 万羽 進, 成田 収: 最近の当教室における不妊外來統計, 日不妊誌, 22: 208, 1977.
- 5) 伊東武久, 宮内文久, 木戸雄一, 右田満明, 福田栄: 最近2年間の当科不妊症クリニックの現況, 日不妊誌, 21: 188, 1976.
- 6) 高田 久: 農村都市における不妊症の実態, 日不妊誌, 19: 137, 1974.
- 7) 東出香二, 成田 収, 万羽 進, 下須賀洋一, 木村 隆, 中西 勉, 友田 豊: 最近の不妊外來における妊娠成功例の検討, 日不妊誌, 23: 354, 1978.
- 8) 西村敏雄, 杉本 修, 矢野弘之, 林 俊郎, 広崎彰良, 鈴木 瞭, 池谷東彦, 横山重喜, 道本知子: 不妊治療成績の統計的観察, 日不妊誌, 12: 125, 1967.
- 9) 楠田雅彦, 立山浩道, 熊本照史, 中村正彦: 教室不妊外來における妊娠成功例の検討, 日不妊誌, 17: 273, 1972.
- 10) 高橋久寿, 松家五朗, 加藤秀之, 増田歳久, 吉崎健一, 堤 康, 乾 泰延, 三村経夫, 足立春雄: 産婦人科領域におけるホルモン測定と臨床的意義, 臨床病理, 23: 865, 1975.
- 11) 高橋久寿, 足立春雄: 性ステロイドホルモンの臨床生化学, 臨床婦人生化学 (足立春雄編), 167, 理工学社, 東京, 1978.
- 12) 倉智敬一: 現代産科婦人科学大系 4 C 「内分泌症候学」: p 135, 中山書店, 1971.
- 13) 野口昌良, 高木 孝, 花田征治, 中北武男, 近藤東洋夫, 中根茂雄, 森川満夫, 伊藤祐正, 中西正義, 八神喜昭: クロミヘンサイトレート (クロミッド) による排卵誘発効果, 日不妊誌, 16: 183, 1971.
- 14) 金岡 毅, 岡田悦子, 清水潤司, 森 巍, 関場香: 当科不妊外來における最近2年間の妊娠例についての検討, 日不妊誌, 18: 99, 1973.
- 15) 高橋久寿, 松家五朗, 加藤秀之, 乾 泰延, 三村経夫, 増田歳久: 機能性不妊症の薬物療法—特に clomiphene の有効性について—, 産婦治療, 39: 93, 1979.
- 16) 高木繁夫, 津端捷夫, 浜田正一, 坂元秀樹: 排卵誘発と多胎妊娠, 産婦治療, 33: 504, 1976.
- 17) Jewelewicz, R., Dyrenfurth, I., Warren, M. P. & Vande Wiele, R. L.: Gonadotropin Therapy in Female Infertility, ed Rosenberg. p 235, 1973.
- 18) 高野 昇, 清水三郎, 高見沢裕吉: 当科不妊外來における妊娠例の検討, 日不妊誌, 20: 383, 1975.
- 19) 倉智敬一: 現代産科婦人科学大系 17A 「流早産」: p 21, 中山書店, 1974.

Clinical observation on the pregnant cases in our infertility clinic during 5 years

Goro Matsuka, Toshihisa Masuda,
Kenichi Yoshizaki, Yasunobu Inui,
Tsuneo Mimura, Satoru Takeuchi,
Shuji Yamano and Hisatoshi Takahashi

Department of Obstetrics and Gynecology,
Tokushima University, Medical School

The statistical observation on 165 successful pregnant cases of the infertile women who had visited on our sterility clinic for 5 years from January 1974 to December 1978 was examined.

The total number of infertile women who visited on our clinic during 5 years was 766, and the frequency of sterility amounted to 8.0% in our outpatient diseases. The infertile periods on first visit of 79 successful pregnant cases was less than 2 years.

The highest rate of conception was noted in group of age 26-30, that is 25.2% of this group succeeded in pregnancy.

Analysis of the correlation between the clinical status and effectiveness of various treatments was performed.

The pregnancy rate in anovulatory group with occasionally ovulatory cycle (71.4%), functional uterine bleeding (44.4%) and anovulatory cycle (39.2%) were high, in ovulatory group with tubal obstruction (43.5%), functional sterility (43.1%) and corpus luteum insufficiency (33.3%) were also high.

