

日本不妊学会雑誌

第 25 卷

第 4 号

昭和 55 年 10 月 1 日

— 目 次 —

原 著

Cervical Mucus and in Vitro Morpho-Dynamic Studies of Human Ciliated Cells of the Female Genital Tract the Brush Surface Biopsy Technique.....A. Campos da Paz, M.D..... 1

Effects of Prostaglandin E₂ and Various Hormones on Acid Mucopolysaccharides in the Tissue of the Human Cervix Uteri.....M. Nakanishi・他.....14

clomiphene 無効例における prednisolone と clomiphene 併用療法中のホルモン分泌動態.....東山秀声・他.....20

短時間で測定可能な DPC, FSH・LH キットに関する臨床的研究.....大川とみ・他.....29

RIA-Quant™ β-HCG Test Kit の基礎的検討と臨床応用.....福永友明・他.....36

遠隔操作式 Kymographic-Hystero Salpingo Graphy の開発とその臨床応用に関する研究.....飯嶋忠次.....43

卵管形成手術例における子宮卵管造影と卵管内膜走査電顕像との関連.....金倉洋一.....54

妊娠免疫に関する研究
——リンパ球 subpopulation への HCG 関与——.....塩塚幸彦・他.....63

Inhibition of Premature Labor by Indomethacin.....K. Mizuno・他.....68

ヒト精子の客観的運動能解析法の開発——とくに Ficoll 溶液を用いた洗浄精子について.....兼子智・他.....73

Intravaginal Contraceptive Sponge Impregnated with Nonoxynol-9. The Development of Sponge for Clinical Efficacy Trials.....R. Takano.....80

当院における不妊外来統計.....中居光生・他.....88

当科不妊外来における通水療法施行症例の統計的検討.....須藤寛人・他.....95

ラットの実験的停留睾丸における下垂体性腺系の機能について.....稲葉善雄.....101

男性不妊とカリクレイン
——高単位カリクレイン錠の有用性について——.....松本修・他.....113

地方部会講演抄録.....122

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 25, No. 4, 1980)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Cervical Mucus and in Vitro Morpho-Dynamic Studies of Human Ciliated Cells of the Female Genital Tract. the Brush Surface Biopsy Technique.....	<i>A. Campos da Paz, M. D.</i> 1
Effects of Prostaglandin E ₂ and Various Hormones on Acid Mucopolysaccharides in the Tissue of the Human Cervix Uteri.....	<i>M. Nakanishi, T. Nakaya & K. Mizuno</i> 14
Mechanism of the Effectiveness of Prednisolone-Clomiphene Therapy in Patients with Clomiphene Failure.....	<i>S. Higashiyama, J. Yasuda K. Otsubo & H. Okada</i> 20
Clinical Evaluation of the DPC Kit; A New Short Term Assay Method for hFSH and hLH.....	<i>T. Okawa, H. Okano, K. Yoshie, Y. Miyasato, H. Ikeshita, K. Arai & S. Okinaga</i> 29
Fundamental Examination of RIA-Quant β -HCG Test kit and its Clinical Application.....	<i>T. Fukunaga, Y. Izumi, Y. Nakamura & R. Iizuka</i> 36
Remote-Control Kymographic Hystercsalpingography: Development and Clinical Application	<i>T. Iijima</i> 43
Correlation between Hysterosalpingograms and Scanning Electron Microscopic Images of Tubal Endometrium in Cases of Tubal Plastic Surgery.....	<i>Y. Kanakura</i> 54
A Study on the Immunity of Pregnancy Participation of HCG on Lymphocyte Subpopulation	<i>Y. Shiotsuka, M. Hayashi, K. Kobayashi & S. Yamauchi</i> 63
Inhibition of Premature Labor by Indomethacin.....	<i>K. Mizuno, Y. Okumura, K. Ikuta, H. Kasegi & Y. Yagami</i> 68
Development of a Multiple Exporsure Photography Method for Analysis of Sperm Motility and Preparation of Washed Sperm with Ficoll Density Gradient.....	<i>S. Kaneko, C. Moriwaki, H. Sato, T. Kobayashi & R. Iizuka</i> 73
“Intravaginal Contraceptive Sponge Impregnated With Nonoxynol-9. The Development of Sponge for Clinical Efficacy Trials”.....	<i>R. Takano, M. D.</i> 80
Statistical Study on the Infertile Women.....	<i>M. Nakai, T. Majima, M. Nishijima, S. Ozaki, T. Maeda, M. Arai & K. Osanai</i> 88
Clinical Analyses of Hydrotubation Practiced in Our Clinic.....	<i>N. Sudo, K. Morita, H. Yoshizawa, T. Takahashi, M. Furuya & S. Takeuchi</i> 95
Testicular-Hypophyseal Function Observed in Experimentally Induced Cryptorchism in Rat	<i>Y. Inaba</i>101
Kallikrein and Male Infertility: Usefulness of High-unit Kallikrein Tablets.....	<i>O. Matsumoto, M. Hazama, K. Takada, O. Tomioka, S. Kamidono & J. Ishigami</i>113

CERVICAL MUCUS AND IN VITRO MORPHO-DYNAMIC STUDIES OF HUMAN CILIATED CELLS OF THE FEMALE GENITAL TRACT THE BRUSH SURFACE BIOPSY TECHNIQUE

A. CAMPOS da PAZ, M. D.

Director of the National Institute of Preventive Gynecology and Human Reproduction,
Fundação das Pioneiras Sociais, and Department of Human Reproduction,
Maternity Medical School of Rio de Janeiro-Gama Filho University

Abstract: A technique for collection of endocervical cells, brush surface biopsy was made to study the endogeneous movement of the ciliated cells. This method for in vitro morphodynamic studies of the ciliated cells differs from the other by being more vigorous with exfoliate cells found deeply in the crypts. The vibration of the cilia is so vigorous and intense that it engenders a movement of the cellular body itself. In order to study the behavior of the ciliated cells in other areas, we collected materials from the endometrium and from the endosalpinx.

According to Odebald, we can distinguish two types of cervical mucus in any phase of the cycle. Type E mucus reaches a proportion of 90% in which the disposition of the macromolecules provide migration of the sperm cells and the type G in which macromolecules display themselves in a irregular and compact network. In 1950, we suggested for the first time that progesterone would be the only responsible for inhibition of the typical crystallization. Fern pattern has always been collected and has already been universally provided. The Fern test enjoys today a place of acknowledged importance in the semiology of reproduction. And now, the Caramel test, the Billings test, Sims-Huhner test and in vitro sperm tests can become a routine investigative methods allowing an interpretation of the behavior of the endocervical epithelium.

Although many literatures on the composition and functions of the cervicals mucus, there still are numerous mysteries from infertility and contraception point of view. And the taping in video-tapes of the morphodynamics of the endocervical cells facilitate the study and the observation which has also been demonstrated in material collected from the endometrium and from the endosalpinx.

Introduction

Ancient writings register that reproductive function has always been one of the chief preoccupations of the human being.

Primitive peoples ignored any relationship between reproduction and sexual function. The majority believed that stars influenced sex differentiation and deities were responsible for creation of human beings by introducing the child into the womb of the female body.

Magicians, witches and priests utilized several elements to interpret the phenomenon. The Egyptian Papiros Kaum and Ebers, the oldest of medicine's documents, describe several empirical tests, aiming at the diagnosis of female sterility.

Empiricism and total ignorance of the matter persisted to Hippocratic time when the genital organs were then related to the phenomenon of reproduction. Hippocrates stressed the post menstrual period as the "fertile period"—when the uterus was blo-

odless and fully dilated to receive the penis.

At that time, it was already said that "to conceive, the mouth of the uterus had to be in a healthy state, neither closed nor displaced". Hippocrates affirmed deviation of the os and presence of an obstructive membrane therein as one of the five causes of sterility.

On the other hand, abortion could be due to a failure of the os Hippocrates called attention to semen expulsion from the vagina, after coitus, as a cause of sterility.

In Sorano's Book on the Disease of Women (200 A. D.) among other requirements to know whether a woman was fertile or not it was necessary that the cervix "be neither too open, nor too closed".

Oribasius (323-403 A. D.) compilations state that sterility could be due to totally closed or widely open cervical os.

Aetius of Amida in one of his books stated that stenosis of the cervix resulted from ulceration and inflammation. In consequence, the cervical canal could become so narrow that semen could not enter, and when that occurred the semen was not retained by the cervix.

Measures aiming at treating sterility or at prevention of conception, at blocking or facilitating semen penetration in the uterus are mentioned in several ancient documents, such as "Kama Sutra" of Vassayana Malanga (400 A. D.), in the Chinese text by Sub Ssu Mo (695 A. D.), and in the Rhazes writings Islam (923 A. D.).

Fallopia in 1551, described the cervix as a structure with a very narrow mouth into which the penis never enters but often may touch.

The importance of the cervix as the mandatory pathway for sperm was well stressed by Bartolomeu Eustachio (1520-1574). This doctor was successful in the treatment of sterility by having the husbands, immediately after coitus, insert the fingers in the vagina in order to push the semen into the uterus.

Simpson in 1843, for the first time advised the dilatation of the cervical canal as treatment for sterility, method which was widely utilized with success by Marion Simms, to whom we owe the post coital test developed in 1869 and methodized by Huhner (cervix

test). Smith (1855) called attention to the property of the cervical mucus to become filamentous as a spider's web in the midst of the menstrual cycle.

The reports by Strassman (1895), stated that the human spermatozoa could survive in the female genital tract for about one week after coitus, indicating that the uterine cervix should have highly important functions in the physiology of reproduction thus being, on certain occasions, a true habitat for the sperm cells.

Seguy and Vimeux (1933) observed that during the middle of the cycle the cervical mucus becomes more translucent and less viscous and with a low or absent cellular content. This phenomenon was correlated with an increase in estrogen excretion. Moricard (1933) and Watson (1939) were able to increase the cervical secretion with the administration of estrogen. Similar results were obtained in women after menopause by Guttmarcher and Shettles. In 1944 Viergiver and Pmmerenke, studied the quantitative variation of the cervical mucus during the menstrual cycle averaging 60 mg within reaches of 200 to 700 mg during the middle of the cycle, and going down around 60 mg in a second phase. A low viscosity of the cervical mucus at the middle of the cycle was also mentioned by these authors. Palmer's studies showed the correlation of these variations with the estrogenic action.

The Endocervix

Within the very short 3 cm. extension of the endocervix, about 10,000 crypts lie forming the so called "tree of life". The columnar epithelium forming this surface is made up of various types of secreting and ciliated cells. The number of crypts and cells varies according to the age, day of the menstrual cycle and hormonal stimulation. The non-ciliated cells are responsible for the secretion of the mucus.

From the viewpoint that the cervical mucus is indeed a mixture of secretions there still are arguments whether the different fractions of the mucus are a product of groups of crypts, secreting cellular units or that the different fractions of the mucus may be si-

multaneously secreted by a single cell. The ciliated cells are in a smaller number and their cilia beat toward the vagina propelling the mucus from the surface of the secreting cells.

However, we still know very little about the dynamics of the endocervical cells and especially of the ciliated cells.

The observation of the occasional presence in the aspirated cervical mucus of isolated ciliated cells with the endogenous movement led us to develop a technique for collection of endocervical cells for *in vitro* studies. This technique we called "brush surface biopsy" (Fig. 1).

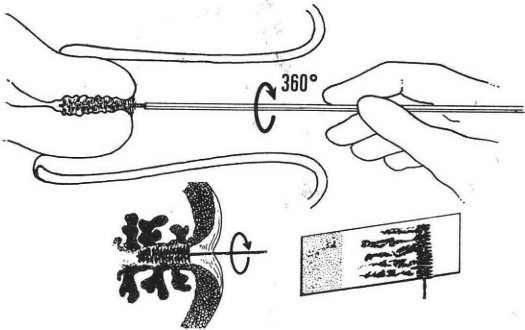


Fig. 1 Brush Surface Biopsy

This method is based on our experience maintained since 1958, by the use of a special brush for the endocervical collection of oncotoc cytology.

We developed this technique with the purpose of obtaining a richer cellular material when the squamo-columnar junction is localized in the interior of the cervical canal (older woman) and having in mind that epidermoid carcinoma originates itself more frequently from the glandular epithelium by squamous metaplasia.

Our experience embraces over 1.000.000 endocervical collections made simultaneously with collection of material from the vagina and ectocervix by Ayre's spatula (triple collection).

The brush endocervical surface biopsy for *in vitro* morpho-dynamic studies of the ciliated cells differs from the collection for oncotoc cytology by being more vigorous, with the purpose of not only obtaining ex-

foliated cells, but with the brush, exfoliate cells found deeply in the crypts. This results in the obtention of mucus with minute conglomerate cells or isolated cells which are placed on a slide without producing a smear, that is in a gross manner.

The material is examined under the cover slip with 400 \times and 1000 \times magnifications. By this technique it is possible to observe the intense vibration of the cilia of the isolated cells or of those in the cellular conglomerate.

The vibration of the cilia is so vigorous and intense that it engenders a movement of the cellular body itself. These vibrations and these movements are maintained under the microscopic preparation without any support bearing heat from the light bulb during several hours until ceasing completely after 4 to 5 hours, with the drying of the cervical mucus.

This suggests that the cervical mucus also acts as an energy supplier of the ciliated cells.

As can be seen in Fig. 2, the ciliated cells observed *in vivo* have a ballooned aspect whereas after being fixed and stained they present the classical aspect of cylindrical cells.

The isolated ciliated cells appear in the collected material more frequently during the estrogenic phase and especially in the pre-ovulatory phase or in women under estrogen therapy.

This new technique may be very useful to better interpret the physiology of the endocervical mucosa, its pathological states, including dysplasia and carcinoma *in situ* as well as the action of the contraceptive drugs.

In order to study the behaviour of the ciliated cells in other areas of the genital tract, we collected material from the endometrium and from the endosalpinx (the latter by surgical technique). Through the laparoscope it will not be difficult to collect ciliated cells from the tubal fimbriae for study.

In the specimens we examined *in vitro*, the cells do not appear isolated but in conglomerate however with the same vibratory energy of the cilia (all of these phenomena were registered in video tape).

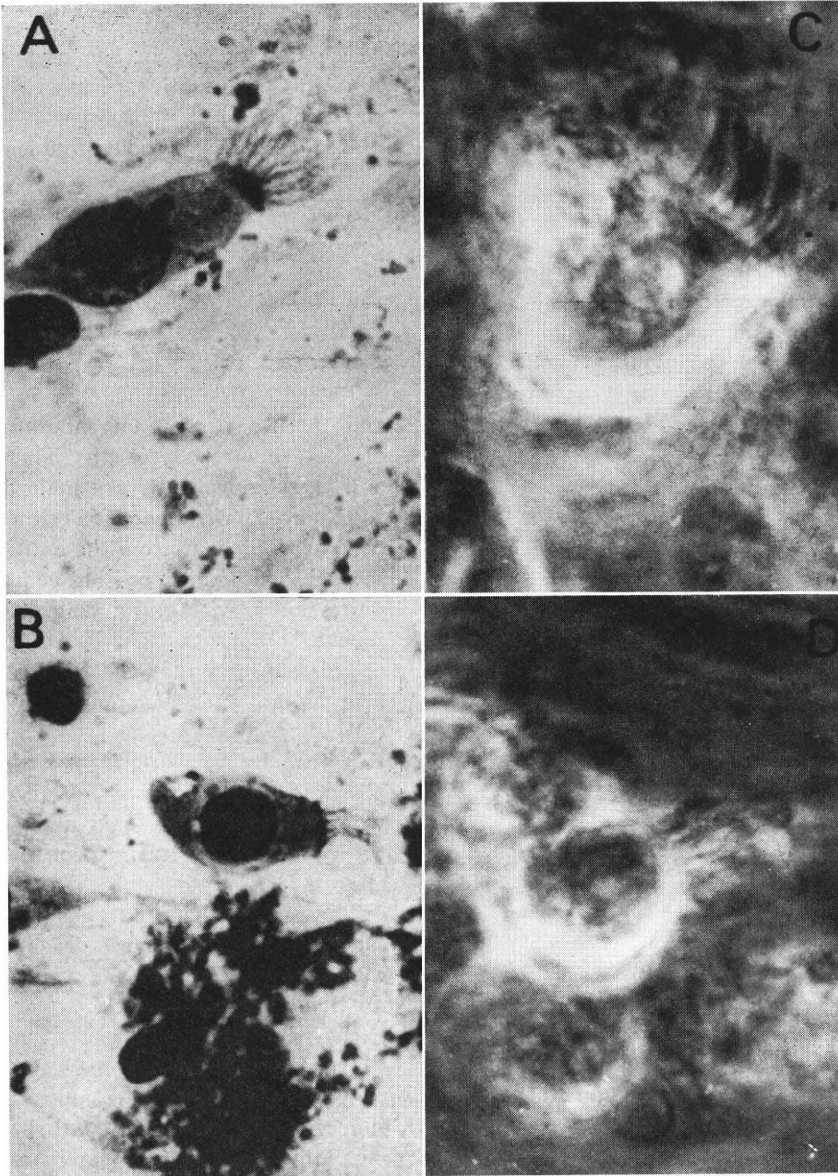


Fig. 2 Cervical Mucus

- A and B Ciliated Endocervical Cell, cylindrical shape. (Fixed material—Pap stain 1000×)
Endocervical Brush surface Biopsy
- C and D Ciliated Endocervical Cell, Balloned shape. (Fresh material—contrast phase
microscopy 1000×) Endocervical Brush Surface Biopsy

The Cervical Mucus

As target organ of the ovarian hormone the physiological response of the uterus has particular characteristics in different areas.

While in the endometrium the morphological modifications have a great significance

to the point of Novak classifying it as the mirror of the ovarian function, the uterine cervix reflects the hormonal action especially through its mucus secretion of a complex molecular structure. The biophysical and biochemical studies of the cervical secretion have allowed the determination of the important role the cervical mucus plays in the

physiology of reproduction.

A number of studies demonstrates the wealth of the elements contained in the cervical mucus with the majority undergoing cyclical concentrations for the purpose mainly of receiving, storing and aiding migration of normal sperm cells at the proper moment of ovulation or hampering this mechanism outside the ovulatory period.

Inorganic salts and several organic substances are present in the "cervical plasma". Among the inorganic ones, sodium chloride is the most important one appearing in greater concentration. Among the organic substances glycoproteins, plasma proteins, immunoglobulins and enzymes stand out. Amino acids, carbohydrates and lipids are also present.

Affecting the physiology of the cervical mucus, transudates, material originating from the uterine cavity, oviducts, ovarian follicles and even material coming from the peritoneal cavity, may influence the physical and chemical modifications occurring under hormonal control.

Biochemical and immunological studies made to date in the cervical mucus, in different phases of the menstrual cycle during pregnancy, menopause and various disturbances of the reproductive function or in pathological situations, have allowed the interpretation of facts of high importance in the physiopathology of reproduction. However, these studies are difficult to utilize in clinical practice thus being the biophysical aspects the best parameters to evaluate the function of the cervical mucus.

Today, due chiefly to the studies of Odeblad we know that the mucus is a hydrogel with rheological properties with components of high and low viscosity. The high viscosity components are represented by long and flexible macromolecules. These molecules, glycoproteins, have water around them, thus contributing for their structure. Among the molecules there are cavities of free water which increase under estrogenic stimulation and decrease under progestogenic action. Free spaces thus result between the high viscosity components facilitating progression of the sperm cells during the aqueous phase.

Studies made with scanning electron mi-

croscopy and transmission electron microscopy are highly suggestive of this molecular architecture.

Blandau and Verdugo using laser light measurements believe that the pre-ovulatory mucus is an ensemble of entangled randomly coiled macromolecule whose spaces allow migration of sperm cells especially under induced stress.

As a matter of fact, Guibons and Mattner showed that the tension applied on the mucoïd substance starts a reorganization of its macromolecules which align themselves in parallel in agreement with the lines for force.

Odeblad more recently defines the cervical mucus as a "tridimensional mosaic pattern" made up of "loafs" and "strings".

In the pre-ovulatory phase the crypts responsible for the type of mucus which forms the stringes are more numerous in these higher portions of the endocervix.

In any way, what is important is to emphasize that under normal conditions the cervical mucus undergoes cyclical variations deriving from specific responses of the glandular system which, thus, is capable of producing several types of mucus whose mixture may undergo a bulk variation or present specific variations in each one of the fractions of the mucus thus consequently defining functional status following the hormonal stimulus on the endocervical glandular system.

Fundamentally and according to Odeblad we can distinguish two types of cervical mucus always present in any phase of the cycle but in extremely variable proportions.

The type E mucus reaches a proportion of 90% in which the disposition of the macromolecules provide migration of the sperm cells and the type G mucus in which the macromolecules display themselves in a tridimensional irregular and compact network which does not allow sperm migration. The type E mucus is estrogen dependent and the type G mucus is estrogen/progesterone dependent.

The type G mucus, highly viscous, can be considered as a permanent protective element of the fragile columnar epithelium during menacme. Its molecular display in the

compact network is a natural obstacle to the ascending of sperm cells and other foreign elements. Bacteriostatic and bactericidal properties are also attributed to it.

During an inflammatory process the glandular elements, the secreted mucus loses its protective function and may become a risk factor facilitating the appearance of cellular atypias. It is worth remembering that the DNA of sperm cells has been mentioned as having possible oncogenic action.

In women during natural or artificial menopause with pre-ovulatory cervical hostility and in the rhesus monkey it has been demonstrated that drugs with estrogenic action are capable of producing a considerable increase in the volume of the secreted mucus. However, it has been suggested that this type of mucus, although with similar characteristics to the pre-ovulatory mucus and with free spaces for sperm penetration does not show the normal parallel arrangement of macromolecules. However, since 1954, we have been treating with success, the cervical hostility of mucus insufficiency by pre-ovulatory administration of estrogens. Patients presenting type G mucus in the pre-ovulatory period with negative sperm penetration and the negative fern pattern, react in the majority of cases, with an abundant mucus receptive to the sperm cells with the administration of 5 ad 10 mg of estradiol benzoate given in one single injection between the 10th and 12th day of the menstrual cycle.

In 1950 we suggested for the first time that progesterone would be the only hormone responsible for inhibition of the typical crystallization (Fern pattern) responding to a pre-ovulatory estrogenic mucus and Zondek was to determine in 15 mg of progesterone the inhibiting dose of 1 mg of estrogen. Progestogenic drugs have similar action, turn mucus secretions thick, opaque and produce the compact framework characterized by a closed network of micro fibers and changing a positive fern pattern into a negative one (Campos da Paz, 1953).

The use of progestogenic drugs is indispensable when one desires to produce artificially the hostile conditions to sperm penetration in the cervical mucus.

The type G mucus is gradually substituted by type E mucus starting on the 7th day of the menstrual cycle attaining the proportion of only 10% in the pre-ovulatory period. Immediately after ovulation, the new increase of type G mucus starts until the pre-menstrual period. In the two or three days preceding menstrual flow, coinciding with the involution of the yellow body, the proportion of type E mucus increases, the latter being observed many times in mixture with the menstrual blood (Fig 3).

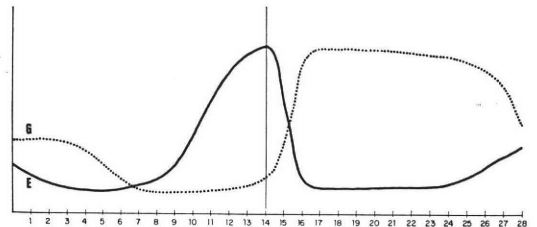


Fig. 3 Cyclic variation of the mucus E & G in the ovulatory menstrual cycle

The type E mucus has its maximum production and particular characteristics immediately prior to ovulation and corresponds to the greater surge of estrogen in the menstrual cycle. Its function is, through its characteristic macromolecular arrangement on this occasion, to provide migration of the normal sperm cells in the cervical canal towards the uterine cavity or to the crypts where they will be stored and gradually released. Although having also bacteriostatic and bactericidal characteristics, the type E mucus is more vulnerable to penetration of foreign elements. For this reason, search for pathogenic micro-organisms may by culture technique should be done, preferably in the aqueous phase.

The cellular content varies considerably in the two types of mucus. While the type E mucus is practically acellular, the type G mucus shows a high cellular content. This fact has importance when one intends to collect material from the endocervix for oncotic cytology. The type G mucus provides the richest material.

The type E mucus in its maximum expression, has a transparent aspect, increased volume, increased Spinnbarkeit, decreased viscosity, practically absent cellular content,

positive crystallization, remains white even when heated for one minute under candle light, and facilitates sperm migration.

The type G mucus in opaque, of decreased volume, negative Spinnbarkeit, increased viscosity, abundant cellular content, negative crystallization, is, brown after heating, and does not allow sperm migration.

These two fractions, under ovarian hormone influence alternate themselves during the menstrual cycle, thus varying intensity of the above mentioned aspects.

The observation of the variation of these elements serves in practice to monitor ovarian function and the receptivity of the cervical mucus to the sperm cells.

The Fern Phenomenon

Although in the examination of the cervical mucus one should take into consideration several parameters such as the aspect, volume, Spinnbarkeit, viscosity, cellular content, and even pH, the fern phenomenon still today surpasses all other parameters with the advantage of being a test of easy performance in the doctor's office.

The Fern phenomenon was also studied by us in the ovulatory cycle, anovulatory cycle, pregnancy, threatened abortion, amenorrhea, cervical receptivity, and hostility in several animal species such as the sow, ewe, cow, mare and the rhesus monkey. (Fig. 4).

In 1948, Rydeberg described a characteristic crystallization of the cervical mucus when placed on a slide and allowed to dry. The phenomenon was correlated with the menstrual cycle, pregnancy and menopause compared with the basal body temperature.

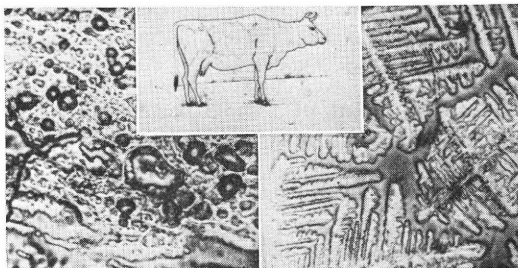


Fig. 4 Negative crystallization out of the heat period and typical fern pattern during the heat period of the cow.

The crystallized mucus was first described by Papanicolaou in 1945 (Argyrophil secretion). In 1950 Campos da Paz confirmed the findings of Rydeberg and proposed a new test for cervical receptivity to the spermatozoa based on the degree of crystallization.

The Fern pattern has always been correlated to the Spinnbarkeit, the aspect, cellular content, vaginal smear, endometrial biopsy, basal body temperature, Sims-Huhner test, Muller-Kurzrok test, and Val Davajan and Nakamura test. In experiments with the administration of several hormones in castrated women or in the menopause, we demonstrated the exclusive dependence of the phenomenon upon estrogens and the specific capability the progesterone possesses to inhibit the phenomenon totally or partially. The test can be used in most cases, when one wants to observe the estrogenic function on one side and the progestogenic function on the other. The test also showed a great value in monitoring the treatment of hormonal cervical hostility and the induced ovulation.

All of these aspects had already been universally proved and the Fern test enjoys today a place of acknowledged importance in the semiology of reproduction.

The Fern crystallization phenomenon is not a specific characteristic of the cervical mucus. It can occur in saliva, tear and everything leads one to believe it to be under the influence of water, glycoproteins and sodium chloride concentrations.

The type G mucus to which one adds a certain amount of isotonic saline may show areas of typical crystallization and allow sperm migration. In the same way was the white of the chicken's egg, with 10% of sodium chloride, produces the Fern pattern and allows free sperm migration in vitro. (Fig. 5). The Fern test has been interpreted by several authors in a quantitative form. However, the presence of typical or atypical, total or partial crystallization means variation in the proportion between the two fractions of mucus E and G, and consequently alters its physiological properties. For the same reason, the interpretation of the test must be done quantitatively and

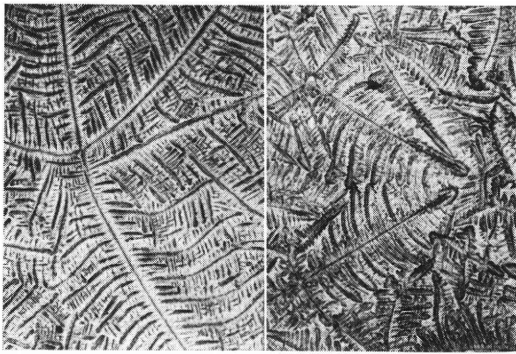


Fig. 5 Two fern-patterns obtained with the mixture of white of the chicken eggs with sodium chloride.

qualitatively.

Another factor of error in the interpretation consists in allowing the mucus to dry spontaneously under room temperature as suggested by Rydeberg and also, initially by us. However, we soon realized that the phenomenon varies according to humidity of the atmospheric air. Sodium chloride absorbs water and this interferes with crystallization, resulting in false-negative tests.

For a good interpretation, the heating of the material is indispensable utilizing the flame of an alcohol lamp and the reading must be done immediately. To leave the reading to be done hours later may also result in mistakes for the same reason.

It is worth remembering that the material must be uniformly displayed on the slide before putting it to heat-drying. Samples with varying thicknesses show Ferning of various sizes. Contamination with blood during collection inhibits the phenomenon.

The Caramel Test

Studies on the macaca fascicularis made by Ferrari related the fertile period to the color of the heated cervical mucus. The pre-ovulatory mucus is colorless or white, while after ovulation it is dark brown. (Fig. 6).

Reviewing this method we conclude that:

1. The test involves heating the cervical mucus for two minutes on an alcohol burner and one of three colors is seen: white, light caramel, and dark caramel.

2. The white color in mid-cycle is not

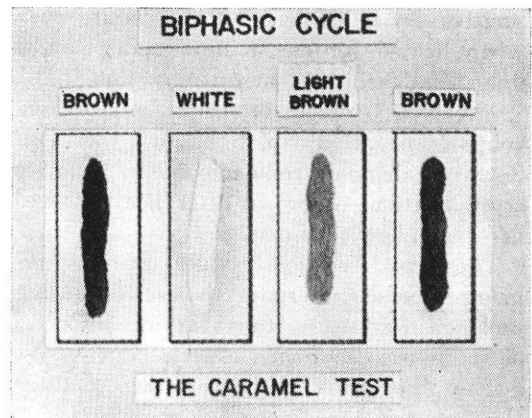


Fig. 6 Biphasic cycle—The Caramel Test

specific for ovulation, but reflects estrogenic stimulation.

3. The brown or caramel colors occur in estrogen deficient states or under progestogenic action.

4. The phenomenon is cyclical and correlates with the Fern test.

5. The light brown or caramel color seen following the white specimen of the fertile period suggests some relation to the ovulatory phenomenon.

6. Following daily the white color during the pre-ovulatory day a positive caramel test suggests ovulation occurrence.

7. Although progesterones inhibit estrogenic action by transforming a white specimen to dark caramel, the phenomenon is related to the glycoprotein, to the cellular content and glucose, as well as a rapid increase in the water content and volume of the cervical mucus.

8. The designation "caramel test" was given in order to emphasize that it is the changing of the white color that is more significant in relation to the ovulatory phenomenon.

Alignment of Dendritic Crystals in the Dry Sample

Davajan and Nakamura found that in the fertile period a normal cervical mucus when dried under the cover slip showed alignment of dendritic crystals and the mucus which was dried outside the cover slip formed the typical Fern crystallization pattern. (Fig. 7).



Fig. 7 A) Alignment of Dendritic Crystals under the cover slip.
 B) Typical Fern pattern outside the cover slip.

The parallel orientation of dendritic crystals was correlated with the channels which are formed in the type E mucus and to facilitate the penetration of the spermatozoa.

On the other hand, the hostile mucus shows very wide dendritic crystals, without intercommunication (labyrinth pattern)—no “pathways”, no Fern pattern outside the cover slip.

This is a phenomenon which, although it does not present total agreement, in our cases, it is so simple to carry out as the Fern test is, that it must be done routinely in the studies of the cervical mucus helping the interpretation of the mechanisms of the sperm transport. (Fig. 8).

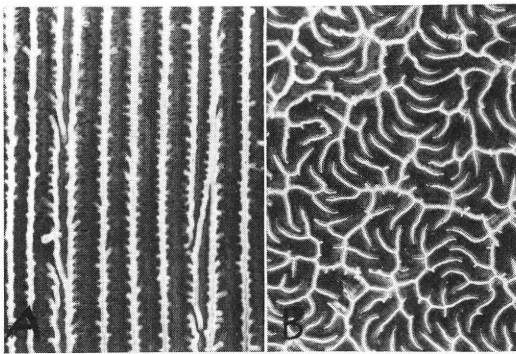


Fig. 8 A) Parallel dendritic crystallization.
 B) Labyrinth crystallization pattern under the cover slip.

The Billings Test

The presence of the cervical mucus humidifying the vulva in the pre-ovulatory period led Billings to utilize this symptom to determine the pre-ovulatory period thus

creating a natural contraceptive method which is being used in several countries, including here in Japan, with success.

The women, well instructed on the humid period and the dry periods can use the method with a good margin of safety.

The knowledge of these physico-chemical variations in the phenomena which occurs in the cervical mucus represent the tools we have in clinical practice to evaluate ovarian function, the response of the endocervical glandular epithelium to hormonal stimulus and the receptivity of the cervical mucus to sperm migration, which as has been demonstrated can be immediately studied through these phenomena.

However, the receptivity of the mucus to sperm cells and the sperm transport can be verified through the

Sims-Huhner Test (Post Coital Test)

The post coital test informs us also of the placement of semen and its retention in the interior of the vagina after sexual intercourse.

The following methodology is used by us : collection of material from the vaginal cul-de-sac to verify the presence of spermatozoa. Eventually when there is a large volume of ejaculate, and the concentration of sperm cells is elevated, spermatozoa may be observed with immense migratory activity a few hours after coitus.

However, the objective of this sample is to verify the presence of sperm cells no matter if immobile.

This collection is made with the patients in the gynecological position. With no speculum, in order for the material to be collected under normal anatomic conditions of the vagina, which is otherwise artificially distended if the speculum is used.

For the collection of the cervical mucus a dry speculum is placed, the ectocervix is cleaned and the largest possible amount of mucus is aspirated with a tuberculine type syringe, in such a way, that the portion of the mucus to be initially placed on the slide represents the highest mucus of the cervical canal. With this in mind, the Spinnbarkeit is tested at the same time and the material

for examination is placed along the slide and under the cover-slip. So, by studying the sample from one to the other, we can observe the various degrees of sperm migration which correspond in general to the different heights of the cervical canal (Fig. 9).

This collection must be repeated at least two more times.

We frequently find a better receptivity in the third sample when practically one aspirates mucus coming from the higher portion of the cervical canal.

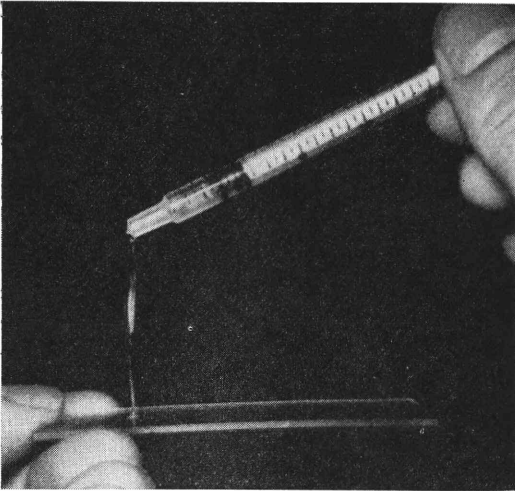


Fig. 9 Measurements of the Spinbarkeit disposition of a filament of mucus along the slide.

SIMS-HUHNER TEST - CRITERIA FOR INTERPRETATION

1. **TOTAL RECEPTIVITY OF THE CERVICAL MUCUS** - WHEN 10 OR MORE SPERMATOZOA ARE SEEN ON A MICROSCOPE FIELD.
2. **PARTIAL RECEPTIVITY OF THE CERVICAL MUCUS** - WHEN LESS THAN 10 MOTILE SPERMATOZOA ARE SEEN ON A MICROSCOPE FIELD BESIDES SOME NONMOTILE OR LOW-MOTILE SPERMATOZOA.
3. **PARTIAL HOSTILITY OF THE CERVICAL MUCUS** - WHEN SPERMATOZOA OF LOW MOTILITY BESIDES NONMOTILE SPERMATOZOA ARE OBSERVED.
4. **TOTAL HOSTILITY OF THE CERVICAL MUCUS** - WHEN THE SPERMATOZOA AFTER PENETRATING THE CERVICAL MUCUS DO NOT RESIST ITS HOSTILITY AND SHOW COMPLETE IMMOBILITY OR WHEN NO SPERMATOZOA CAN BE SEEN BECAUSE THE MUCUS DOES NOT PERMIT THEIR ENTRANCE. IN THE LAST CASE, IT IS INDISPENSABLE TO KNOW WHETHER THE CONDITIONS OF THE VAGINAL INSEMINATIONS AND THE CERVIX INSEMINATION INTO THE VAGINAL POOL ARE NORMAL. IT IS UNDERSTOOD THAT THE INTERPRETATION OF THE ABOVE CLASSIFICATION OF THE SIMS-HUHNER TEST DEMANDS PREVIOUS KNOWLEDGE OF THE SEMEN ANALYSIS. ANY ABNORMALITY OF SEMEN WILL RENDER THE INTERPRETATION NULL.

Fig. 9 A Sims-Huhner Test - Criteria for interpretation.

We have been using the following criteria for interpretation :

1) *Total receptivity of the cervical mucus*—when 10 or more spermatozoa are seen on a microscope field.

2) *Partial receptivity of the cervical mucus*—when less than 10 motile spermatozoa are seen on a microscope field besides some non-

motile or low-motile spermatozoa.

3) *Partial hostility of the cervical mucus*—when spermatozoa of low motility besides nonmotile spermatozoa are observed.

4) *Total hostility of the cervical mucus*—when the spermatozoa, after penetrating the cervical mucus, do not resist its hostility and show complete immobility or when no spermatozoa can be seen because the mucus does not permit their entrance. In the last case, it is indispensable to know whether the conditions of the vaginal inseminations and the cervix insemination into the vaginal pool are normal. It is understood that the interpretation of the above classification of the Sims-Huhner test demands previous knowledge of semen analysis. Any abnormality of semen will render the interpretation null.

In Vitro Sperm Tests

Several tests for in vitro migration have been proposed, all of them based on the contact of the semen with the cervical mucus.

We think that by its simplicity of performance and not needing any specialized equipment, the Muller-Kurzrok test adequately performed provides highly valuable information.

This test is indicated when the Sims-Huhner test is negative, when the mucus is normal and there is a good semen placement in the vagina. It is also indicated for a re-evaluation of the sterility factor when no clear conclusions are reached in the diagnostic investigation.

The classical method is placing a drop of semen beside a drop of mucus and joining the edges of the two drops by pressure with the cover-slip.

Under the microscope, in normal conditions, we will verify the formation of indentations into which the spermatozoa direct themselves opening their way by forming true trails by which their followers flow. Gradually, new caravans bifurcate, often leading off one sperm cell which swims in several directions, freely in the cervical mucus. ((Fig. 10).

When there are impeding factors the progression of the spermatozoa, frequently anti-spermatozoa antibodies the contact of the

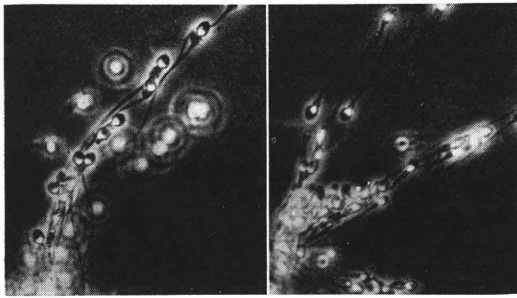


Fig. 10 Normal Spermigration

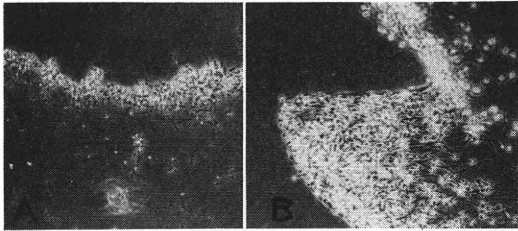


Fig. 11

surfaces of the two liquids show on the seminal side a progressive accumulation of spermatozoa which vainly force passage unsuccessfully until the accumulation of the spermatozoa becomes also a mechanical obstacle to the attempted passage by other spermatozoa (Fig. 11-A 100× and B 200×).

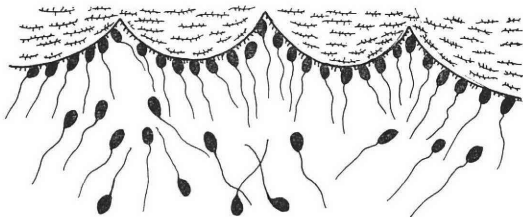
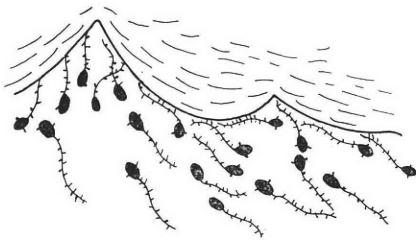


Fig. 12 Imitation of the Kramer and Jaeger concept Top—Immobilizing factors in the cervical mucus Below—Immobilizing factors in the spermatozoa.

According to Kramer when spermatozoa become attached to the edge of the cervical mucus by the head, the immobilizing factor comes from the cervical mucus (Fig. 12-A); when attached by the tail, the immobilizing factor is in the spermatozoa (Fig. 12-B). Often, spermatozoa are attached by the tail and by the head. In other instances, one sees a great effort of compact groups of spermatozoa which try with difficulty to penetrate the cervical mucus. A few break away and show randomized migration. Frequently, many of these spermatozoa do not go over 2 cm. of migration and show the shaking phenomenon, described by Kramer.