The treatments which succeeded in having pregnancy were mostly clomiphene citrate therapy in women with ovulatory failure, and effective treatments in ovulatory group were HSG or kymoinsufflation (14.7%), activation of luteal function by clomiphene citrate (13.5%) and hydrotubation (8.8%), but 24 of them had no therapy (14.1%).

The rates of ovulation in clomiphene citrate group were 83.3% by cases and 73.4% by cycles, and pregnancy rates were 18.8%.

As clinical outcome or consequence of these patients, 75.4% of them terminated as normal and full term delivery, however, 20.3% were aborted. The incidence of abortion was higher.

(受付: 昭和54年10月22日)

当大学病院家族計画外来開設後の臨床統計

Statistical Analysis on the Infertile Women in our Family Planning Clinic

東海大学医学部産婦人科

林 茂 興 塩 塚 幸 彦 大 和 竜 夫
Shigeoki HAYASHI Yukihiko SHIOZUKA Tatsuo YAMATO

林 茂 一 郎 小 林 一 夫
Moichiro HAYASHI Kazuo KOBAYASHI

井 上 正 人 見 常 多 喜 子 藤 井 明 和
Masato INOUE Takiko KENJO Akikazu FUJII

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

昭和50年7月より昭和54年6月までの間に挙児希望で来院した558名を対象とし臨床統計的分析を行った。

(1) 初診時年齢分布は25歳より30歳迄が最も多く認められた。原発不妊で20歳以下が2例、原発、続発不妊併せて39歳以上が7例認められた。

(2) 不妊期間に関しては1年より3年迄が最も多数であったが、不妊期間1年以内の来院が原発不妊50例(14.5%)、続発不妊51例(23.8%)あり、不妊症に対する患者側認識の向上が推定され、その対策の必要性が痛感された。

(3) 不妊原因としては卵巣因子21.6%男性因子25.9%と高率を占めたが、精液検査が45.1%の施行率であるから男性因子による不妊症はより高率である可能性もあり、routine 検査としての精液検査の必要性が示唆された。

(4) 妊娠成功例は153例(29.2%)であり、その誘因となつた検査、治療法は、子宮卵管造影術が41例と最も多く、次は排卵誘発による30例であった。

(5) 習慣性流産例35例の検討では、子宮腔内癒着症等の器質的疾患が16例に認められた。

19例の原因不明例のうち12組24人の夫婦の染色体分析を行ったところ5人に転座型等の染色体異常が認められた。

告する。

1. 緒 言

2. 検索対象

東海大学病院家族計画外来では、不妊症、不育症の患者のみでなく避妊を希望する患者も対象としており広く家族計画全般に関与する診療を行つている。また不妊期間も特に限定せず挙児希望で来院した場合には不妊期間1年以内でも相談に応じ指導を行つている。

今回、昭和50年7月の当科開設より昭和54年6月迄の約4年間の症例について臨床統計的検討を行つたので報

昭和50年7月1日より昭和54年6月30日までの3年11カ月間に当科家族計画外来受診者687名の内、不妊又は不育症を主訴とする挙児希望の患者558名を対象として検討を行った。この中には35名の習慣性流産症患者が含まれている。

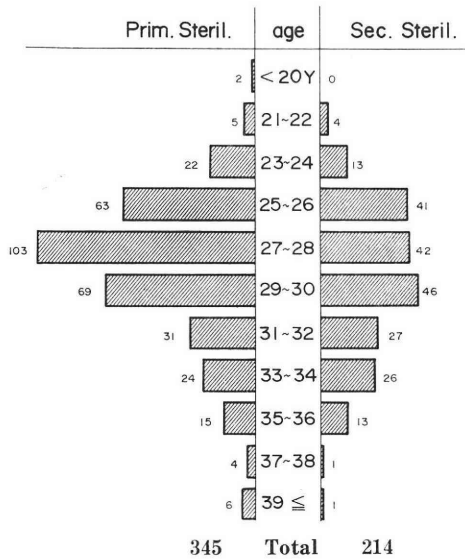


Fig. 1 Distribution of age

3. 結 果

(1) 患者年齢分布 (Fig. 1)