As it is known, the cervical mucus shows different aspects. Because of this several in vitro tests have been proposed with the

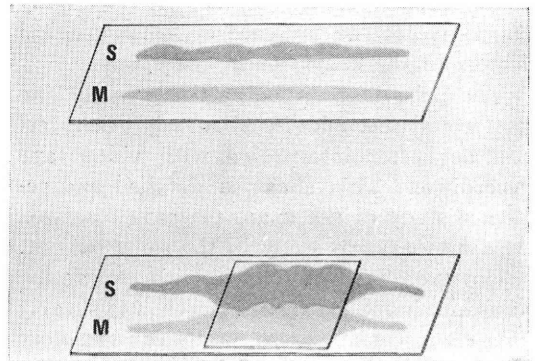
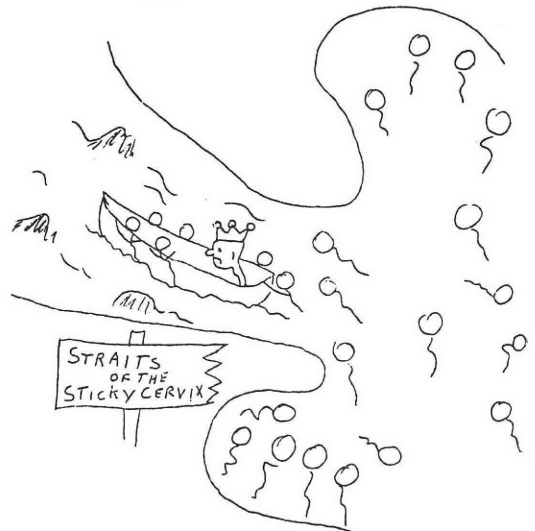


Fig. 13 Our technique for Muller Kurzrok test.



In the Straits of the Sticky Cervix.

Fig. 13 In honor to late Irving Stein.

fractioned examination of cervical mucus.

In practice we have been solving the problem in the following manner: the semen is placed along the slide parallel to the cervical mucus. This allows us to approximate the two liquids and increase maximally the dividing line between the two specimens, allowing a study of sperm penetration along this long frontier (Fig. 13). In following up the specimen it is frequent to sometimes see frank penetration, in others low penetration, or even no penetration.

These facts can be correlated with the presence of different fractions of cervical mucus or to translate immunological hostility.

The Muller-Kurzrok test performed according to this methodology, when negative or frankly positive in the presence of mucus with normal characteristics, it is highly suggestive of the presence of immunological factors in the couple or in one spouse.

The behaviour of the spermatozoa in the post coital test and *in vitro* migration test can be better interpreted with video tape recordings. This allows a detailed and repeated study of the exam performed as well as a comparative study in the same patient.

However, *in vivo* and *in vitro* migration tests and immunological research inexplicably present in certain cases totally contradictory results when repeated in another cycle. For this reason, a negative result should not be conclusive.

In summary, we could say that the above cervical mucus tests, due to their simplicity of performance, can become a routine investigative method allowing an interpretation of the behaviour of the endocervical epithelium.

Comments

Today, we can say that the cervical mucus acts as an efficient filter whose permeability increases or decreases during the several stages of the menstrual cycle and sexual life sometimes facilitating other times hampering the penetration of the sperm cell.

Although existing literature on the composition and characteristics of the cervical mucus and its functions, its complex mixture of secretions, transudates and other compon-

ents from the genital tract is extremely vast, the cervical mucus still hides numerous mysteries which are a stimulus for research involving the etiology of conjugal sterility or the development of new contraceptive methods.

The taping in video-tapes of the behaviour of the spermatozoa as well as the morpho-dynamics of the endocervical cells facilitate the study and the observation which has also been demonstrated in material collected from the endometrium and from the endosalpinx.

In honor to my late and beloved friend Irving Stein I make mine his words and show a self explanatory symbolic picture: "the cervix is a sticky straight where the canoe of the King spermatozoa must be pushed by the guards. Now the stream is too goeey for paddling, many of his followers turn back here and are left to perish in the fragrant vagina, overcome by the fumes, unable to survive the long journey". I do not believe that the cervical canal is the door of the garden of Eden as it was called by Behrman. I think it is a mysterious tunnel the spermatozoa will experience the most fantastic and unpredictable adventure.

(Presented at the Japan Simposium of NFP in October—Tokyo, Japan 1979)

頸管粘液と女性性管内における繊毛細胞の インピトロの形態および動態に関する研究 —ブラッシュ表面生検法—

A. Campos da Paz
Gama Filho 大学産婦人科

繊毛細胞の本来の動態を研究する目的で、頸管内細胞の採取方法としてブラッシュ表面生検法を行なった。インピトロにおける、繊毛細胞の形態および動態に関する、この研究方法は、他の方法に比し、繊毛運動はより活動性に富み、かつ深部頸管クリプトからの剝離細胞も存在した点で異なる。繊毛の運動は活発であり、力強く、細胞集団自身の動きも観察された。また性管内の他の部位における繊毛細胞の動態を研究するため、試料を子宮内膜や卵管内膜からも採取した。

Odebladによると、頸管粘液は、どの月経周期においても2つのタイプに分けられる。つまり、type E 頸管粘液は90%に達すると高分子の配列が変化し精子の侵入を容易にする。またtype G 頸管粘液は高分子の配列が不規則となり、高密度の網目構造をとる。私達は、プロゲステロンのみが典型的な頸管粘液の結晶形成を阻

止することを、1950年世界で初めて報告した。羊菌様結晶の程度を観察することは現在世界中で広く行なわれていることである。頸管粘液の結晶形成試験は不妊症学の分野で今日極めて重要な地位を占めている。しかも、Caramel test, Billing test, Sims-Huhner test そしてインビトロの精子通過試験なども今日ではルーチンの頸管検査法となつている。

現在、頸管粘液の組成や機能に関する研究論文は多いが、未だに不妊症や避妊の観点からみて不明の点が少なくない。また頸管内細胞の形態および動態に関する研究がビデオテープ装置によつて発展するものと思われる。子宮内膜や卵管内膜における同様の研究も行なわれてくると考える。

(受付：昭和55年5月28日)

EFFECTS OF PROSTAGLANDIN E₂ AND VARIOUS HORMONES ON ACID MUCOPOLYSACCHARIDES IN THE TISSUE OF THE HUMAN CERVIX UTERI

Masami NAKANISHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Aichi Medical University

Takayoshi NAKAYA and Kinichiro MIZUNO

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Medical School

Abstract: The quality of acid mucopolysaccharides (AMPS) as uronic acid was investigated biochemically in the cervix uteri after prostaglandin E₂ (PG E₂) and sex hormones treatments. AMPS contents measured in PG E₂ 6 mg group and PG E₂ 10 mg group were detected in almost same value and slightly higher than that in the control group. Moreover, AMPS values in PG E₂ 12 mg group markedly increased. It suggested that a certain dose or more of PG E₂ increased AMPS value in the cervical tissue. The highest value of AMPS was recognized in PG E₂ 12 mg-estradiol benzoate 4 mg group of all groups. The problems of the effects on cervical AMPS of PG E₂ and sex steroid hormones were pursued. The effects on cervical AMPS of estradiol benzoate seem to be interfered by progesterone, but that of PG E₂ was not depressed by progesterone.

Introduction

Though the cervix forms an integral part of the uterus, its structure and function differ from that of the corpus. During pregnancy the cervix aids in the retention of the conceptus but during labor it dilates in response to the contractions of the corpus and permits delivery of the fetus and placenta. But there are many problems in obstetrics that are pressing and must be solved before we can achieve any real improvement in our clinical results. Prolonged labor, where the cervix fails to become fully dilated twenty-four hours or more from the onset of contractions, remains one of the great problems of maternal complications and fetal prognosis. Of these, the most urgent is the control of uterine activity and the understanding and control of cervical effacement.

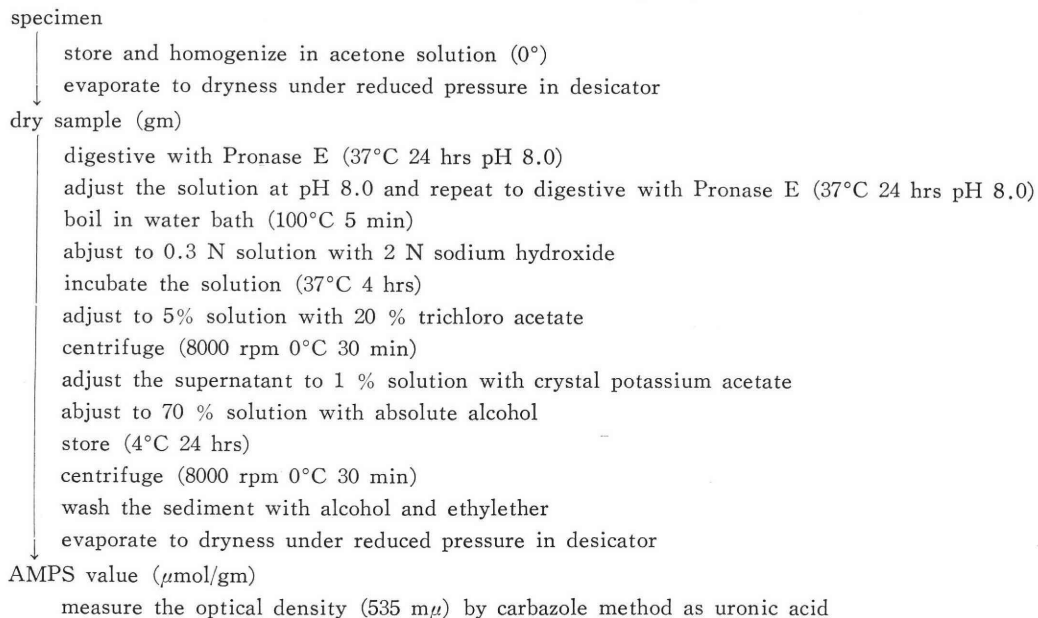
It is curious that so little thought has been given to the explanation of these dramatic changes that are associated with dilatation, and that so little effort have been made

either to find out what they consist of or to control them. It appears now to be generally accepted, that the cervix is basically and fundamentally a connective structure. Consequently the changes must be explained in terms of the mechanisms of connective tissue, especially hydrophilic acid mucopolysaccharides in ground substance. Sex steroid hormones are markedly increased during pregnancy, therefore it seems that softening and ripening of cervical tissue during pregnancy are regulated by various hormones. This investigation was undertaken to make clear the mechanism of ripening in the human cervical tissue during pregnancy by studying changes of AMPS in cervical tissue.

Materials and Methodes

Total thirty-four materials were obtained from the cervical tissue of the human uterus removed operatively for leiomyoma of the corpus uteri. All patients were not pregnant, ranged from 30 to 52 years old. Six-

Table 1 Methods of extraction and quality of AMPS.



teen materials obtained from the patients without prostaglandin E₂ (PG E₂) or hormonal treatment were examined as control. Three materials from patients with PG E₂ 6 mg, two materials from patients with PG E₂ 10 mg, six materials from patients with PG E₂ 12 mg, three materials from patients with PG E₂ 12 mg—estradiol benzoate 4 mg, two materials from patients with PG E₂ 12 mg—estradiol benzoate 4 mg—progesterone 50 mg, two materials from patients with PG E₂ 12 mg—progesterone 50 mg, were studied. PG E₂ orally, and estradiol benzoate and progesterone intramuscularly were given daily for 4 days before operation. Each group was divided to by each treatment.

Immediately after removal of the uterus the part of the cervix between the internal and external os was amputated, and the endocervix, peripheral attachment tissue, secretion, and blood were carefully excluded. The estimation of AMPS value in the cervical tissue was determined as shown in Table 1.

Results

Total AMPS values were estimated as uronic acid per 1g of dried and defatted tissue weight. The control group showed

a mean value of $8.1 \pm 0.5 \mu\text{mol/g}$ in Table 2. The AMPS value of the each group is shown in Table 3. and the results are graphically outlined in Fig. 1. The mean values of PG E₂ 6 mg group, PG E₂ 10 mg group and PG E₂ 12 mg group were $10.4 \pm 1.4 \mu\text{mol/g}$, $10.3 \pm$

Table 2 Total uronic acid value in the cervix uteri.

No. of case	dry weight (gm)	total uronic acid (μmol)	μmol/g dry weight
1	2.22	17.0	7.7
2	1.84	14.9	8.1
3	2.91	21.0	7.2
4	3.51	28.4	8.1
5	1.85	16.6	9.0
6	1.93	15.0	7.8
7	1.87	14.8	7.9
8	1.52	11.5	7.6
9	1.84	14.1	7.7
10	1.59	14.1	8.9
11	2.51	22.5	9.0
12	1.70	14.8	8.7
13	3.18	23.9	7.5
14	2.64	22.2	8.3
15	3.45	27.1	7.9
16	1.52	12.5	8.2
Mean	2.26	18.2	8.1 ± 0.5

Table 3 Total uronic acid value in the cervix uteri.
(effect of PG E₂ 6 mg, 10 mg, 12 mg)

No. of case	dry weight (gm)	total uronic acid (μ mol)	μ mol/g dry weight
reatment group of PG E ₂ 6 mg			
17	2.55	23.2	9.1
18	2.62	26.4	10.1
19	1.76	21.0	11.9
Mean	2.31	23.5	10.4 \pm 1.4
reatment group of PG E ₂ 10 mg			
20	2.46	25.6	10.4
21	1.85	19.0	10.3
Mean	2.16	22.3	10.3 \pm 0.1
reatment group of PG E ₂ 12 mg			
22	1.82	22.2	12.0
23	1.84	22.8	12.4
24	1.89	21.6	11.4
25	3.09	35.2	11.4
26	2.25	30.4	13.5
27	1.70	21.6	12.7
Mean	2.10	25.6	12.3 \pm 0.8

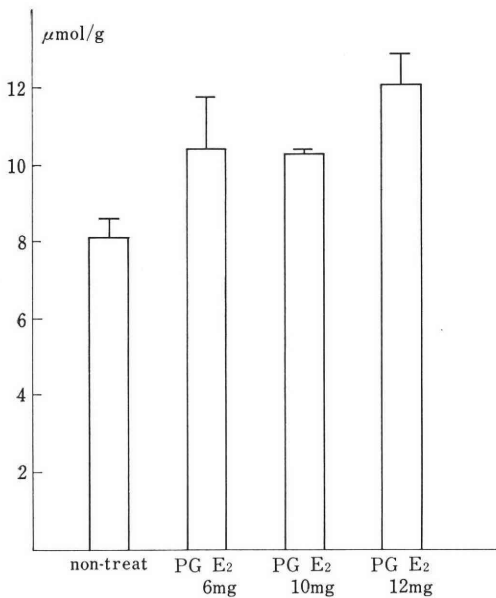


Fig. 1 Total uronic acid value in the cervix uteri
(effect of PG E₂ 6 mg, 10 mg, 12 mg)

Table 4 Total uronic acid value in the cervix uteri.
(effect of PG E₂ and sex steroid hormones)

No. of case	dry weight (gm)	total uronic acid (μ mol)	μ mol/g dry weight
reatment group of PG E ₂ 12 mg-estradiol			
33	2.36	37.6	15.9
34	2.13	30.6	14.4
35	1.91	30.6	16.0
Mean	2.13	32.9	15.4 \pm 0.9
reatment group of PG E ₂ 12 mg-ertradiol-progesterone			
36	2.59	30.0	11.6
37	1.70	22.8	13.4
Mean	2.15	26.4	12.5 \pm 1.3
reatment group of PG E ₂ 12 mg-progesterone			
38	1.78	19.8	11.1
39	1.87	25.2	13.4
Mean	1.83	22.5	12.3 \pm 1.2

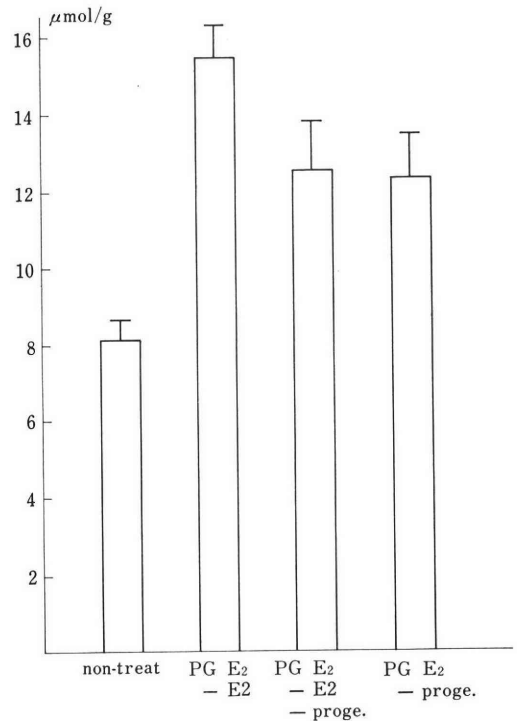


Fig. 2 Total uronic acid value in the cervix uteri
(effect of PG E₂ and sex steroid hormones)

0.1 $\mu\text{mol/g}$ and $12.3 \pm 0.8 \mu\text{mol/g}$ respectively. Total AMPS contents as uronic acid measured in PG E₂ 6 mg group and PG E₂ 10 mg group were almost in the same value and slightly higher than that in the control group. And then, compared with the value in the control group, the values in PG E₂ 12 mg group markedly increased. It suggested that a certain dosis or more of PG E₂ seems to increase AMPS value in the cervical tissue.

The problems of the effects on cervical AMPS of PG E₂ and sex steroid hormones were pursued. The results were shown in Table 4 and were outlined in Fig. 2. The mean values of PG E₂ 12 mg—estradiol benzoate 4 mg group, PG E₂ 12 mg—estradiol benzoate 4 mg—progesterone 50 mg group and PG E₂ 12 mg—progesterone 50 mg group were $15.4 \pm 0.9 \mu\text{mol/g}$, $12.5 \pm 1.3 \mu\text{mol/g}$ and $12.3 \pm 1.2 \mu\text{mol/g}$ respectively. The highest value was recognized in PG E₂ 12 mg—estradiol benzoate 4 mg group of all groups. But total AMPS contents in PG E₂ 12 mg—estradiol benzoate 4 mg—progesterone 50 mg group and PG E₂ 12 mg—progesterone 50 mg group were presented in the same value and higher than that in the control group. Effects of estradiol benzoate seem to be interfered with progesterone, but that of PG E₂ were not depressed with progesterone.

Discussion

Recently, many attention to the mechanism of cervical ripening "softening" during pregnancy and labor have been turned toward. Nevertheless, it is impossible that the cervix uteri is intendedly regulated to the condition of soft ripening or rigid unripening. Since in Danforth¹⁾ in 1947 stated that the human cervix uteri is basically a connective tissue, and is to be contrasted sharply with the cotpus, which is basically muscular, much research has been carried out into the connective tissue in the cervix uteri.

To dissolve the problems of this mechanism, many investigations as to the collagen in the uterin cervix were done by Harkness²⁾, Buckingham³⁾, Danforth⁴⁾, Rimmer⁵⁾ and Karube⁶⁾ who reported concentration of

the collagen decreased and the weight of the uterin cervix increased during pregnancy and labor. There is the implication that the collagen may be destroyed, and not simply loosened and pulled apart.

Danforth⁴⁾, Buckingham³⁾, Timpl⁷⁾, Hirakawa⁸⁾ and Karube⁶⁾, presented that the non-collagenous protein, or the structural protein increased in the coincident with the decrease of collagen concentration in the cervix uteri during pregnancy.

On the other hand, Nakayama⁹⁾ and Majima¹⁰⁾ found that hexosamine and glucosamine increased in the cervix of rat, and Ohkawa¹¹⁾ and Endo¹²⁾ found that uronic acid and glucosamine increased in the human cervix uteri during pregnancy. Authors¹³⁾ and Danforth reported previously that acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri markedly increased during pregnancy and labor, and that the acid mucopolysaccharides which were most frequently found in the human cervix uteri were hyaluronate, chondroitin-4- and chondroitin-6-sulfate and dermatan sulfate.

Many studies have been given to the relation of sex steroid hormones to connective tissue mechanism, but few studies concern the human cervix uteri.

Morgan¹⁴⁾, Grant¹⁵⁾ and Saga¹⁶⁾ reported marked changes in hyaluronate by estradiol treatment. Puck¹⁷⁾, Hübner¹⁸⁾ and Borglin¹⁹⁾ stated that estriol has a strong influence on the cervix and the vagina. The authors also recognized that estriol 40 mg group had as strong effects on acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri as estradiol benzoate 4 mg group did.

Few biochemical investigations have been reported as to the effects of PG E₂ on acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri, although PG E₂ has been used clinically with some success. The present study indicated that PG E₂ 12 mg group combined with estradiol benzoate 4 mg was most effective on increasing of acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri.

It is also very interested that the effects of estradiol were depressed by progesterone, but those of PG E₂ were not inhibited by progesterone in acid mucopolysaccharides content of the human cervix uteri. From

these findings, it may be suggested that sex steroid hormones (especially estrogen and progesterone) regulate the synthesis of prostaglandins, while the latter controls production of acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri.

But it is not clear whether these effects of these compounds are direct or mediated through some unknown reactions. Also it is important to define what characters hyaluronate, chondroitin-4-, chondroitin-6-sulfate, and dermatan sulfate play in the cervical ripening during pregnancy and labor.

Acknowledgement

We express sincerely our deep indebtedness to Prof. Yagami, Y. Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Medical School for his guidance. We acknowledge Ono pharmaceutical industrial Co. for kindly supplying the we used.

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, 1947.
- 2) Harkness, M. L. R. and Harkness, R. D.: The collagen content of the reproductive tract of the rat during pregnancy and lactation. *J. Physiol.* 123: 492, 1954.
- 3) Buckingham, J. C., Seldom, R. and Danforth, D. N.: Connective tissue changes in the cervix during pregnancy and labor. *Ann. New York Acad. Sci.* 97: 773, 1962.
- 4) Danforth, D. N. and Buckingham, J. C.: The biology of the cervix. p.351, Univ. of Chicago Press, Chicago and London, 1973.
- 5) Rimmer, D. M.: The effect of pregnancy on the collagen of the uterine cervix of the mouse. *J. Endocrinol.* 57: 413, 1973.
- 6) Karube, H., Kanke, Y., Mori, Y., Hirakawa, S. and Hayashi, M.: Increase of structural glycoprotein during dilatation of human cervix in pregnancy at term. *Endocrinol Japan*, 22: 445, 1975.
- 7) Timpl, R., Wolff, I. and Weiser, M.: Acidic structural proteins of connective tissue. 1. Solubilization and preliminary chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*, 194: 112, 1969.
- 8) Hirakawa, H.: The effect of estriol on the hexosamin containing substance in the human cervix uteri. *Connective Tissue*, 6: 155, 1974. (in Japanese)
- 9) Nakayama, T.: Studies on metabolism of estrogen in the obstetric and gynecologic field. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 17: 713, 1965.
- 10) Majima, K.: Studies on the factors softening the cervix uteri during pregnancy. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 23: 831, 1971. (in Japanese)
- 11) Ohkawa, R.: Biochemical studies on acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri. *Acta Obst. Gynaec. Jpn.* 21: 1309, 1969. (in Japanese)
- 12) Endo, F.: Studies on acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri, *Sanfujinka no Sekai*, 21: 375, 1969. (in Japanese)
- 13) Nakaya, T.: Studies on acid mucopolysaccharides in the human cervix uteri. *Nagoya Med. J.* 18: 295, 1973.
- 14) Morgan, C. F.: A study of estrogenic action on the collagen, hexosamine and nitrogen content skin, uterus and vagina. *Endocrinol.* 73: 11, 1963.
- 15) Grant, R. A.: Chemical changes in the uterus of the rat during late pregnancy and post-partum involution. The effects of lactation and hormone treatment. *J. Reprod. Fertil.* 9: 285, 1965.
- 16) Sasa, M.: Studies on acid mucopolysaccharides in the female genital organs. *Sanfujinka no Sekai*, 19: 863, 1967. (in Japanese)
- 17) Puck, A. and Hübner, K. A.: The effects of estriol on the uterus and vagina of rabbits and guinea pigs and on the symphysis pubis of guinea pigs. *Acta Endocr.* 22: 191, 1956.
- 18) Hübner, K. A. and Puck, A.: Comparison of the effects of estriol in small quantities and total ovarian extract. *Zbl. Gyn.* 80: 459, 1958.
- 19) Borglin, N. E.: Effect of oestriol on the female genital tract. *Acta Obstet. Gynec. Scand.* 38: 157, 1959.

人子宮頸部の酸性ムコ多糖類に及ぼす Prostaglandin E₂ 及び各種ホルモンの 効果についての考察

中西正美

(愛知医科大学産婦人科学教室)

中谷 剛彬・水野金一郎

(名古屋市立大学産婦人科学教室)

Prostaglandin E₂ (PG E₂) と各種性ステロイドホルモン投与後の人子宮頸部中の酸性ムコ多糖体 (AMPS) の量をウロン酸として生化学的に測定した。PG E₂

mg と 10 mg 投与の両群の AMPS の量は殆んど同程度であり、その値はわずかに対照群に比し高かった。更に PG E₂ 12 mg 投与群では AMPS は著明に増加していた。一定量又はそれ以上の PGE₂ は子宮頸部組織内の AMPS を増加させうることを示唆した。PG E₂ 12 mg と estradiol-benzonate 4 mg 投与の群が全ての群のうちで最高の AMPS 値をしめた。

PG E₂ と性ステロイドホルモンの子宮頸部組織中の AMPS に及ぼす影響について追求した、estradiol-benzonate の頸部中の AMPS に及ぼす影響は progesterone によつて妨げられるが、PG E₂ の影響は progesterone によつて抑制されなかつた。

(受付：昭和55年3月13日)

clomiphene 無効例における prednisolone と clomiphene 併用療法中のホルモン分泌動態

Mechanism of the Effectiveness of Prednisolone-Clomiphene Therapy in Patients with Clomiphene Failure

京都府立医科大学産婦人科学教室

東 山 秀 聲 保 田 仁 介

Shusei HIGASHIYAMA Jinsuke YASUDA

大 坪 一 夫 岡 田 弘 二

Kazuo OTSUBO Hiroji OKADA

Department of Obstetrics & Gynecology, Kyoto Prefectural
University of Medicine, Kyoto, Japan.

clomiphene 無効例に対し、prednisolone-clomiphene 療法により優れた排卵誘発効果がえられる。本研究は血中 FSH, LH, estradiol, progesterone, testosterone, ならびに尿中17-KS と17-OHCS の分泌動態から prednisolone-clomiphene 療法の排卵誘発機序の検討を行ない、とくにこの療法における prednisolone の作用を明らかにしようとした。その結果、prednisolone は1) ACTH 分泌抑制により副腎由来の androgen 分泌を抑制して、gonadotropin 分泌を促進する。2) PCO では LH の基礎値を低下させ、FSH の基礎値は増加傾向をもたらす。3) positive feedback 機能不全を改善、正常化し LH surge をひきおこす。これには過剰 androgen の抑制が関与すると考えられる。4) 卵巣において gonadotropin に対する反応性の増大効果をもたらす。5) clomiphene の FSH, LH 分泌促進作用と卵巣の gonadotropin に対する反応性の増大効果との協調作用を発揮する。6) 下垂体における LH 放出に対して調節作用がある。

I はじめに

排卵誘発法の最近の進歩はめざましいものがあり、従来治療が不可能とされていた重症の排卵障害でも、その多くものに排卵の誘発に成功し、最終目的である妊娠成立も少なからず期待できるようになった。このような最近の進歩は、clomiphene citrate, cyclofenil, human menopausal gonadotropin (hMG), ならびに Br-ergocriptine (CB-154) などの開発によることが第一にあげられる。

各種の排卵誘発剤の中でも clomiphene は最も広く使用され、軽症の排卵障害には優れた誘発効果がえられることはよく知られている。しかしながら、いわゆる軽症例でも clomiphene で排卵が起こらなかつたり、あるいはこれまで clomiphene によく反応したものでも

反応しなくなるものがある。このようなものに対する治療法の一つとして glucocorticoid と clomiphene との併用療法がある。われわれはすでに副腎皮質機能正常な clomiphene 無効の第1度無月経に対し、prednisolone と clomiphene の併用で極めて高い排卵誘発効果がえられることを発表している⁴⁾⁵⁾。本研究では prednisolone-clomiphene 療法の排卵誘発機序、とくに prednisolone の作用を解明する目的で、以下のような実験を行った。

研究対象ならびに研究方法

本研究でいう clomiphene 無効とは、clomiphene を1日50mg, 5日間投与から始め、その投与量で排卵が誘発されない場合は周期毎に1日50mg ずつ段階的に、1日150mg まで増量投与し、150mg, 5日間、連続3周期

投与を行ってもなお排卵が起こらない第1度無月経である。本来 clomiphene 投与の適応とならない第2度無月経は除外している。なお、無月経の分類は progesterone 60mg の投与で消退出血が認められなかったのを第1度無月経とした。

clomiphene 無効例について clomiphene 1日150mg 単独投与の周期と、それに引き続いた prednisolone-clomiphene 投与の周期に連日採血を行い、血中 LH, FSH, estradiol (E₂), testosterone (T), progesterone の定量ならびに頸管粘液の性状の検索を行った。また症例によっては、prednisolone-clomiphene 投与期間中の血中 LH, FSH, T, ならびに尿中17-KS と17-OHCS の測定を行い、その変動を検討した。

血中 LH, FSH の定量は第1ラジオアイソトープ研

究所製のヒト LH, FSH キットを用いて2抗体法により行った。血中 E₂ および progesterone は、それぞれ ¹²⁵I-estradiol, ¹²⁵I-progesterone システムによる2抗体法により定量した。血中Tはミドリ十字社製のキットを使用して測定した。

尿中の17-KS は Dreker 変法、尿中17-OHCS は Reddy 変法によつて測定を行った。prednisolone と clomiphene の投与方法は併用投与方法によつた。すなわち、progesterone による消退出血または月経開始第2日から prednisolone 1日5mg を10日間、clomiphene は第5日より1日150mg を5日間投与した。

成績

prednisolone 1日150mg, 5日間単独投与の周期と、

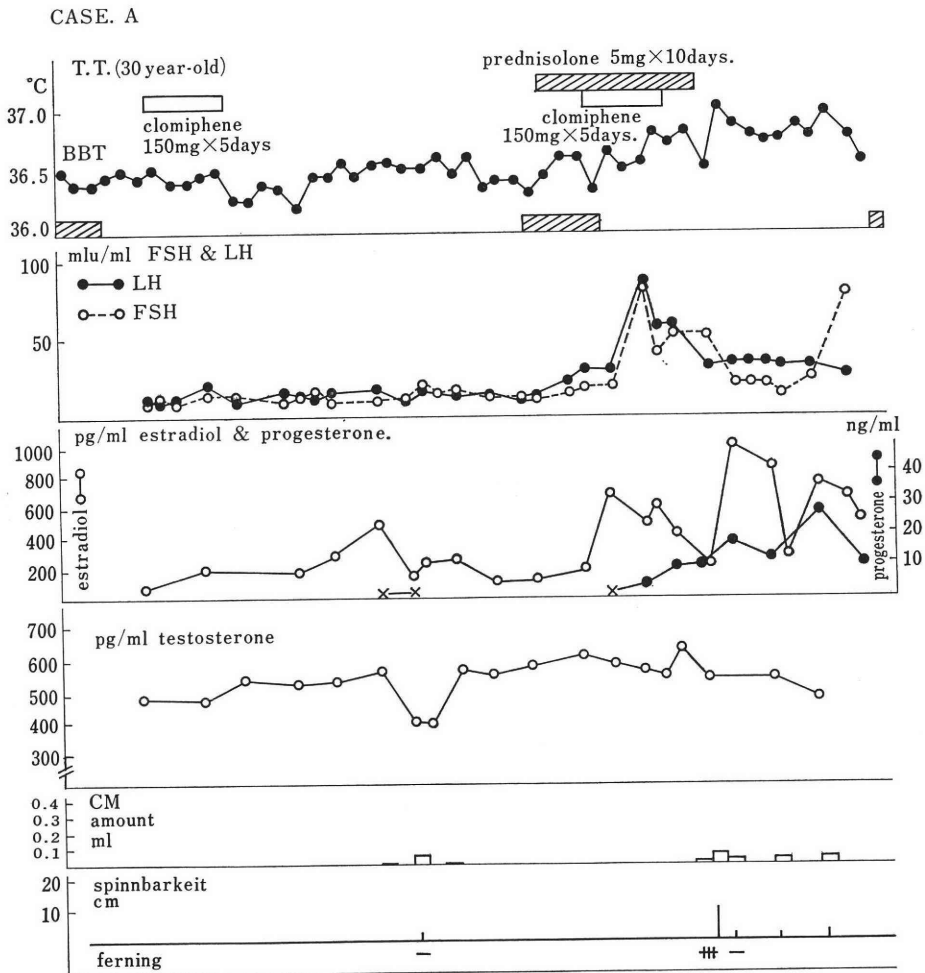


Fig. 1 Pattern of BBT, serum FSH, LH, estradiol, progesterone, testosterone and cervical scoring during clomiphene alone and prednisolone-clomiphene therapy in a patient with clomiphene failure

CASE. B

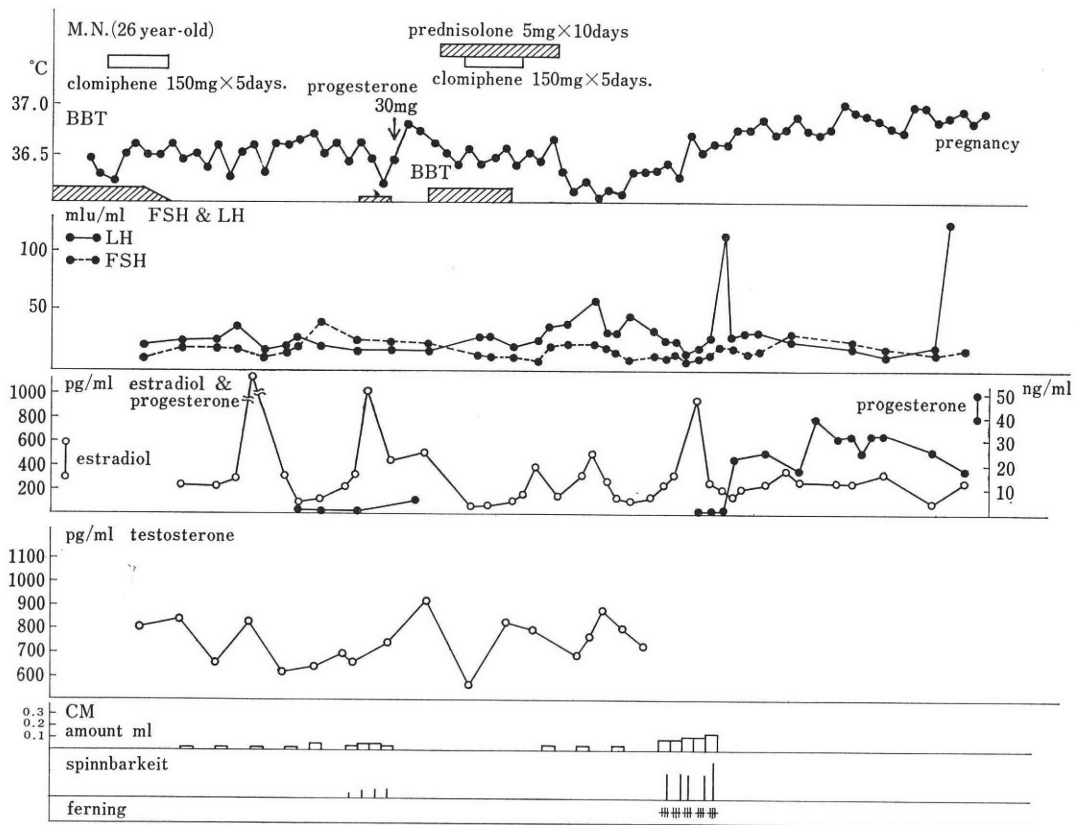


Fig. 2 Pattern of BBT, serum FSH, LH, estradiol, progesterone, testosterone and cervical scoring during clomiphene alone and prednisolone-clomiphene therapy in a patient with clomiphene failure

それに続く prednisolone-clomiphene 併用周期の BBT 曲線、血中ホルモンおよび頸管粘液の性状の変動を図 1~2 に示した。

clomiphene 単独で排卵が起こらなかった周期においては、血中 FSH, LH の変動は症例 A, B ともにおおむね平坦である。症例 A では E_2 は clomiphene 中止 10 日後には 500pg/ml のレベルまで上昇したが、それに続く LH の大量放出は起こらず、BBT と血中 progesterone レベルからみてもこの周期は無排卵に終わっている。なお、この症例は clomiphene 投与中止 20 日後に月経様の性器出血が認められた。症例 B においても E_2 は clomiphene 投与終了 9 日後に 1650pg/ml という非常に高いレベルに達して鋭いピークを形成したが、これに続く LH の大量放出は起こらなかった。BBT と血中 progesterone 値からみて、本症例もこの clomiphene 単独投与の周期には無排卵であると推定される。

clomiphene 単独周期に引き続き、次周期には月経周

期第 2 日より prednisolone 1 日 5 mg を 10 日間投与し、さらに第 5 日より clomiphene 1 日 150mg を 5 日間併用投与した。この併用周期では、症例 A は clomiphene 投与第 2 日、predsolone 投与第 5 日に血中 E_2 は 720 pg/ml まで上昇してピークを形成した後、 E_2 の高レベルは 5 日間持続し、その後下降した。血中 E_2 のピークに続いて LH, FSH はそれぞれ 88.1mIU/ml, 79.6mIU/ml の値でピークに達した。血中 progesterone は LH ピークの 2 日後に 10ng/ml のレベルに達した後、10ng/ml 以上のレベルが続き、この周期には clomiphene 投与中にすでに排卵が起こったと考えられた。症例 B では血中 E_2 は clomiphene 投与終了 2 日後と 7 日後にそれぞれ 400pg/ml 以上のレベルに達してピークを形成した後、いつたん下降した。LH は clomiphene 投与中から投与終了後数日までの期間で分泌が刺激され、同じ期間では FSH 分泌の軽度亢進も認められた。clomiphene 終了 12 日後に E_2 の第 3 の急峻なピークの形成が

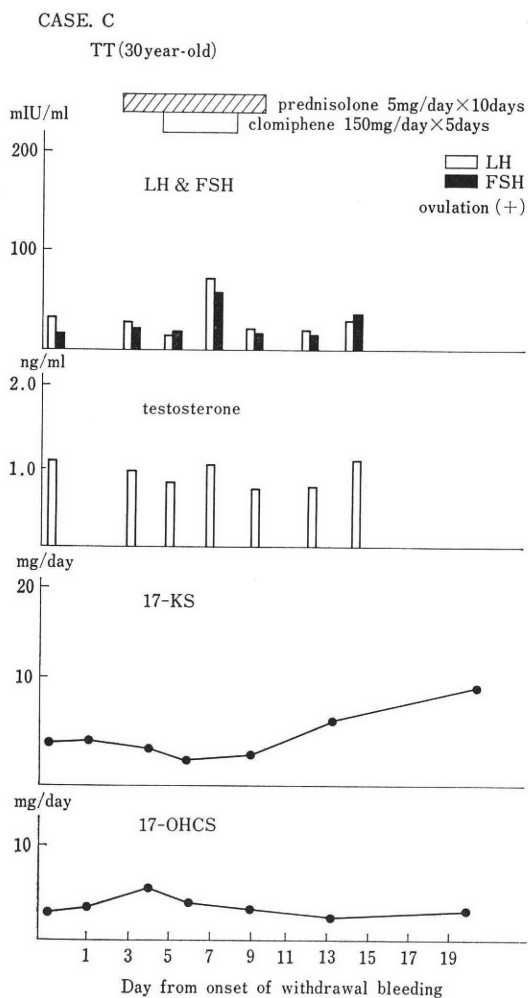


Fig. 3 Pattern of serum FSH, LH, testosterone, urinary 17-KS and 17-OHCS during prednisolone-clomiphene therapy

みられ、そのレベルは1,000pg/mlを示した。このピークに続いて LH の鋭いピークと FSH の緩やかな上昇が認められた。血中 progesterone は LH ピークの翌日から上昇した。この症例はこの治療周期に妊娠が成立した。

血中Tは、clomiphene 単独周期と prednisolone-clomiphene 併用周期の全期間を通して、症例Aは0.4~0.7ng/ml, 症例Bは0.5~0.9ng/mlの範囲内の変動であった。

次に、prednisolone-clomiphene 併用周期において、prednisolone と clomiphene 投与期間中の血中ならびに尿中ホルモンの変動を図3~5に示した。症例Cでは、血中 LH の基礎値は30.5mIU/ml, FSH は16.8 mIU/ml であるが、prednisolone の投与で LH は低

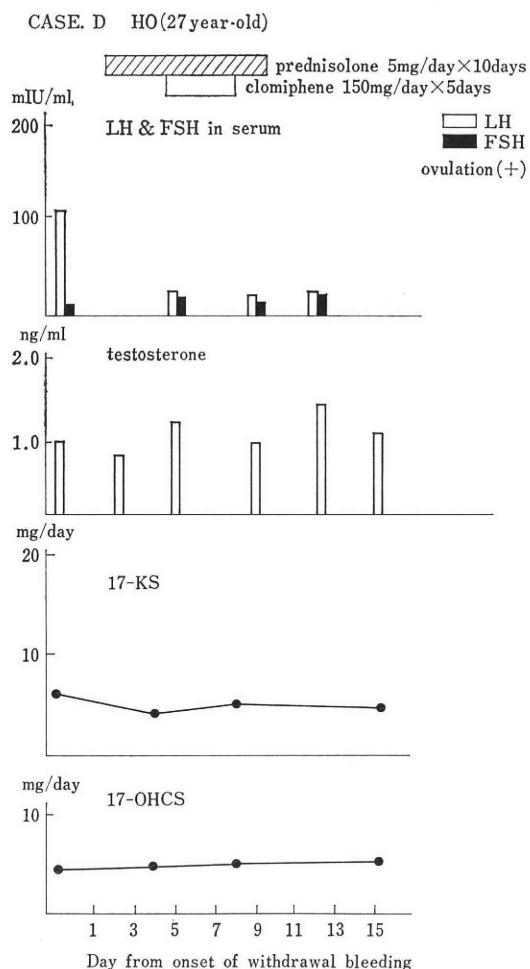


Fig. 4 Pattern of serum FSH, LH, testosterone, urinary 17-KS and 17-OHCS during prednisolone-clomiphene therapy

下、FSH は増加傾向を示した。clomiphene の追加投与で血中 LH と FSH は増加し、月経周期第6日に両者とも小さいピーク形成がみられた。血中Tは周期第8日から第11日までは軽度低下し、その後は上昇傾向を示した。尿中17-KS は血中Tとほぼ並行して変動した。尿中17-OHCS 値は prednisolone 投与中も低下しなかった。症例Dでは治療前の gonadotropin の基礎値は LH は106.6mIU/ml, FSH は11.0mIU/ml であり、多嚢胞卵巣 (PCO) が考えられた。prednisolone 1日5mg の投与開始により、血中 LH は著明に減少して正常レベルとなったが、血中 FSH はやや増加を示した。血中Tと尿中17-KS 値は prednisolone 投与で軽度低下した。clomiphene の追加投与による血中 LH, FSH ならびに尿中17-KS, 17-OHCS の変動は極めて少なく、

CASE. E KH(30 year-old)

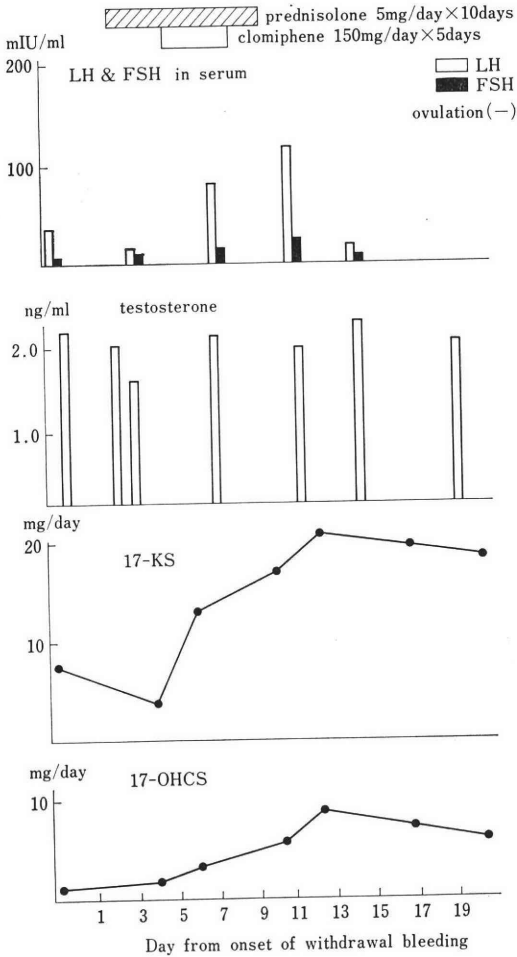


Fig. 5 Pattern of serum FSH, LH, testosterone urinary 17-KS and 17-OHCS during prednisolone-clomiphene therapy

血中Tにわずかな変動が認められたが、それも0.9~1.4 ng/mlの範囲内であった。なお、症例CとDはこの観察周期に排卵が誘発された。症例Eでは、治療開始前の血中 LH と FSH はそれぞれ36.1mIU/ml, 7.4mIU/mlを示し、LHの基礎値がやや高値であった。prednisoloneの投与で血中 LH は正常レベルまで下降したが、FSHは軽度増加した。clomiphene を追加投与すると、血中 LH と FSH はともに増加し、とくに LH の増加が著明で、clomiphene 投与開始第3日目では84.6mIU/ml、第7日目には121.5mIU/ml まで増量した。血中Tは基礎値が2.2ng/ml とかなり高値をとったが、prednisoloneの投与で低下し、投与第2日には1.55ng/ml まで減少した。しかしながら、clomiphene の投与で LH が増量

すると血中Tも再び増加して2ng/ml以上の高レベルで推移した。尿中17-KS 値は血中Tとよく並行して変動し、prednisolone の投与で LH の低下とともに17-KS も低下し、clomiphene の追加投与で LH が増加すると17-KS 値も再び上昇するというパターンをとった。尿中17-OHCS は prednisolone の投与ではあまり変化を受けず、clomiphene 投与で漸増を示した。なお、この周期には排卵は誘発されなかった。

次に、clomiphene 無効例に対する clomiphene 単独投与周期と prednisolone-clomiphene 併用投与周期の周期第10~12日に、合成 LH-RH 200ug を負荷して下垂体の反応性を比較したのが図6である。clomiphene 単独と prednisolone-clomiphene 併用とでは2症例とも FSH の基礎値、および LH-RH 負荷後の各時間値の血中 FSH には差はみられないが、下垂体からの LH 放出量には大きな差が認められた。すなわち、LH の基礎値には著差は生じないが、LH-RH 負荷後の LH 量には単独周期と併用周期とでは著しい差がみられ、とくに60分値までの LH 量には2症例とも著差が生じた。ここで興味のあることは、LH の反応態度が対照をなしていることである。clomiphene 無効の第1度無月経でありながら、LH-RH 投与後の LH の反応性の相違がどうして生ずるかは、さらに検討を重ねる必要がある。ここに示した成績から少なくとも、prednisolone が下垂体の LH 放出を直接調節する効果を持つと考えられる。

prednisolone と clomiphene 投与期間中の尿中17-KS と17-OHCS の変動を、12症例について示したのが図7である。尿中17-KS が prednisolone 投与では不変、clomiphene の追加投与で上昇するもの2例、prednisolone で低下し clomiphene 投与で上昇するもの2例、prednisolone で低下し clomiphene 投与で上昇しないもの3例、prednisolone と clomiphene 両者の投与でも変化しないもの5例であった。一方、尿中17-OHCS は prednisolone で低下し clomiphene で変化しないもの3例、prednisolone と clomiphene 投与中に上昇したものの1例、prednisolone と clomiphene 投与で変化がみられなかったもの8例であった。

考 案

clomiphene 1日150mg, 5日間の単独投与では排卵が誘発されないが、これに prednisolone を1日5mg, 7~10日間併用すると排卵が起こる。この prednisolone-clomiphene 療法は clomiphene 無効例に対して、極めて高い排卵誘発効果がえられ(症例数に対し約85%)⁹⁾、この療法の優れた効果は prednisolone に負うところが多

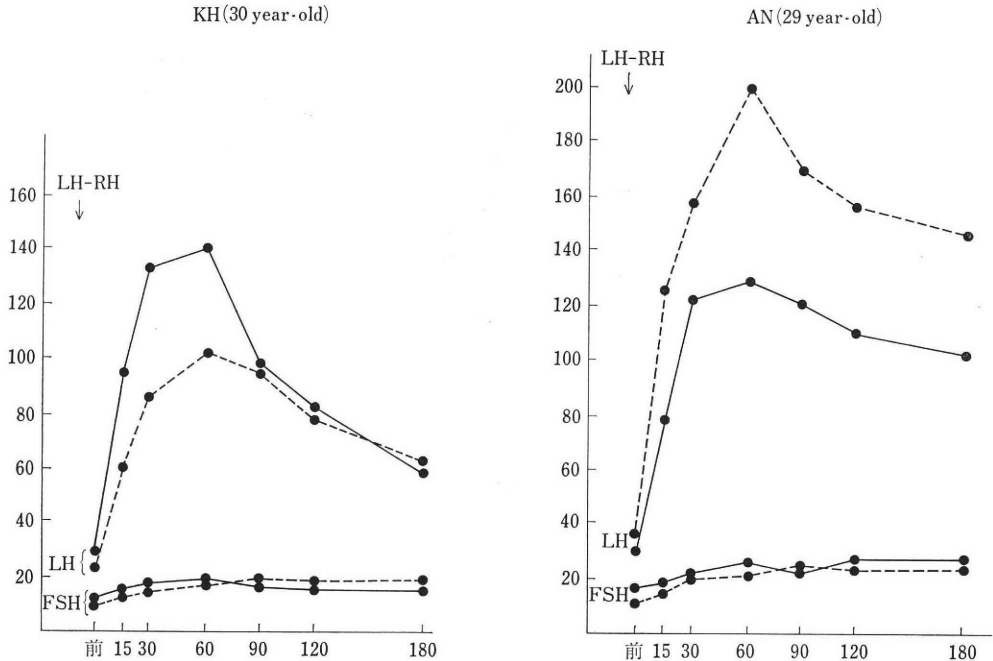


Fig. 6 Pituitary response to LH-RH during clomiphene therapy (●—●) and prednisolone-clomiphene therapy (●····●)

い。本研究では prednisolone がどのような役割を果たすのかを、血中や尿中ホルモン動態から検討を行った。

prednisolone などの副腎皮質ホルモンはこれまでも副腎性器症候群、Stein-Leventhal 症候群、PCO 症候群などの androgen 過剰症に対し、排卵誘発の目的で使用されている。これは ACTH を介する副腎皮質機能の抑制を行うことによつて副腎由来 androgen 分泌を抑制し、その結果卵巣機能に変化をもたらし、排卵を起こすことにあると考えられる。しかしまた、副腎皮質ホルモンは副腎皮質機能が正常なものに使用しても、本実験で示したように下垂体 gonadotropin 分泌の増加が認められ、同様の報告は Sohval and Soffer¹²⁾によつても行われている。

prednisolone の性上位部に対する作用は下垂体前葉からの gonadotropin 分泌の亢進効果のほか、estrogen の positive feedback 効果に対する機能の改善効果があると考えられる。すなわち、症例 A と B はともに clomiphene の単独投与周期では、血中 E₂ はそれぞれ 500pg/ml, 1,650pg/ml と高いレベルでピークを形成した。しかし、それに続く LH の大量放出は起こらず、無排卵に終わっている。clomiphene 単独周期に引き続いた prednisolone と clomiphene の併用投与周期には、症例 A では E₂ は 720pg/ml の値でピークに達し、このピークに続いて LH surge が起こり、排卵が誘発

された。症例 B の prednisolone-clomiphene 投与周期には、clomiphene 終了 12 日後に血中 E₂ は 1000pg/ml に達して急峻なピークが形成され、その 2 日後に LH の鋭いピークが認められ、排卵が誘発されている。ここに示した症例から、clomiphene 無効例には estrogen に対する positive feedback 機能不全があると考えられ、prednisolone はこの機能不全を改善、正常化して LH surge を引き起こすと思われる。次に症例 C~E では、血中 FSH の基礎値は正常であるが、LH の基礎値は 30mIU/ml 以上と高レベルにあり、PCO が疑われた。これらの症例に対し prednisolone を投与すると、血中 LH は一般に低下傾向を示し、とくに症例 D でそれが顕著となり、高い LH の基礎値から prednisolone 投与 3 日で正常レベルまで著減した。症例 C と E においても prednisolone により LH レベルが低下するという現象が認められた。一方、血中 FSH は LH とは異なり、prednisolone の投与で増加の傾向がみられた。

このように、prednisolone は gonadotropin の分泌に対して特異な作用を示すことがある。PCO において prednisolone は高 LH を減少して正常レベル化し、正常~やや低レベルの FSH は増量の方へ向わせると考えられる。Sowers & Favez¹²⁾は PCO を含む続発無月経に dexamethasone を大量(1日 8mg, 5日間)投与すると、LH と FSH 両者の基礎値が低下し、また LH-

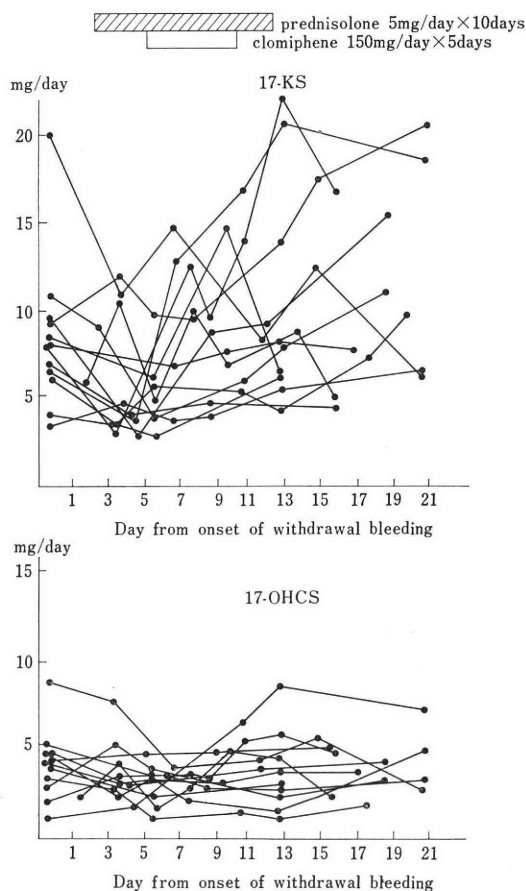


Fig. 7 Seventeen-KS and 17-OHCS during prednisolone-clomiphene therapy

RH に対する LH と FSH の反応も低下すると報告している。これは LH については同一傾向であるが FSH に関しては本実験成績とは相違する。この相違は使用した副腎皮質ホルモンの用量の差により生じたとも考えられる。

図3～5でみられた prednisolone による gonadotropin の質的量的変化は、一部は androgen の血中濃度の変化による可能性が示唆された。androgen の過剰症の場合、androgen が positive feedback 機構に対し抑制的に働くが、prednisolone により androgen レベルが低下するとその抑制が除かれ、前述のように positive feedback 機構の改善・正常化がもたらされると推定される。しかし、prednisolone で androgen レベルが低下しても、症例 E (KH) のように clomiphene の追加投与による LH の分泌亢進の結果、卵巣よりの testosterone 分泌が増加し、その血中レベルが異常高値となると positive-feedback 機能の不全が起こる

と考えられる。

一方、過剰 androgen は卵巣にも直接作用して卵胞発育を阻害すると考えられるが¹²⁾、prednisolone による androgen の減少は卵胞発育の阻害を除き、卵胞発育を促進するものと推測される。

prednisolone にはこのほか、既報⁴⁾⁵⁾のように卵巣レベルで作用し、卵巣の gonadotropin に対する反応性を高める効果を持っている。また、下垂体レベルにおいては、prednisolone が前葉からの gonadotropin 放出を調節する可能性があり、これについて現在検討を行っている。

次に、clomiphene の作用部位は二つの部位が考えられている。一つは卵巣であり、clomiphene は卵巣の gonadotropin に対する感受性を増大させる¹³⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹⁵⁾。他の一つは視床下部・下垂体系である。そのうちでも clomiphene の主な作用部位は視床下部であるが²⁾⁷⁾¹¹⁾¹⁵⁾下垂体にも直接作用して FSH, LH の放出を調節する⁶⁾。視床下部、あるいは下垂体レベルにおける clomiphene の作用部位は estrogen receptor である⁷⁾¹¹⁾¹⁵⁾。clomiphene は estrogen receptor と結合して clomiphene-receptor complex を形成する。その結果、視床下部は血中の estrogen 濃度が低いと認識し、estrogen の negative feedback 機序により視床下部から下垂体門脈系へ gonadotropin 放出ホルモンの分泌が促進される。その結果、下垂体から FSH, LH の分泌が刺激され、卵胞の発育促進と estrogen 分泌促進とがあいまって、clomiphene により排卵が誘発される。clomiphene と estradiol receptor の結合は強固であり¹¹⁾、したがって clomiphene の効果は持続して発揮されることになる。

文 献

- 1) Crooke, A. C., Hansolita, M. D. and Bertrand, P. V.: Joint action of clomiphene citrate and pituitary gonadotropins, *Lancet*, 1: 567, 1969.
- 2) Eisenfeld, A. J. and Axelrod, J.: Evidence for estradiol binding sites in the hypothalamus effects of drugs, *Biochem. Pharmacol.*, 16: 1781, 1967.
- 3) Hagerman, D. D., Smith, O. W. and Day, C. F.: Mechanism of the stimulatory effect of clomid on aromatization of steroids by human placenta in vitro, *Acta Endocrinol (Kbh)*, 51: 591, 1966.
- 4) 東山秀聲：クロミフェンとプレドニソロン併用療法。産婦進歩, 28: 417-422, 1976.
- 5) 東山秀聲, 小林仁也, 大野洋介, 山元貴雄, 岡田弘二: prednisolone-clomiphene 療法による

- 排卵誘発とその作用機序. 日産婦誌, 30:1424, 1978.
- 6) 岩崎武輝, 木津収二, 東山秀聲, 岡田弘二: clomiphene citrate 作用下の前葉 gonadotropin 分泌について. 日内分泌会誌, 52:510, 1976.
 - 7) Jorgensen, S. E. B., Starup, J., Roos, J. and Micic, S.: Studies on the mode of action of clomiphene citrate, Acta Obstet. Gynecol. Scand., 55:337, 1976.
 - 8) Louvet, J. P. Harman, S. M. Scheriber, J. R. and Ross G. T.: Evidence for a role of androgens in follicular maturation, Endocrinology, 97:366, 1975.
 - 9) Rayne, R. W. and Runser R. H.: The influence of estrogen and androgen on the ovarian response of hypophysectomized immature rats to gonadotropins, Endocrinology, 62:313, 1958.
 - 10) Roy, S., Mahesh, V. B. and Greenblatt, R. B.: Effects of clomiphene on the physiology of reproduction in the rat, Acta Endocrinol (Kbh), 47:669, 1964.
 - 11) Ruh, T. S., Puh, M. F. and St. Louis, M.: The effect of antiestrogens on the nuclear binding of the estrogen receptor, Steroids, 24:209, 1974.
 - 12) Sohval, A. R. and Saffer, L. J.: The influence of cortisone and adrenocorticotropin in urinary gonadotropin excretion, J. Clin. Endocrinol. 11:697, 1951.
 - 13) Sowers, J. R. & Favez, T.: Effect of dexamethasone on gonadotropin responsiveness to luteinizing hormone releasing hormone and clomiphene in women with secondary amenorrhea, Am. J. Obstet. Gynecol., 134:325, 1979.
 - 14) Smith, O. W., Smith, G. V. and Kistner, R. W.: Action of MER-25 and of clomiphene on the human ovary, JAMA. 184:878, 1963.
 - 15) Speroff, L., Glass, R. H. and Kase, N. G.: Induction of ovulation with clomiphene (Clomid) and human menopausal gonadotropins (HMG), Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. The Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1973. P. 214.

Mechanism of the effectiveness of prednisolone-clomiphene therapy in patients with clomiphene failure

Shusei Higashiyama, Jinsuke Yasuda,
Kazuo Otsubo and Hiroji Okada

Department of Obstetrics & Gynecology,
Kyoto Prefectural University of
Medicine, Kyoto, Japan

The purpose of this study is to elucidate mechanisms of effectiveness of prednisolone-clomiphene therapy in patients with clomiphene failure in spite of the condition where certain level of estrogen is produced. Prednisolone was administered in a daily dose of 5 mg for 10 days from the 2nd day of the cycle, and clomiphene was given in a daily dose of 150 mg for 5 days from the 5th day. Serum LH, FSH, estradiol (E), testosterone (T), progesterone (P), and urinary 17-KS and 17-OHCS were measured in both clomiphene and prednisolone-clomiphene treated cycles. Pituitary responses to synthetic LH-RH in clomiphene and prednisolone-clomiphene cycle were examined.

Serum LH and FSH did not fluctuate and stayed within the normal range throughout clomiphene treated cycle. E₂ levels gradually elevated after starting the clomiphene administration and rose to a peak. However, preovulatory surge of LH did not occur in clomiphene cycle. In prednisolone-clomiphene cycle, there were gradual elevation of serum LH and FSH with beginning of prednisolone administration, and drastic LH surge was followed by the E₂ preovulatory peak after the clomiphene administration. Serum P level gradually rose to 10 ng/ml or more, confirming ovulation.

On the other hand, a high serum LH level prior to prednisolone-clomiphene therapy in patients having polycystic ovary promptly dropped with starting of the prednisolone administration, and thereafter LH gradually rose with the clomiphene administration. However, FSH stayed at a normal level throughout the observation with slight fluctuation. Serum T and urinary 17-KS also continued to be abnormally high when the LH level was very high. Abnormally high levels of serum T in the early phase of the treated cycle were probably the result of ovarian stimulation by the elevated LH. The high T levels seemed to inhibit follicular maturation, thus resulting the ovulation failure.

The results of the present study suggested

that many patients having clomiphene failure might be related to polycystic ovary syndrome with the dysfunction of positive feedback mechanism. Mechanism of action of prednisolone-clomiphene therapy was likely to increase gonadotropin production in co-operation of prednisolone and clomiphene through the hypothalamo-

pituitary system. Moreover, prednisolone in this regimen seemed to have the resumptive effect of LH response to estrogen on the hypothalamic level and to modulate the LH release from the pituitary.

(受付：昭和55年4月17日)

短時間で測定可能な DPC, FSH・LH キット に関する臨床的研究

Clinical Evaluation of the DPC Kit; A New Short Term Assay Method for hFSH and hLH

帝京大学産婦人科学教室

大川 とみ 岡野 秀子 吉江 絹子
Tomi OKAWA Hideko OKANO Kinuko YOSHIE
宮里 良尚 池下 久弥 荒井 清
Yoshinao MIYASATO Hisaya IKESHITA Kiyoshi ARAI
冲 永 莊 一
Shouichi OKINAGA

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

数時間で測定可能なダイナボット RI 研の DPC 製, FSH, LH-RIA キットの臨床応用につき検討した.

- ・標準曲線の LOGIT-LOGプロットは FSH, LH いずれもよい直線性を示した.
 - ・本アッセイのアッセイ内変動は, FSH で0.7~5.8%, LH は4.3~9.1%であり, アッセイ間変動は FSH 4.7~8.9%, LH 6.3~10.5%であった.
 - ・アッセイ系の感度は, FSH 1.9 ± 1.4 , LH 3.4 ± 1.1 mIU/ml であった.
 - ・アッセイ系の精度については, FSH で回収率103~116%, LH で85~88%であった.
 - ・NIAMDD 提供のヒト FSH, LH, RIA 系との測定値の相関係数は, FSH 0.92, LH 0.96と有意の相関を示した.
 - ・本アッセイ系を用いて, 若干の臨床検体の FSH, LH 測定を行なった.
- 以上の結果から, 本キットの臨床応用の可能性につき考察を加えた.
-

FSH および LH は, 下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンで, 産婦人科領域においては, 卵巣機能を直接支配している重要なホルモンである. 卵胞の発育並びにエストロゲンの合成分泌に主として FSH が関与し, 排卵およびそれに続く黄体形成段階でさらに LH の作用が必要となってくる. 正常月経周期婦人では, 周期前半の卵胞期に, 血中 FSH レベルが後半期に比しやや高値をとる傾向にあり¹⁾, 排卵の前日には, FSH, LH とともに著明な増加を来してピークを作る²⁾. 一方, 無排卵性周期, 或は無月経婦人の血中 FSH, LH 値の動向をみると, こうした一定の傾向を示さず, 特に周期中間の両者のピークは認められない³⁾. また, 更年期後,

両側卵巣摘除後の婦人では, 卵巣機能が低下または消失し, 血中 FSH, LH が高値を維持する.

かように, 婦人の reproduction と密接な関連をもつ下垂体・卵巣系機能の診断上, 血中 FSH, LH 測定は不可欠である. これらゴナドトロピンの測定は, それぞれ特異的抗体を用いたラジオイムノアッセイ (RIA) 法と, 標的臓器である睾丸または卵巣の細胞の受容体との結合を応用したラジオレセプターアッセイ法とが一般的である. しかし, 何れも研究室レベルでの測定法で, 日常臨床検査にルチンに取り入れるには, やや煩雑な操作が多く, 高度の技術と熟練を要する. これらの難点のある程度解決した, RIA 用キットが市販されるようになった

が、測定を開始してから、結果判定までに、なお長時間を要するものが多い。今回、ダイナボット RI 研の「DPC 製 FSH, LH キット」を検討する機会を得たので、ここにその概要を報告する。

対象および実験方法

(1) 対象

本キットを用いてゴナドトロピン測定を行なった臨床症例は次の通りである。

- a. 20~28歳の正常月経周期を有する婦人 2例。
- b. 第1度および第2度無月経を含む、続発性無月経症例 33例。
- c. 婦人科的腫瘍のため両側卵巣摘出術を受け、1カ月以上経過した症例 3例。
- d. 所謂「更年期諸症状」を主訴として来院した45~50歳の閉経前婦人 5例。
- e. 閉経後の婦人 12例。
- f. 正常月経周期婦人、卵胞期初期の LH-RH テスト施行例 14例。

(2) 採血

午前10~12時に、肘静脈より採血、血清を分離後、-20°Cにて測定時まで保存した。なお、LH-RH テストは、午後1時に実施、注射前、100 μ g 合成 LH-RH (田辺製薬) 静注後、15, 30, 60, および120分にそれぞれ肘静脈より採血した。

(3) 測定方法

a. FSH, LH-RIA キットの内容

- ・凍結乾燥抗 FSH, LH 血清
- ・凍結乾燥 ¹²⁵I-FSH, LH
- ・凍結乾燥標準 FSH (2~100mIU/ml), LH (3~200mIU/ml) : WHO の 2nd IRP-HMG で検定済み。
- ・凍結乾燥抗家兎 γ -グロブリン山羊血清 (第二抗体)
- ・ポリエチレングリコール (PEG)

b. 必要器具・試薬

ピペット (100 μ l, 200 μ l, 2ml), アッセイチューブ (7 \times 100mm), メスシリンダー, 塩化ナトリウム, 蒸留水, 遠心分離機, ウェル型シンチレーションカウンター。

c. 試薬の調製

抗血清, ¹²⁵I-FSH, -LH, 第二抗体は、それぞれ蒸留水 10ml を加えて溶解する。標準品は、それぞれ指定された量の蒸留水を加え溶解する。PEG は生理食塩水300ml 中に溶解して、4% PEG 生食液を作成し、この溶液200ml と調製した第二抗体液10ml を混和して沈澱剤

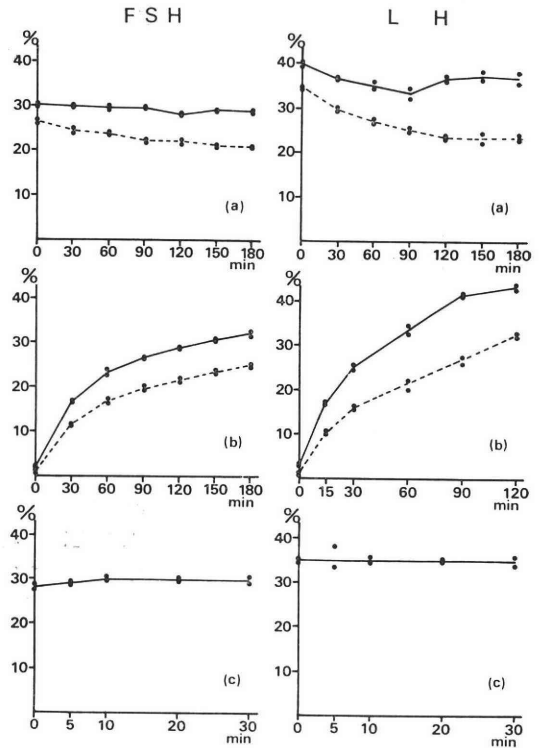


図1 インキュベーション時間による結合率 B/T % の変化 (●—●: 標準品A, ●---●: 標準品D)

表1 標準曲線の各濃度に於ける B/B₀ % の平均および標準偏差。

FSH				LH			
St. (mIU/ml)	mean B/B ₀ % \pm S.D.	% CV		St. (mIU/ml)	mean B/B ₀ % \pm S.D.	% CV	
B 2	94.7 \pm 2.2	2.3		B 3	95.6 \pm 2.9	3.0	
C 5	85.7 \pm 2.7	3.2		C 10	82.1 \pm 2.9	3.5	
D 10	72.2 \pm 2.6	3.6		D 20	69.5 \pm 3.1	4.5	
E 20	55.5 \pm 3.1	5.6		E 40	47.9 \pm 2.3	4.8	
F 40	33.0 \pm 1.7	5.2		F 100	21.2 \pm 1.8	8.5	
G 100	14.5 \pm 1.1	7.6		G 200	11.5 \pm 1.1	9.6	

とする。

d. 操作法

- ①標準曲線用に, Total, NSB, 標準品 A~G をそれぞれ 2 本ずつ操作する。サンプルの測定も duplicate で行なう。
- ②各濃度の標準品溶液, および被検血清をチューブに加える。但し NSB には標準品 A (O 血清) を加える。(採取量は FSH 200 μ l, LH 100 μ l)
- ③ T および NSB を除く全チューブに抗血清 100 μ l を加え混和して, 2 時間プレインキュベーションを行なう。(FSH は 37°C, LH は室温)
- ④全チューブに, ¹²⁵I-FSH あるいは LH 100 μ l を加え混和して, さらに, FSH は 37°C 2 時間, LH は室温, 1 時間インキュベートする。
- ⑤ T を除く全チューブに, 氷冷した沈澱剤 2 ml を加え混和して, 室温, 5 分放置する。
- ⑥ T を除く全チューブを, 2000g, 20 分で冷却遠心分離後, 上清を捨て, 放射能を 1 分間測定する。
- ⑦ Logit-Log 紙に B/B₀ % をプロットして標準曲線を描き, サンプルの B/B₀ % から, FSH および LH 濃度を決定する。

(4) 比較試験

本キットで測定した検体を, 科研化学製 FSH および LH リアパック⁴⁾, ならびに, NIAMDD 提供のヒト FSH, LH 測定用キットで測定し, 得られた結果を対比せしめ⁵⁾, 検討を行なった。

標準血清に抗血清添加後のプレインキュベーションでは, 図 1(a) に示す如く, LH で 120 分以降, 標準血清 A (0 mIU/ml) と標準血清 D (20 mIU/ml) の結合率 B/T の

結果

DPC 製 FSH, LH キットの基礎的検討

(1) インキュベーション時間の検討

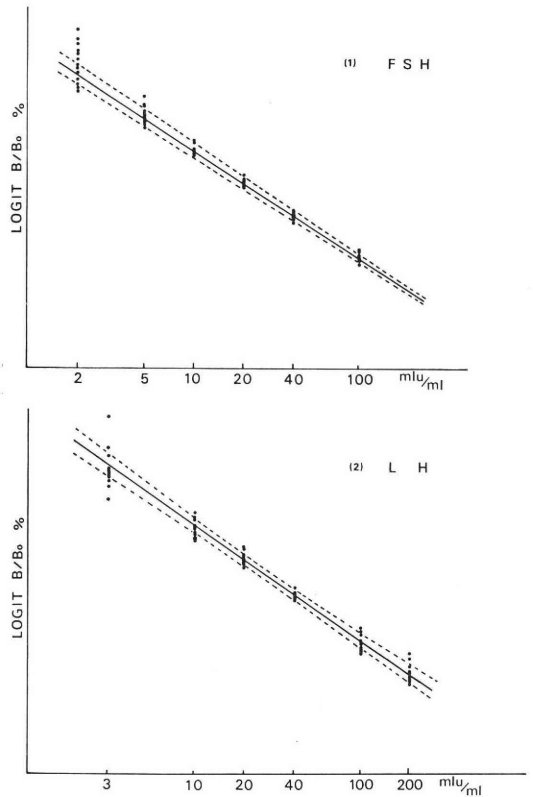


図 2 標準曲線の LOGIT-LOG プロット) 破線は ± 1 S.D.)

表 2 -DPC-, FSH, LH キットのアッセイ内変動およびアッセイ間変動。

[1] Intra-assay Variance

Serum NO	FSH			LH		
	mean \pm S.D.	% CV	(n)	mean \pm S.D.	% CV	(n)
1	4.832 \pm 0.033*	0.7	(9)	8.281 \pm 0.355	4.3	(9)
2	12.53 \pm 0.620	4.9	(8)	37.73 \pm 3.420	9.1	(7)
3	61.39 \pm 3.580	5.8	(9)	196.6 \pm 12.92	6.6	(8)

[2] Inter-assay Variance

Serum NO	FSH			LH		
	mean \pm S.D.	% CV	(n)	mean \pm S.D.	% CV	(n)
4	10.20 \pm 0.907	8.9	(6)	18.62 \pm 1.958	10.5	(9)
5	40.46 \pm 2.578	6.4	(9)	79.65 \pm 7.237	9.2	(9)
6	60.07 \pm 2.831	4.7	(8)	198.6 \pm 12.49	6.3	(8)

* mIU/ml 2nd IRP-HMG

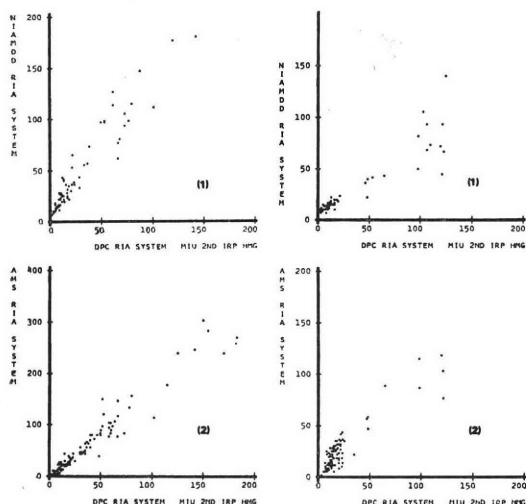


図 3 DPC RIA 系と他の RIA 系との測定値の相関

差が大きい至適条件が得られた。ヨード化ホルモン添加後は、図 1(b) に示す如く、FSH 120分、LH 60分で、ほぼ満足すべき結果が得られた。沈澱剤添加後は、ほぼ瞬時で安定した結果を得た(図 1(c))。

(2) 標準曲線の安定性

10回のアッセイで、標準曲線の各濃度の B/B₀ % の平均および標準偏差を表 1 に示す。FSH の変動係数は 2~8%、LH は 3~10% と、FSH の標準曲線の方が高い安定性をもつといえる。これら10本の標準曲線の LOGIT-LOG プロットを図 2(1), (2) に示す。各濃度の標準偏差は、FSH が低濃度で大きく、LH が低および高濃度で大きくなった。

(3) アッセイ内変動およびアッセイ間変動

低、中、高濃度の FSH, LH を含有する血清を測定し、それぞれアッセイ内およびアッセイ間変動を検討した表 2。FSH, LH とともに低濃度で、やや変動が大きくなる傾向を認めたが、10%以内であり、満足すべき結果であった。

(4) 感度および精度

10回の測定結果より、最低検出可能濃度を計算したところ、FSH 1.9±1.4, LH 3.4±1.1mIU/ml±S.D. であった。

既知量ホルモン含有血清 (Amersham, Radioassay Controls 4 & 5, code QAS, 102, Lot # 2) を測定、平均回収率より、本キットの精度を検定した。2種類の血清でそれぞれ回収率は、FSH, 103%および116%、LH は85%および88%であり、LH で回収率の低い傾向が認められた。

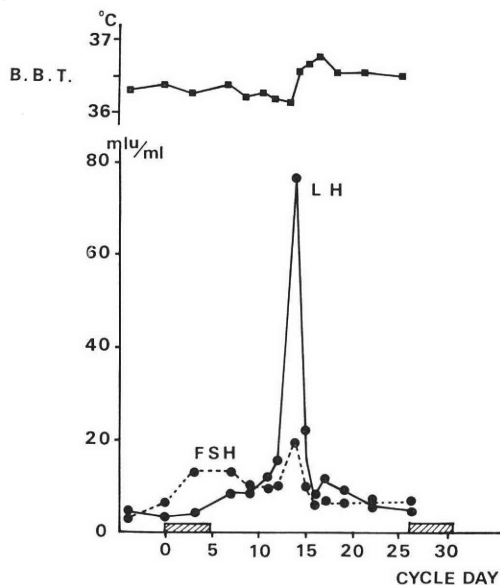


図 4 正常月経周期の FSH, LH 変動パターン

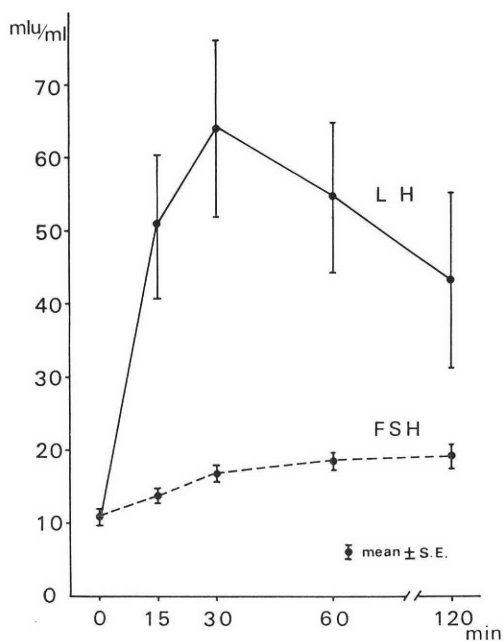


図 5 正常月経周期婦人、卵胞期初期の LH-RH 負荷テストに於ける血中 FSH, LH 変動パターン

(5) 他の RIA 系との相関

73例につき NIAMDD 提供のヒト FSH, LH 測定用キットを用いて測定し、DPC キットとの相関を検討したところ、図 3(1) に示す如く、相関係数は FSH 0.92, LH 0.96といずれも P<0.01で有意の相関が見られた。106例につき Amersham 提供の FSH および LHリアパ

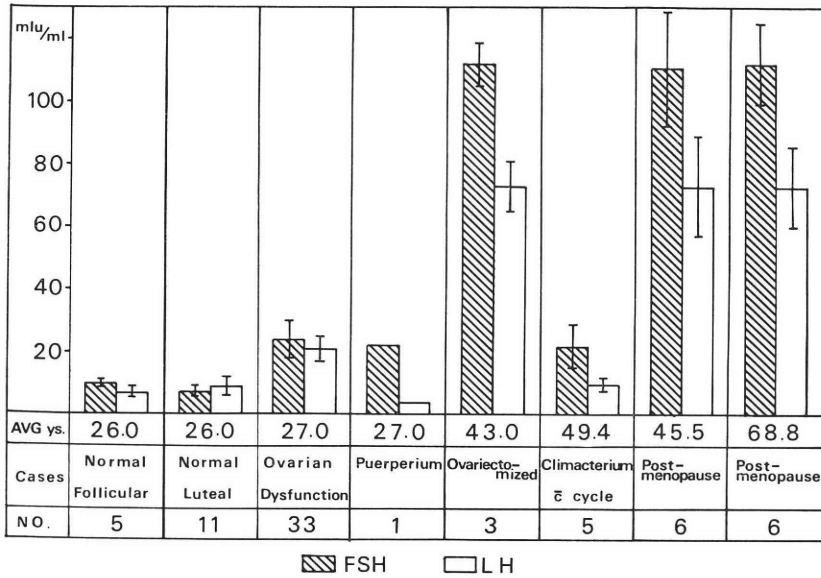


図 6 各種症例の末梢血中 FSH, LH 値 (平均±S.E.)

ックを用いて同様の検討を行なった結果、相関係数は、FSH 0.91, LH 0.90といずれも $P < 0.01$ で有意の相関を示した(図 3(2)).