不妊期間に関わりなく、妊娠歴の全くない者を原発不妊、流産分娩等の妊娠歴を有している者を続発不妊として検討を行ったが(以下同じ)、当科初診時の年齢分布をみるに、原発、続発不妊ともに25歳より30歳迄が最も多く、原発不妊では27~28歳に高いピークが認められた。

原発不妊で20歳以下2例、また原発、続発不妊併せて39歳以上が7例認められた。

(2) 不妊期間 (Fig. 2)

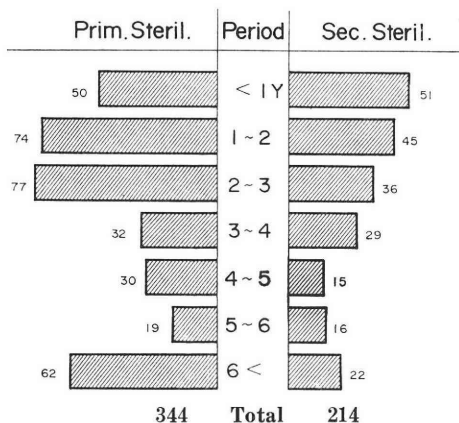


Fig. 2 Period of sterility

当科受診迄の不妊期間は、原発不妊では不妊期間1~3年での来院が多く151例(43.9%)であった。また6年以上が62例(18.0%)も認められた。前述せる如く挙児希望で来院した患者を全て不妊症又は不育症として取

扱っているため1年未満が50例(14.5%)と比較的多数認められた。

続発不妊では1年未満から3年迄が最も多く特に1年未満が51例(23.8%)と多数を示したのは前回妊娠が流産で、その後直ちに挙児希望にて当科を受診した患者を含んでいるためである。

(3) 他診療機関受診歴 (Fig. 3)

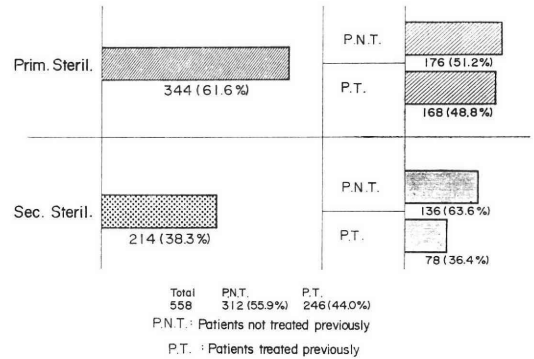


Fig. 3 History of previous treatment

昭和50年7月新設という当科の特殊性を考慮し当科受診前に他診療機関で検査治療を受けたか否かを検討した。

原発不妊では168例(48.8%)に他医受診の既往があり、続発性不妊では78例(36.4%)が他医受診の既往を有している。これらの患者は紹介、又は患者の転居、又は近くに当科が新設された等の理由により当科を訪れている。

(4) 検査施行率 (Table 1)

Table 1 Examination

H. S. G.	464 (83.2%)
Rubin test	394 (70.6%)
Endomet. biopsy	322 (57.7%)
Semen exam.	252 (45.2%)
Huhner test	173 (31.0%)
Menst. bl. cul.	208 (37.3%)

不妊期間1年未満例、又は習慣性流産例、他診療機関より検査結果を記載せる紹介状持参例等を除き、当科初診者はroutine検査を系統的に全て受けるよう指導を行なっている。初診時 Fig 4に示すパンフレットで検査項目の説明を行ない、まず1カ月間基礎体温測定を行なわせ、次周期の高温相7日目に内膜検査を行ない以後経血培養、子宮卵管造影術と順次行なっている。

各検査項目別に施行率をみるに子宮卵管造影術が最も高率であり、これに比較して子宮内膜検査が低率なの

東海大学病院

不妊症一般検査について

婦人体温表

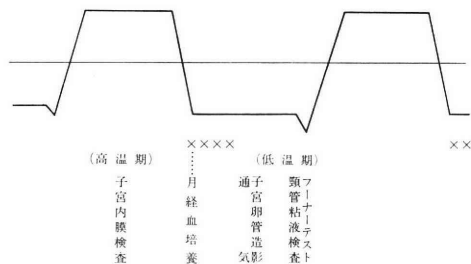


Fig. 4 Program of routine examination

は、無排卵症や、特に原発不妊では子宮ゾンドの挿入も不可能で内膜採取を施行しえなかつた症例があつたためである。

精液検査は252例(45.2%)と約半数しか行なわれていない。

(5) 不妊原因 (Table 2)