DPC 製 FSH, LH キットを用いた臨床検体の測定

(1) 正常性周期

正常月経周期婦人の血中 FSH, LH 値を 図 4 に示す。FSH は卵胞期に高い傾向をとり、LH とともに周期中間にピークを作った。

(2) LH-RH テスト

14例に実施した LH-RH テスト結果を Fig. 5 に示す。LH は静注後30分で前値の約6倍のピークを作り、FSH は60~120分で有意に上昇し、プラトーに達した。

(3) 正常、卵巢機能不全、産褥、去勢、更年期、閉経後婦人の血中 FSH, LH 値

図 6 にこれらの症例の測定結果を示す。無排卵性周期等の卵巢機能不全症例の平均値は、いずれも正常婦人の卵胞期および黄体期に比し高い傾向がみられた。去勢婦人、閉経後婦人は高値であったが、月経周期の存続する更年期婦人に比べ、平均年齢では低い閉経後婦人の FSH, LH 値が有意に高かった。今回は、閉経後年齢による変化は認めなかった。

考 按

ゴナドトロピン測定には、高い特異性をもつ抗体、純度の高い抗原、国際的に統一化された標準品を用いることが必要で、NIAMDD から全世界の研究者に供給されるキットが、多数の研究室で使用されてきた。然しながら、

抗原のヨード化、ヨード化ホルモンの分離、抗体希釈、インキュベーション条件等、研究者の熟練と優れた技術とを要する方法である。また、インキュベーション時間も長いので、測定を開始してから結果が出るまで、ほぼ一週間を要した。

最近、我国でも、ヨード化抗原を含めた、簡便なアッセイキットが入手可能となり、チューブ内で検体、試薬を混合、インキュベート、遠沈だけすれば、あとは放射能測定結果からホルモンを定量できるようになった。我々は、先に一社のキットを検討する機会を得、ほぼ満足すべき成績を得たが、サンプル入手から測定結果を得るまでに、約1日半を要した。今回、検討した DPC 製 FSH, LH キットは、インキュベーション時間が、それぞれ合計で4時間および3時間余と、著しく短縮されているため、朝アッセイを開始すれば、その日の午後早々に結果が得られることになる。臨床的に FSH, LH 値をルチンに測定する場合、この時間的因子は特に大切である。すなわち、LH ピークを確認してから次の処置、例えば AIH などを行なう症例については、基礎体温、最終月経、周期日数などから予想される排卵前日あたりに来院せしめ、朝採血、その結果をみて、午後ただちに処置実施が可能となる。一般的に、採血の翌日結果がわかるとすれば、普通の生化学諸検査と同じ早さで、複雑な内分泌機能動態の一端がつかめるわけであるから、一定数以上の検体が揃う場合、例えば LH-RH テスト後など、一般病院でも非常に有力な武器になると考えられる。

次に、いくら簡素化、時間の短縮化が行なわれても、その精度、再現性に問題がある方法では実用化できない。本キットの感度、精度、特異性ともに従来広く用いられて来た、NIAMDD キットに匹敵、両者による測定値もよく近似していた。また、既に市販されているリアパックによる測定結果とも、高い相関々係を示した。従って、インキュベーション時間を短縮、一般操作を簡易化したデメリットは全く認められず、産婦人科臨床応用面で、従来実現困難であった治療と直結させる診療システムを可能ならしめたメリットは大きいと思われる。

(稿を終るにのぞみ DPC-LH, FSH キットを提供されたダイナボット・ラジオアイソトープ研究所に深謝いたします。)

文 献

- 1) Odell, W. D., Parlow, A. F., Cargille, C. M. and Ross, G. T.: Radioimmunoassay for Human Follicle-Stimulating Hormone: Physiological Studies J. Clin. Invest. 47: 2551, 1968.
- 2) Cargille, C. M., Ross, G. T. and Yoshimi, T.: Daily Variations in Plasma Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone and Progesterone in the Normal Menstrual Cycle. J. Clin. Endocri. 29: 12, 1969.
- 3) Dignam, W. J., Parlow, A. F. and Daane, T. A.: Serum FSH and LH measurements in the evaluation of menstrual disorders. Am. J. Obst. Gynec. 105: 679, 1969.
- 4) 山本俊郎, 吉江絹子, 大川とみ, 佐藤直樹, 沖永莊一, 荒井 清: LH リアパック, FSH リアパックの臨床応用, ホルモンと臨床, 28: 237, 1980.
- 5) Rodbard, D. and Hutt, D. M.: Radioimmunoassay and related procedures in medicine. International Atomic Energy Agency, 165, Vienna, 1974.
- 6) Arai, K., Yanaihara, T. and Okinaga, S.: Response of Ovarian Steroid Secretion to the Intrinsic Gonadotropin Release Caused by the Administration of Synthetic LH-RH. Am. J. Obst. Gynec. 123: 804, 1975.

Clinical evaluation of the DPC kit; A new short term assay method for hFSH and hLH

**Tomi Okawa, Hideko Okano, Kinuko Yoshie,
Yoshinao Miyasato, Hisaya Ikeshita,
Kiyoshi Arai and Shouichi Okinaga**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Teikyo University, School of Medicine.

In dealing with infertility patients, measurements of FSH and LH in peripheral blood become quite often mandatory. A critical analysis of a new RIA kit for FSH and LH was made in our laboratory, and applicability of the method in clinical endocrinology will be described.

Clinical subjects: Samplings were made every day (or every other day) from normally menstruating women: Samples were also collected from patients with secondary amenorrhea, ovariectomized women, climacteric cases, and postmenopausal women. Serum FSH and LH were measured in normally menstruating women during the LH-RH test.

Assay Methods: The DPC kit was used according to the instruction. The NIAMDD kit for hFSH and hLH, and the RIA-Pack, Kakenkagaku, were used to measure gonadotropins in the identical samples to check correlation of the methods.

Results: The optimal pre-incubation time was obtained at 120 min for LH. Following the addition of indinated hormones, satisfactory results were obtained at 120 min for FSH and at 60 min for LH.

Reproducibility of the standard curves was good. Intra- and inter-assay coefficients of variation were within 10% for both FSH and LH.

Sensitivity and accuracy of the method were quite satisfactory.

Correlation of the results obtained by the three methods was highly significant.

In normally menstruating women, the FSH level showed a tendency to be higher in the follicular than in the luteal phase, and the LH and FSH levels made a distinct peak at the mid-cycle.

After the injection of LH-RH, the LH level reached a peak in 30 min, and the FSH concentration also rose significantly at 60-120 min.

The average gonadotropin level of the patients with ovarian dysfunction was slightly higher than the normal controls at the early follicular or the late luteal phase.

Elevated FSH and LH levels were observed in ovariectomized or postmenopausal women. And

this was also true in the younger postmenopausal group as compared to the climacteric patients with menstrual cycles, whose average age was older.

This new kit enabled us to measure blood FSH

and LH levels within a remarkably short period of time (several hours), with sufficiently high specificity, accuracy and precision.

(受付：昭和55年6月23日)

RIA-Quant™ β -HCG Test Kit

の基礎的検討と臨床応用

Fundamental Examination of RIA-Quant β -HCG Test Kit and its Clinical Application.

慶応大学医学部産婦人科学教室

福永 友明 泉 康 史

Tomoaki FUKUNAGA Yasushi IZUMI

中村 幸雄 飯塚 理 八

Yukio NAKAMURA Rihachi IIZUKA

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

血中 HCG を β -subunit 抗血清を用いて測定する RIA キット (RIA-Quant™ β -HCG Test Kit) の基礎的検討と妊娠初期における臨床応用を試み以下の結果を得た。

- ①本キットの測定範囲は2.5~200mIU/ml であり、再現性に優れまた HCG に対する特異性も極めて高い。
- ②正常妊娠初期21例の検討では、血中 HCG は LH Peak 後6~11日目まで検出可能であった。
- ③妊娠診断基準として用いる HCG 濃度は時期により異なるが、25mIU/ml を基準とすれば LH Peak 後14日目まで妊娠診断が可能である。
- ④HCG 筋注射後は約1週間血中に HCG が証明されるので、HCG 投与後の妊娠診断には慎重を要する。
- ⑤妊娠初期流産例では正常妊娠に比し血中 HCG は低値を示しており妊娠初期切迫流産の予後判定への応用が可能である。

はじめに

human chorionic gonadotropin (HCG) は、 α , β の2つの subunit により構成され、ホルモン特異性は β -subunit にあることは周知となっている。一方、血中あるいは尿中の HCG の測定においては、HCG が LH と免疫交叉性を有するために、LH に干渉されずに HCG を特異的に測定することは不可能であった。しかしこの問題は β -subunit に対する抗血清を用いた RIA 法が開発されたことにより解決し、LH レベルあるいはそれ以下の微量の HCG の測定が可能となつたり。この方法により血中の HCG 値を測定することは、絨毛性疾患の follow up や妊娠の早期診断に有用であることは論をまたないが、手技の煩雑なこと、測定に長時間を要するなどの点で難があり、より簡便な測定方法が望まれていた。今回、我々は β -subunit 抗血清を用いて血中

HCG を測定するキット (RIA-Quant™ β -HCG Test Kit) を使用する機会を得たので、このキットの基礎的検討とあわせて妊娠初期における臨床応用成績を報告する。

1. 対 象

慶応病院産婦人科外来、慶応健康相談センター婦人科に不妊を主訴として来院し、排卵前より可及的経目的に採血し妊娠に至つた24例である。採血はできる限り早朝空腹時に行ない、採血後直ちに血清を分離し一部を測定に供した。残りの血清はさらに分割し-20°C で保存して再測定に備えた。

2. 血中 HCG 測定法

- 1) 本キットは100検体用でありその構成は以下に示した。

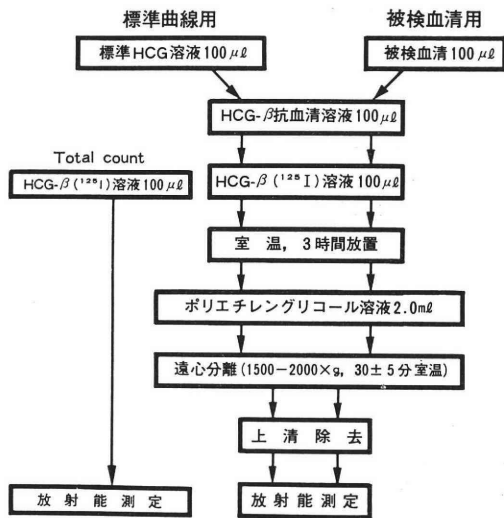


図 1 測定操作手順

- (1) β-HCG 抗血清 (凍結乾燥品) 1 パイアル
- (2) 標準 HCG (凍結乾燥品) 0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 200.0mIU/ml の 8 パイアル
- (3) β-HCG-¹²⁵I 溶液約 2 μCi (製造日において) 1 パイアル

- (4) ポリエチレングリコール (20% w/w) 220ml
- 2) 試薬の調製

(1) β-HCG 抗血清: パイアルに蒸留水11ml を加えて溶解する。

(2) 標準 HCG 原液: 標準品 (0, 25.0mIU/ml) のパイアルには蒸留水 4 ml を加えて溶解し, 他の標準品のパイアルには 2 ml の蒸留水を加え溶解する。

3) 測定操作法 (図 1)

なお被検血清を稀釈する必要のある時は, HCG free 血清として男子血清を使用した。

4) 結果の計算

ゼロサンプルの計数率を B_0 , 標準溶液の各濃度の計数率を B とし, 片対数グラフの対数目盛に HCG 濃度を取り整数目盛に B/B_0 (%) の値をプロットし標準曲線を描く。被検血清についても計数率 B より B/B_0 (%) を算出して標準曲線より HCG 濃度を読みとる。

3. 測定成績

1) 標準曲線

本キットを用いて10回測定した標準曲線を各濃度における B/B_0 (%) の平均値および標準偏差で示した (図 2)。この標準曲線では各濃度の間には有意の差が認められたので ($P < 0.005$) 2.5mIU/ml を測定感度とした。

2) 再現性

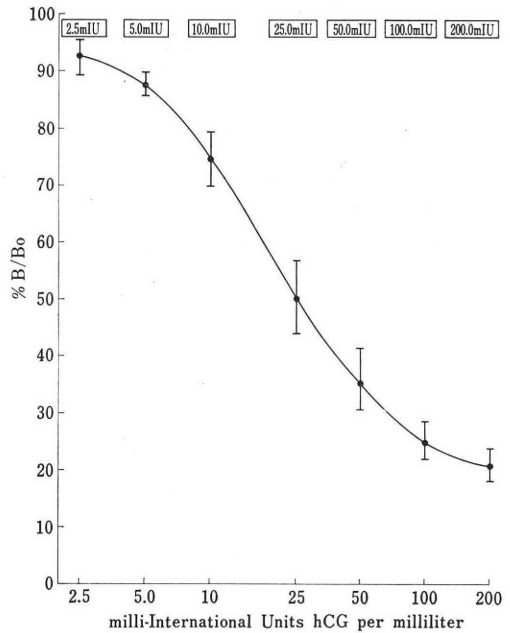


図 2 RIA-Quant™ β-hCG GRAPH

3種の異なる血清を同一の assay において10回測定した結果を表 1 に示した (Intra-assay precision). 表 2 は 3種の異なる血清を 5回, 日を変えて測定した結果である (Inter-assay precision).

3) 回収率

HCG 濃度28.0mIU/ml の血清にキット添付の標準 HCG, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0mIU/ml を添加した際の回収率を求めた (表 3)。

4) 稀釈試験

2種の被検血清を 2倍から16倍まで稀釈して測定した結果は表 4 に示した。

5) LH-RH テスト

合成 LH-RH 100μg を筋注し, 投与前, 投与後30, 60, 120, 180分, 24時間の血中 LH, FSH 値を測定した。同時に本キットにてこの血清の HCG 値を測定したのが表 5 である。なお血中 LH, FSH は第一ラジオアイソトープ社製の RIA キットを用いて測定した。試料 A の LH-RH テストは high-good 型, 即ち卵巣性の排卵障害と推定できるが, HCG は30, 60, 120分値で微量ながら検出された。試料 B では LH の Peak 値は 130mIU/ml, FSH は26mIU/ml であつたが, この検体では HCG 値としては検出されなかつた。

6) HCG 5000iu 筋注による血中 HCG 値

成人男子 3名に HCG 5000 iu を筋注し血中 HCG 値を経日的に測定した (図 3)。筋注後12時間値は 90.7 ± 8.1 mIU/ml ($M \pm S.D.$), 24時間後は 72.0 ± 5.3 mIU/ml,

以後漸減し6日目では5.3±2.0mIU/ml と僅かに測定感度以上を示したが、8日目では3名とも血中 HCG は検出されず、HCG 筋注前の状態に復した。

4. 初期妊娠例における測定成績

妊娠24例中、切迫流産の徴候を示さずに順調に経過して超音波ドップラー法にて児心音の確認が得られた21例を正常妊娠とみなし、その血中 HCG 値の推移を図4、

表 1 Intra-assay precision.

試料 No.	A mIU/ml	B mIU/ml	C mIU/ml
1	11.3	35.3	192.0
2	9.9	38.6	157.0
3	11.5	34.2	180.0
4	10.6	35.5	172.0
5	11.2	45.0	170.0
6	9.8	38.2	188.0
7	10.8	39.0	150.0
8	11.4	38.8	162.0
9	11.2	38.7	164.0
10	9.9	40.4	186.0
M.	10.8	38.4	172.1
S.D.	0.21	3.05	14.1
C.V. %	6.23	7.96	8.21

表 2 Intra-assay precision.

試料 No.	A mIU/ml	B mIU/ml	C mIU/ml
1	25.0	35.5	167.0
2	14.0	38.4	172.0
3	13.6	32.2	150.0
4	16.2	39.4	156.0
5	14.2	36.0	144.0
M.	14.6	36.3	157.8
S.D.	1.02	2.80	11.62
C.V. %	6.99	7.71	7.36

表 5 LH-RH テストにおける HCG 値.

	試料 A			試料 B		
	LH mIU/ml	FSH mIU/ml	HCG mIU/ml	LH mIU/ml	FSH mIU/ml	HCG mIU/ml
0分	100	170	0	21	13	0
30分	500 ↑	250	2.9	90	20	0
60分	500 ↑	250	2.9	130	24	0
120分	500 ↑	360	2.5	105	26	0
180分	500 ↑	360	0	96	24	0
24時間	68	200	0	25	12	0

5に示した。排卵期の血中 LH 値は47から210mIU/ml を示したがこの時期の血中 HCG 値はすべて本キットの測定感度以下にあつた。以後 LH Peak 後5日目までは HCG は検出されないが、6日目に3.5mIU/ml を示した1例を始めとして遅い例でも11日目で検出可能であつた(図6)。以後 HCG は急激に増加し、Mean±S.D. で19日目は220.5±89.1mIU/ml を示し、以後測定に際しては検体の稀釈が必要とされることが多い。図7は妊娠初期流産例の3例の血中 HCG 値を正常妊娠例と比較したものである。Case. N.K. および Y.T. ではごく初期から血中 HCG は正常範囲を下回る値を示し、それぞれ LH Peak 後29日目、30日目に流産となつたものである。Case H.S. は妊娠11週で流産となり子宮内容除去術を行なつた例であるが LH Peak 後20日まで血中 HCG は正常域にあつた。図8は流産例、図9

表 3 回収試験.

添加 HCG 値 mIU/ml	HCG 予想値 mIU/ml	HCG測定値* mIU/ml	回収率 %
0	—	28.0	—
5	33	33.5	101.5
10	38	40.5	106.6
25	53	52.5	99.1
50	78	72.5	92.9
100	128	120.0	93.8

* 3回測定の平均値

表 4 希釈試験.

	試料 A		試料 B	
	測定値 mIU/ml	回収率 %	測定値 mIU/ml	回収率 %
原液	38	—	105	—
2×	23	121.1	48.0	91.4
4×	10.5	110.5	25.5	97.1
8×	4.5	94.7	14.5	110.5
16×	2.5	105.3	7.5	114.3

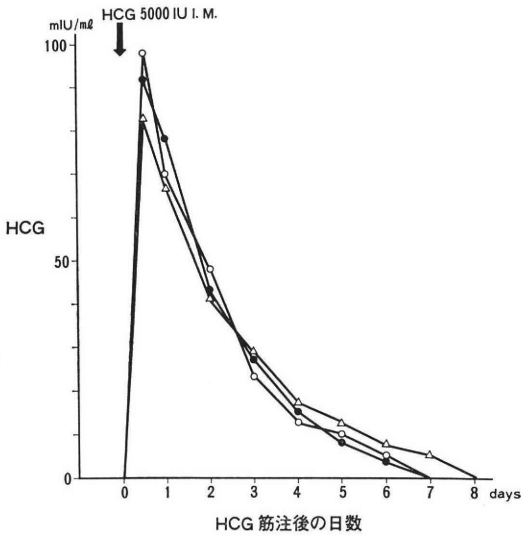


図 3 HCG 5000IU 筋注後の血中 HCG 値

は正常妊娠例の血中 HCG 値であり、最上段の HCG 値は本キットによるもの、抗 HCG 抗体および抗 HCG β -subunit 抗体を用いた奥村ら²⁹⁾の方法による HCG 値はそれぞれ HCG (RIA), β -subunit として下段に示した。RRA による血中 HCG の測定は田辺³⁰⁾の方法により行なった。血中 LH 値も含め、各方法により測定した HCG 値はすべて同様の変動傾向を呈し、臨床症状ともよく一致している。

妊娠診断としての実際の利用法を具体例として表 6 に示した。症例 N.K. は BBT で高温が 16 日間持続している時点で尿妊娠反応 (Gonavislide) は陰性であった。この血清を図 1 の測定操作に従って計数率を出し、同時に行なった標準 HCG 25mIU/ml の計数率と比較した。患者血清の計数率は 25mIU/ml のそれより低く、妊娠と診断した。この 5 日後に尿妊娠反応も陽性となった。症例 M.N. は BBT 高温 14 日間持続の例であるが、患者血清の計数率は 25mIU/ml のそれより高く、妊娠反応陰性とみた。検査翌日即ち推定排卵日より 15 日目に月経が到来して非妊娠の確認ができた。

5. 考案およびまとめ

本キットは標準曲線からみると測定範囲が検体の稀積なしでは 2.5~200mIU/ml である。測定操作をみると、従来の incubation だけでも 1 日~3 日を要した RIA に³¹⁾比し、本法では 3 時間の incubation というこ

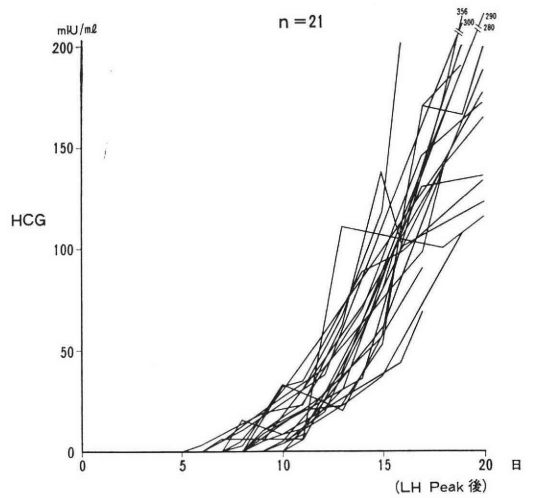


図 4 正常妊娠初期の血中 HCG 値

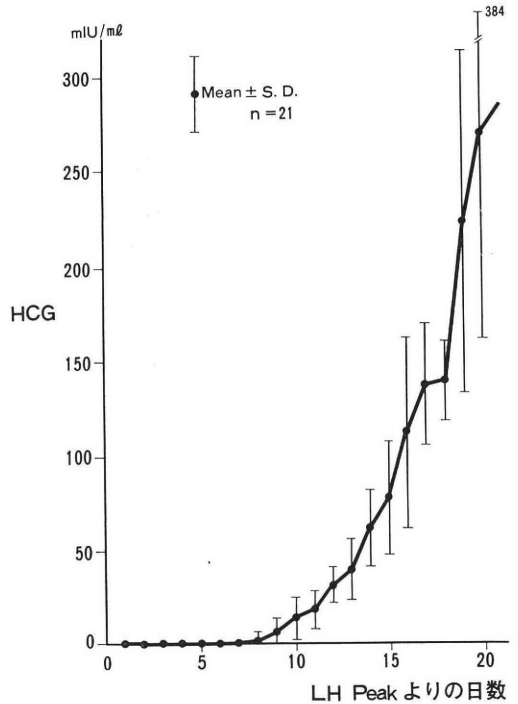


図 5 正常妊娠初期の血中 HCG 値

6.23~8.21%, Inter assay precision は C.V. 6.99~7.71%と各濃度とも平均して良好な成績を示していた。回収試験では 92.9%~101.6%と満足できる回収率が得られている。さらに稀積試験においても実測値とのずれは小さく稀積によつて得た測定値への信頼性は高い。稀積試験の好成績はキットの優秀性を示す一つの指標とはなり得るが、日常臨床上では血清の稀積を要する程の

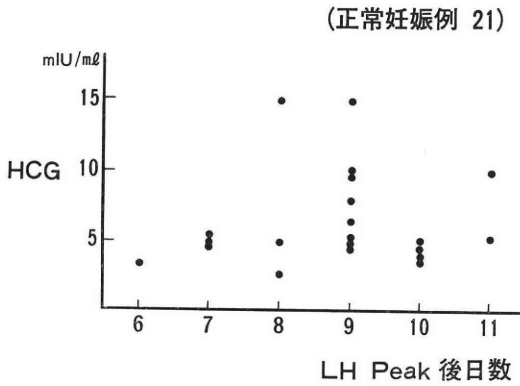


図 6 血中 HCG の初検出日とその値

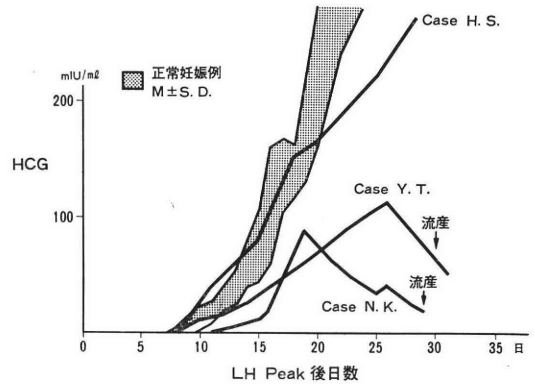


図 7 初期流産の血中 HCG 値

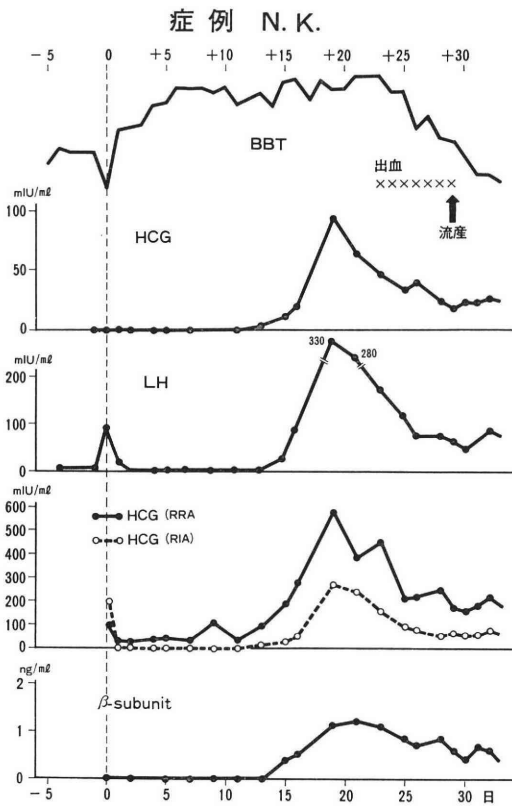


図 8

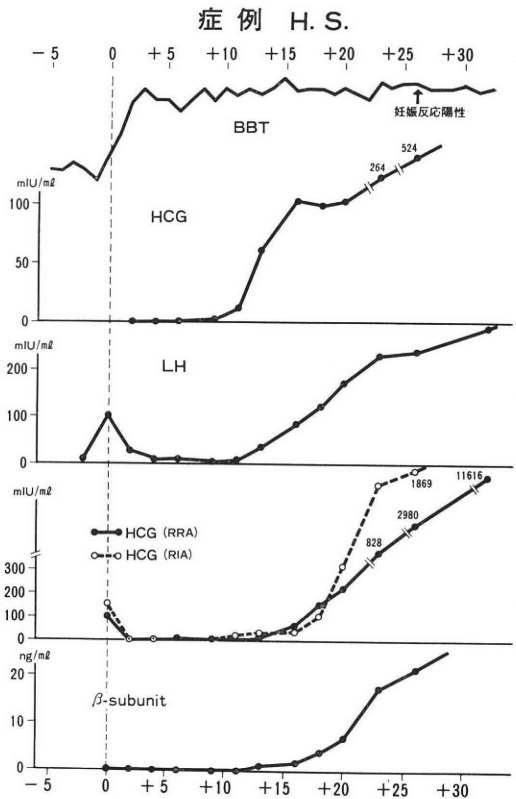


図 9

表 6 妊娠診断の応用への具体例.

症 例	BBT 高温 持続日数	Average Net CPM* (標準 HCG 25mIU/ml)	Average Net CPM* (患者血清)	診 断
N. K.	16	2422	2103	妊娠反応(+)
M. N.	14		3523	妊娠反応(-)

* 2 回測定の平均値

(200mIU/ml 以上) 高濃度について本キットで測定する意味は少ないと考える。本キットの特性としての、血中 LH 値にほとんど影響されずに HCG に特異性の高い測定法という観点からすると測定範囲は2.5~200mIU/ml で充分なものと思われる。今回は LH, FSH との個々の交叉反応性についての検討は行なわなかったが、排卵障害婦人に LH-RH テストを施行した際の血清を本キットで測定することにより間接的に特異性の有無を検討しようと試みた。それによると LH 500mIU/ml 以上、FSH 250mIU/ml 以上という正常性周期婦人ではまず考えられない異常高値の血清においても HCG 値としては2.5~2.9mIU/ml と極めて微量を検出したに過ぎず、また LH-RH テストの正常反応の範囲では全く検出されなかった。これは本キットの LH, FSH に対する交叉性の低さを示すものと評価できる。同様に、正常妊娠21例の排卵時の LH Peak も本キットでは HCG が測定感度以下であったことより、非妊娠時の生理的な LH, FSH の増加状態を血中 HCG として捕えてしまうことはまずないと考えられる。

正常妊娠初期の血中 HCG の検出時期は、中村⁶⁾が抗 LH 抗体を用いての測定と、抗 HCG β -subunit を用いた測定でどちらも LH Peak 後9日目から検出し、田辺の行なつた RRA³⁾では13日目から検出可能であった。RRA では、Catt ら⁷⁾は LH Peak 後12日目より検出されるとして、また Saxena ら⁸⁾は6~8日目から検出可能と述べている。本キットを用いた我々の成績は Saxena よりやや遅く、他の報告よりはやや早目のところに位置している。

妊娠の早期診断の目的で本キットを利用する際は血中 HCG 値を定量するまでもないことは理論上明らかである。実際尿妊娠反応では日常我々は1000iu/l あるいは2000iu/l という基準を設けてそれ以上の尿中 HCG が存在すれば妊娠と診断しているわけである。同様に本キットで妊娠反応をみる場合も一つの基準とした標準 HCG と被検血清を図1の測定操作と同様に行ないその計数率を比較する。被検血清の計数率の方が低ければその血中 HCG 値は基準とした標準 HCG 濃度より高いとみて、妊娠反応陽性とする。基準としてどの濃度の標準 HCG を用いるかは時期により異なることは言うまでもないが、本キットでは妊娠診断用として25mIU/ml の標準 HCG が、他の濃度のものより量が多くなっている。その25mIU/ml を基準とすれば図4、5よりみて LH Peak 後10~13日目まで妊娠の診断は可能であるが、全例に妊娠反応陽性と出るのは14日目以後であると言えよう。排卵誘発や黄体機能不全の治療の目的で HCG を筋注投与することは臨床上多く行なわれているが、図

3に示した如く HCG 5000iu 1回の筋注でも約一週間は血中 HCG が検出された。中村ら⁶⁾は HCG 5000iu 筋注によつて行なつた検討で血中 HCG の半減期は約33時間としているが、今回の検討でも長期間血中に存在することが証明されたので、排卵後 HCG 療法を施行した症例について血中 HCG を測定する際にはこれを考慮に入れて判定には慎重を要する。

流産例の血中 HCG 値は予想されたことではあるが、正常妊娠例に比べて低値を示した。従つて切迫流産の予後判定としての応用も十分考えられるが、妊娠の極く初期に適応を限り、血清を稀釈して測定する程の時期となつては、いかに本キットの簡便さを考慮しても費用や RIA の特殊性からみて、ラテックス凝集阻止反応や赤血球凝集阻止反応による尿中 HCG の半定量に譲るのが妥当と思われる。

今回我々は、第一ラジオアイソトープ研究所より提供を受けた RIA-QuantTM β -HCG Test Kit の基礎的検討を行ない満足すべき結果を得た。本キットは HCG に極めて特異性が高く測定手技も容易なことにより、臨床応用として妊娠早期診断、妊娠初期切迫流産の予後判定に有用性を認めることができたので報告した。さらにこのキットの特性を生かして、絨毛性疾患の follow up により有用性を見出し得ると思われ、今後の検討課題としたい。

文 献

- 1) Vaitukaitis, J. L., et al.: Am. J. Obst. & Gynec., 113: 751, 1972.
- 2) 奥村 一, 他: 日内分泌会誌, 52: 105, 1976.
- 3) 田辺清男: 日産婦誌, 30: 167, 1978.
- 4) Den Hollander, F. C., et al.: J. Immunol. Meth., 1: 247, 1977.
- 5) 中村幸雄: 日産婦誌, 29: 1216, 1977.
- 6) Catt, K. J. et al.: J. Clin. Endocr., 34: 123, 1972.
- 7) Sexena, B. B., et al.: Science, 184: 793, 1974.
- 8) 中村幸雄, 他: 産婦の世界, 26: 37, 1974.

Fundamental examination of RIA-quant β -HCG test kit and its clinical applications

Tomoaki Fukunaga, Yasushi Izumi,
Yukio Nakamura and Rihachi Iizuka

Department of Obstetrics and Gynecology,
school of Medicine, Keio University

Fundamental examination and clinical application on RIA kit (RIA Quant β -HCG Test Kit)

for the initial stage of pregnancy was undertaken to measure HCG in blood using β -subunit antisera. The following results were obtained:

1. The range of measurement of the kit is from 2.5 to 200 mIU/ml; it has an excellent rate of reproductivity and extremely high rate of specificity for HCG.

2. On examination of 21 cases of initial stage of normal pregnancy, it was possible to detect HCG in blood 6 to 11 days after LH peak.

3. The concentration of HCG as a cyesiological criterion varies according to the stage of

pregnancy; if 25 mIU/ml is set as the standard, it is possible to diagnose pregnancy 14 days after LH peak.

4. HCG is detected in blood for about a week after its intramuscular injection; therefore, cyesiognosis after the injection of HCG requires great care.

5. In cases of abortion, the amount of HCG in blood is low as compared to those of normal pregnancy; application for determining prognosis for early abortion is possible.

(受付: 昭和55年6月24日, 特掲)

遠隔操作式 Kymographic-Hystero Salpingo Graphy の開発とその臨床応用に関する研究

Remote-Control Kymographic Hysterosalpingography : Development and Clinical Application

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

飯 嶋 忠 次

Tadatsugu IJIMA

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

従来の手動式子宮卵管造影 (Hystero Salpingo Graphy=HSG) 法に対して自動造影剤注入装置, 注入圧力調節可能, およびサーボ駆動型記録器を接続した遠隔操作式の Kymographic HSG を開発した. その臨床応用において次の成績を得た. (1) Kymographic HSG の曲線を正常通過形, 卵管腹口端通過障害形, 卵管狭部通過障害形, 完全閉鎖形の4形に分類が可能である. (2) Kymographic HSG からみた妊娠成立群の最高注入平均値は194mmHg であり, 100mmHg 未満および251mmHg 以上では妊娠例を示さない. (3) 注入圧250mmHg 以下において子宮内腔容積平均値は妊娠例では3.38ml であり, 10ml 以上1.5ml 未満は妊娠例を示さない. (4) 生殖年齢婦人において無排卵期間が長期なほど子宮内腔容積は減少を示す. (5) 本機器と従来の手動式 HSG 使用の撮影時における副作用 (疼痛, 腹膜刺激症状, 出血, ショック, 静脈への流入, 子宮卵管角の攣縮, 通気の不一致他) の発現率はすべて前者が低率である.

I. 緒 論

卵管疎通性検査法には Rubin test¹⁾をはじめとし通水法, 子宮卵管造影法 (Hystero Salpingo Graphy 以下 HSG と略) がある. これらの方法の中で, 子宮内腔, 卵管内腔の形態, 卵管采の癒着状態, 付属器腫瘍の判定, さらに内膜症の存在など生殖器内腔の形態や環境を非観血的に検査する方法としては HSG を凌駕するものはなく, 女性不妊の診断法には不可欠である. 従来行われてきた HSG はテレビジョンモニターによる透視下で行われるとはいえ, 造影剤の注入は手動によるため注入量, 注入圧を一定に調節し明確に記録することは不可能であった. したがって, 同一条件で HSG の撮影とその評価を行い得ず客観的な診断法の確立が待たれていた. 一方手動式のため高圧による注入や造影剤の過不足もあつて再撮影や, 腹膜刺激症状などの副作用もしばしば認められた. そこで著者は注入速度を一定にして,

注入圧は250mmHg の範囲内で自由に調節することが可能で, 注入中の圧の変化および注入量の記録ができる描写式子宮卵管造影法 (Kymographic HSG, 以下 Kymo-HSG と略) を開発²⁾した. さらにこの Kymo-HSG による診断基準を設定して, その所見と妊孕性に関し検討し, 従来の HSG に比しその撮影方法, 読影の客観性, 妊孕性の評価, 検者, 被検者の安全性および諸利点を確認したのでここに報告する.

II. 研究対象および研究方法

1. 対象

(1) 本院産婦人科における不妊症外来患者で, 1976年6月1日~1978年7月31日までに本機器を用いて撮影した392例と無排卵治療中の50例.

(2) 妊娠成立群の解析に関しては, 1979年12月31日までに妊娠成立を認めた60例を対象とした.

(3) HSG を施行した全症例は婦人科的診察後, 血沈,

子宮内膜組織検査, 月経血培養で急性炎症症状, 性器結核, 悪性腫瘍を否定し, さらにヨードテスト陰性であることを条件とした。

2. 研究方法と目的

(1) 使用機器: 遠隔操作式注入圧, 注入量, 同時描写式子宮卵管造影法 (Kymo-HSG) を開発(後述)し同機器により以下の条件で撮影した。条件は注入圧250mmHg以下, 注入速度 5 ml/min, 撮影条件は65kv, 100A, 1.0 μ c, 管球フィルム間距離60cm で撮影を行なった。

(2) 造影剤: 油性造影剤 LIPIODOL ULTRA FLUID[®]を使用した。

(3) 撮影時期: 月経終了後排卵前とした。

(4) 上記方法により従来の手動式 HSG では解析不可能であった次の事項の研究を企図した。

- (i) Kymo-HSG の曲線の解析
- (ii) Kymo-HSG による妊娠成立群, 非成立群の最高注入圧平均値。
- (iii) 子宮内腔容積と妊孕性
- (iv) 無排卵期間と子宮内容量
- (v) 本機器と手動式 HSG 撮影とにおける副作用発現率の比較。

III. Kymo-HSG の開発とその機構

本機器は注入鉗子セットと自動造影剤注入装置および圧力調節可能なサーボ駆動型記録器を各々接続した一連のシステムより構成されている(図1)。造影剤注入装置(限定圧力可動範囲は150~250mmHg)は金属性三方ジョイント, 圧力トランジューサー (Staham 製 Model P 23 D₆) および20cc シリンジ式注入器より成り, 注入は 5 ml/min の速度で行われる(写真1~5)。注入開始により造影剤がストレンゲージドームに送られると圧力はストレンゲージドーム本体に内蔵されているダイヤフラムによって検知され, そのダイヤフラムの変形をひずみゲージにより電圧に変換している(図2)。ひずみゲージ構造は導線の電気抵抗は長さ l と断面積 S によって抵抗 (Ω) $=\rho \frac{l}{S}$ (ρ : 抵抗率) と決まるため図2Bのように細い導線を引き矢印の方向に伸縮させることで抵抗を

変化させる。ホイートストブリッジの原理は図2Cのように抵抗と電源Eを接続した場合 $R_2R_3=R_1R_4$ となる抵抗値の場合電圧計Vには電圧が生じない。しかし R_1 が少量変化した場合 V_1V_2 の電圧に差が生じ電圧計Vに電圧が加わる。ここで生じる電圧は微少であるため1,000倍の増幅器によってレコーダを作動させるに十分な電圧に上げている。この注入装置をX線撮影台上に固定し別室に設置したサーボ駆動型記録器によりX線透視テレビジョンモニターの造影剤注入像を観察しながら同時に駆動制御を行なう。注入圧の変化と注入量(デジタル標示式)は増幅器接続のサーボ駆動型記録器(記録範囲は0~250mmHg, 紙送り速度は40mm/min)によって描記記録される。すなわち注入圧と注入量が時間の経過と共にグラフに描記記録される。グラフは縦が注入圧で横が経時の変化を表わし曲線は左から右へ向かつて描かれる。

IV. 研究成績

1. Kymo-HSG の曲線の解析

Kymo-HSG を使用して描かれた経時的な造影剤注入圧曲線は注入圧200mmHg以下で通過性の認められた正常形と最高注入圧250mmHgにおいても通過性の認められない閉鎖形, および通過性は示すが200mmHg以上を必要とするいわゆる通過時に抵抗を示す通過障害形に分けられる。そのうち通過障害形を2型に分類し, 注入圧のピークが後半にあるものを通過障害形 Type I, 前半にあるものを通過障害形 Type IIとし, Kymo-HSG の曲線を4つの波形に分類した。図に示すごとく, グラフIは正常形で注入開始より次第に子宮内腔に造影剤が充満し子宮卵管角(Utero Tubal Junction 以後 UTJ と略)が造影剤の陰影で明確になるまでを斜線部分で示している。ここまでに必要な造影剤の量が一定注入圧下の子宮内腔容量となる。次に左卵管が先に充満し腹腔内流出を認めたことをこの Kymo-HSG は示している。通常は子宮腔長を CL とすると, 撮影に必要な造影剤量 V は, $V=CL+2(CL-7)$ で示される。グラフIIは閉鎖形で最小の注入圧150mmHg では卵管への流出が認められない。さらに注入圧を200mmHg, 250mmHg と漸次上昇させる。本機器の最高注入圧250mmHgをもつても通過性の認められない場合これを閉鎖形とした。グラフIIIは通過性はあるが, 注入圧が201mmHg以上の抵抗を有し注入量が上記数式以上を必要とする例で通過障害形 Type Iとした。これは通過障害形のうち Kymo-HSG で全体の注入圧曲線の中で卵管を通過し卵管采から造影剤が流出するまでに, 時間と圧力が必要な例であり HSG 上卵管溜水腫, 卵管采癒着が相関する。一方グラフIVは

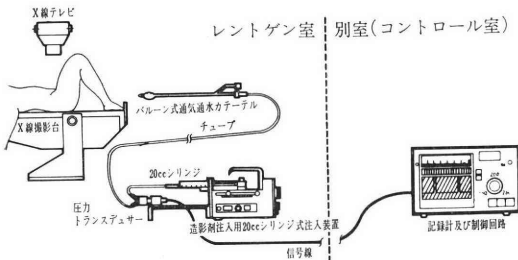


図1 注入圧, 量同時描写式子宮卵管造影器

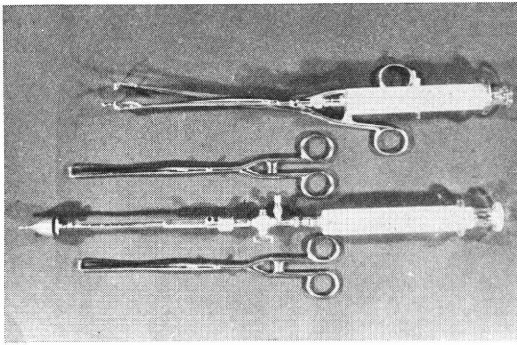


写真 1 各種 HSG 用鉗子セット

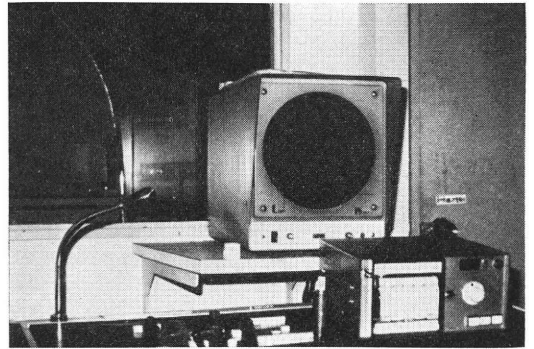


写真 4 コントロール室のサーボ駆動型記録器とテレビジョンモニター

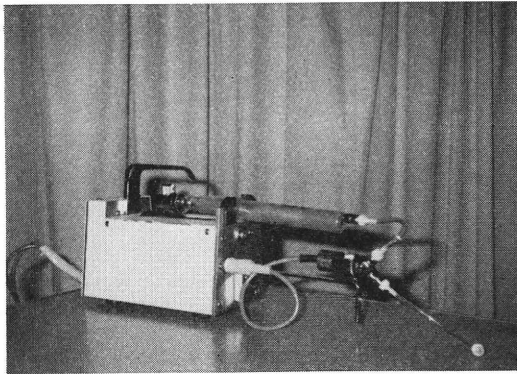


写真 2 アトム製自動注入器

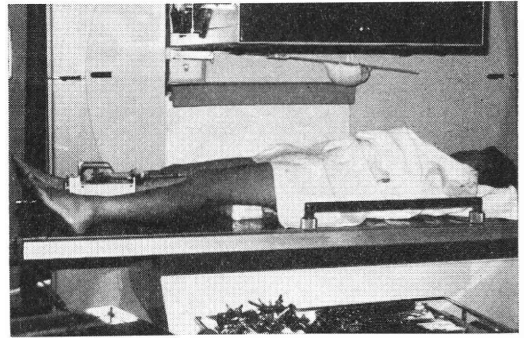


写真 5 設置された自動注入器

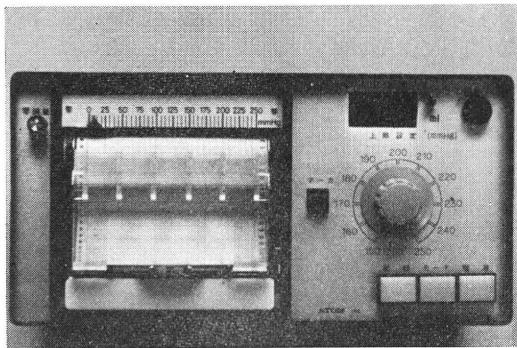


写真 3 サーボ駆動型記録器

UTJ を越えて造影剤が流出するのに201mmHg 以上の圧を必要とする例で HSG 上、子宮卵管角の癒壜、卵管狭窄と相関し時間の経過と共に通過性を示してくる例で Type II とした(図 3~6). 各々の実際の症例の Kymo-HSG 所見は写真(6~9)に示した. 対象の392例を上記の4種に Kymo-HSG にての波形を分類すると以下のごとくなる. 正常形261/392 (66.6%), 通過障害形 Type I 62/392 (15.8%), Type II 39/392 (9.9%), 閉鎖形30/392 (7.7%)であつた. またこのうち60例の妊娠例をみたが、妊娠成立例の Kymo-HSG の波

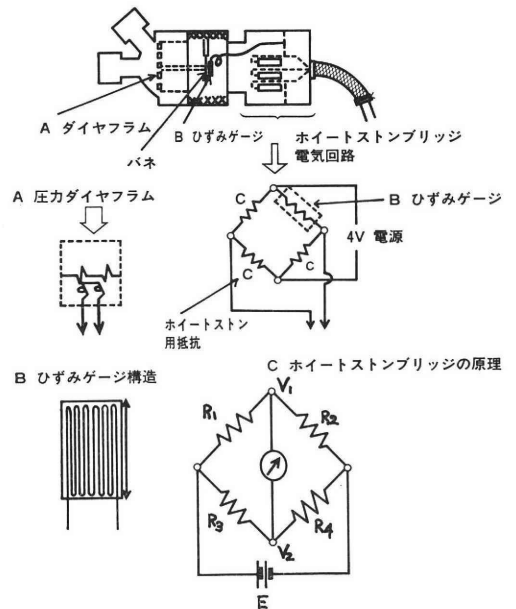


図 2 圧力トランスジューサー内部構造

形は正常形47/60 (78.3%), 通過障害形Type I 10/60 (16.7%), Type II 2/60 (3.3%), 閉鎖形1/60 (1.7%)であつた(表 1).

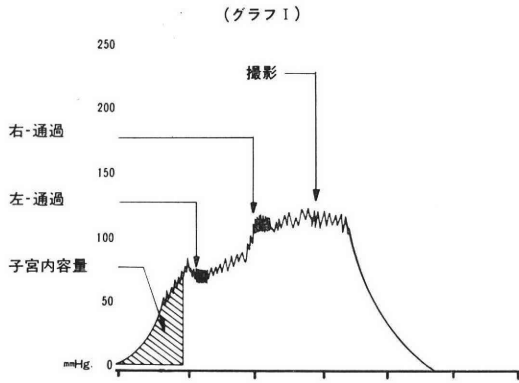


図 3 正常形

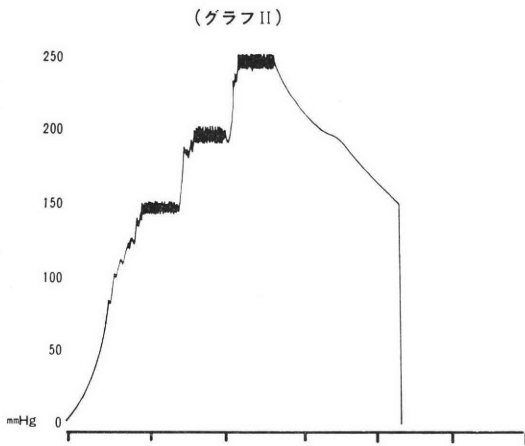


図 4 閉鎖形

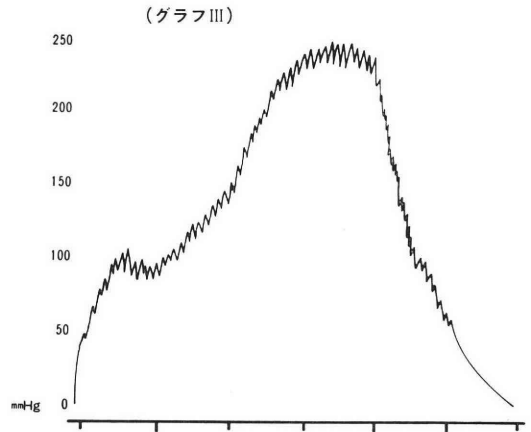


図 5 通過障害形 Type I (卵管采癒着, 卵管溜水腫)

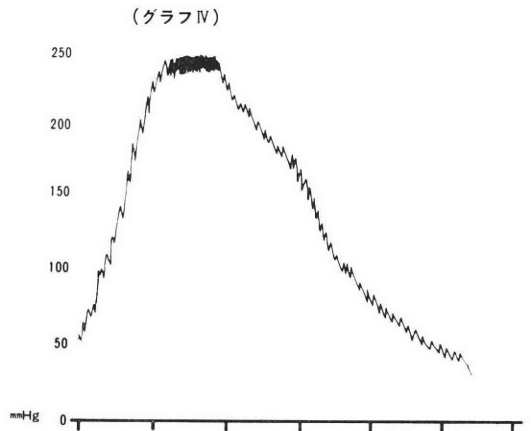


図 6 通過障害形 Type II (攣縮, 狭窄)

2. Kymo-HSG による妊娠成立群, 非成立群の最高注入圧平均値

本機器を用いて撮影した392例中撮影後現在 (1979, 12, 31) までに妊娠成立を認めたのは60例で, その最高注入圧平均値は194mmHg であつた. 特に231mmHg 以上では1例しか妊娠を認めていない. 一方妊娠を示した60例のうち注入圧100~200mmHg の間に71.7%の妊娠例を含み, 201~230mmHg の範囲では26.7%, 231mmHg 以上では1.67%, 100mmHg 未満は0%であつた. したがつて Kymo-HSG の注入圧では100~230mmHg の間に98.4%の妊娠例をみたことになる(表II).

3. 子宮内容積と妊孕性

従来の手動式 HSG では一定注入圧での子宮内容積は測定不能であつたが, 本機器により注入圧を250mmHg 以下と設定し, 子宮腔内が充満した時点の造影剤の量を測定すると392例中妊娠成立を認めた60例の子宮内容積平均値は3.38ml であり, 非妊娠例332例の子

宮内容積平均値は3.45ml であつた(表III). 表のごとく妊娠例の90%は1.5ml~6ml の範囲にあり, 6ml 以上10ml 未満は10%の妊娠例を示すが, 1.5ml 未満および10ml 以上の子宮内容を示す例では妊娠成立をみていない. なお392例の子宮内容積平均値は, 3.44ml であつた.

4. 無排卵期間と子宮内容積

不妊を訴え当大学病院へ通院する症例のうち, 無排卵, 無月経を示す50例についてその期間別にみた子宮内容量を Kymo-HSG を使用し注入圧250mmHg 以下にて測定した. その結果は次のとおりである.

無排卵無月経期間	症例	子宮内容量平均値
2年未満	22例	3.5ml
2年~5年	15例	3.2ml
5年以上	13例	2.2ml

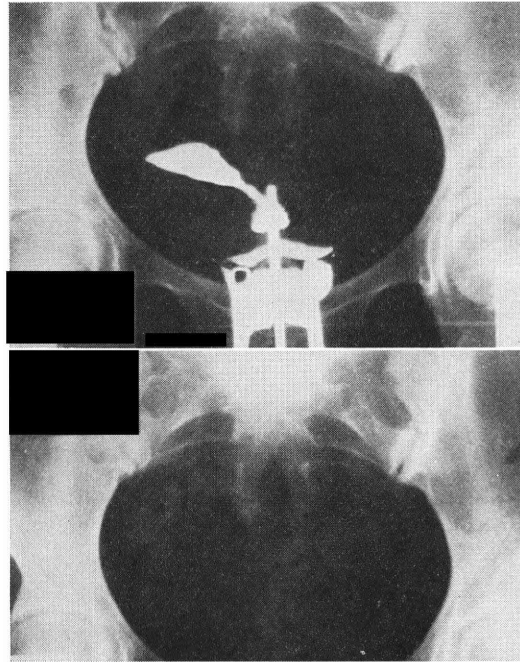
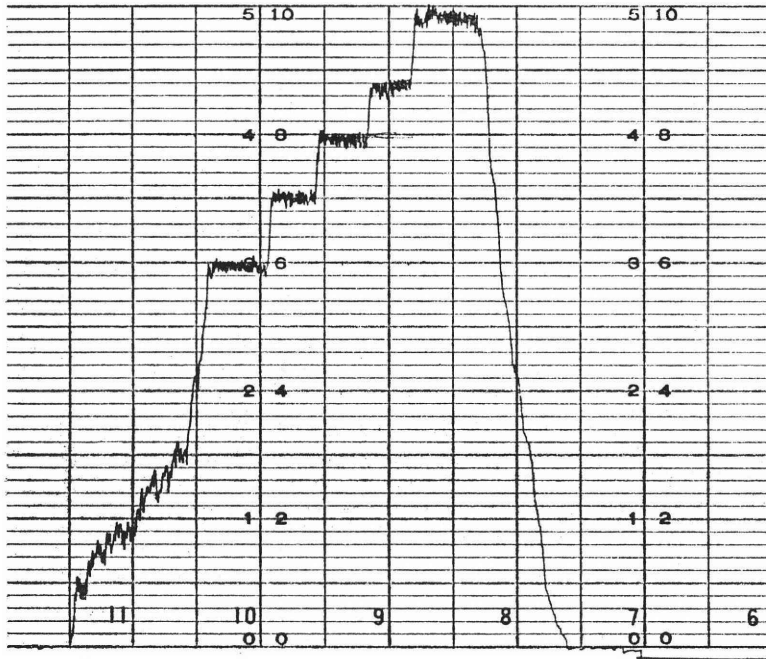


写真 7 卵管閉鎖例



閉鎖形

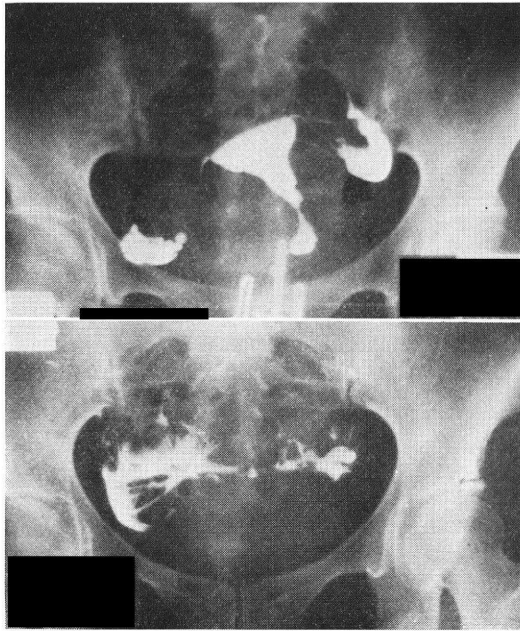
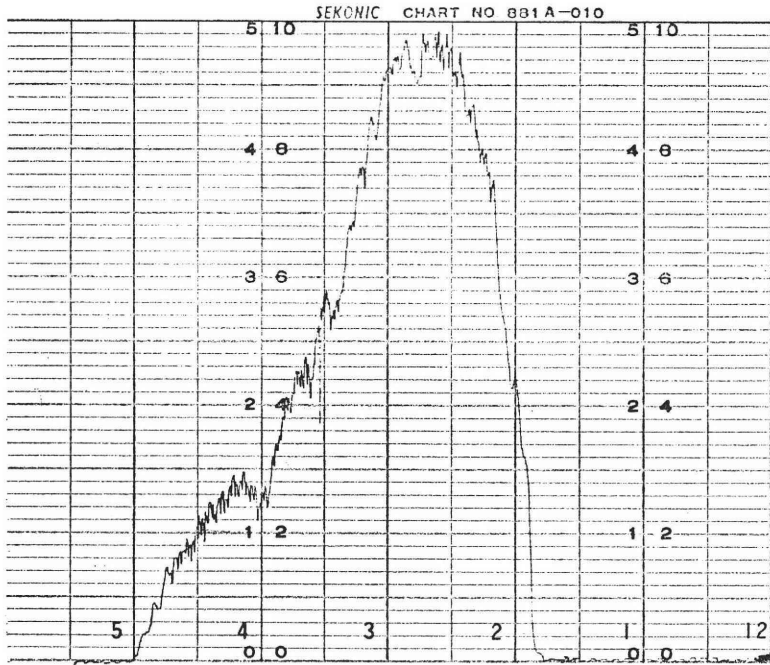


写真 8 両側卵管溜水腫例



通過障害形 Type I

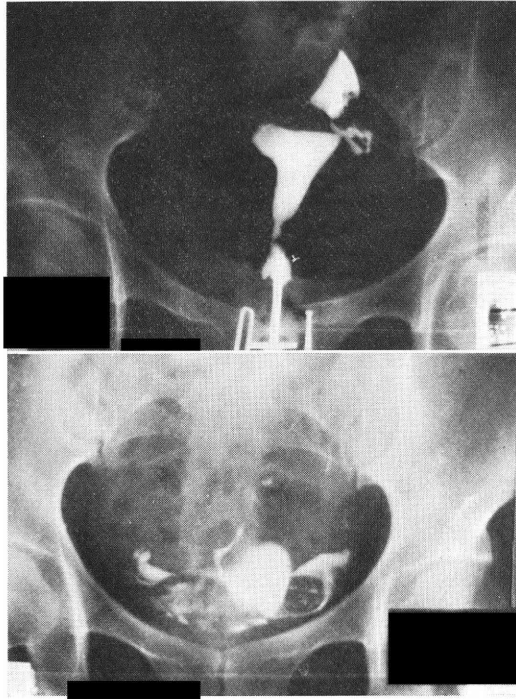
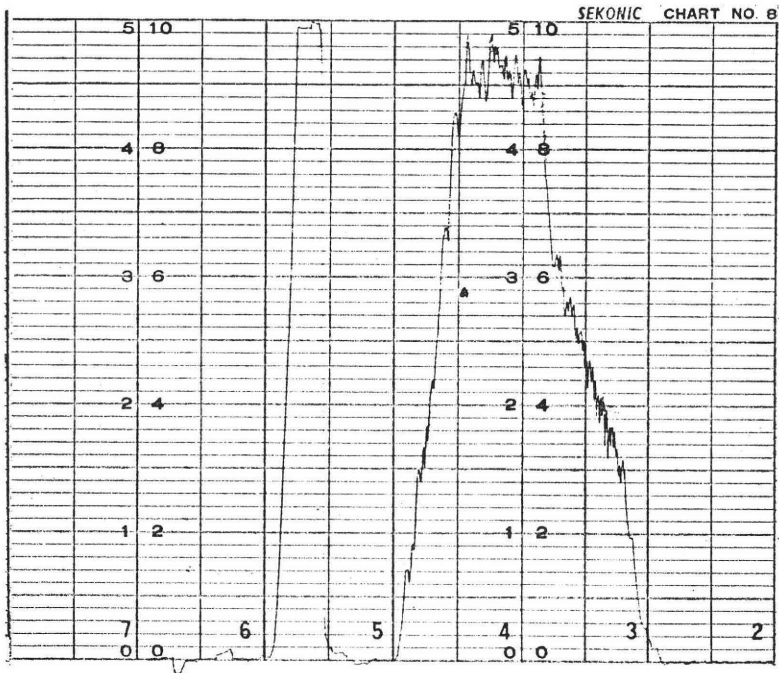


写真 9 子宮卵管角スパズムス例

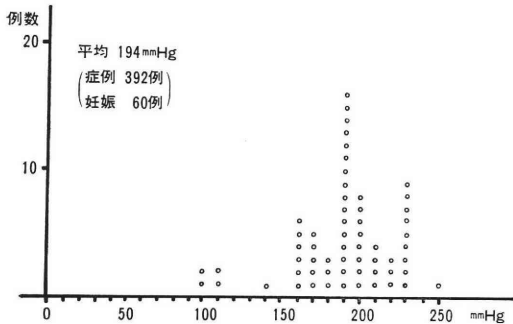


通過障害形 Type II

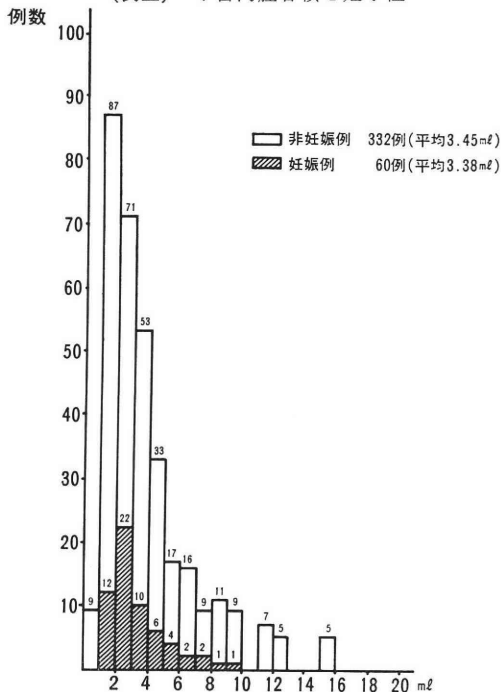
(表 I) 対象例の波形分布.

波 形	対象 392例	妊娠例 60例
正常形	261例 (66.6%)	47例 (78.3%)
通過障害形	Type I	62例 (15.8%)
	Type II	39例 (9.9%)
閉鎖形	30例 (7.7%)	1例 (1.7%)

(表 II) 妊娠例の注入圧分布



(表 III) 子宮内腔容積と妊孕性



すなわち無排卵、無月経期間が長期なほど子宮内容量は減少を示す傾向をみた。特に無排卵無月経から5年以上を示している例では平均2.2ml以下となり、有排卵症例の平均値3.44mlと1ml以上の差を有する。また50例の無排卵無月経症例のうち原発性無排卵無月経は13例

で、続発性無排卵無月経は37例であるが、特に前者の子宮内腔容量の平均値は2.2mlで、後者の平均は3.4mlで原発性無月経症例の子宮容量の低下すなわち子宮發育不全が特徴的である。

5. 本機器と手動式 HSG 撮影とにおける副作用発現率の比較

著者が開発した Kymo-HSG と従来の手動式の HSG 撮影時の副作用とその発現率を以下当大病院症例にて比較してみた。Kymo-HSG は392例を対象とし、手動式 HSG は当院における1976年1月から6月までの500例を対象とした。

(1) 疼痛：疼痛は主観的要素が強く客観的にその程度を現わすことは困難であるが、造影中に疼痛のため中止したものは Kymo-HSG では0/392(0%)、疼痛を訴えたものは28/392(7.1%)であり、従来の手動式では中止したものは6/500(1.2%)、疼痛を訴えたもの170/500(34%)であった。

(2) 出血：撮影時子宮腔、子宮頸管よりの出血および撮影後3日以上子宮出血が持続した例は、Kymo-HSG では0/392(0%)で手動式では18/500(3.6%)であった。

(3) ショック状態やアレルギー反応を起したものは、Kymo-HSG では0/392(0%)で手動式では3/500(0.6%)であった。

(4) 造影剤注入後、子宮腔から静脈へ造影剤が流入し、いわゆる脈管像を示した例、すなわち Venography となつたものは、Kymo-HSG では3/392(0.77%)、手動式では13/500(2.6%)であった。

(5) 子宮卵管角の攣縮 (spasm) の発生率：器質的には子宮卵管の通過性を有するが、HSG 撮影によって子宮卵管角の痙攣を生起し、HSG の上では閉鎖を示す状態⁴⁾⁵⁾でこれは従来から報告されていた撮影技術上の問題であった。そのため HSG 撮影前に行う通気カーブでは通過性を認めるが HSG では閉鎖型という不一致例を認めていた。しかし本機器の使用により急激な注入がさけられ注入圧も手動式の盲目的注入ではなくて、250mmHg 以下に規制することができるため spasm の発現率は低下した。通気の不一致例は Kymo-HSG では2/392(0.5%)で手動式では15/500(3.0%)であった。

V. 考 察

1. Kymo-HSG の開発とその臨床応用

卵管の通過性の有無、子宮内腔の拡大および子宮發育不全と診断する根拠が、従来の子宮卵管造影法では、圧

力、注入速度、注入量の条件が一定ではなく、それを客観的に数値をもつて記録されていなかった。したがって撮影の同一条件における子宮卵管の評価が不可能であった。文献的には藤森⁷⁹⁾氏が1960年開発した描写式子宮卵管通水装置に端を發し、1973年同氏⁸⁰⁾が Moscow の第7回世界産婦人科学会において注入圧描写式子宮卵管造影法を發表した。そして卵管の機能のおよび形態学的所見を同時に診断し得る方法として有意義であることを報告した。著者は種々の注入圧下における子宮内腔卵管腔の注入量の関連性と妊孕性を解析するため通気通水用鉗子セットまたは、通気通水用バルーンカテーテル⁸¹⁾を圧力トランスジューサーに直結し、注入量、注入速度を一定にし注入圧を調節可能にした。しかもそれらを同時描写式にした子宮卵管造影機を開発した。そして描写される波形を4種に分類し、HSGによる卵管通過性の状態を相関させて、同一条件におけるHSGの診断を可能にした。

2. 注入圧と妊孕性

百瀬¹⁰⁾は子宮卵管造影法で、注入器に目盛り付きガラス管をつけて、簡単に造影剤の注入圧を測定できるようにした。造影剤1ml注入毎に圧力を測定すれば、卵管疎通例では、6~7ml注入しても圧は上昇せず、100mmHg程度に止まる。卵管閉塞例では3~4ml注入で300~400mmHgに達し、腹痛を訴えることを報告している。また藤森⁸⁰⁾も描写式子宮卵管造影法を開発し撮影の至適な注入圧を200mmHg以下と報告している。しかし注入圧と妊娠率の解析の報告はなかった。著者は本機器にて検査症例の妊娠例を抽出し、その最高注入圧を検討し妊娠例は100~230mmHgの幅に98%、150~230mmHgの幅では90%が存在することを明示した。

3. 一定注入圧下における子宮内腔容積と妊孕性

当教室の河上、杉山¹¹⁾等は2ml~5mlまでに妊娠例が多く、これを1とすると6ml以上ではその妊娠率は $\frac{1}{8}$ と少なく、2ml未満では $\frac{1}{73}$ であると報告している。これは手動式のHSGで注入圧は一定ではない。著者は注入圧を規定しその注入圧における子宮腔内容積と妊娠率を検討した結果、注入圧250mmHg以下において3.88mlが妊娠成立群の平均であることが判明した。一方同注入圧のもとでは10ml以上および1.5ml未満は妊娠成立をみない。手動式の場合は卵管通過障害例に対しては注入圧が強くなり、子宮腔はそれにつれて拡大し、一定の注入圧下における正確な子宮内容量は判定し得なかった。本機器ではそれを可能にした。

4. Kymographic-HSGの利点

従来の手動式のHSG撮影に伴う副作用¹²⁾からみると、著者が開発したKymo-HSGは次の点で被験者および検者に対し諸利点がある。

(1) 注入量および注入速度を一定にして検査するため、急激な注入によるUtero-tubar junctionのspasmを予防することができる。

(2) 子宮内腔、卵管内腔の容積を一定条件下(一定注入圧、一定注入速度)にて正確に測定できる。すなわち子宮内腔異常(子宮筋腫、癒着)や卵管内腔の異常(卵管溜水腫、卵管延長など)の診断が数値をもつて表わすことが可能である。

(3) 一定の圧にして通水治療も行なえる。圧は150~250mmHgの範囲で次第に強くして注入することも可能である。

(4) 遠隔操作式であるため験者がX線に被爆することがない。

(5) 注入速度は5ml/minとし一定にしてあるため無理な注入が予防できるので患者の疼痛が少ない。

(6) 注入圧を150~250mmHgの範囲で次第に強めることが可能である。すなわち150mmHgで流入しない症例では、徐々に圧力を上げ、通過に必要な最小限の圧で注入が可能である。

(7) 通水治療、HSG撮影が本機器一台で行うことが可能である。すなわち機能的な問題と器質的な問題を同時に診断することができる。

(8) 生殖機能の解剖学的判定に対し従来の盲目的な操作に比し、各種条件と妊孕性の相関を数値をもとに観察ができる。

VI. 謝 辞

本稿を終るにあたり終始御指導御校閲を賜った慶応義塾大学医学部産婦人科学教授恩師飯塚理八教授に深謝致します。また本研究に御協力下さった荘病院産婦人科医長瀬尾道次先生、慶応義塾大学産婦人科学講師河上征治先生、および研究室諸兄姉ならびに本機器開発に御援助いただいたアトム株式会社に謝意を表します。なお本論文の要旨は第55回日本産科婦人科学会関東地方部会ならびに第23回日本不妊学会総会シンポジウムにて発表した。

文 献

- 1) Rubin, I. C.: Uterotubal Insufflation, Value in the Treatment of Tubal Obstruction to Ovular Migration, Fertil. and Steril. 5(4): 311, 1954.
- 2) 飯塚理八: 子宮卵管造影器機, 産婦世界, 30:

- 46, 1978.
- 3) 百瀬和夫, 西平守之, 郭 国鎮: 新造影剤 Lipiodol UF による子宮卵管造影法, 臨放射線, 9: 739, 1964.
 - 4) 飯塚理八, 己斐秀豊, 小林俊文: 不妊症学: p. 51, 金原出版, 東京, 1974.
 - 5) 杉山 武: 妊孕性を基準とした Hysterosalpingography の Scoring 開発とその臨床解析に関する研究, 日不妊会誌, 20(1): 1, 1975.
 - 6) 河上征治: 子宮卵管造影, 産婦人科シリーズ No. 12, 不妊症診断のすべて: p. 89, 南江堂, 東京, 1975.
 - 7) 藤森速水, 釜本正憲: 描写式卵管通水診断治療装置, 日本医事新報, 1909: 29, 1960.
 - 8) 藤森速水: 描写式子宮卵管造影法, 産婦世界, 26(7): 805, 1974.
 - 9) 中村幸雄, 浅岡 健, 清水謙一, 小林俊文: balloon 式通気法, 子宮卵管造影法について, 産婦治療, 26(2): 245, 1973.
 - 10) 百瀬和夫, 江沢健夫, 林 新 慶: 子宮卵管造影法, 産婦治療, 34(5): 563, 1977.
 - 11) 河上征治, 杉山 武: 妊孕性を基準とした HSG の Scoring について, 日不妊会誌, 19(1): 19, 1974.
 - 12) Siegler, A. M.: Hysterosalpingography: p. 5, Medcom. N. Y. 1974.

Remote-control kymographic hysterosalpingography: Development and clinical application

Tadatsugu Iijima

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

A new remote-control kymographic hysterosal-

pingography using an automatic injector of contrast medium with a regulator of injection pressure and a servomechanical servellant has been developed and applied successfully to clinical examinations. The findings thus far obtained are as follows: (1) The insufflation patterns of the kymographic HSG can be classified into the normal, ampullar obstruction, isthmal obstruction, and total occlusion.: (2) The highest injection pressure was 194 mmHg on the average in a pregnant group, and no pregnant case was found at pressures below 100 mmHg or at 251 mmHg or above. (3) The average cavity volume at injection pressures of 250 mmHg or below was 3.38 ml in the pregnant group, and no pregnant case was found at the volume of 10 ml or above or below 1.5 ml. (4) The cavity volume has been shown to decrease with the duration of anovulation in the women in their reproductive years. (5) The complications of HSG such as pain, peritoneales Reizsymptom, bleeding, shock, intravenous flow of the contrast medium, and contraction of the utero-tubular junction, are all fewer with the new HSG than with the conventional manual HSG. Significantly less inconsistency of findings obtained with insufflation curves and x-ray examinations has also been observed with the new HSG.

(受付: 昭和55年6月5日)

卵管形成手術例における子宮卵管造影と 卵管内膜走査電顕像との関連

Correlation between Hysterosalpingograms and Scanning Electron Microscopic Images of Tubal Endometrium in Cases of Tubal Plastic Surgery

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室（指導：飯塚理八教授）

金 倉 洋 一
Yoichi KANAKURA

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

子宮卵管造影（HSG と略）が示す卵管通過障害例の手術症例において、その閉塞部陰影と走査電子顕微鏡（SEM と略）による同部の卵管内膜を線毛細胞を中心に観察した所見との関連性を解析した。一方同症例の術後妊娠成立率を追跡し、HSG 所見、SEM 所見からみた卵管形成術の適応を作成した。

- 1) 卵管溜水腫（HYD と略）を水腫部分が大きく卵管狭部にまでおよぶ症例をⅡ型、それ以外の水腫部分が小さく卵管膨大部に限局するⅠ型に分類した。
- 2) 卵管采部癒着（PFA と略）、卵管延長（ELN と略）、HYD Ⅰ型、卵管結紮術後の卵管内癒着（ITA と略）の症例の術後残存卵管の卵管内膜は正常に保たれている。
- 3) HYD Ⅱ型、結核性 ITA の卵管内膜の線毛細胞は全域にわたり、萎縮、消失している。
- 4) HYD Ⅱ型、結核性 ITA の術後妊娠成立率は 0 である。
- 5) 以上より、卵管形成術の適応を、HSG 所見より診断した PFA、ELN、HYD Ⅰ型、卵管結紮術後の ITA に厳選すべきである。

緒 言

女性不妊のなかで、卵管因子の占める割合は高く、その治療対策に体外受精¹⁾が開発されつつあるとはいえ、卵管形成術にたよらざるを得ないのが現状である。しかし、その術後妊娠成立率は内外の報告^{2,3,4)}とも極めて低率である（10～40%）。

従来の卵管機能の診断とその治療の評価は単に卵管の疎通性の改善を主眼とし、卵管内膜の腺毛状態との相関において解析されていなかった。歴史的にヒトの卵管内膜の走査電子顕微鏡（Scanning electron microscope = SEM と略）による観察は、Ludwig⁵⁾、Patek⁶⁾、Ferenczy⁷⁾、(1972年)の報告があるが、卵管通過障害との関連においては報告されていない。そこで著者は、子宮

卵管造影（Hysterosalpingography = HSG と略）が示す卵管通過障害例の手術症例において、その閉塞部陰影と同部の SEM による観察を行ない、卵管通過障害病態を HSG と SEM 所見とによつて分類した。また同症例の術後妊娠成立率を追跡し、HSG、SEM 所見からみた卵管形成術の適応と予後の判定指針を次の研究成績の結果から明示せんとした。

(1) 慶応大学病院産婦人科不妊外来患者5000例の HSG 陰影より、卵管内造影剤の通過状態と造影剤の24時間後骨盤内拡散状態から、卵管通過性の診断基準の作製。

(2) 術前の HSG において、その診断基準上、卵管通過障害陰影と判定した部分の卵管内膜の SEM による観察と組織所見の関連性の追求。

(3) (2) の結果と術後妊娠成立率の比較検討.

研究対象および方法

1. 研究対象

①1974年1月1日~1978年12月31日の期間の慶応大学病院産婦人科不妊外来患者のうち、HSGを施行し、子宮内腔、卵管像確認可能な5000例のうち、卵管形成術を行なった219例. 同症例のうち1977年1月1日~1978年12月31日の期間に行なった手術症例のなかの58例にSEMを使用しての、卵管通過障害部の卵管内膜の観察を行なった.

②コントロールの正常卵管として、子宮筋腫で子宮摘除手術を行なう患者で、術前にHSGを行ない、正常卵管通過性を認めた妊娠既往のある生殖可能年齢婦人の卵管15例を対象として観察を行なった.

2. 研究方法

①HSG撮影方法

我々の開発した、注入圧、注入速度の調節が遠隔操作で可能な注入圧、量同時描写式子宮卵管造影器(Kymographic-Hysterosalpingography=Kymo-HSGと略)を、注入圧250mmHg以下、注入速度2ml/min以下にて使用し、ビデオコーダー付X線テレビ装置を併用し、70KV、100mA、0.4~0.5秒、管球フィルム間距離60cmで、造影剤リピオドール・ウルトラフィルドで撮影した.

②卵管組織の検査法

剔出した卵管通過障害部を一部組織はヘマトキシリン・エオジン染色して鏡検した. また卵管内膜の観察は、試料(3×3mm~5×5mm)を2%グルタルアルデヒド液にて洗浄後、同液にて固定したのち、70%、90%、100%アルコール脱水剤で脱水し、臨界点乾燥を行ない、金-カーボンにて蒸着操作を行ない、JSM-SI型走査電子顕微鏡にて線毛細胞の密度、配列、性状等を観察した.

③術後妊娠経過の調査

卵管形成術を施行した219例について、術後1年以上経過の時点で妊娠成立を追跡調査可能例190例を対象に調査した. 通院患者はカルテ記録より、非通院患者は通信により調査した. 妊娠成立群と非妊娠成立群の術前HSG陰影と手術時に剔出した卵管通過障害部の卵管内膜のSEM所見との関連において、術後妊娠成立を検討し、卵管形成術の手術適応の基準を考案した.

研究成績

1. 正常卵管内膜の走査電顕像

摘出した正常卵管(15例)を、卵管狭部、卵管狭部から卵管膨大部への移行部、卵管膨大部、卵管采部に4分画し、それぞれの内膜の線毛細胞の密度、配列、高さ、一般状態をSEMにて観察した(図1参照). 各分画における卵管内膜一定面積あたりの線毛細胞と非線毛細胞の比率、すなわち線毛細胞/(線毛細胞+非線毛細胞)×100(%)は、卵管狭部で45%、卵管狭部から卵管膨大

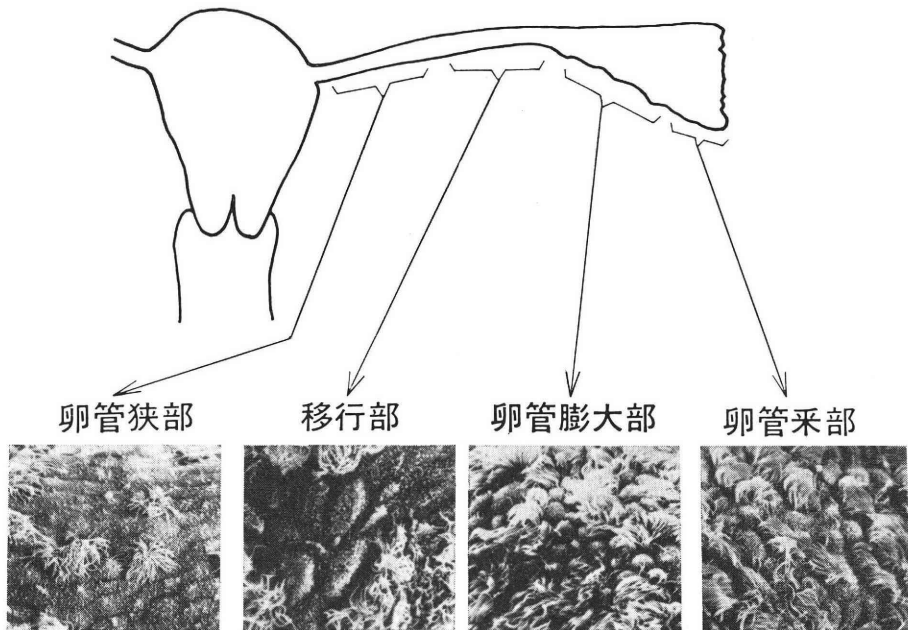


図 1 正常卵管 (SEM)



写真 1 卵管采部の梁形成, SEM 30×

表 1 子宮卵管造影卵管像の分類.
(1972年~1978年 慶大産婦人科5000例)

正常型(片側の場合も含む).....	73.1%
卵管采部癒着(PFA).....	16.4%
卵管延長(ELN).....	7.1%
卵管溜水腫(HYD).....	2.2%
卵管内癒着(ITA).....	1.2%
(卵管結紮術後を含む)	

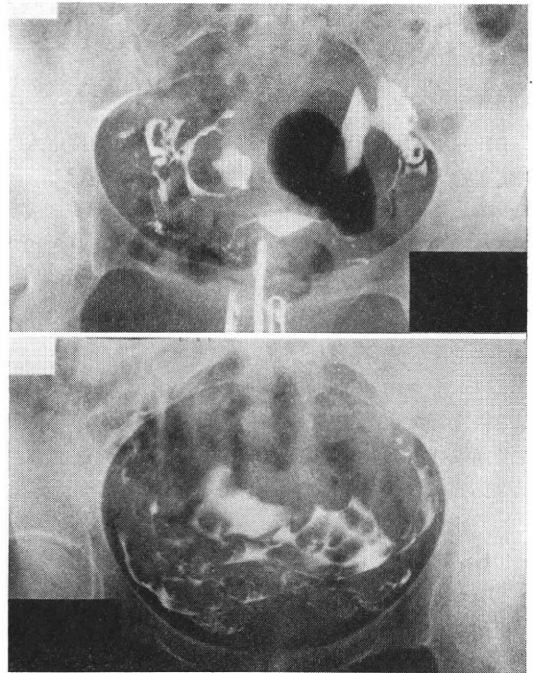


写真 2 PFA を示す HSG

部にかけて60%, 卵管膨大部で85%, 卵管采部で90%であった。(SEM 700×の写真で5×5cmの面積部分にて算出。)線毛細胞の密度は卵管采部と卵管膨大部では有意差はみられないが、卵管膨大部から子宮卵管角に移行するにしたがい線毛細胞は減少しているのが特徴的である。一方線毛細胞の配列、一般状態に関しては、各分画とも乱れ、萎縮、消失はみられなかった。線毛の高さは6~8μ(平均7μ)で、卵管狭部、卵管膨大部、卵管采部において差を認めなかった。SEMにて観察した15例の正常卵管はすべて排卵前期(BBTで低温最終日を0日とすると-3~-1日)という条件下にあった。

また低培率において、卵管内腔の構築からみた特徴は、卵管采部を中心に卵管膨大部にかけて卵管狭部にはみられない梁形成が観察される(写真1参照)。

以上の正常卵管内膜のSEM所見をコントロールとし、以下の卵管通過障害例のそれぞれの卵管内膜のSEM所見を比較した。

2. 卵管通過障害を示す HSG 所見と卵管内膜の SEM 所見の関連性

研究方法で述べた Kymo-HSG 装置を使用して撮影した HSG 所見にて、著者等^{8,9)}は卵管通過障害を表1の如く5型に分類した。慶応大学病院産婦人科不妊外来5000例の HSG 所見をその読影基準に従って分類する

と、正常型73.1%, 卵管采部癒着16.4%, 卵管延長7.1%, 卵管溜水腫2.2%, 卵管内癒着1.2%であった。26.9%の卵管通過障害のうち卵管形成術を行なった症例は219例で、著者はそのうち58例について、HSG が示す卵管通過障害部の卵管内膜の線毛細胞を中心に SEM 所見を検討した。

(i) 卵管采部癒着 (Perifimbrial adhesion=PFA と略)

造影剤注入直後の撮影フィルム(momental film)において、卵管の通過性は認められるが、24時間後の撮影フィルム(follow-up film)において、造影剤拡散不良の硬い陰影が momental film における卵管采部に一致して認められる PFA 15例(写真2)に著者等は卵管采部漿膜と隣接臓器の間にみられる癒着の剝離術(fimbriolysis)を行なったが、同症例の卵管采部の卵管内膜を3×3mm採取してSEMにて観察した。15例中14例は写真3の如く、コントロールとした正常卵管内膜と差がなく、線毛細胞と非線毛細胞の比率、配列は正常所見を呈していた。1例は線毛細胞/(線毛細胞+非線毛細胞)×100(%)が40%で低率であった、しかし開腹時所見では少量の滲出液を卵管采部に認め卵管溜水腫様であった。ヘマトキシリン・エオジン染色所見では子宮内膜症が12例にみられ、術後の炎症所見のみがみられたのは3例であった。すべての症例とも漿膜間の癒着が主徴であり、卵管内膜を侵していないのが特徴的であった。最