不妊原因を因子別に検討してみると、卵巣因子が原発、続発不妊とも高頻度であり、また男性因子が原発不妊で乏精子症、無精子症を併せると102例(33.5%)に認められ、続発不妊でも18例(11.3%)に乏精子症を認めた。乏精子症は4～5日間禁欲後に用手法により精液を採取させ、精子数 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以下のものとしている。

機能性不妊は routine 検査で特に異常を認めないにもかかわらず2年以上不妊のもので、腹腔鏡検査を行なつた症例も含んでいるが、必要事項とはしていない。

原因不明群が原発不妊47例(15.5%)、続発不妊81例(50.9%)と高値を示したのは、routine 検査現在施行中の例や、何らかの理由により検査を全て終了しえなかつた症例を全て含んでいるためである。なお習慣性流産例35例はこの中に含まれていない。

(6) 検査、治療別妊娠成功例 (Table 3)

習慣性流産例を除外した523例中妊娠成功例は153例

Table 2 Cause of sterility

	Prim. Steril.	Sec. Steril.
Uterus		
Endometritis	1	1
Adhesion	1	2
Myoma	3	0
Anomaly	5	2
Cervix	14	6
Oviduct	23	18
Ovary	75	25
Polycystic Endometriosis	17	0
Semen		
Azospemia	18	0
Oligospemia	84	18
Functional	14	6
Unknown	47	81
Total	304	159

Table 3 Cause of pregnancy

Induced Ov.	30
H. S. G.	41
Rubin test	2
Hydrotubation	4
Endomet. Curet.	3
A. I. H. (A. I. D.)	10(2)
Pseudopreg.	1
DANAZOL	1
Treatment for luteal insuff.	10
Hydrotubation, Induced Ov.	3
Gynecol. exam.	7
Therap. Asherman's Synd.	1
Laparo. Induced Ov.	2
Unknown	38
Total	153

(29.2%)であつた。

各項目別の妊娠件数は子宮卵管造影術施行後の妊娠例が41例と最も多く、次いで排卵誘発による妊娠が30例であり、AIDによる2例の妊娠例は他診療機関へAIDのみを依頼し妊娠した症例である。

原因不明例は routine 検査終了後検査結果に特別異常を認めないため基礎体温測定のみにて数カ月経過を追っていたところ妊娠した例と、同様 routine 検査終了後又は、検査中に患者側の都合で来院を中止し数カ月後に再び来院した時には妊娠が成立していた例を含んでいる。

(7) 習慣性流産例の検討 (Table 4)

Table 4 Cause of habitual abortion

Uterus	Anomaly	1 (2.9%)
	Hypoplasia	2 (5.7%)
Intra uterine adhesion		6 (17.1%)
Cervical insuffi.		4 (11.4%)
Intra uterine adhesion +Cervical insuffi.		3 (8.6%)
Unknown		19 (54.3%)
Total		35(100.0%)

2 回以上連続して流産を繰り返した場合を習慣性流産症とし、末梢血、血沈、梅毒血清反応、トキソプラズマ検査、一般検尿を行ない、さらに子宮卵管造影術を行っている。

35 例中一般検査で異常を認めた例は全くなき、子宮卵管造影術により子宮腔内癒着症 6 例、子宮頸管不全症 4 例等が認められた。これら器質的又は機能的異常の認められた例ではその治療法を施行しているが、この様な検査により全く異常が認められない例が 19 例 (54.3%) 存在した。

著者等はこのような原因不明習慣性流産例では患者によく説明を行ない同意が得られたならば夫婦両者の染色体分析を行なっている。

12 組 24 人の染色体分析を行ない、5 人に転座型の染色体異常を認めた (Table 5)。

Table 5 Analysis of karyo type

1	46, XY, t (7q-, 10p+)
2	46, XY, 13p-
3	46, XX, 21p-
4	46, XX, Dp+
5	46, XY, inv (9p+, 9q-)
(total 12 couples)	

4. 考 案

挙児希望にて来院した患者の初診時年齢分布は、原発、続発不妊共に 25~30 歳に最も高率であったのは三上¹⁾、品田²⁾等の報告と同様である。20 歳以下の 2 例は不妊期間も 1 年以内であり真の不妊症とはいい難いが、最近の不妊症への認識の向上を反映していると考えられる。このような症例では著者等は基礎体温を測定させ排卵日や妊娠可能な時期の説明を行ない、患者の要望が強ければ頸管粘液検査、Huhner 検査を行ない、経過を追うようにしている。

39 歳以上が 7 例認められたが、このような症例では不妊期間も長く治療困難なことが多い。また年齢的に妊娠率

の低下や、Down 症等の先天異常児の発生率の上昇等、様々な問題を含んでおり検査治療の施行に困惑することが少なくない。患者の社会的条件も加味して case by case の判断が必要であると考えられる。

不妊期間に関しては従来 3 年以上の不妊期間の例を不妊症として取扱っていたが、最近では柚木³⁾等は 2 年以上、三上¹⁾、五十嵐⁴⁾等は 1 年以上経過している場合には不妊症として検査治療を行なうべきであると報告している。当科では、原発不妊 50 例、続発不妊 51 例が不妊期間 1 年以内で来院している。1 年以内の不妊期間で不妊症として取扱うのは必ずしも妥当とは言えないが、著者等は原発不妊では基礎体温を測定させ妊娠可能な時期の説明を行ない定期的に来院させて経過を追求している。また流産歴を有している続発不妊では積極的に検査治療を開始している。

当科受診前の他診療機関受診歴では、原発不妊 48.8%、続発不妊 36.4% が他医で検査、治療を受けた既往があり、その中には他機関での検査施行途中に当科へ転医し、しかも紹介状等今まで施行した検査結果を持参していないため、routine 検査を最初から施行しなければならなかった例も多く含まれている。不妊症の検査治療開始前に、現在大学病院、官公立病院等の不妊症外来で行なわれている routine 検査は、ほぼ同様であり、特に差はないから、routine 検査は同一医療機関で受けた方がよい結果となることが多いし、また家庭の事情で他医療機関へ移る場合は申し出があれば、施行した検査結果を記載した紹介状を記載することをよく説明し指導を行なっておく必要性が痛感される。

不妊原因の各因子別検討では卵巣因子と男性因子が高率を示した。乏精子症、無精子症の男性因子は原発不妊 102 例 (33.5%) 続発不妊 18 例 (11.3%) と高値を示したが、精液検査が 252 例 (45.1%) にしか施行されなかった事を考慮すると、実際の男性因子による不妊はより高頻度である可能性も考えられ男性因子検査の重要性が認識される。続発不妊で乏精子症が 18 例 (11.3%) に認められたが、三上¹⁾、楠田⁵⁾等も指摘しているところであり、秦⁶⁾等の如く続発不妊では精液検査を除外するという報告もあるが、著者等は原発、続発不妊共に精液検査は必ず施行すべきであると主張したい。

治療別に妊娠成功例をみると、子宮卵管造影術施行後に 41 例妊娠が成立している。品田²⁾、高野⁷⁾等も同様の報告をしており、本検査法が優れた治療効果を有していることを示していると考えられる。

排卵誘発法としては clomid, sexovid, HMG-HCG 等を使用しているが、最近の内分泌学の進歩はめざましく、今後、卵巣因子が原因の不妊症ではさらに妊娠率が

向上すると考えられる。

直接的な誘因不明な妊娠例は routine 検査終了後特に異常を認めないため、経過観察を行なっていたところ妊娠した例や、患者が一時来院を中止し、数カ月後に来院した時は妊娠が成立していた例であり、それまでに施行した検査治療法の総合効果とも考えられる。このような例が38例と多数認められるところにも不妊症治療の難かしさが現われており、著者等は routine 検査後、特に異常な結果のない例や軽度異常があり一定期間治療を行なっても妊娠成立しえない例では、一時来院を中止させて患者の精神的安定を図る試みも行なっている。

習慣性流産症は従来の検査法では異常を発見出来ず原因不明とされる例が多かった。当科では患者の同意が得られればこの様な症例で夫婦双方の染色体分析を行なっている。12組24人中5人(20.8%)に転座型等の染色体異常が認められた。今後原因不明な習慣性流産例では分染法による染色体分析を可能ならば施行すべきであると考えられた。