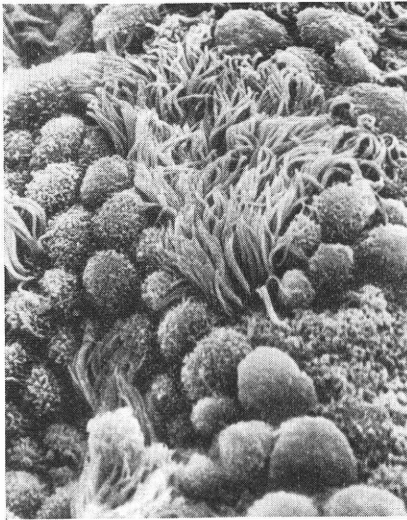


写真 3 PFA の SEM 所見 1000×

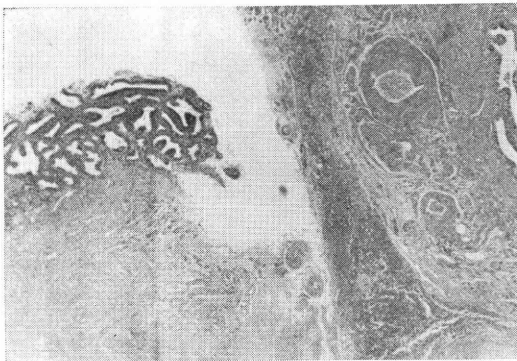


写真 4 子宮内膜症の HE 所見 50×
(右端が卵管内腔である)

近の増加疾患である子宮内膜症は卵管不妊の原因疾患としても増加しているが、写真4の如く子宮内膜症が卵管漿膜、卵管筋層には認められても、卵管内膜まで侵している例はなかつた。

(ii) 卵管延長 (Tubal elongation=ELN と略)

momental film において卵管の延長がみられる ELN は、卵管采部の強度な隣接臓器との癒着による直線的延長(写真5)と、卵巣腫瘍、子宮筋腫による円弧状延長(写真6)があるが、前者は前述の PFA に入れ、後者に限定して検討した。生殖可能年齢にあるが挙児希望ないため付属器摘出術を受けた症例より得た9例の摘出標本を、卵管采部から子宮卵管角まで全域にわたり卵管内膜を SEM にて観察したが、線毛細胞と非線毛細胞の比率、配列、一般状態ともコントロールと差はなかつた。卵巣腫瘍がいわゆるチョコレート腫といわれる卵巣子宮内膜症の3例の卵管内膜もコントロールと差はなく、PFA の子宮内膜症症例と同じく、子宮内膜症は

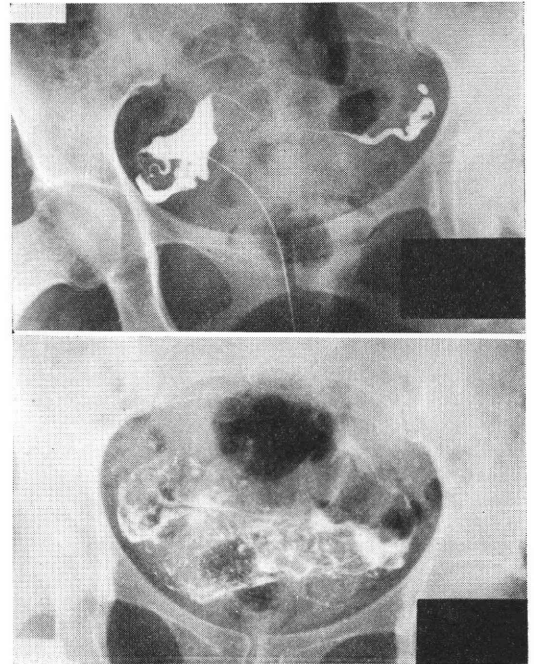


写真 5 直線的 ELN を示す HSG

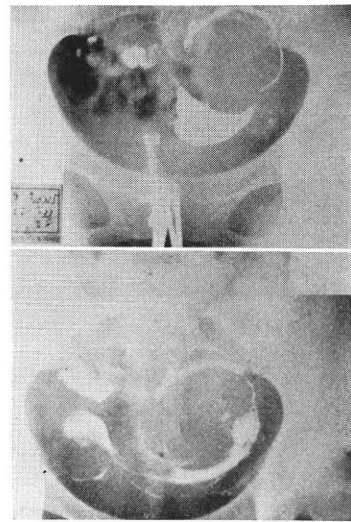


写真 6 円弧状 ELN を示す HSG

卵管内膜を侵してはなかつた。要するに腫瘍による解剖学的卵管延長は卵管機能の輸送機能の阻害は想定されるが、卵管内膜の異常所見はなかつた。

(iii) 卵管溜水腫 (Hydrosalpinx=HYD と略)

momental film で卵管開口端が完全閉塞あるいは強度の狭窄を示し、follow-up film にて卵管膨隆が momental film の膨隆部に一致して認められ、貯溜液との表面張力差によって造影剤が滴状にみられる HYD (写真7)では、著者等は切除開口術を行なうが、その切除

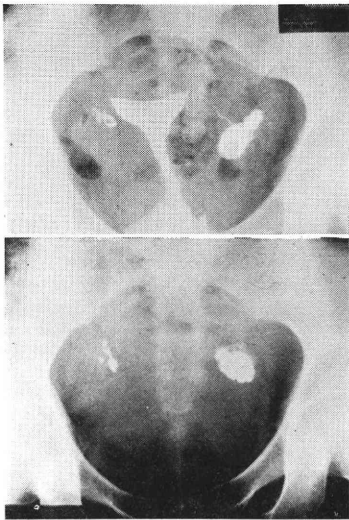


写真 7 HYD を示す HSG

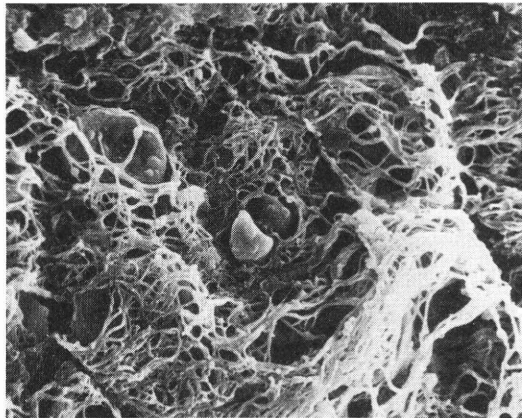


写真 8 HYD の SEM 所見 2000×

開口部と切除した溜水腫部分の卵管内膜 (32例) を SEM にて観察した。溜水腫部分の卵管内膜の性状は不良で、正常な線毛細胞は完全消失し、変形、萎縮した線毛細胞が粗に存在するのみであった (写真 8)。開口部の卵管内膜の SEM 所見は、正常所見に差がない例 15 例で、17 例は溜水腫部分と同じ所見を呈していた。

(iv) 卵管結紮術による卵管内癒着 (Intra tubal adhesion=ITA と略)

対象として卵管結紮術後で、子宮筋腫にて挙児希望のない生殖可能年齢で子宮摘出術を行なった患者 6 例の卵管を卵管采部から子宮卵管角まで全域にわたって観察し、卵管再疎通術 (端々吻合術) を行なった 6 例については剔出した結紮部とその周囲の卵管の卵管内膜を観察した。12 例全例結紮部以外の卵管内膜は全域にわたり正常卵管所見と差がなかった。

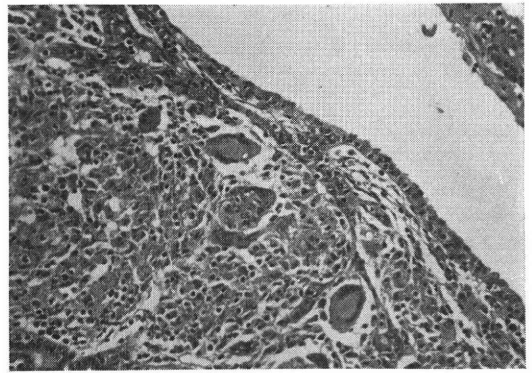


写真 9 卵管結核の HE 所見 100×

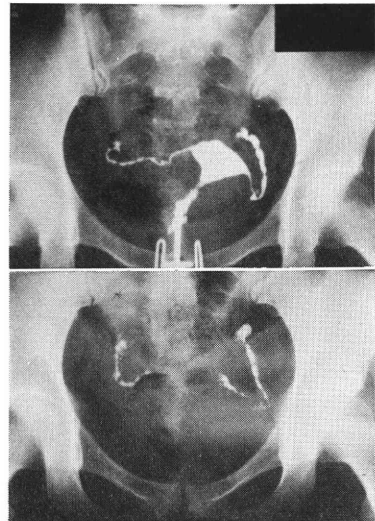


写真 10 結核性 ITA を示す HSG

(v) (iv) 以外の ITA

momental film で卵管通過性が全くないのが ITA である。その原因は結核あるいは、結節性卵管炎であるが、著者が観察した ITA の症例は 5 例すべて結核性の ITA であった。写真 9 はその組織所見の写真で、結核特有の所見を呈している。また結核性 ITA の場合 HSG 所見に特有の陰影像を呈するが¹⁰⁾、写真 10 はそのうちの鏑針金状卵管のレリーフ像および菊花蕾像がみられる HSG である。結核性の ITA の卵管内膜は 5 例とも写真 11 の如く全く不良で、正常な線毛細胞は全くみられず消失していた。

1, 2, で述べた卵管内膜の SEM 所見を表にしたのが表 2 である。

3. 卵管通過障害の SEM 所見と術後妊娠成立率

卵管通過障害例の分類とその術後妊娠成立率の表が表 3 である。PFA, ELN, 卵管結紮後の ITA に限定すると、20% 以上の術後妊娠成立率がみられるが、HYD の

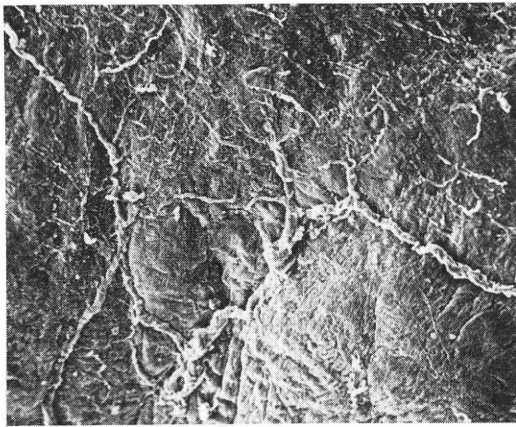


写真 11 結核性 ITA の SEM 所見 2000×

表 2 卵管内膜の SEM 所見.

HSG 所見	症例数	線毛細胞を主体としたSEM所見の特徴
正常型	15	密度(采部, 膨大部>狭部), 配列整, 高さ6~8μ
PFA	15	14例 正常型と差なし 1例 密度40% 配列やや乱れ
ELN	9	全例, 卵管内膜は正常型と差なし
HYD I	15	滲出液存在している部分の線毛細胞は萎縮, 消失他の部分は保存されている
II	17	全域にわたり, 線毛細胞は萎縮, 消失
Tbc ITA 結紮後	5 12	全域にわたり, 線毛細胞は萎縮, 消失 結紮部以外の卵管内膜は全く正常型と差なし

表 3 術後妊娠成立率.

PFA	10/43	23.4%
ELN	17/87 (Ectopy 1例)	19.7%
HYD I型	5/25	20.0%
II型	2/20 (Ectopy 2例)	10.0%
ITA Tbc 性	0/9	0%
結紮後	2/6	33.0%
Total	36/190	18.9%

1974.1.1~1978.12.31.

術後妊娠成立率は低い. そこで著者は HYD の症例に検討を加え, HYD の HSG 陰影より以下の分類を行なった(図2参照).

Kymo-HSG により, 卵管内腔が5 ml 以上に拡大あるいは卵管溜水腫が卵管膨大部に限局せず卵管狭部あるいは子宮卵管角にまでおよぶ例を HYD II型, それ以外の卵管溜水腫部分が膨大部, 采部に限局し, しかも卵管内腔容積の少ない例を HYD I型と分類した. 2に

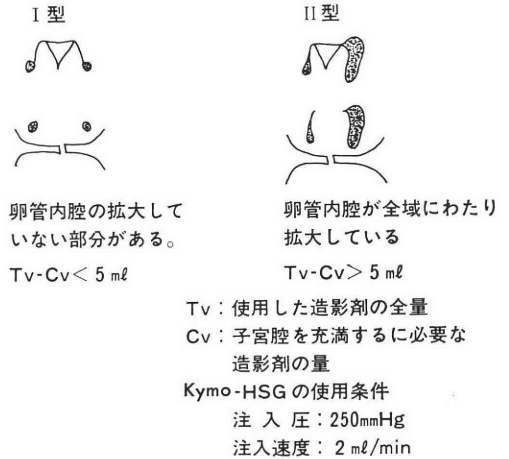


図 2 HYD の分類 (Kymo-HSG による)

表 4 卵管形成術.

PFA	卵管采癒着剝離術
HYD	卵管開口術
ELN	腫瘤摘除術
ITA	卵管周囲癒着剝離術 端々吻合術

述べた SEM 所見で, 開口部の卵管内膜の SEM 所見が正常卵管所見と差がなかった15例の HSG 所見は HYD I型に一致し, 卵管内膜所見の不良だった17例の HSG 所見は HYD II型に一致した. そこで術後妊娠成立率を再検討すると, HYD I型の場合20%であるのに対し, HYD II型の場合の正常子宮内妊娠は0であった(表3).

4. 卵管通過障害例の手術適応

著者等は, 卵管通過障害例に対し表4の種々の卵管形成術を行なっているが, 1, 2, 3, を総合すると, SEM 所見において線毛細胞の密度, 配列, 一般状態が術後妊娠成立を大きく左右している事が判明した. すなわち卵管通過障害例において, 線毛細胞が萎縮, 消失している HYD II型, 原因が卵管結紮以外の ITA ではたとえ卵管形成術により卵管の通過性を改善し得ても, 術後妊娠成立は0に近い. そこで著者は HSG 所見と卵管内膜の SEM 所見の関連性を解析し, 術前の HSG 所見による手術適応の選択基準を示してみた. それは, 術前の HSG 所見の卵管通過障害を分類し, PFA, ELN, HYD I型, 卵管結紮後の ITA に手術適応を厳選することである.

考 察

従来卵管形成術は保存手術であるため, 卵管内膜を詳

細に検討することは困難であったが、SEM を使用することにより、極めて小さい試料(2×2 mm~5×5 mm)で卵管内膜を観察することが可能になった。

榎木¹¹⁾、Ludwig¹²⁾は、卵管内膜の SEM による観察所見を報告し、Pauerstein¹³⁾は種々の卵管の組織所見を観察しているが、卵管通過障害を HSG で分類し、そのそれぞれの SEM 所見とその予後を比較検討されてはいない。そこで著者は、HSG により6型に分類した卵管通過障害例の卵管内膜を開腹時に剔出して SEM にて観察し、HSG 所見と SEM 所見の関連性を求め、各症例の術後妊娠成立率を解析した。

コントロールとして、高野⁹⁾らと同様に正常卵管15例を対象に、卵管を4分画に分け各分画を SEM にて観察し、通過障害部の卵管内膜の SEM 所見と、線毛細胞の状態を中心に比較した。

卵管機能には、精子の輸送(Sperm Transport)、精子受精能獲得(Capacitation)、卵子採取(Ovum Pick up)、卵子の輸送(Ovum Transport)、受精(Fertilization)、受精卵の輸送(Embryo Transport)、受精卵の発育(Embryo Nourishment)があり、単に通水療法、卵管形成術等にて卵管通過性のみを改善しても妊娠成立をみない卵管不妊症例が高率に存在するのも当然の事である。そこで著者は、輸送機能、とくに卵の輸送に関与していると思われる卵管内膜の線毛細胞状態を SEM で観察し、それと妊娠性の相関に注目して、卵管形成術の適応、予後の関連性を追求してみた。

特徴的なのは、卵管通過障害のなかで、滲出液を卵管内腔全域に含む巨大 HYD、結核性の ITA の症例では、子宮卵管角から卵管采部にかけ卵管全域にわたり卵管内膜の線毛細胞の萎縮、消失がみられ、保存手術に意義を認め得ないことである。本来線毛は再生されるものではあるが、慢性炎症を存する卵管は、卵管内膜、卵管筋層、卵管漿膜全体に炎症が波及しているために、正常な線毛の再生は期待できないということであろう。したがって著者が HSG 所見にて分類した HYD II型、結核による ITA を想定しうる卵管閉塞症例は SEM にて観察するまでもなく保存の意義を有しないと考える。内外の報告とも過去における卵管形成術の術後妊娠成立率は低率であるが、その手術症例から結核性の ITA と HYD II型を除外すれば、術後妊娠成立率は向上するはずである。HYD I型は滲出液が卵管膨大部、卵管采部に局限する症例であり、同部を切除開口すれば残存させる卵管内膜の線毛細胞は十分保存され、卵管機能の回復は期待される。そこで問題となるのは保存された卵管の長さの問題¹⁴⁾であろう。著者は卵管内腔の滲出液によって拡大された範囲が、卵管の機能保存の最大の問題であること

を重視し、一般に卵管溜水腫(HYD)と診断される卵管通過障害を HYD I型とII型の2種に分類し、前者のみを卵管形成術の適応とすることを提唱したのである。

また HSG 所見より、PFA、ELN、卵管結紮後の ITA と診断した症例では、その卵管内膜の SEM 所見はコントロールに比較し、線毛細胞の密度、配列、一般状態に差はなく、卵管内腔は十分保存されていることを確認した。しかし PFA では卵子採取機能の障害、ELN ではそれだけでなく卵管の輸送機能の障害が想定される。したがって、卵管采部癒着剝離術や、解剖学的卵管延長の原因である卵巣腫瘍、子宮筋腫を摘除することによって卵管の機能の回復を期待できると考えられ、卵管内膜の SEM 所見からも保存手術の意義を十分存するものと考えられる。

PFA の原因疾患として最も高頻度にみられる子宮内膜症は、将来も増加すると考えられている疾患であるが、飯塚¹⁵⁾、滝¹⁶⁾が述べている如く、子宮内膜症が卵管内膜を侵すことがなく、卵管漿膜、卵管筋層に存在するのみであったことは特徴的であると同時に、術後再癒着を防止できれば卵管形成術による予後が期待されると確信する。

体外受精の適応が、卵管形成術の手術適応から除外される HYD II型、結核性 ITA などについて大いに期待される方法論であるかもしれないが、しかしこれらの症例は卵管内膜の一部に局限された病変とは考えられず、子宮、卵管、卵巣という女性生殖器一連の慢性疾患、あるいは器質的変化が完了した病態として把握すべきであり、それらの症例には体外培養の受精卵の着床率も極めて低率であると考えねばならない。卵管不妊が体外受精で解決されたとはいえず、むしろ著者等が提唱する HSG 所見と SEM 所見の関連からみた卵管機能の診断法の確立と卵管形成術の新しい方法論の開発^{16,17)}、特にマイクロサージェリーによる卵管形成術、術後再癒着防止法の開発に挑戦する価値が存在すると考える。本論文で述べた卵管形成術の適応に、マイクロサージェリー、再癒着防止のフードの利用により30%以上の術後妊娠成立率をみるのは必至である。

結 論

卵管通過障害を HSG にて6型(①卵管采部癒着、②卵管延長、③卵管溜水腫I型、④卵管溜水腫II型、⑤卵管結紮術後の卵管内癒着、⑥⑥以外の卵管内癒着)に分類し、その各々の卵管内膜を線毛細胞を中心に SEM にて観察し、両者の関連性と同症例の卵管形成術後の妊娠成立率とを比較し、以下の結論を得た。

1. HSG にて卵管通過性正常な卵管内膜の線毛細胞の密度は、卵管采部から子宮卵管角に移行するにしたがい減少している。

2. 卵管采部癒着、卵管延長を HSG で認められる卵管内膜はコントロールと差がない。

3. 卵管溜水腫を、それが膨大部に局限する卵管溜水腫 I 型と、それが子宮卵管角まで存在する卵管溜水腫 II 型に分類すると、I 型では溜水腫部分以外の卵管内膜の線毛細胞は保存されているが、一方 II 型では全域にわたり卵管内膜の線毛細胞は萎縮、消失している。

4. 卵管結紮術後の卵管内癒着の場合、結紮部以外の卵管内膜は正常に保存されている。しかし、卵管結紮術以外の原因による卵管内癒着では、卵管内膜は全域にわたり侵されており、線毛細胞は萎縮、消失している。

5. 走査電子顕微鏡により卵管内膜の線毛細胞の萎縮、消失が観察される卵管溜水腫 II 型、卵管結紮術後以外の卵管内癒着において、術後妊娠成立は 0 である。

6. 走査電子顕微鏡所見と、術後妊娠成立率の検討から、卵管通過障害例の手術適応は HSG によつて、卵管采部癒着、卵管延長、卵管溜水腫 I 型、卵管結紮術後の卵管内癒着を示す症例に厳選すべきである。

稿を終るにあたり御懇意な御指導、御校閲を賜った恩師飯塚理八教授に深甚なる謝意を表します。また本研究の遂行に終始御指導頂いた河上講師に感謝の意を表します。さらに御指導、御助言を頂いた病理学教室山圭三教授、三方淳男助教授、電顕室主任藤原達司先生に心より感謝致します。

(なお本論文の要旨は第56回日本産科婦人科学会関東連合地方部会、第24回日本不妊学会総会および第10回国際不妊学会にて発表した。)

文 献

- 1) Steptoe, P. C., and Edwards, R. G., : Lancet, II : 366, 1978.
- 2) 飯塚理八, 他 : 卵管不妊に対する手術のコツ, 産婦人科治療, 37 : 548, 1978.
- 3) 高野 昇, 高見沢裕吉, : 卵管形成術症例の検討 (とくにその予後について) : 日不妊誌, 20 : 33, 1975.
- 4) Siegler, A. M. and Perez, R. J. : Reconstruction of fallopian tubes in previously sterilized patients. Fertil. Steril. 26 : 383, 1975.
- 5) Ludwig, H., Wolf, H., Metzger, H. : Zur Ultrastruktur der Tubeninnenfläche im Rasterelektronenmikroskop. Arch. Gynäk. 212 : 380, 1972.
- 6) Patek, E., Nilsson, L., Johannisson, E. : Scanning electron microscopic study of hu-

man fallopian tube. Report I. The proliferative and secretory stages. Fertil. Steril. 23 : 459, 1972.

- 7) Ferenczy, A., Richart, R. M., Agate, F. J., Jr., Purkerson, M. L., Dempsey, E. W. : Scanning electron microscopy of the human fallopian tube. Science 175 : 783, 1972.
- 8) 杉山 武 : 妊孕性を基準とした Hysterosalpingography の scoring 開発とその臨床解析に関する研究, 日不妊会誌, 20 : 1, 1975.
- 9) 日原 弘 : 子宮卵管造影が示す卵管通過障害陰影とその組織像に関する研究, 日不妊会誌, 23 : 333, 1978.
- 10) 飯塚理八, 河上征治, 金倉洋一 : 性器結核の診断法 (HSG 像を中心として), 産科と婦人科, 45 : 464, 1978.
- 11) 榎木 勇, 他 : 卵管の形態及び微細構造, 産科と婦人科, 46 : 1399, 1979.
- 12) Ludwig, H., Metzger, H. : The human Female Reproductive Tract, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1976.
- 13) Pauerstein, Carl. J. : The Fallopian Tube, Lea & Febiger, 1974, Philadelphia.
- 14) Henderson, Simon, R. : Successful reversal of sterilization—the use of the microscope vs. a macro-micro technique and the significance of tubal length, IXth World Congress of Gynecology and Obstetrics 288, 1979.
- 15) 飯塚理八, 金倉洋一, 他 : 卵管, 臨床婦人科産科, 33 : 361, 1979.
- 16) 滝 一郎 : 子宮内膜症のすべて, 産婦人科シリーズ, 15 : 16, 1976, 南江堂.
- 17) 河上征治 : 卵管形成術における microsurgery の基礎, 産婦人科におけるマイクロサージェリー : 43, 1979, 東海大学出版会.
- 18) 河上征治, 金倉洋一, 他 : 卵管形成術, 産婦人科の世界, 31 : 567, 1979.

Correlation between hysterosalpingograms and scanning electron microscopic images of tubal endometrium in cases of tubal plastic surgery

Yoichi Kanakura

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

Patients who had an operation by the hysterosalpingographical (HSG) diagnosis as having obstructed tubal patency were selected for our obstructed studies of the correlation between the shadow of the closed part and scanning electron microscopical (SEM) findings on tubal endometrium of the same part, with a special emphasis

on the condition of ciliated cells.

On the other hand, the above patients were followed up in order to learn their success rate of postoperative pregnancy. In addition, findings by HSG as well as those by SEM were taken into consideration for the analytical studies of the applicability of tubal plastic surgery.

1) Hydrosalpinx was divided into two types: Type II included those cases in which the edema was so large that it reached as far as the isthmus; and other cases than those of Type II, in which the edema was relatively small and localized within the ampulla, were classified as Type I.

2) The remaining tubal endometrium after the operation of peritubal adhesion, tubal elonga-

tion, hydrosalpinx Type I and intratubal adhesion after a tubal ligation was found normal.

3) In cases of hydrosalpinx Type II and intratubal adhesion by tuberculosis, ciliated cells of tubal endometrium was found withered or disappeared.

4) No postoperative pregnancy was found in patients of hydrosalpinx Type II and intratubal adhesion by tuberculosis.

5) From the above observations, we believe the application of tubal plastic surgery should be limited strictly to those patients suffering from peritubal adhesion, tubal elongation, hydrosalpinx Type I, and Intratubal adhesion after a ligation.

(受付: 昭和55年6月20日)

妊娠免疫に関する研究

—リンパ球 subpopulation への HCG の関与—

A Study on the Immunity of Pregnancy Participation of HCG on Lymphocyte Subpopulation

東海大学医学部産婦人科学教室

塩塚 幸彦 林 茂一郎 小林 一夫
Yukihiko SHIOTSUKA Moichiro HAYASHI Kazuo KOBAYASHI

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

共利研微生物

山 内 進
Susumu YAMAUCHI

Division of Microbiology Inter Departmental Laboratory, Tokai
University School of Medicine, Kanagawa

著者らは、妊婦末梢血中リンパ球 subpopulation の検索を行ない、1st trimester に起る T cell 発現率の低下と、この現象が masking による見せかけの減少である事を認め報告している。今回、この masking 現象に関与する妊婦血清中の液性因子について検索を行い、以下の結果を得た。

1) 褥婦末梢血より分離したリンパ球と、同一人の妊娠初期に採取し凍結保存した血清とを混合培養し、その後再び行なった検索では、T cell 発現率の著明な減少を認めた。減少パターンは、妊娠初期における検索結果と相似性を示した。

2) 用いた妊婦血清中 HCG 濃度変化と T cell 発現率の変化は互いに負の相関が認められた。

3) In vitro での HCG 添加培養では、対照に比較して、T cell 発現率の減少傾向を認めた。

以上の結果より、妊婦末梢血中 T cell 発現率の低下に関与する masking factor として、血清中の液性因子、特に HCG の存在が強く示唆される。

緒 言

胎児は母親にとって semi allograft とも考えられることから、妊娠現象は従来より免疫学的に極めて興味ある生理現象であり、様々な方法論により検索が行なわれて来ている。特に移植免疫に関与する細胞性免疫機能の変化については、妊婦のリンパ球 subpopulation に関する多くの報告が行なわれているが、未だ完全な意見の一致をみていない¹⁻⁷⁾。

著者らは、同一個体で妊娠初期より分娩に至るまで連続的にリンパ球 subpopulation の変化を検索し、1st

trimester に T cell 発現率が著明に減少することと、これが masking 現象による見せかけの減少であり⁸⁾、妊娠子宮が機能的に関与している事を認めすでに報告している⁹⁾。

今回、この masking 現象の解明のため、妊婦血清中の液性因子、特に HCG に注目し、そのリンパ球 subpopulation への機能的関与の検討を行なったので報告する。

検索対象

合併症のない、24歳から34歳迄の妊婦12例を検索対象

とし、妊娠5週より20週迄と、さらに産褥4～6週に末梢血を採取し、検体とした。

対照としては、21歳～24歳迄の非妊娠正常婦人末梢血を用いた。

また、HCG 添加培養実験には、26歳および43歳の正常男性の末梢血を用いた。

検索方法

1) リンパ球 subpopulation に関与する妊婦血清中液性因子の機能

産褥4～6週の褥婦より、ヘパリン採血した末梢血から lymphoprep を用いてリンパ球を分離し、PBSにて3回洗浄後、 $1 \times 10^6/ml$ のリンパ球浮遊液とし、その0.5ml に同一人の妊娠5週より20週に至るまで連続的に採取し凍結保存した各週数別の自己血清0.4ml を加え、 $37^\circ C$ 2時間 incubate を行なった。その後、PBS で洗浄し、再び RPMI 1640中にリンパ球浮遊液とし、T cell は E-RFC 法、B cell は S-Ig 法によりリンパ球 subpopulation の検索を行なった。

2) 各妊娠週数による HCG 濃度とリンパ球 subpopulation との相関について

妊娠5週より20週迄の各妊娠週数別に採取し凍結保存した妊婦血清中 HCG 濃度を CIS 製 HCG RI kit により二抗体法により測定を行なった。さらに、HCG 濃度と、各血清と混合培養後の褥婦血清中リンパ球 subpopulation の変化との相関関係の検討を行なった。

3) In vitro 実験系によるリンパ球 subpopulation への HCG の関与の検討

正常男性末梢血をヘパリン採血し、lymphoprep によりリンパ球を分離し、その RPMI 1640浮遊液に HCG を50IU/ml より5000IU/ml の濃度に添加し、 $37^\circ C$ 2時間 incubate を行なった。PBS で洗浄後、RPMI 1640浮遊液とし、T cell は E-RFC 法、B cell は S-Ig 法により検索を行なった。

結果

1) リンパ球 Subpopulation に関与する妊婦血清中液性因子の機能

T cell 発現率：産褥期における T cell 発現率は、 66.2 ± 4.3 であり対照の 67.7 ± 6.3 と有意の差を認めない。妊娠週数別各血清との混合培養後では、T cell 発現率は著明に減少し、妊娠10週で 47.3 ± 10.8 と最も低値を示した。その増減パターンは、正常妊婦における T cell 発現率の変動パターンと極めて類似性を示し、正常妊婦での T cell 減少が妊婦血清中の液性因子により、惹起されている事を示唆する結果を得た(表1, 図1)。

表1 使用血清中 HCG 濃度と添加培養後の Tcell 発現率。

Gestational week	Level of HCG (IU/ml)	Tcell (%)
5	6.8 ± 5.4	ND
6	29.0 ± 18.8	65.5 ± 2.5
7	56.3 ± 36.0	59.5 ± 10.5
8	72.4 ± 41.5	53.3 ± 8.9
9	97.2 ± 44.4	47.5 ± 5.4
10	106.7 ± 42.6	47.3 ± 10.8
11	101.0 ± 39.3	48.0 ± 12.0
12	56.5 ± 31.8	53.0 ± 10.2
13	39.2 ± 25.4	52.4 ± 3.7
15	26.0 ± 19.8	55.1 ± 5.3
17	23.7 ± 18.0	62.6 ± 7.7
18	18.2 ± 13.3	67.8 ± 9.5
19	14.9 ± 9.5	69.4 ± 4.8
20	15.5 ± 5.3	68.1 ± 2.3
Standard value less than 8mIU/ml		67.7 ± 16.3

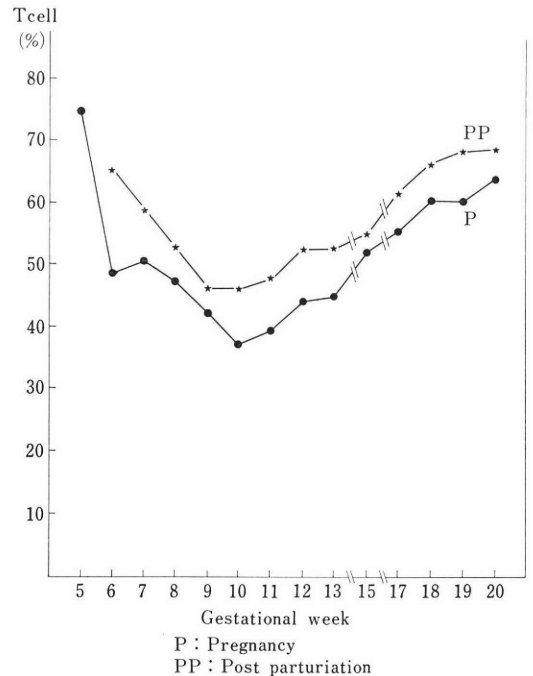


図1 HCG 添加培養後の T cell 発現率の変化と正常妊娠例との対比

B cell 発現率：褥婦末梢血中 B cell 発現率は、 15.4 ± 8.9 であり、対照の 14.4 ± 9.4 と大差なく、また妊娠各週数別各血清との混合培養後の検索でも明らかな変化は認めなかった。

2) 各妊娠週数による HCG 濃度とリンパ球 sub-

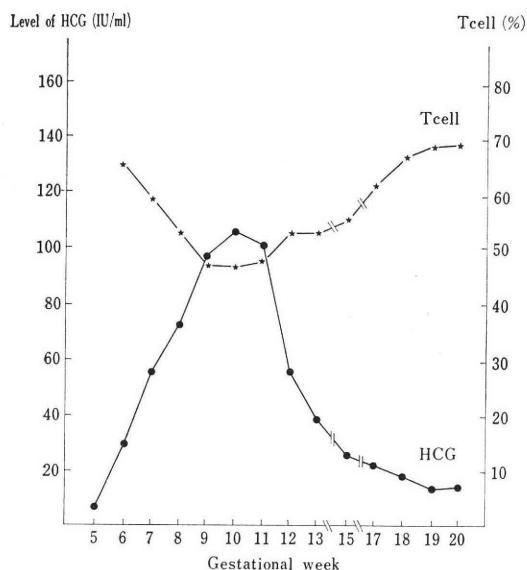


図 2 使用血清中 HCG 濃度と添加培養後の T cell 発現率の変化

population の相関について

HCG 濃度は、妊娠5週で6.8±5.4IU/ml と最も低値であつたが以後漸増し、妊娠10週では106.7±4.26IU/ml と最高値を示した。妊娠12週以後は、漸次減少を示している。妊婦血清中 HCG 濃度は、従来の報告と大差ないが、産褥婦人の末梢血より分離したリンパ球と同一個体の妊娠初期血清との混合培養後の T cell 発現率は、結果(1)でも述べている如く明らかに減少傾向を示し、添加した血清中 HCG 濃度と負の相関関係が認められ、リンパ球 subpopulation, 特に E-RFC 法による T cell 発現率への HCG の何らかの関与が推定される結果を得た(表1, 図2)。

3) In vitro 実験系によるリンパ球 subpopulation への HCG の関与の検討

HCG 添加培養後の T cell 発現率は、200IU/ml 添加例で58.5, 61.0と発現率が低下している。In vitro の実験であり、培養時間が2時間と短かつたため、あまり明らかな変化は示されなかつたが、HCG 添加により、対照に比較し、T cell 発現率の低下傾向が認められた(図3)。

B cell 発現率は、14.8±7.5であり対照に比較して明らかな変化は認めなかつた。

考 案

母親にとって semi allograft ともいえる妊卵が着床し生育する妊娠現象を可能にするために妊婦は非妊婦に比

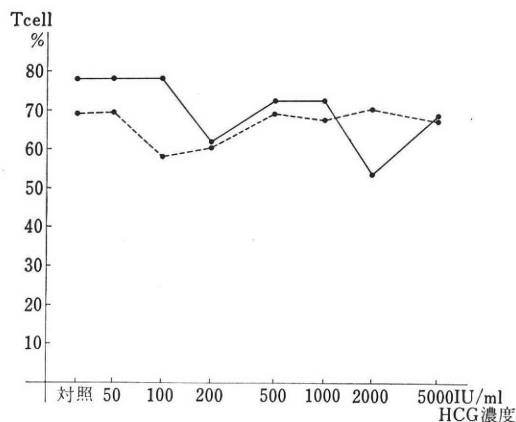


図 3 HCG 添加 In vitro 実験による T cell 発現率の変化

較して、免疫学的に特殊な状態にあるのではないかと考えられ、特に移植免疫に関与する細胞性免疫機能については従来より多くの研究が行なわれているがあまり明確な結論に達していない¹⁻⁷⁾。また、妊娠は生理現象であり、妊婦が免疫学的に非妊時と極端に異つた状態になるとは考え難く、妊婦リンパ球の量的及び質的に極端な変化が妊娠により惹起されるとも考え難い。このような事より妊娠時に妊婦血清中に特異的に出現する胎児、胎盤由来のホルモン及び特異蛋白等のいわゆる液性因子の存在が目されてきている。

著者らは、妊婦末梢血中のリンパ球 subpopulation の検索を行ない、1st trimester で T cell 発現率の減少と、それが masking 現象による見せかけの減少であること⁸⁾、masking 現象が妊娠子宮内で行なわれている事を認め報告している⁹⁾。

本報では、まず masking factor の検索のため妊娠初期に採取し凍結保存した血清と同一人の産褥期に採血し分離したリンパ球との混合培養を行ない、その後に行なつた E-RFC 法による T cell の検索で発現率の低下を認め、しかも妊娠時における検索結果と極めて類似した減少パターンを示したことから、T cell 発現率の低下は妊婦血清中に存在する液性因子の masking 作用による見せかけの減少であることを示した。

液性因子による masking 現象に関しては、まず妊婦血清中で 1st trimester に最も高濃度となり^{10,11)}、また In vitro の実験で免疫抑制作用を示すと報告されている¹²⁻¹⁵⁾。HCG に注目し、使用した各血清中の HCG 濃度と、混合培養後の T cell 発現率との相関関係の検討を行なつたが、HCG の妊娠週数による濃度変化は従来の報告^{10,11)}と大差は認められないが、T cell 発現率とは明らかに負の相関関係が認められ、妊婦血清中の HCG

の masking 現象が E-RFC 法による T cell 発現率低下の誘因であろうことが推定された。

HCG の masking 現象の検索のために行なった In vitro の実験では、顕著な変化は認められなかったが、In vitro の実験であり、また培養時間が2時間と短時間であつたためとも考えられる。症例数も少なく断定は出来ないが、HCG 200IU/ml 添加例で明らかな T cell 発現率の低下があり、全体として T cell 発現率の低下傾向が認められた。

著者らは、リンパ球細胞膜に付着又は結合して存在する HCG の局在を酵素抗体法により証明しすでに報告している¹⁰⁾。このリンパ球に付着又は結合した HCG が羊赤血球の結合を阻害し E-RFC 法による T cell 発現率を低下させ、見せかけの減少を起していると考えられる。HCG による masking 現象とリンパ球機能との関係は何らかの相関が推定されるが詳細は現在不明であり今後の研究課題として追求していきたい。

文 献

- 1) Brain, P., Marston, R. H. and Gordon, J.: Immunologic response in pregnancy: Bvit. Med. 4: 488, 1972.
- 2) Campion, P. D. and Currey, H. L. F.: Cell-mediated immunity in pregnancy. Lancet, II: 830, 1972.
- 3) Confield, D. B., Jencks, J., Binder, R. A. and Rath, C. E.: T and B lymphocytes in pregnancy women. Obstet. Gynecol., 53: 203, 1979.
- 4) Dadson, M. G., Kermann, R. H., Lange, C. F., Stefani, S. S. and O'Leary, J. A.: T and B cells in pregnancy. Obste. gynecol., 49: 299, 1977.
- 5) Gergely, P., Dzuonyar, J. and Szegedi, G.: T and B lymphocytes in pregnancy. Kli. Wochenschr., 52: 601, 1974.
- 6) Loke, Y. W., Brook, S. S. and Allen, G. E.: Increase in IgM-bearing lymphocytes in peripheral blood of pregnant women. Am. J. Obstet. Gynecol., 122: 561, 1975.
- 7) Strelkauskas, A. J., Wilson, B. S. and Dray, S.: Inversion of levels of human T and B cell in early pregnancy. Nature., 258: 331, 1975.
- 8) 山内 進, 塩塚幸彦, 小林一夫, 小沢 敦: 妊娠初期における母体の免疫反応と Masking factor. 臨床免疫, 7月号掲載予定.
- 9) 塩塚幸彦, 小林一夫, 山内 進, 小沢 敦: 妊娠現象における免疫機能に関する研究, リンパ球 subpopulation に関与する子宮因子の機能について. 日産婦誌, 32: 577, 1980.
- 10) Faiman, C., Ryan, R. J., Zwirek, S. J. and

- Rubin, M. E.: Serum FSH and HCG during human pregnancy and puerperium. J. Clin. Endocr. Mtab., 28: 1323, 1968.
- 11) Goldstein, D. P., Aono, T., Taymor, M. L., Jochelson, K., Todd, R. and Hines, E.: Radio-immunoassay of serum chorionic gonadotropin activity in normal pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., 102: 110, 1968.
- 12) Adcock, E. W., Teasdale, F., August, C. S., Coz, S., Meschia, G., Battaglia, F. C. and Naughton, M. A.: Human chorionic gonadotropin: 1st possible role in maternal lymphocyte suppression. Science, 181: 845, 1973.
- 13) Beling, C. G. and Weksler, M. E.: Suppression of mixed lymphocyte reactivity by human chorionic gonadotropin. Clin. exp. Immunol., 18: 537, 1974.
- 14) Kaye, M. and Jones, W. R.: Effect of human chorionic gonadotropin on in vitro lymphocyte transformation. Am. J. Obstet. Gynecol., 109: 1029, 1971.
- 15) Schiff, R. I., Mercier, D. and Buckley, R.: Inability of gestational hormones to account for the inhibitory effect of pregnancy plasmas on lymphocyte responses in vitro. Cellular Immunology, 20: 69, 1975.
- 16) 塩塚幸彦, 小林一夫, 山内 進, 渡辺慶一, 小沢敦: 妊娠免疫に関する研究, リンパ球細胞膜における HCG の局在について. 日産婦誌投稿中.