なお本論文の要旨は第24回日本不妊学会総会で報告した。

文 献

- 1) 三上正憲, 植村次雄, 鈴木直行, 高田二郎, 塩島令儀: 当教室における不妊クリニック統計, 日不妊誌, 22: 203, 1977.
- 2) 品田孝夫, 竹中恒久, 横田佳昌, 大和田信夫, 阿美邦榮: 不妊外来における臨床統計的観察, 日不妊誌, 24: 80, 1979.
- 3) 柚木祥三郎: 不妊症付避妊, 15/1: 2, 金原出版, 1956.
- 4) 五十嵐正雄, 保坂 久, 佐藤昭吾, 小沢陸男, 藤間幸道: 群馬大学産婦人科不妊外来の検査成績(第一報), 日不妊誌, 6: 92, 1961.
- 5) 楠田雅彦, 納島廉正, 熊本照史, 福嶋恒彦: 教室における不妊婦人の統計的観察, 日不妊誌, 14: 95, 1969.
- 6) 秦喜八郎, 有田 裕, 上笹貫修, 浜田政雄: 当科における不妊症の臨床統計, 日不妊誌, 19: 123, 1974.
- 7) 高野 昇, 清水三郎, 高見沢裕吉: 当科不妊外来における妊娠例の検討, 日不妊誌, 20: 38, 1975.

Statistical analysis on the infertile women in our family planning clinic

Shigeoki Hayashi, Yukihiko Shiozuka,
Tatsuo Yamato, Moichiro Hayashi,
Kazuo Kobayashi

Masato Inoue, Takiko Kenjo, Akikazu Fujii

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

The statistical studies on 558 infertile women who visited our family planning clinic during last four years from July 1975 to June 1979 were performed.

1. The age distribution of the patients: The majority of our patients were 25-30 years old when first seen. Two cases were under the age of 20 and 7 were 39 years or older.

2. The infertile periods: Most of our patients had had 1-3 years of exposure to conception when first came to our clinic, while 50 cases with primary infertility (14.5%) and 51 with secondary infertility (23.8%) had been exposed for less than one year. These figures clearly indicate that the infertile women tend to seek advice and treatment earlier than before.

3. Etiology of infertility: Of all of the causative factors, 25.9% were of male origin. Since complete semen analyses were performed in only 45.1% of our infertile couples, male factors might be in fact more involved, suggesting the importance of the semen analysis as a routine examination for infertility. 21.6% were classified as tubal dysfunctions and were the highest among female factors.

4. Pregnancy rate: The over all pregnancy rate was 29.2%, 153 pregnancies were analysed in terms of therapy. The highest pregnancy rate (26.8%) was achieved after tubal insufflation and hysterosalpingography without any other treatment, followed by ovulation induction with a 19.6% pregnancy rate.

5. Habitual abortion: 35 patients with habitual abortion were included in this study. Organic abnormalities such as intrauterine adhesions were detected in 16 cases. Of the remaining 19 cases, 12 couples were subjected to chromosome analysis, revealing translocation in 5 cases.

(受付: 昭和54年10月22日)

地方部会講演抄録

第83回日本不妊学会関西支部集談会

日時 1979年7月7日

場所 関西医科大学専門部学会第1講堂

1. Gonadotropin 療法における細胞診の意義

堀越順彦・芦原孝三・中島徳郎
余語郁夫・榎木 勇

(関西医大産婦)

HMG-HCG 療法に当つて、卵巣の過剰刺激反応を防止し、排卵時期を決定するためには、卵胞の成熟状態の適確な把握が極めて重要である。今回、頸管粘液検査と陰細胞診をとりあげ、実際の HMG-HCG 療法に当つて、これらと血中 estrogen との相関について検討した。その結果、HMG に反応した症例では、HMG の投与が進むに従つて血中 estradiol (E_2) は増加したが、頸管粘液所見は必ずしもこれに伴つた変化を示さないものもみられた。また、細胞診では、maturation index と karyopicnotic index には定型的な推移は認められなかったが、eosinophilic index (EI) が比較的 E_2 レベルと平行した変化を示した。全体として、頸管粘液所見が E_2 ともつともよく相関し、次いで EI となった。

2. 高ゴナドトロピン性無排卵に対する HMG-HCG 療法と排卵

堤 博 久・小池浩司・高田 満
塩路 武徳・三宅 侃・安田 基
南川淳之祐・宮崎正敏・青野敏博
倉智敬一(大阪大産婦)

女性不妊症の中で無排卵が不妊の原因である患者に対して排卵を誘発することは治療上最も重要である。無排卵症に対して各種の排卵誘発剤が大きな効果をあげているが、卵巣障害を主因とする高ゴナドトロピン性の無排卵症に対して有効な治療法がないのが現状である。我々は LH, FSH 共高値の卵巣性無月経患者で挙児希望の強い患者 21 例に試験的に HMG-HCG 治療を行った。排卵率は 15.5% と予測通り低かつたが、連続して排卵する例も認められ、その際の HMG 使用量は比較的少なく、

HMG-HCG 治療にクロミフェンの priming が有効であることを認めた。高ゴナドトロピン性無排卵症の代表として、続発性無月経の 1 例と原発性無月経を呈する、karyotype が XXp を示す Turner 症候群の 1 例につき HMG-HCG 治療の経過を基礎体温、頸管粘液および各種ホルモン測定により検討したところ排卵を認めた。以上の成績より高ゴナドトロピン性無排卵症であっても排卵を誘発できる可能性が残されていることが示唆された。

3. HMG-HCG 治療における Hyperstimulation と血中ホルモン動態

松岡賢光・麻生武志・蘇 鈞煌

堀江克行・泰井俊造・西村敏雄

(京都大産婦)

奥田喜代司・杉本 修(大阪医大産婦)

HMG-HCG による排卵誘発後の妊娠例における血中ホルモンの経時的変動パターンを分析を試みた。第 1 度無月経の 3 症例 4 周期に対し HMG 150~225IU/day, 7~11日間, HCG 3000~10000 IU/day, 2~4日間投与し、plasma LH, FSH, PRL 及び 9 種のステロイドホルモンの変動を RIA により検討した。卵巣腫大の認められた症例では estradiol, androstenedione は HCG 投与開始時には他に比べて著しい高値で、それまでの HMG 投与量とは明らかな関連が認められなかった。progesterone は HCG に切り換えた後、卵巣腫大例で著明な高値を示し過剰排卵がうかがわれた。特に双胎例での 14 日前後にみられる著しい高値は単胎例に比して絨毛組織より多量に分泌される hCG により卵巣におけるステロイド産生が著明に賦活されたと考えられる。また卵巣腫大のうち 1 例では卵巣腫大の経過とほぼ一致して prolactin が高値を示すなどの興味深い所見が得られた。

4. 不妊外来における最近 1 年間の妊娠について

草西 洋・東山秀聲・岡田弘二

(京都府立医大産婦)

挙児を希望して産婦人科を受診する婦人の数は増加傾

向にあるが、我々の不妊外来の患者数も最近著しく増加している。この度、昭和53年度に於ける不妊外来患者763名の不妊原因別及び治療項目別の妊娠成立とその後の経過につき集計を行い検討を加えた。排卵障害では127例/141例に排卵が誘発され42例に妊娠成立した。黄体機能不全では54例/252例に妊娠成立し、卵管因子では4例/73例、男性不妊因子では2例/98例であつた。全症例の妊娠率は124例/763例(16.3%)で流産率は15例/124例(12.1%)であつたが、高度精子減少症と途中脱落例を除くすると妊娠成立は123例/672例(18.3%)という良好な成績をえた。これは主に排卵障害と黄体機能不全に対する治療後の妊娠成立が多数例にのぼつたためと考えられる。一方卵管因子、男性不妊因子例では低い成績であり、今後の治療法の改善向上がのぞまれる。

5. 卵巣の blood-follicle barrier について

和田裕充・片山和明・望月真人
東條伸平(神戸大産婦)

卵巣の blood-follicle barrier の透過性が、PMS-HCG estradiol, progesterone, histamine によりどの様に修飾されるのかを検索した。