A study on the immunity of pregnancy participation of HCG on lymphocyte subpopulation

Yukihiko Shiotsuka, Moichiro Hayashi and Kazuo Kobayashi

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

Susumu Yamauchi

Division of Microbiology Inter Departmental Laboratory Tokai University School of Medicine, Kanagawa

The authors studied on the lymphocyte subpopulation in the peripheral blood of pregnant women, and reported the T cell population decreased in the 1st trimester and that this phenomenon was an apparent decrease due to masking. This time, a study was made on the humoral factors in the serums of pregnant women, which could participate in this masking phenomenon, and the following results were

obtained.

1) The lymphocytes separated from the peripheral blood of puerperas were mixed with the respective serums which were collected from the some women in their initial stage of pregnancy and stored in frozen state, and the respective mixtures were cultured. Then, they were examined, and remarkable decrease of T cell population was observed. The decrease pattern showed similarly to the results of the examination made during pregnancy.

2) In the used serums of pregnant women,

negative correlation was observed between the change in HCG concentration and the change in T cell population.

3) In vitro culture with HCG added, a trend of T cell population decrease was observed, compared with the control.

The above results positively suggest the existence of humoral factors in the serum, especially HCG, as a masking factor which participates in the decrease of T cell population in the peripheral blood of pregnant women.

(受付：昭和55年7月14日特掲)

INHIBITION OF PREMATURE LABOR BY INDOMETHACIN

Kinichiro MIZUNO, Yutaka OKUMURA, Katsuo IKUTA,
Hisayuki KASEKI and Yoshiaki YAGAMI

Department of Obstetrics and Gynecology, Nagoya City University Medical School

Abstract: Indomethacin was administered from the 16th to 36th week of gestation to 50 women (52 fetuses) with clinical evidence of premature labor.

Total amount was ranged from 100 mg to 1950 mg. The average interval between the initial administration and the delivery was 33.5 days. Forty-three infants of 52 (82.7%) were survived. There were 6 neonatal death and 3 intrauterine death in this series. No cause of death except prematurity was demonstrated in the infants of neonatal death and the pregnant women, whose infants were died in utero, were complicated with toxemia or hepatitis.

These results indicate that indomethacin treatment was effective on inhibition of premature labor, though contraindicated for complicated pregnancy.

Introduction

Despite the significant decline in perinatal mortality in recent years, neonatal morbidity and mortality associated with prematurity still cause a great number of death. Therefore, prevention of premature delivery is very important for further decline of perinatal infant mortality. This has stimulated to find an agent that will diminish or eliminate uterine contractions.

A functional role of prostaglandines in parturition is suggested by in crease of prostaglandins concentration in human blood¹⁾ and amniotic fluid²⁾ during labor and by the observation that exogenously administered prostaglandins can induce labor^{3,4)} and abortion^{5,6,7)}. In 1971, Vane et al.⁸⁾ reported that prostaglandins syntheses could be blocked by indomethacin.

This study was undertaken in a attempt to evaluate the inhibitory effect of indomethacin on premature labor.

Materials and Methods

Fifty patients associated with premature labor were included for this study. Their gestational age were ranged from the 16th

to the 36th week. Before the administration of indomethacin, each patient was proved to have regular uterine contractions at least once every 10 minutes by external tocography. Patients were excluded from the study in principle, if the following conditions were present: fetal abnormality, fetoplacental insufficiency, premature rupture of membrane, uterine bleeding, severe maternal diseases and imminent labor such as dilated cervix more than 5 cm.

All patients received 100 mg indomethacin in suppository form, followed by 25 mg suppository, every 6 hours up to 12 hours after uterine contractions ceased. When the contractions were reactivated, the treatment was reinstated. If the fetus was died in utero or cervical dilatation had progressed beyond 5 cm, the administration of indomethacin was discontinued. When the pregnancy was reached to the 37th week of gestation /or the estimated fetal weight was over than 2,500 gm, the treatment was stopped even if the contractions were present.

Results

Total dose of indomethacin was ranged from 100 mg to 1950 mg (mean 350 mg).

The mean interval between the initiation of indomethacin treatment and the delivery was amounted to 33.5 days (range 0-82 days).

The clinical outcome of pregnancy was shown in Table 1. In 11 patients (22.0%), the uterine contractions did not cease and lead to parturition within 72 hours after the initial administration. Twenty-three patients (46.0%), including 4 case whose membrane were ruptured after the initiation of treatment, prolonged their pregnancy more than 72 hours, but delivered in less than the 37th week of gestation. Sixteen patients (32.0%) have reached beyond the 36th week of gestation.

Fifty-two infants (including 2 cases of twin pregnancy) were delivered. The birth weight was less than 2,000 gm in 17 infants (32.7%) and was 2,500 gm or more in 24 infants (46.1%). Fortythree infants of all (82.7%) were survived (Table 2). Six neonatal death and three intrauterine death were observed in this series. No other cause was revealed in the cases of neonatal death except for prematurity.

Three cases followed by intrauterine fetal death were complicated with some diseases. Their clinical causes were follows:

The first case was treated by 300 mg of indomethacin at the 23th week of gestation, after then some medical treatment was continued for hepatitis. The second administration of indomethacin started at the 26th week of gestation and when the total amount reached to 475 mg, the fetus was suddenly died in utero.

The second case was complicated with severe toxemia. Indomethacin treatment started at the 31th week of gestation and total dose of 300 mg was given. The intrauterine fetal death was diagnosed 8 days after the last administration, when the toxemia was not recovered.

The third case had the onset of regular uterine contraction at the 35th week of gestation, when she was in therapy for hepatitis. Total dose of 200 mg indomethacin was administered and the fetal heart beats disappeared at 60 hours after the last administration. Autopsys were performed in these

Table 1 The effect of indomethacin on the prolongation of pregnancy.

Prognosis	No. of cases (%)	Gestational week at onset of treatment			
		-23 wks	24-27 wks	28-31 wks	32-35 wks
Parturition within first 2 days of treatment	11(22.0%)	0	2 ×	0	9 ××
Parturition after first 3 days before 37th week of pregnancy	23(46.0%)	4 ×▲	6 ××	6 ×▲	7 ▲
Birth at term	16(32.0%)	3	3	7	3
Total	50				

× Cases with premature rupture of membrane during treatment

▲ Cases of intrauterine fetal death during treatment

Table 2 Fetal outcome in different birth weight groups.

Birth weight (gm)	No. of babies (%)	Survived	Neonatal death	Intrauterine fetal death
-1,999	17(32.7%)	10	6	1
2,000-2,499	11(21.2%)	10	0	1
2,500-	24(46.1%)	23	0	1
Total	52	43	6	3

three fetus, closure of ductus arteriosus and the foramen ovale were revealed only in the third case.

In order to examine the adverse effects of indomethacin on the fetus, Apgar score and various abnormal findings of the newborn infant were observed.

There is no correlation between the Apgar score and the last administration-delivery interval (Table 3). Various disorders in live born infants were shown in Table 4 and 5. Those classified under cardio-pulmonary disorder included Respiratory Distress Syndrome in 7 infants, Massive Aspiration Syndrome in 3 and Ventricular Septal Defect in 1. It was also noteworthy that more than

half of infants had edemation on their extremities.

No correlation could be observed between the total dose of indomethacin or the last administration-delivery interval and the incidence of cardiopulmonary disorders.

We never noticed any significant changes in blood examination in pregnant women during and after the treatment. However, some adverse effects were noted. These included: epigastralgia in one patient with history of gastric ulcer, light headache in 2 patients, general malasia in nature and did not need any treatment, and administration of indomethacin was never discontinued for the reason of maternal side effects.

Table 3 Relation of Apgar score to the time elapsed between delivery and the final administration.

Time elapsed between delivery and the final administration	within 6 hrs	6-12 hrs	12-24 hrs	1-7 days	more than 1 week
10		○	○	○	○ ○ ○ ○
9	○ ○ ○ ○	○ ○		○	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○
8	○			○ ○ ○	○ ○
7	○	○			○ ○
6	○	○	○	●	○
5	○		○	○	
4			○ ○	○	
3	● ●				
2		○ ●			○
1		●			
0	●				

○ denotes babies with good prognosis ● denotes neonatal death

Table 4 Relation of abnormal findings to the time elapsed between delivery and final administration

Time elapsed between delivery and the final administration	within 6 hrs	6-12 hrs	12-24 hrs	1-7 days	more than 1 week
Cardio-pulmonary disorder	● ● ●	○ ○ ● ●		○ ○ ●	○
Bleeding tendency					○
Hyperbilirubinemia	○ ○	○		○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ○
Edema	○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ○ ●	○ ○ ○ ○ ○ ○ ● ●	○ ○ ○	○ ○ ○ ○ ○ ●	○ ○ ○
Uneventful		○			○ ○ ○ ○ ○ ○ ○

○ denotes babies with good prognosis ● denotes neonatal death

Table 5 Relation of fetal outcome and abnormal findings to the total dose of indomethacin

Total dose (mg)	-100	-200	-300	-400	-500	-600	-700	-800	-900	-1,000	1,000-
Cardio-pulmonary disorder	●	●●	○○	○	●●●○			○			
Bleeding tendency				○							
Hyperbilirubinemia	○○	○○	○○	○	○	○	○				○
Edema	○○○ ○●	○●	○○○ ○○○ ○○	○○○	●●	○○○		○		○	○○
Uneventful		○○	○○	○○	○					○	
Intrauterine fetal death		▲	▲					▲			

○ denotes babies with good prognosis ● denotes neonatal death
▲ denotes intrauterine fetal death

Discussion

It is a matter of common knowledge that the dominant cause of perinatal death is prematurity which will be greatly reduced by prevention of premature labor.

With a few exception, the etiology of premature labor remains obscure and the exact mechanism which will initiate the utrine contractions remains to be resolved.

In recent years, a functional role of prostaglandins in parturition is suggested by increase of prostaglandins concentration in human blood¹⁾ and amniotic fluid²⁾ during labor by the observation that exogenously administered prostaglandins can induce labor^{3,4)} and abortion^{5,6,7)}. It was also demonstrated that indomethacin have a inhibitory effect on prostaglandins synthesis⁸⁾ and diminish or eliminate the spontaneous uterine contraction in human⁹⁾.

Our clinical studies of indomethacin treatment on human premature labor demonstrated that 78% of all patients prolonged their pregnancies more than 72 hours after the initiation of treatment and that the survival infant rate was 82.7%.

These results may indicate the availability of indomethacin on human premature labor as the several investigators did^{10,11)}.

In the clinical use of indomethacin, it is important to study the adverse effects on the favorable effects. It has been mentioned that indomethacin induced gastro-intestinal complications and reduced maternal blood

coagulability. The most dreaded consequences of maternal administration of indomethacin are connected with the specific fetal effects. Indomethacin passes the placental barrier freely and may therefore inhibit the formation of prostaglandins in fetal tissues¹²⁾.

Prostaglandins play a role in the maintenance of the ductus arteriosus patency during fetal life¹³⁾ and indomethacin may trigger premature closure of this ductus¹⁴⁾. Our results demonstrated that the maternal side effects were minimal and transient, and did not cause to discontinue the administration of indomethacin.

On the other hand, three fetus whose mothers were complicated with toxemia or hepatitis were died in utero after the treatment of indomethacin, and one of them was revealed to have a closure of the ductus arteriosus.

In conclusion, it may be mentioned that indomethacin prevents the premature labor with a fair success by inhibition of uterine contractions. Nevertheless, indomethacin administration should be short in duration to minimize its side effect, and contraindicated for the pregnant women with severe complications.

References

- 1) Kalim, S. M. M.: Appearance of Prostaglandin F2α in Human Blood during Labor. Brit. Med. J. 4: 614, 1968.
- 2) Kalim, S. M. M. and Devlin, J.: Prostaglandin Content of Amniotic Fluid during

- Pregnancy and Labor. J. Obstet. Gynecol. Brit. Commonw. 74: 230, 1967.
- 3) Kalim, S. M. M., Trussel, R. R., Hillier, K. and Patel, R. C.: Induction of Labor with Prostaglandin F_{2α}. J. Obstet. Gynecol. Brit. Commonw. 76: 769, 1969.
 - 4) Kalim, S. M. M., Hillier, K., Trussel, R. R., et al.: Induction of Labor with Prostaglandin E₂. J. Obstet. Gynecol. Brit. Commonw. 77: 200, 1970.
 - 5) Embrey, M. P.: Induction of Abortion by Prostaglandins E₁, E₂. Brit. Med. J. 2: 256, 1970.
 - 6) Kalim, S. M. M., Filshie, G. M.: Therapeutic Abortion using F_{2α}. Lancet. 1: 157, 1970.
 - 7) Roth-Brandel, U., Bygdeman, M., Wiquist, N., et al.: Prostaglandin for Induction of Therapeutic Abortion. Lancet. 1: 190, 1970.
 - 8) Van, J. R.: Inhibition of Prostaglandin Synthesis as a Mechanism of Action for Aspirin-like Drugs. Nature. 231, 232, 1971.
 - 9) Zuckerman, H., Reiss, V. and Rubinstein, I.: Inhibition of Human Premature Labor by Indomethacin. J. Obstet. Gynecol. 44: 787, 1974.
 - 10) Wiquist, N., Lundstrom, V. and Green, K.: Premature Labor and Indomethacin. Prostaglandins. 10: 515, 1975.
 - 11) Grella, P. and Zanor, P.: Premature Labor and Indomethacin. Prostaglandins. 16: 1007, 1978.
 - 12) Parks, B. R., Jordan, R. L., Ranson, J. E. and Douglas, B. H.: Indomethacin Studies of Absorption and Placental Transfer. Am. J. Obstet. Gynecol. 129: 464, 1977.
 - 13) Kalim, S. M. M. and Amy, J. J.: Prostagl-

andins and Human Reproduction. In Scientific Basis of Obstetrics and Gynecology (R. R. MacDonald, ed.) 2nd. edit. p. 347 Churchill Livingstone, Edinburgh, 1979.

- 14) Coceani, F., Olley, P. M. and Bodach, E.: Prostaglandins, a Possible Regulator of Muscle Tone in the Ductus Arteriosus, Advance of Prostaglandin and Thromboxane Research (Samuelson, B. and Paoletti, R. eds.) Vol. 1. p. 417 Raven Press New York, 1976.

流・早産防止に対するインドメサシン治療について

水野金一郎, 奥村 豊, 生田 克夫

可世木久幸, 八神 喜昭

名古屋市立大学産婦人科学教室

今回我々は、妊娠16週から36週の間で、流・早産の徴候を示した50例(2例の双胎を含む)にインドメサシンによる治療を行なった。

総投与量は、最低100mgから最高1950mgまでで、投与開始から分娩までの平均延長日数は33.5日であった。

2例の双胎を含む52児中43児は救命しえたが、6児は新生時期に死亡し、3児が子宮内にて死亡した。6例の新生児死亡の原因は、児の未熟性以外には特別な理由は見あたらず、3例の子宮内胎児死亡においては、その母親が、妊娠中毒症かあるいは肝炎を合併していた。

今回の結果によれば、流・早産防止に対するインドメサシン治療は効果的であることがわかった。しかし、合併症のある例には、禁忌とした方が良いように思われた。

(受付: 昭和55年7月30日)

ヒト精子の客観的運動能解析法の開発—とくに Ficoll 溶液を用いた洗浄精子について

Development of a Multiple Exposure Photography Method for Analysis of Sperm Motility and Preparation of Washed Sperm with Ficoll Density Gradient

東京理科大学薬学部生理化学

兼子 智 森脇 千秋

Satoru KANEKO Chiaki MORIWAKI

Laboratory of Physiological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Science University of Tokyo

慶応義塾大学医学部産婦人科

佐藤 博久 小林 俊文 飯塚 理八

Hirohisa SATO Toshifumi KOBAYASHI Rihachi IIZUKA

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

精子運動能測定は顕微鏡観察によって運動率(%)を求める方法が広く採られているが、これには信頼性、再現性に乏しいという欠点がある。我々はストロボ発光による精子運動軌跡多重撮影により、運動様式の分別解析が可能な客観的解析法を開発した。また、精子生存性、運動能を損うことなく、高い回収率で洗浄精子を得る Ficoll 洗浄法を検討し、約87%の精子回収率と、ほぼ完全な精漿除去が可能であり、また洗浄精子の形態、運動が良好に保持されることを認めた。

この洗浄精子を用い、上記の多重撮影法によって精子運動に及ぼす生理活性ペプチド、ブラジキニンの影響を検討し、ブラジキニンは運動率にはあまり影響しないが、直線運動速度を増加させることを認めた。この結果は Schill らによるキニンの精子運動賦活に関する報告と一致し、また一層詳細な運動の解析を可能にした。したがって本実験系は精子運動能評価に有用であると考える。

緒言

男子不妊のうち、精子減少症、精子無力症に対する精子数、精子運動の改善は約20年前より試みられ、ホルモン剤、核酸前駆体、ビタミン剤、ATP 剤、カリクレイン剤などが用いられた¹⁾。これらの治療成績の検討は定期的な精液検査及び妊娠によってなされている。

妊娠成立に関与する男性側因子の中で精液検査は最も基本的なものであり、通常、精液量、精子数、精子運動能、奇型率などが測定されるが、このうち精子数及び精子運動能が最も重要な指標と考えられている。精子数は

トーマ氏算定盤等を用いることにより比較的正確に測定できるが²⁾、一般に精子活動度(運動能)は運動率(運動精子数/全精子数, %)で表現され、検査者が顕微鏡下に精液標本を観察して主観的に運動率を求める方法が最も広く行なわれている³⁾。しかし本法は妊孕性に直接関与すると考えられる直線運動精子⁴⁾と、あまり重要でないと考えられる波状、回旋精子等を区別して測定し難く、また本法は主観的方法であるために、信頼性、再現性に乏しいという欠点を有する。

一方、*in vitro* における精子の代謝、及び運動能に対する種々の物質の影響を検討する際、一般的には精液

をそのまま、または生理食塩水等で希釈したものを検体に用いたり、あるいはこれらを低速で遠心分離した洗浄精子を試験に供している。精漿には種々の糖、ホルモン、酵素、生理活性物質（特にプロスタグランジン）など精子代謝能、運動能に影響を及ぼす物質が含まれており⁹⁾、精漿の混在は実験結果の解析を複雑にしている。

しかし精漿を分離する目的で遠心分離を行うと、精子が機械的損傷を受け生存性、運動性の低下を招くことが指摘されている。

我々は臨床的、並びに基礎的研究に応用可能な客観的精子運動能解析法の開発を試み、精子運動様式の分別解析、再現性、記録の保存性、及び操作の簡易さなどの点から、ストロボ写真を用いて精子の運動軌跡を一定時間露出して測定する方法を開発した。さらに精子生存性、運動能を損うことなく、高い回収率で洗浄精子を得る Ficoll 洗浄法を併せて検討し、この洗浄精子を用いた客観的精子運動能解析法を確立したので報告する。

方 法

精液：慶応義塾大学病院産婦人科家族計画相談所にて採取した精液のうち、精子数 $4 \sim 6 \times 10^7/\text{ml}$ 、運動率 60% 以上のものを用いた。採取は 4 日以上禁欲後、用手法にて採取して射精後 2 時間以内に使用した。

ブラジキニン分解活性測定法：モルモット回腸を用いたマグヌス法により行った。合成ブラジキニン 100ng と試料を pH 8.0、30° で一定時間インキュベートした後、摘出回腸片を懸垂し、タイロド液を満したオルガンバス内に投与して残存ブラジキニンによる回腸片収縮高を記録した。予め作製した検量線から残存ブラジキニン量を求め、試料のブラジキニン分解活性を算出した。

酸性フォスファターゼ活性測定法：基質溶液 (5 mM P-ニトロフェニルリン酸ナトリウム、0.1M クエン酸緩衝液、pH 4.8) 1 ml と試料 0.2 ml を 30°、20 分間インキュベートした後、0.2N NaOH、2.0 ml を加えて発色させ、予め作製した P-ニトロフェノール検量線から基質分解量を求めた⁹⁾。

結 果

顕微鏡写真撮影法：撮影条件（露光条件、発光間隔等）の検討を行ない、以下に示す方法で測定した。撮影装置を Fig. 1 に示す。

西川式保温盤を顕微鏡ステージに装着して 37° に保ち、精液または洗浄精子をスライドガラス上にとり約 30 秒間保温盤上に静置した。

顕微鏡下 (×400)、暗視野において 1 秒毎に 3 回ストロボを発光させ、精子運動の軌跡を撮影した。通常、測

定は 1 検体につき視野を変えて 3 回行なった。

現像したフィルムを映写し、精子運動の軌跡を紙上に記録した。Fig. 2 に示すように直線運動精子は連続した 3 点として示され、振旋精子は同一位置において重複した像を示し、また非運動精子は明瞭な像として撮影された。直線運動精子は移動距離を線分として、振旋精子は Δ で、また非運動精子は ∇ で紙上に記録した。さらに線分はカーブメーターを用いて集計し、予め撮影しておいたマイクロメーターを同一条件下に映写して移動距離を μm に換算した。測定に際して一視野の精子数は 40 以上として、更に 3 回撮影した平均値を測定値とした。精子運動率、直線運動精子平均速度を以下に示す式より算出した。

$$\text{精子運動率 (\%)} = \frac{\text{直線運動精子数} + \text{振旋精子数}}{\text{全精子数}} \times 100$$

$$\text{直線運動精子平均速度 } (\mu\text{m}/\text{秒})$$

$$= \frac{\text{直線運動精子移動距離総計}}{\text{直線運動精子数} \times 2}$$

培養液の検討：一般に *in vitro* における精子培養には生理食塩水⁷⁾または Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer⁸⁾などが用いられる。本研究においてもこれらの使用を検討した。新鮮精液を直ちに遠心分離 (500×g, 10 分, 25°) して得た沈澱精子をこれらの培養液に再懸濁した後、運動能の経時変化を調整後 2 時間まで観察した結果、培養中の pH 変化や通気によって運動能がほとんど失われることを認めた。そこで HEPES-NaOH を緩衝系とした Harrison 液⁹⁾を用いたところ、経時的な pH 変化もなく精子運動能は原精液とほぼ同程度に保たれた。Harrison の原法⁹⁾では同液中にウシ血清アルブミン、抗生物質等を加えるが、ウシ血清アルブミン自身が精子生理に影響するという報告¹⁰⁾もあり、実験系を単純化するという目的から、本研究においてはウシ血清アルブミン、抗生物質を除いた modified Harrison 液 (20 mM HEPES, 10 mM グルコース, 2 mM Na₂HPO₄-4 mM MgCl₂, 2.5 ml N-KOH, 7.5 ml N-NaOH/1 l, pH 7.5, 290~300 ミリオスモル) を培養液として用いた。以下の文では同液を MH 液と称する。

精子洗浄法：Harrison らは密度勾配遠心分離用担体である Ficoll (Pharmacia) を用いてウシ、ヒツジ精子洗浄法を報告した⁹⁾。

すなわち 7.5% (w/v) Ficoll 溶液に精液を層積し、500×g 5 分, 1200×g, 10 分の 2 段階遠心により精子を沈澱させて洗浄した。我々は本法をヒト精子洗浄に応用しようと試みたが、ヒト精液は密度が大きく Ficoll 層に層積できず、また 1200×g, 10 分の遠心条件では著しい運動能の低下を生ずることを認めた。

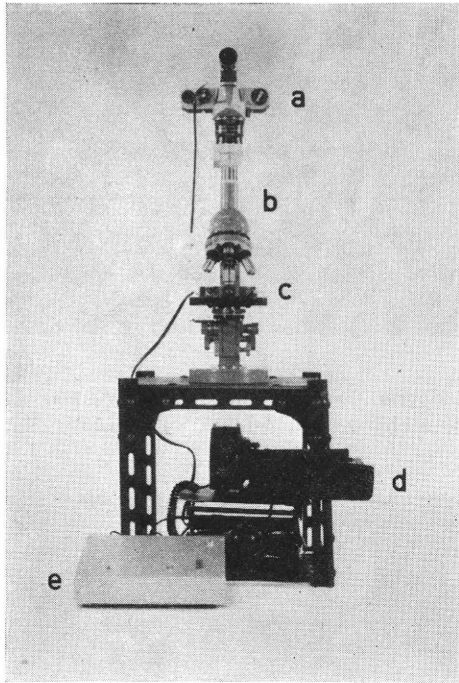


Fig. 1 Multiple Exposure Photography Method for Sperm Motility Measurement
 a : Camera
 b : Microscope
 c : Thermal Insulation Plate
 d : Stroboscope
 e : Stroboscope Pulse Regulator

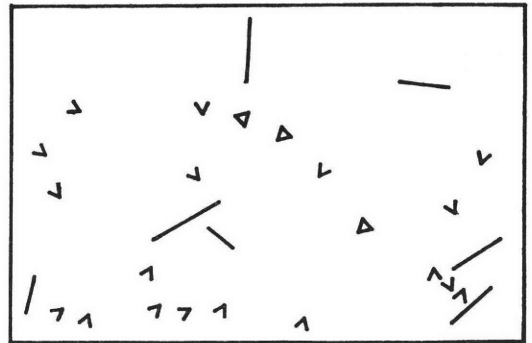
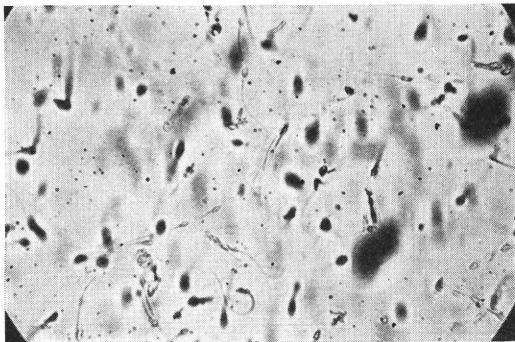


Fig. 2 Analytical Procedures of Photographed Sperm Motility
 — : Forward motile sperm Δ : Submotile sperm ∇ : Nonmotile sperm

そこでヒト精子に応用できる洗浄条件を検討した結果、精液を MH 液で 2 倍に希釈することにより安定した層積が可能となった。

さらに遠心条件の検討を行ない、 $150\times g$ 、 $250\times g$ 、 $500\times g$ 、各 10 分間遠心分離における精子回収率、運動能を調べた結果、 $150\times g$ では運動能は原精液と同程度に保たれたが、回収率が 50% 以下であり、また $250\times g$ 、 $500\times g$ では約 90% の回収率と同程度の運動能が保たれ、良好な結果を得た。しかし $500\times g$ では精子以外の精液成分が多数混入することを認めたので、 $250\times g$ 、10 分の条件で遠心分離を行なうこととした。以上検討した洗浄条件から次に述べる洗浄法を確立した。

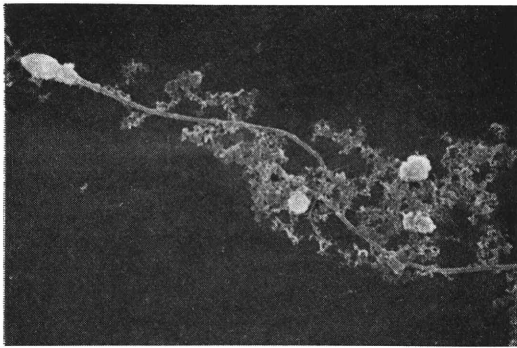
7.5% (w/v) Ficoll を含む MH 液 5 ml を試験管に

分注し、同液で 2 倍に希釈したヒト精液 1 ml を注意深く層積する。スウィングローター (KOKUSAN, H103 N) に装架して $250\times g$ 、10 分間遠心分離した後、Ficoll 層及びその上に残存した精漿を除去し、沈澱精子を 0.5 ml の MH 液に再懸濁して、これを洗浄精子とした。

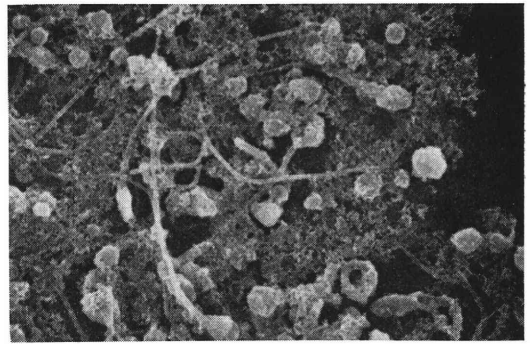
洗浄精子の評価：

a. 形態学的観察

Ficoll 洗浄法または生理食塩水で 5 倍に希釈した精液を $250\times g$ 、10 分遠心分離して調整した洗浄精子を、グルタルアルデヒド、オスミウム酸を用いて二重固定した。常法に従い電子顕微鏡用試料を作製して走査電子顕微鏡 (JSM-T20) を用いて精子の形態学的観察を行なった。Fig. 3 に示すように Ficoll 法で洗浄した精子 (Fig. 3

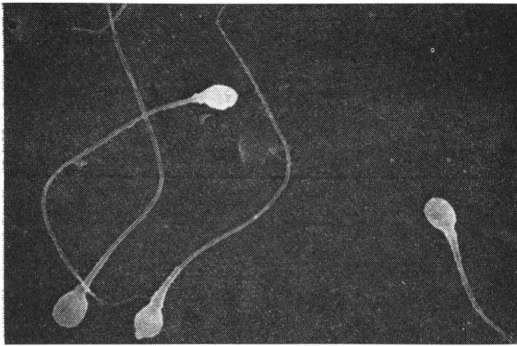


×2000

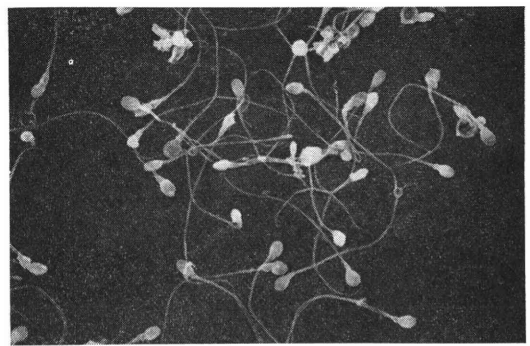


×2000

Fig. 3-a Scanning Electron Micrographs of Human Sperm Washed with Control Method
Semen was diluted 5 times by modified Harrison's solution and centrifuged (250×g, 10min). The sedimentated pellet was resuspended in the medium



×2000



×1000

Fig. 3-b Scanning Electron Micrographs of Human Sperm Washed with Ficoll

b)は、希釈精液を単に低速遠心分離して得た精子(Fig. 3, a)と比べ、精漿成分の精子表面への吸着がほとんど認められず、また遠心分離法により精子を洗浄する際問題となる精子頭部や中片部の損傷が少なく、正常な形態が保持されていた。さらに Ficoll 法で洗浄した場合、沈澱精子の凝集が少なく再懸濁が容易であった。

b. 精子回収率

Ficoll 洗浄後、原精液と等量の MH 液に再懸濁した洗浄精子をホルマリン固定して、トーマ氏算定盤を用いて精子数を測定した結果、 $87 \pm 3.4\%$ (n=10) の精子が再懸濁液中に回収されていることを認めた。

c. 精漿除去率

精漿中に存在するブラジキニン分解酵素並びに酸性フォスファターゼ活性を指標として、洗浄精子再懸濁液中への精漿成分残存率を測定した。Fig. 4 に示すように指標にした両酵素の活性は1回の洗浄により原精液の2~3%に減少し、約97%の精漿成分が除かれたと推定される。また洗浄を反復することによりさらに精漿除去率が上昇したが、同時に精子回収率が約60% (2回)、約

40% (3回) と減少するため、Ficoll 法による洗浄は1回が適当であると考えられる。

d. 洗浄の運動能に及ぼす影響

精液を二分して、一方を Ficoll 法により洗浄した。調整した洗浄精子と原精液を各々室温で培養し、両者の運動能を経時的に比較した(Fig. 5)。両者の運動率、直線運動精子平均速度にはほとんど差がなく、洗浄後も原精液とほぼ同等の運動能が保持されることを認めた。

精子培養温度の検討: 精子培養温度は精子生存性、運動能に大きく影響することが知られている。洗浄精子を室温(22°)及び37°で培養して運動能を測定し、培養温度条件を検討した。精子運動速度は22°より37°の方が速いため測定は37°で行なった。

すなわち、22°で培養した精子をスライドグラス上にとり、37°にした保温盤(Fig. 1, c)で約30秒間静置して精子懸濁液が37°となった後、写真撮影を行なった。Fig. 6 に示すように37°で培養した場合は、22°と比べ運動率、直線運動精子平均速度の経時的劣化が著しく、培養は22°で行なうことが適当と考えられる。

ブラジキニンの精子運動能に及ぼす影響：本研究において確立した Ficoll 洗浄ヒト精子を用いた客観的運動能解析法により、生理活性物質ブラジキニンの精子運動能に及ぼす影響を検討した。最終濃度 1 ng/ml となるようにブラジキニンを洗浄ヒト精子懸濁液に加えて経時的に運動能を解析した結果、Fig. 7 に示すようにブラ

ジキニン添加により精子運動率には顕著な差はなかったが、直線運動精子平均速度の増加を認めた。

考 察

従来の精子運動能測定は臨床的にも、基礎的にも検査者が主観的に運動率を観察する方法⁹⁾が汎用されてきた。従来の方法は簡便ではあるが、信頼性に乏しく、得られる情報も限られている。元島らは女性々管内の精子移動を観察し、卵管内到達精子数は子宮内に注入した精子数、特に直線運動精子数と深く相関していると報告している⁹⁾。このことからも妊孕性に直接関与すると考えられる直線運動精子と、その他の精子(振旋、波状運動等)を分別して測定することが重要であり、精子運動能解析は客観的、かつ精子運動様式を分別して解析することが望ましいと考えられる。

客観的解析法としてこれまでにいくつかの方法が報告されているが、代表的なものはトーマ氏算定盤の小四分面の一辺を出入する精子を観察する方法¹¹⁾、顕微鏡写真¹²⁾または映画¹³⁾を撮影して運動の軌跡を解析する方法、さらにはレーザー光線を用いて精子運動による光散乱を測定して、直接精子運動量を解析する方法^{14,15)}なども報告されている。今回我々は特に精子運動様式の分別解析を目的として顕微鏡写真法の適用を検討した。本法は写真現像後でなくては結果が得られず、即時性という点では主観法に劣るが、一視野の解析時間が約30秒程度と簡便であり、また特殊な装置も必要とせず、ストロボ発光装置も比較的安価である。

さらに本法は検査結果の保存性、高い信頼性、得られる情報の多様性という点から、臨床的、基礎的応用が可能であると考えられる。また本研究で同時に検討したヒト精子洗浄法と本法を組み合わせることにより *in vitro* にお

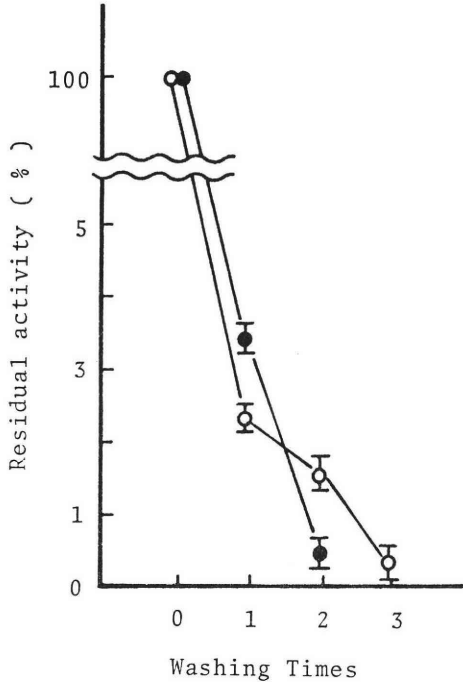


Fig. 4 Washing Efficiency of Human Sperm by Density Gradient of Ficoll

- : Bradykinin degrading enzyme
- : Acid phosphatase
- (with error bar) : Mean ± s.e. (n=6)

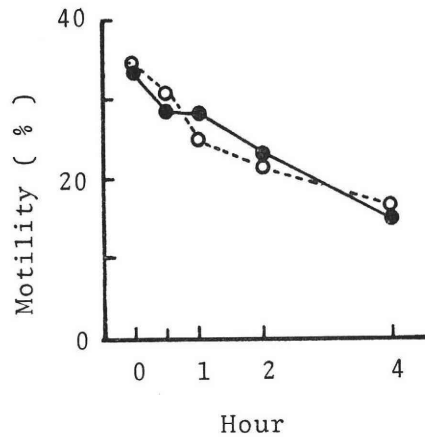
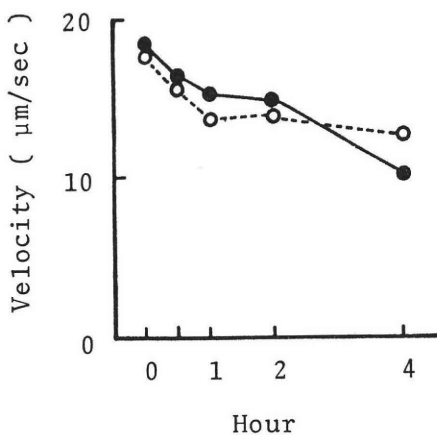


Fig. 5 Comparison of Motilities between Ficoll washed and Native Human Sperm
 —●— : Native sperm ···○··· : Ficoll washed sperm

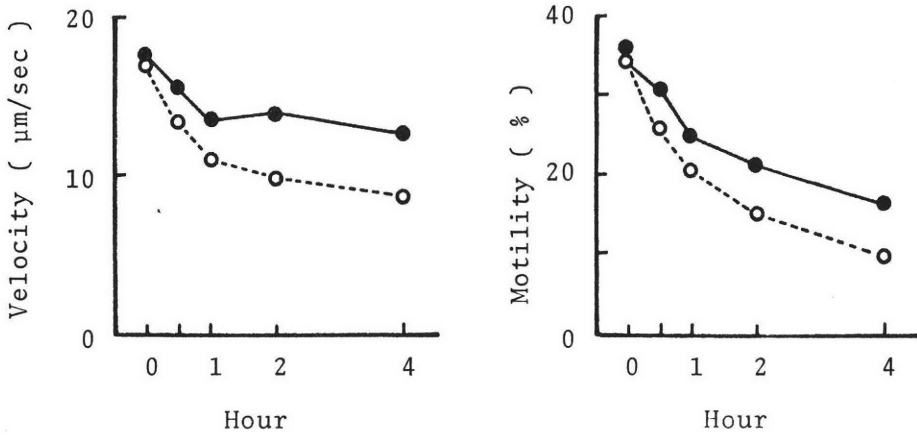


Fig. 6 Influence of Temperature on the Motility of Washed Human Sperm

—●— : 22°○..... : 37°

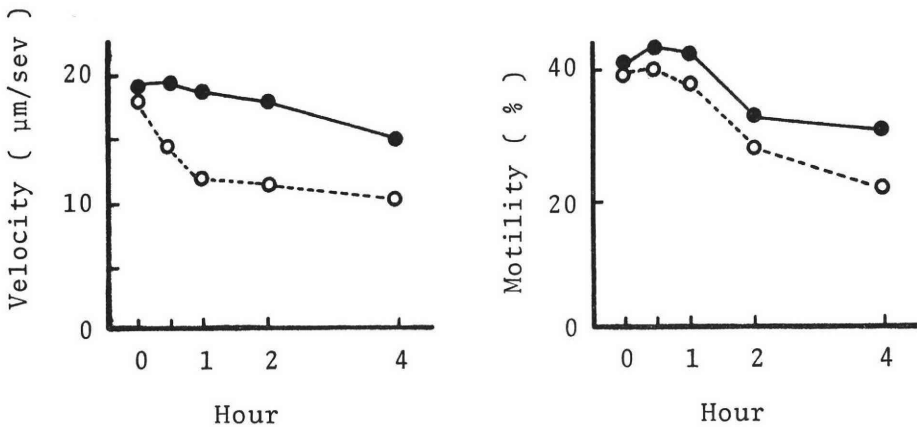


Fig. 7 Effect of Bradykinin on the Motility of Ficoll Washed Human Sperm

Washed sperm suspension (0.3ml) and 0.1ml of bradykinin (4ng/ml) were incubated in a small plastic test tube at 22°

.....○..... : Control —●— : Bradykinin

ける客観的精子運動能解析系を確立した。

Schill らは生理食塩水で希釈したヒト精液にブラジキニンを追加して主観法⁷⁾またはレーザードップラー法¹⁵⁾により精子運動能を測定して、ブラジキニンが運動能を賦活することを報告した。しかし、精漿中には強いブラジキニン分解酵素活性が存在しており¹⁶⁾、精液に直接ブラジキニンを適用してその作用を検討することには問題があると考えられる。

今回用いた洗浄精子は Fig. 4 に示したようにブラジキニン分解酵素を始めとして約97%の精漿成分が除去されていると考えられ、より単純化された系における検討が可能となった。

また顕微鏡写真を用いた運動能解析により、ブラジキニンの精子運動賦活は運動率よりむしろ直線運動速度を増加させていることを認めたが、本法は主観法における

運動率、レーザードップラー法における総運動量では表現し得ない、運動様式を分別して解析することが可能であり、今後種々の精子研究に応用し得ると考える。

謝 辞

終りに本研究に対し有益な御助言を賜わった農水省畜産試験場、和出靖博士、千葉大学工学部画像工学科田島恵樹先生並びに実験に御協力をいただいた押尾茂氏に深甚の謝意を捧げます。

文 献

- 1) 石神襄次：性II，男性不妊，16(9)，1425，中山書店，1979.
- 2) 西川義正：飯田勲編，哺乳類の精子，207，学窓社，1972.
- 3) 西川義正：飯田勲編，哺乳類の精子，203，学窓

社, 1972.