実験動物は成熟家兎を使用した。

対照群には、PMS 300単位を静注し卵胞発育を促し、9時間目に¹³¹I-RISA 200 μ Ciを耳静脈より投与した。9時間半目に卵巣摘出と採血を行い、卵胞液と血清のRISAの濃度を比較したものを%であらわし、これを透過率とした。以上の対照群に加え、PMS追加又はHCG投与群は8時間半目に各々1000単位を静注し、estradiol又はprogesterone投与群は7時間目に各々10mg, 100mgを皮下投与、histamine投与群は8時間55分目～9時間半目にかけて総量500mgを投与した。

透過率は、対照群29～59%・PMS追加投与群48～63%・HCG投与群40～68%、estradiol投与群45～66%、progesterone投与群43～66%、histamine投与群47～68%であつた。

estradiol投与群とhistamine投与群では有意に透過性の亢進する傾向がうかがえ、又、PMS追加投与群も軽度亢進する傾向がうかがえたが、その他の群では有意差はなかつた。

6. 透明帯除去ハムスター卵子と融合する豚精子の微細構造的観察

今井 裕・丹羽皓二・入谷 明
(京都大・農)

豚精子の授精能獲得にともなつて誘起される先体反応

と透明帯除去ハムスター卵子との膜融合前後の豚精子の形態的变化を透過型電子顕微鏡により観察した。豚精子を単純な合成培地である修正KRB液中で前培養しても先体反応は誘起されないし、精子の透明帯除去ハムスター卵子への侵入も認められないが、雌豚子宮内で5時間培養した精子には先体反応がみられ、またこれらの精子は容易に卵子と膜融合する。膜融合は、これまで報告されてきた哺乳動物におけるそれと同様に、精子頭部後領域の細胞膜と卵子細胞膜との間で起こるが、精子の核質の拡散から前核期に至る過程は、豚卵子内で豚精子が示す動態とは異なり、この過程の形態的变化を支配する未知の物質がハムスター卵子内に存在することを示唆する。

7. 人精子 Subcellular fraction による不妊婦人血中精子不動化抗体の吸収実験

窪田耕三・伊藤健一郎・高田喜嗣
香山浩二・磯島 晋三
(兵庫医大産婦)

原因不明不妊婦人の血中に特異的に補体依存性精子不動化抗体が検出されるところから不妊症発生病因の1つとして精子免疫の関与が注目されている。又、この不妊婦人血中に検出される精子不動化抗体が洗滌精子及び無精子症患者精液によつても吸収されるところから、この精子不動化抗体の対応抗原として精子自身の抗原並びに精子表面に付着している精漿抗原、即ち精子付着抗原の関与も考えられている。現在我々は抗体吸収実験法を用いて精漿並びに精子より対応抗原の分離精製を試みており、今回我々は洗滌人精子をsubcellular fractionに分画し、各分画の抗体吸収作用、並びに洗滌精子をパパイニン酵素分解して得た可溶性分画の吸収能力について検討した。人洗滌精子の凍結融解並びにhomogenizationによる可溶性分画及び細胞膜分画に抗体吸収活性が存在した。また洗滌精子の限定的パパイニン分解によつて可溶性抗体吸収活性成分を分離することができた。

8. 精巣血管の微細構造

高山秀則・友吉唯夫
(滋賀医大泌尿科)

ヒト正常成人の精巣内毛細血管の透過型電顕による観察所見について述べる。BennetらによるA-1- α 型に属することは明らかであるが、精巣内毛細血管にはpericyteおよび基底膜の外層に、もう1層の細胞層によつて不完全ながら取り巻かれた型の血管と通常の型の血管の2種が認められた。前者は間細胞と接して存在す

る時にもつともよく観察される。毛細血管の内腔へは内皮細胞質の pseudopodia 様の突起がみられるが、他の内分泌臓器にみるごとき発達した microvillous な突出は稀である。内皮細胞間の接触部では desmosome 様構

造、複雑な interdigitation, $0.2\sim0.8\mu$ の gap 形成, microvilli 様突出による咬合などの種々の接触様式がみられ、複雑な代謝による transport が行なわれていることを物語る。

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 25巻1号

昭和54年12月25日 印刷
昭和55年1月1日 発行

編 集 兼	芦 原 慶 子
発 行 者	
印 刷 者	中 村 清 雄
	東京都品川区上大崎3-12-15
印 刷 所	一ツ橋印刷株式会社
	東京都品川区上大崎3-12-15
発 行 所	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