- 4) 元島正信: 精子の女性性器内移動について, 日不妊会誌, 20, 86, 1975.
- 5) 島崎 淳, 片山 喬, 相川英男, 柳 重行: 性 I, 精液の生化学, 16(4), 119, 中山書店, 1979.
- 6) G. Schmidt, P. D. Boyer, H. A. Lardy and K. Myrback: The enzymes, 5, 37, Academic Press, 1961.
- 7) W. B. Schill: Influences of kallikrein-kinin system on human sperm motility *in vitro*, Kininogenase 2, 47, F. K. Schattauer Verlag, 1975.
- 8) T. Mann: The biochemistry of semen and of the male reproductive tract, 77, John Wiley and Sons Inc, 1964.
- 9) R. A. P. Harrison: A highly efficient method for washing mammalian spermatozoa, J. Reprod. Fert., 48, 347, 1976.
- 10) B. K. Davis: Influence of serum albumin on the fertilizing ability *in vitro* of rat spermatozoa, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 151, 241, 1976.
- 11) 石井延久, 光川史郎, 白井将文: 精子運動率算定法の再検討, 日不妊会誌, 21, 64, 1976.
- 12) J. Janick and J. Maclod: The measurement of human spermatozoa motility, Fertil. and Steril., 21, 140, 1970.
- 13) D. M. Phillips: Comparative analysis of mammalian sperm motility, J. Cell Biol., 53, 561, 1972.
- 14) P. Jouannet: Measurement of human sperm motility on an optical doppler effect, 427, Urban and Schwarzenberg, 1979.
- 15) R. Hartman, R. Steiner, N. Hofman and R. Kaufman: Effect of the kallikrein-kinin system and prostaglandin E on the motility of human spermatozoa measured by the laser-doppler method, 311, Kinins II, Plenum, 1979.
- 16) D. Depierré, J. P. Bargetzi and M. Roth: Dipeptidyl carboxypeptidase from human seminal plasma, Biochim. Biophys. Acta., 523, 469, 1978.

Development of multiple exposure photography method for analysis of sperm motility and preparation of washed sperm with ficoll density gradient

Satoru Kaneko and Chiaki Moriwaki

Laboratory of Physiological Chemistry,
Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Science University of Tokyo

**Hirohisa Sato, Toshifumi Kobayashi
and Rihachi Iizuka**

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

The analysis of sperm motility is usually performed by micrographic observation, however, it is subjective and often yield inaccurate data. We attempted to develop an accurate and objective method to analyse sperm motility, which capable to distinguish the modes of movement. For this purpose, the multiple exposure photography technique by which the migration of sperm in 2 sec was recorded stroboscopically on a film was devised and it became possible to analyse the modes of sperm motility in terms of the percent of motile ones and of their velocities of forward movement.

Seminal plasma contains various substances such as enzyme, hormones and prostaglandins, etc, which may affect on the sperm metabolism, therefore, the elimination of seminal plasma is important in evaluation of the quality of sperm itself. A washing procedure with Ficoll, an agent for density gradient for cells, was applied for washing of human sperm. Semen was diluted with an equal volume of the modified Harrison's solution and layered on 7.5% (w/v) of Ficoll. Sperm pellet which was sedimentated by centrifugation (250×g, 10 min, 25°) was resuspended in the modified Harrison's solution. By this method the sperm recovery was 87%. They kept good motility, and in morphological comparison by electron scanning microscope with the sperm which was washed regularly with saline, there was little contamination of seminal plasma in Ficoll washed sperm.

By the aid of the present washing and analysing methods, the effect of bradykinin, a physiological active peptide, on the sperm motility was studied. It was observed that sperm in a medium contained 1 ng/ml bradykinin increased the velocity of forward movement, but there was little raise in the percent of motility. This result is in good agreement with other previous reports. The present system should be useful to the detail analysis of sperm motility.

(受付: 昭和55年6月27日)

INTRAVAGINAL CONTRACEPTIVE SPONGE IMPREGNATED WITH NONOXYNOL-9. THE DEVELOPMENT OF SPONGE FOR CLINICAL EFFICACY TRIALS

Ryoko TAKANO, M. D.

Department of Obstetrics and Gynecology School of
Medicine, Keio University, Tokyo, Japan
(Director: Professor Rihachi Iizuka)

Abstract: Newly designed intravaginal polyurethane sponges containing the spermicide, nonoxynol-9, were developed for contraceptive purposes. The sponges were made by the polymerization of urethane monomers in a solution of nonoxynol-9. This new biomaterial is analogous to a large, thick cervical cup with a dimple in the center for ease of insertion and positioning to the cervix (and external os). There is no need of precoital planning or preparation for usage of this sponge.

The release of the spermicidal agent from the sponges was first determined by soaking the sponges in saline and squeezing the nonoxynol-9 solution from them. In order to determine the actual amount of nonoxynol-9 released from the sponge, 2 analytic techniques were used. One method was ultraviolet spectroscopy and its accuracy ranged from 85% to 97%. The other was bioassay for the spermicidal activity and its accuracy ranged from 100% to 124%.

To simulate the the actual wearing of the sponge by a patient, the sponges were soaked in a large volume of saline and almost 50% of the spermicidal agent was released during the first 24 hours.

In conjunction with the laboratory studies, a limited study to determine acceptability of the devices was investigated in normal women. The women were asked to wear the sponges for 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 consecutive days. It was found that all women in the population could not tolerate the sponge longer than 5 days due to the malodor.

Thus, with the good release rates for 2 to 4 days and patient acceptability for 2 days of wear, a protocol for the use of the intravaginal sponge as a 2-day-use device was established.

Introduction

The intravaginal contraceptive sponge is one of the oldest methods of contraception¹⁾ acting as a simple mechanical barrier over the cervix. The early sponges used were probably the natural sea sponges. More recently, Chvapil developed and tested a sponge synthetically made from collagen²⁾. Chvapil and his co-workers found that this form of the barrier method was readily accepted by women³⁾.

Recently, a vaginal sponge made of totally synthetic, polyurethane was developed. The sponge concept was chosen for its potential mechanical compliance; open celled, hydrophilic properties were incorporated to allow absorption of the sperm. One major advantage of this system is the facile incorporation of the spermicide, nonoxynol-9, into the polymer matrix. This nonoxynol-9 is a type of soap and foams or suda upon contact with water.

Major determinants of the sponge size

(acceptability) were postcoital observations of sponges by gynecologists, and comments of the users and their partners concerning the ease of sponge insertion/removal and comfort during intercourse.

Some sponges were found in another area of the fornix after intercourse and some women claimed that sponges came out when they coughed or put abdominal pressure. For these reasons, the sponge shape was changed from the original simple rounded surface to the current one-side dimpled one.

Materials and Methods

I. Materials

Polymeric Vaginal Sponge (Fig. 1a, b).

The sponge is polyurethane sponge and standard components are as follows:

1. Urethane foam prepared from an isotonic capped hydrophilic polyoxyethylene polyol polymer.

2. Nonylphenoxy poly (ethyleneoxy) ethanol-9 commonly referred to as nonoxynol-9, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, by weight of sponge.

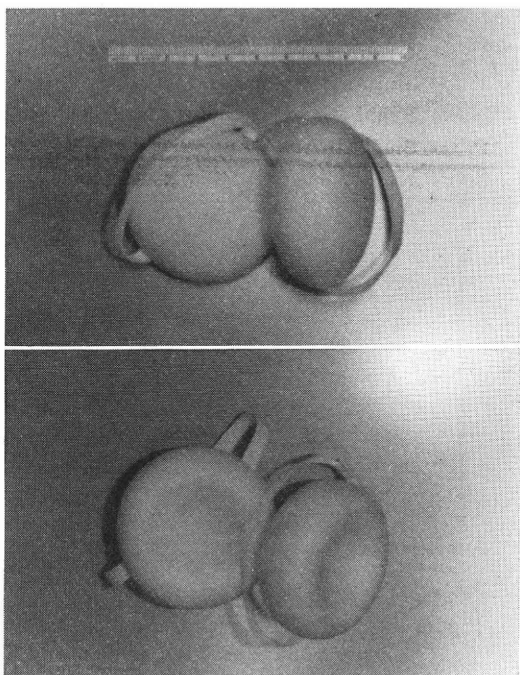


Figure 1 Photograph of Sponge

a) Original

b) Dimple Modification

3. Purified water (USP)
 - *4. Citric acid (USP) Citric acid
 - *5. Sodium hydroxide (USP)
 - *6. Benzoic acid (USP) Preservatives
 - *7. Ascorbic acid (USP)
 - *8. Sodium metabisulfite (ACS)
 9. Polyester (100%) woven tape
- *4, 5 was added to adjust pH and to increase the spermicidal activity.
*6, 7, 8 were added to make long-term multiple use possible.

The diameter of the wet sponge is about 6 cm and when dry shrinks to about 4 cm.

The polyester tape is molded into the sponge to aid the removal from the vagina. The polyester tape is inert to the components of the sponge.

II. Method

1) Analytic Method

a) Extraction of nonoxynol-9 from sponges.

After the washing and incubation experiments, all the sponges were extracted with chloroform to determine the amount of nonoxynol-9 left in them. 50 ml of chloroform was added to a sponge in a beaker and allowed to equilibrate for 5 minutes. The chloroform soaked sponge was then squeezed to remove the chloroform extract which was collected through a funnel into a tared plastic beaker.

Each sponge was extracted 4 times with each extract collected in a separate beaker. The extracts were then dried under a stream of nitrogen gas. Additional extraction yielded no more nonoxynol-9 and resulted in the disintegration of the sponges.

b) Gravimetric Analysis

The dried chloroform extracts were weighed on a single pan Mettler macro balance, model number B-5. The sum of the 4 extracts was assumed as equal to the total amount of nonoxynol-9 contained in the sponges. Particles of the sponges and crystals of NaCl which may have been present in the extracts were subtracted from the weight.

c) Ultraviolet (U. V.) Spectrum

The U. V. spectrum of nonoxynol-9 was determined using a Cary 14 spectrophotometer with matched quartz cuvettes. Dried samples were reconstituted with 200 ml of

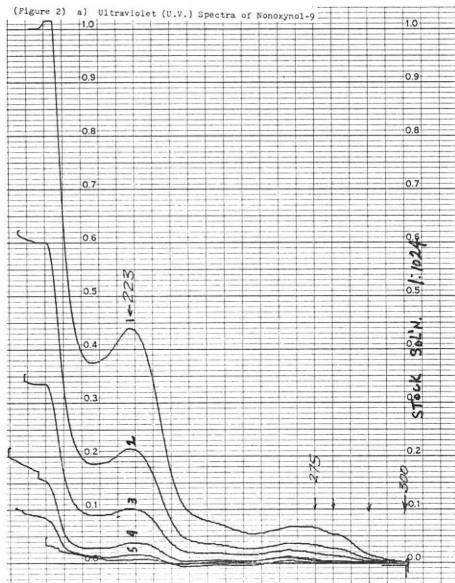


Figure 2 a) Ultraviolet (U. V.) Spectra of Nonoxynol-9

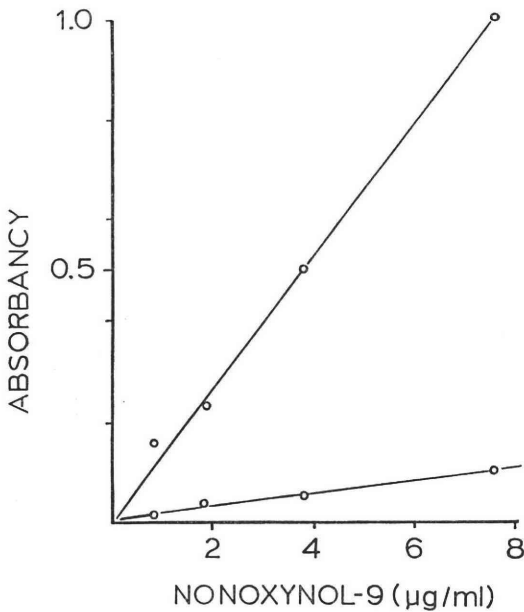


Figure 2 b) Standard curve for nonoxynol-9 at 223 nm and 275 nm.

saline or distilled water. With known amounts of pure nonoxynol-9, a standard curve was made. (Fig. 2-a)

d) Bioassay (Spermicidal Test)^{4,5,6,7).}

A known amount of pure nonoxynol-9 was serially double diluted with physiological saline to a concentration range of 250 to

1.95 micrograms per milliliter. Each assay was run in triplicate as follows: 50 microliters of diluted nonoxynol-9 was put in 10×75 mm glass tubes. Freshly collected semen was diluted with modified Ringer's solution (pH=7.8)⁸⁾ to a sperm density of 10 million sperm per ml and 50 microliters of this stock solution was added to the tubes of nonoxynol-9 dilution tubes.

Immediately after the addition of the stock solution of the diluted semen, the contents of the tubes were mixed gently by a vortex mixer and a drop of the mixture was placed on a prewarmed glass microscope slide. A cover slip was applied and motility and quality (Table I) were checked within 30 seconds after the semen addition 8-10 fields were examined at 400X which was preadjusted. The minimum concentration of nonoxynol-9 required to stop all the sperm motility after 30 seconds was defined as the spermicidal activity. The median value of the triplicate determinations was used for each result. (Fig. 3)

Table I Definition of sperm quality.

+4	Very Rapid <i>Progressive</i> Motility
+3	Rapid <i>Progressive</i> Motility (Normal)
+2b	Sluggish <i>Progressive</i> Motility
+2a	Rapid <i>Non Progressive</i> Motility
+1	Sluggish <i>Non Progressive</i> Motility
0	No Movement

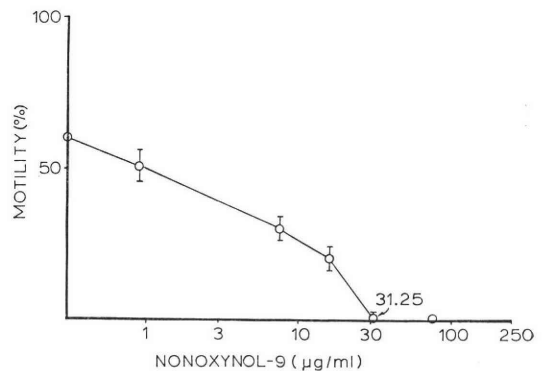


Figure 3 Standard curve of nonoxynol-9 spermicidal activity. Stock solution: Sperm (10⁸/ml), motility (60%), Quality (+3). Mean and standard deviation for each concentration (N=30).

Table II Results of Short Equilibration.

Sponge code No.	Composition					pH of Eluate Rinse Number										Rinse where spermicidal effectiveness is lost				
	Urethane only	10 : nonox	20 : nonox	30 : nonox	Preservatives	Citric acid	1	3	5	8	10	15	20	30	40	0	3	5	10	20
1	●						6.6	6.6	6.4	6.4	6.2	6.2	6.2	6.2	5.8	●				●
2			●				7.9	7.0	6.4	6.5	6.4	6.1	6.2	6.1	5.9					
3				●			4.7	4.6	4.6	4.5	4.5	4.6	5.0	5.2	5.4	●				
4					●		7.0	6.6	6.6	6.2	6.2	6.1	6.2	5.9	5.8					●
5						●	3.4	3.2	3.3	3.5	3.6	3.6	3.9	4.2	5.2	●				
6					●		4.7	4.8	4.8	5.4	5.4	5.5	5.6	5.7	5.8					●
7						●	3.5	3.3	3.2	3.2	3.3	3.6	3.6	4.1	4.7	●				
8							8.4	7.8	6.7	6.4	6.2	6.1	6.2	5.9	6.0		●			
9							8.0	7.0	6.8	6.8	6.2	6.0	6.0	5.8	6.2			●		

(c)

(b)

(a)

All the semen was obtained at the lab from the healthy young donors whose semen was normal, and used within one to one and half hours after ejaculation.

2) Model Release Rate System

a) Short Equilibration

20 ml of physiological saline was added to the sponge containing various amounts of nonoxynol-9 (Table II-a) and allowed to equilibrate for 5 minutes until the saline was fully absorbed into the sponges. The sponges were then firmly squeezed with a gloved hand to recover all the fluid absorbed into the sponges. Each eluate was collected in a beaker and the volume measured. Each sponge was rinsed 40 times and eluates were individually labelled and stored in 20 ml scintillation vials until the nonoxynol-9 contents were measured.

This test was basically an analogue for user's washing to find the critical point where the spermicidal effectiveness was lost.

b) Long Equilibration.

Six sets of sponges containing 10, 20, 30, 40, 50, and 60 percent nonoxynol-9 were used in this phase of the study. Each sponge was placed in a 600 ml beaker with 300 ml of physiological saline. The beakers containing the sponges were incubated in a 37°C water bath with slow agitation (25 cycles/min) for 24 hours, 2 days, 3 days, 4 days and 5 days.

At the end of each incubation period, the sponges were removed from the beakers and the elute which came out spontaneously from the sponge was collected. The sponges were then squeezed and the amount of nonoxynol-9 was determined. This test was intended as an analogue to women's wearing of the sponges.

III. Clinical Acceptability Trial

Nine normal cycling women (age 21-36) with periods ranging from 29 to 32 days were selected. The women were asked to wear the sponges according to the instructions as follows. Regardless of their marital status, there were no major differences among the subjects in terms of their sexual history. Three of the somen tried the sponges containing the citric acid.

They were instructed to begin the study

one day after the last evidence of bleeding from menses. The sponges were to be worn for one day, followed by a new sponge to be worn for 2 days, etc., until wearing one for 7 consecutive days.

The women were requested to refrain from coital activity or to have the partner use a condom during coitus.

All the clinically used sponges were extracted with chloroform, and U. V. and spermicidal analyses were performed to determine the amount of nonoxynol-9 remaining in the sponges.

Results

Gravimetric Analyses and Spermicidal Analyses

Prior to the experiments described, seven samples of nonoxynol-9 from four manufactures were tested for spermicidal activity in the bioassay. Each sample was mixed well before use. The spermicidal activity of the seven samples ranged from 15.6 to 31.2 micrograms per milliliter (one dilution range). The higher number of these two was taken as the standard spermicidal activity, which was 31.2 micrograms per milliliter.

The gravimetric recovery varied from 105 of theoretical to 239% with a mean recovery of 178.5% (Table III).

Therefore, determination of nonoxynol-9 by gravimetric analysis was unreliable and was abandoned in favor of the U. V. analysis.

Table III Percent Recovery of Nonoxynol-9 By Different Analytic Methods.

Concentration of Sponges	Analytic Method	Gravimetric (%)	Bioassay (%)	U. V. (%)
10% (n=20)		199	100	85
20% (n=20)		239	101	97
30% (n=20)		226	124	91
40% (n=18)		171	106	92
50% (n=20)		131	105	99
60% (n=20)		105	121	98
Mean+S.D.*		178.5 +53.0	109.5 +10.4	93.7 +5.4
(C.V.*(%))		29.7	9.4	5.8

*S.D. : Standard Deviation

*C.V. : Coefficient Deviation

U. V. Analysis

The spectrum of nonoxynol-9 was determined between 300 to 200 nm⁹⁾. Two peaks were observed at 275 and 223 nm (Fig. 2-b). Each peak followed a Beer's law relationship. With known amounts of nonoxynol-9 serially diluted, standard curves were made for each peak.

The extinction coefficients of nonoxynol-9 were linear to absorbance of 2.0 at both wavelengths and were 0.0021 and 0.256 milliliters per microgram for 275 nm and 223 nm respectively. At 223 nm, values as low as 0.25 micrograms per milliliter were detectable and as protein absorption is minimum at this wavelength¹⁰⁾ it was used in the assay.

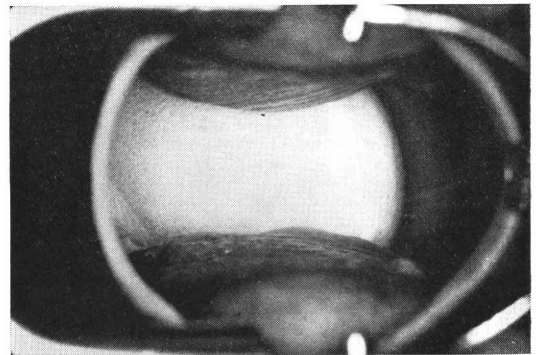


Figure 4 Photograph of vaginal sponge placed in vagina

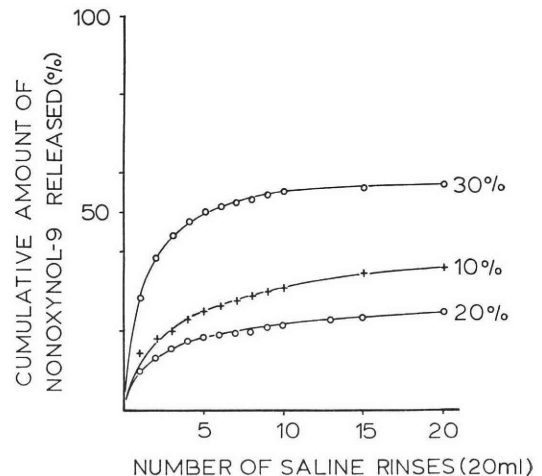


Figure 5 Cumulative percent of nonoxynol-9 released per rinse for 10% (300 mg), 20% (740 mg), and 30% (1270 mg) nonoxynol-8 containing sponges (N=3 per set).

The results using the different analyses were compared. (Table III)

The bioassay results range from 100 to 124% recovery with a mean of 109.5% while the values attained from U. V. range from 85 to 97% with a mean recovery of 93.7%. Control sponges which do not contain nonoxynol-9 had an average extractable mass of 240 milligrams using the gravimetric analysis. Neither the bioassay nor U. V. analysis showed any existence of nonoxynol-9 in the reconstituted solution.

Short Equilibration

In one series of experiments, sponges containing various amounts of nonoxynol-9 (10, 20, 30%) also contained preservatives and a citric acid (pH adjuster) (Table II(b) alone or in combination with 30% nonoxynol-9. The results of the bioassays are shown in Table II(c). Spermicidal activity was found only in the eluate from sponges containing nonoxynol-9.

Spermicidal activity was lost by the third rinse with the sponges containing 19% nonoxynol-9, by the fifth rinse with the 20% sponges and by the twentieth rinse with the 30% sponges. Neither the preservatives nor the citric acid showed any spermicidal activity.

The released amount of nonoxynol-9 was determined spectrophotometrically. Fifty percent of nonoxynol-9 was released by the first five rinses. (Table II(c) (Fig. 6).

Long Equilibration

Sponges containing 10, 20, 30, 40, 50 and 60 percent nonoxynol-9 were incubated for

Table IV Amount of Nonoxynol-9 Released after Squeezing.

	1 Days (mg)	2 Days (mg)	4 Days (mg)
10%	60±5.4	58±4.0	55±2.1
20%	62±3.5	59±5.3	68±4.6
30%	112±5.6	114±5.3	120±6.1
40%	118±3.0	126±5.6	122±4.0
50%	122±4.0	108±5.2	119±2.4
60%	134±7.1	138±2.6	136±7.2

Each Group N=3
Mean±Standard Deviation

1, 2 and 4 days. The total amount released into the media occurred within the first day in all cases (Fig. 7). The sponges were taken out of the container and the remaining saline was squeezed out by hand. The amount of nonoxynol-9 released by this squeezing method ranged from 55 mg to 138 mg (Table IV).

Clinical Patient Use

The three subjects wearing the sponges containing the citric acid all complained of minor irritation during insertion.

The six subjects wearing the sponge for varying number of days all complained of malodor after 5 consecutive days. There were no such complaints for the first three days of wear. Three of the women complained of odor by the fourth day. None of the women completed the 6 and 7 day protocol.

Table V The Amount of Nonoxynol-9 Released From Sponge After 2 Days of Wear.

Patient	Original N-0-9 Contents (mg)	Amount of N-0-9 Released in 2 days (mg)	Percent Released (%)
M. S.	1150	620	46
S. C.	1150	644	56
A. H.	1150	588	51
L. B.	1150	700	61
D. A.	1150	585	50
E. K.	1150	700	60
G. S.	1150	712	62
C. T.	1150	597	51
M. H.	1150	602	52
B. H.	1150	580	50

Mean±S.D.* 632±52.6 53.9±5.5
* S.D.: Standard Deviation

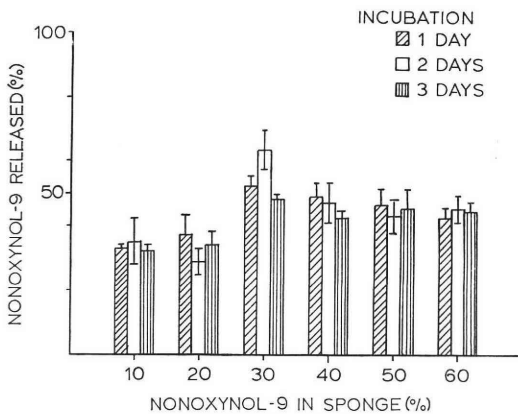


Figure 6 Percent of nonoxynol-9 released in saline incubation.

In one case a sponge placed in the vagina to cover the entire external os was found in another area of the fornix.

The sponges which contained no nonoxynol-9 showed no U. V. or spermicidal activity. The rest of the sponge extracts showed consistent results. (Table V)

Therefore, one-side dimpled nonoxynol-9 containing polyurethane vaginal contraceptive sponge will be used by women at most two days.

Discussion

The polyurethane vaginal sponge containing nonoxynol-9 is a new product. In order to determine parameters relevant to the clinical use of this platform, the release rates of nonoxynol-9 from sponges were studied under different conditions. The analytical methods were not complicated and reliable except gravimetric analysis. The U. V. spectrum of nonoxynol-9 had 2 peaks. One peak was 275 nm which is consistent with substituted phenols. The second peak at 223 nm had a high extinction that allowed detection of nonoxynol-9. Another advantage of this wavelength is that proteins have an absorption peak below 220 nm and any interference from proteins can be easily determined by scanning the sample from 230 nm to 215 nm. The extracts and washings from sponges without nonoxynol-9 had no detectable activity measured by U. V. or bioassay. Throughout the studies, the bioassay and U. V. data were comparable.

The multiple saline rinse study was performed to determine if nonoxynol-9 was released from the sponge by washing. This is critical for clinical use because patients are instructed to moisten the sponge prior to insertion into the vagina. It is also recommended that they wash the sponge after use so it is possible that a substantial amount of nonoxynol-9 are lost from the sponge before they are placed in the vagina.

The incubation studies showed the greatest amount of nonoxynol-9 was released in the first 24 hours. Thereafter, the sponge did not release any more nonoxynol-9 into the media. Thus, it is possible that the clinical sponges will release nonoxynol-9 without

coital stimulation the first day. The amount of nonoxynol-9 that was released from the sponge upon squeezing was greater than 50 mg (Table IV). This amount is comparable to the usual dose agent used in the conventional spermicidal barrier method.

To avoid the irritation at insertion and prolonged wear, the citric acid was withdrawn as a component. Because of the malodor and the high release rate of nonoxynol-9 from the sponge, 2 days was chosen as the maximum use for any one sponge.

To achieve a better fit in the vaginal cavity, a dimple was introduced in the center of one side of the sponge.

Thus, the critical parameters for the protocol¹¹⁾ to investigate the efficacy were determined. They are:

1) the design of the sponge was modified to have a concave (dimple) side for a better fit under the cervix.

2) two days of wear is acceptable to the women.

3) there is sufficient spermicide for at least 5 days (safety).

Using these 3 critical parameters, the protocol for the clinical efficacy trial was written and the trial is presently underway in 5 countries.

Acknowledgements

The author wishes to express her gratitude to Rihachi Iizuka of the Department of Obstetrics and Gynecology, Keio University, Professor Robert Nakamura and Professor Gerald Bernstein of the Department of Obstetrics and Gynecology, University of Southern California for their encouragement and valuable criticism. The author is also indebted to Dr. Bruce Vohauer of Vohauer Laboratory Inc, for his advice throughout this investigation.

The author is also grateful to Mr. Clyde Stitt and Mr. David Fisk for their tremendous technical assistance, and to Mrs. Wanda Beckemeyer for her typing.

References

- 1) Keown, K. K.: Historical perspectives on intravaginal contraceptive sponges. *Contraception*. 16: 1, 1977.
- 2) Chvapil, M.: An intravaginal contraceptive diaphragm made of collagen sponge: New old principle. *Fertil. Steril*, 27: 1387, 1976.

- 3) Chvapil, M., Heine, M. W. and Horton, H.: The acceptance of the collagen sponge diaphragm as an intravaginal contraceptive in human volunteers. *Fertil Steril.*, 27: 1398, 1976.
- 4) Sander, F. V. and Cramer, S. D.: A practical method for testing the spermicidal action of chemical contraceptives. *Hum. Fertil.*, 6: 134, 1941.
- 5) Eliasson, R.: Parameters of male fertility. In *Human Reproduction, Conception and Contraception*, (eds. E. S. E. Hafez and T. N. Evans) Harper and Row, N. Y., p. 39, 1973.
- 6) Zoneveld, L. and Polakoski, K. L.: Seman analysis. In *Techniques of human andrology*, (ed. E. S. E. Hafez) Elsevier/North Holland Biochemical Press, The Netherland, p. 470-471, 1977.
- 7) Jecht, E. and Bernstein, G. S.: The influence of copper on the motility of human spermatozoa. *Contraception*, 7: 381, 1973.
- 8) Bernstein, G. S.: Progress Report NICHD Contract #181-HD-32257, pg. 4-3, 4-6, 1975.
- 9) Burton, F. G.: Personal Communication.
- 10) Bhaskar, K. R.: Amino acids, proteins and related compounds. In *Ultraviolet and invisible spectroscopy*. (ed. C. N. R. Roa), plenum Press, N. Y., p. 190-198, 1967.
- 11) Bernstein, G. S. and Nakamura, R. M.: Clinical effectiveness studies of Vaginal contraceptives. In *vaginal contraception: New*

Developments. (eds. Zatlachai, G., Sobrero, A., Speidel, J., Suau, J.) Harper and Row, N. Y., 1979.

Nonoxynol-9 含有の腔内避妊スポンジ

— その臨床開発 —

鷹野 涼子

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

(指導: 飯塚理八教授)

殺精子物質 nonoxynol-9 を含有する新型腔内スポンジを、避妊を目的として開発した。このスポンジの利点は、着脱が簡便容易であり、他の腔内避妊具や薬剤等と異なり、事前の使用計画や準備の必要がない。

初期実験で、スポンジ内より nonoxynol-9 がリリースするのを確認、更にリリース量の実際を、Ultraviolet Spectroscopy 及び Bioassay (Spermicidal test) の二分析法で測定した。前者の正確度は 85~97% で、後者は 100% であった。

更に臨床使用の状態を模しての *in vitro* 実験で、約 50% の殺精子物質が、最初の 24 時間でリリースし、48 時間内にプラトーとなり、4 日間までは、平衡状態であった。この実験結果より、2 日間連続使用可能な腔内避妊スポンジが開発された。

正常月経周期の婦人 9 人の臨床治験によつて、連続 4 日間使用出来ることを確認した。

なお、本論文内容の一部は、1980 年 Pacific Coast Fertility Society の Annual Meeting に発表した。

(受付: 昭和 55 年 7 月 1 日)

当院における不妊外来統計

Statistical Study on the Infertile Women

北里大学医学部産婦人科学教室

中居 光生 馬嶋 恒雄 西島 正博
Mitsuo NAKAI Tsuneo MAJIMA Masahiro NISHIJIMA
尾崎 周一 前田 徹 新井 正夫
Shuichi OZAKI Tohru MAEDA Masao ARAI
長内 国臣
Kuniomi OSANAI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kitasato University School of Medicine

昭和46年7月当院開設以来昭和52年5月までの約6年間の不妊外来登録患者のうち不妊期間が1年以上の1262例について調査を行い、次のような成績を得た。

- 1) 不妊を因子別に分類すると、原発不妊では男性因子、続発不妊では卵管因子がそれぞれ不妊の最大因子であった。
- 2) 妊娠率は原発不妊24.7%、続発不妊27.5%で、因子別では卵巣・内分泌因子による場合が最高を示し(40.0%)、卵管因子(16.4%)、男性因子(16.0%)が最低を示した。流産率は原発不妊19.1%、続発不妊20.2%であった。
- 3) 全妊娠例の78.5%はHSG検査実施後1年以内に妊娠しており、全妊娠例324例中57例(17.6%)がHSG実施周期に妊娠の成立をみている。

1. 緒言

挙児希望を主訴として不妊外来を訪れる婦人数の増加とその不妊期間の短縮化の傾向が認められる。今回われわれは当院開院以来約6年間の不妊外来登録患者について retrospective な考察とその分析を加え報告する。

2. 対象

昭和46年7月に当院が開設されて以来、昭和52年5月までの約6年間に挙児希望を主訴として当科不妊外来を受診した婦人のうち Hysterosalpingography (HSG) を施行した患者を不妊外来登録患者とした。当院では患者は独自の永久番号をもち、年度ごとに新患として登録されることはない。今回は登録患者1504例のうち初診時までの不妊期間が1年以上の1262例について昭和53年5月まで追跡した。

3. 成績

1) 頻度

年度別登録患者数の外来受診患者数に対する割合は表1に示すごとく、昭和46年7月より昭和52年5月までの総新患者数は34688人であり、登録患者1504例は同期間の4.3%にあたる。

2) 初診時年齢と不妊期間

登録患者1504例のうち1年以上の不妊1262例の内訳は図1のごとく原発不妊811例(64.3%)、続発不妊451例(35.7%)で、初診時の平均不妊期間は原発例では3年1か月、続発例では2年7か月であった。初診時年齢は20歳から42歳で、最長不妊期間が23年という症例がみられた。年齢分布のピークは原発例では26~30歳代で57.7%であり、続発例では26~30歳代で44.9%、次いで31~35歳代で35.3%となっている。

表 1 登録患者数と新患総数に対する割合.

年	登録患者(例)	新患総数に対する割合(%)
1971	20	1.8
1972	194	3.8
1973	267	4.5
1974	286	5.1
1975	293	5.4
1976	351	4.3
1977年5月まで	93	
計	1504	4.3

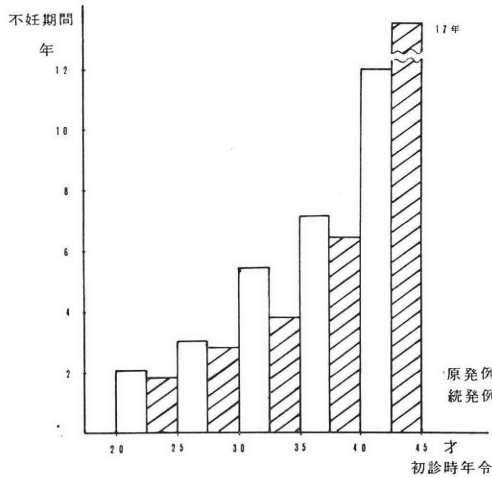


図 1 初診時年齢と平均不妊期間

3) 続発例の前回妊娠

続発例451例の 前回妊娠は 図2のごとく自然流産が第1位で33.9%, 次いで満期経産29.3%, 人工流産26.2%の順であった.

4) 不妊因子の分類

不妊の原因となる諸因子を次のごとく分類した. すなわち無排卵周期症, 無月経などの症例を「卵巣・内分泌因子」. 卵管疎通性障害のある症例を「卵管因子」. 子宮筋腫, 子宮腔癒着などの症例を「子宮因子」. 頸管粘液不足, Hühner test 不良例を「頸管因子」. 精子の数, 運動率, 量などの異常例を「男性因子」. ルチーン検査上異常の見られなかった症例を「機能的」. その他「検査中のもの」と「全身疾患によるもの」などである.

成績は図3のごとく原発811例では男性因子 (179例) が第1位で, 次いで検査中(153例), 卵管因子(116例), 機能的(108例), 卵巣・内分泌因子(104例), 頸管因子(99例), 子宮因子(50例), 全身疾患 (2例) であり, 続発451例では検査中(119例), 卵管因子(91例), 男性因子

続発例 451 例

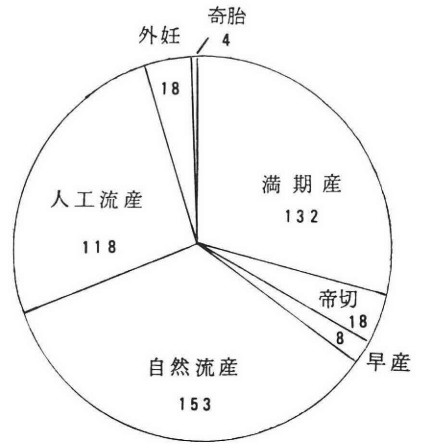


図 2 続発例の前回妊娠の転帰

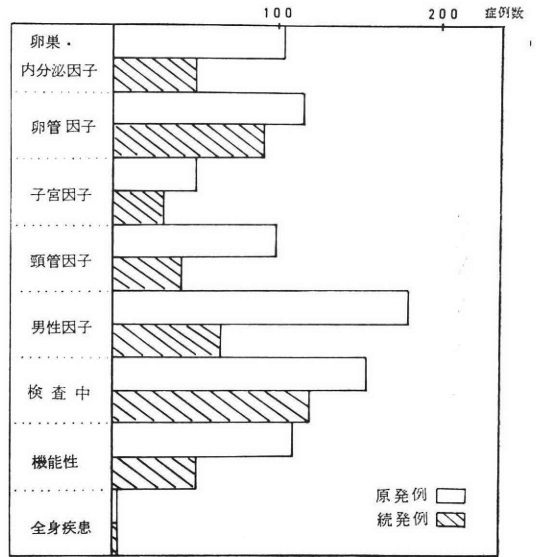


図 3 不妊因子別分類

(65例), 卵巣・内分泌因子(51例), 機能的(50例), 頸管因子(42例), 子宮因子(31例), 全身疾患 (2例) の順であった.

5) 治療

全症例1262例の治療内容は表2のように AIH, 投薬, 処置および手術などであるが前述の因子別分類の項で記載したように男性因子例(244例), 頸管因子例 (141例) が多かったことから AIH 施行例の331例が最も多かった. なお1症例に対し重複治療を含んでいる.

6) 妊娠例の分析

妊娠例は原発例811例中200例 (24.7%), 続発例451例

表 2 登録患者の治療内容.
(原発 811例・続発 451例)

	原発	続発	計
AIH	247	84	331
Clomid	90	27	117
Sexovid	17	5	22
HMG	7	1	8
PMS	48	16	64
HCG	124	43	167
progestin	36	12	48
通水	75	35	110
卵管形成術	5	4	9
筋腫核出術	5	6	11
卵巣嚢腫手術	16	9	25
Strassmann 手術	1	1	2
Alexander 手術	1	0	1

(重複治療を含む)

中124例 (27.5%) であった。

a) 妊娠時年齢

妊娠例324例の妊娠時年齢は図4のように妊娠率は原発例の25~29歳代、続発例の30~34歳代にピークが見られ、35歳以後では原発例、続発例ともに低率であり、40歳以後の妊娠例はなかった。

b) 不妊因子別による妊娠率

不妊因子別の妊娠例、妊娠率を図5に示した。卵巣・内分泌因子の妊娠率は原発例で37.5%、続発例で45.1%、総妊娠率40.0%と良好な成績を示している。これに反し卵管因子、男性因子の総妊娠率はそれぞれ16.4%、16.0%と低率であった。

c) 妊娠例における治療内容

妊娠例324例の治療内容および妊娠成立に關与する処置とその転帰を妊娠成立周期と妊娠成立迄の周期に分けて集計し表3に示した。

AIH による妊娠例は40例、排卵誘発剤によるものは28例、手術療法は16例、通水治療後9例などであった。なお AID は当院では施行していないので他院に依頼し妊娠の成立を確認した症例である。AIH による妊娠率は331例中(表2)40例(12.1%)であった。

d) 卵管因子と妊娠率

登録患者である HSG 施行例で初回検査の判定不能例53例を除く1209例について卵管疎通性と妊娠例、妊娠率を表4に示した。

両側卵管に著変のないものは1209例中1008例(83.4%)、片側のみに異常のみられるもの1209例中119例(9.8%)、両側に異常のみられるものは1209例中82例(6.8%)

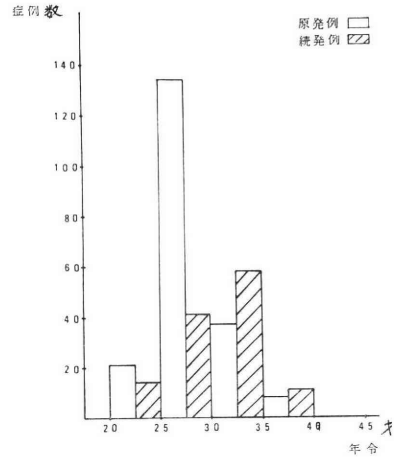


図 4 妊娠例の妊娠時年齢

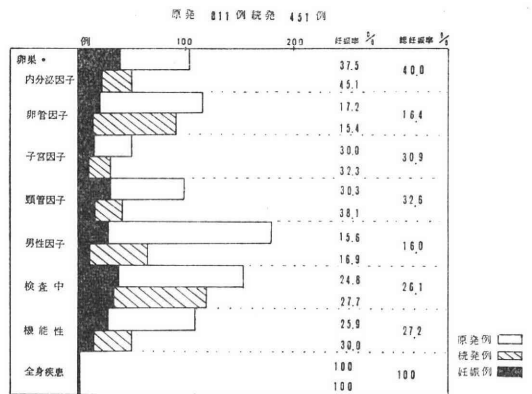


図 5 不妊因子別分類と妊娠例・妊娠率

である。

妊娠率は両側疎通性のあるもの、片側性のものとも各々26.3%、26.9%と差は認められなかった。初回実施した HSG で両側閉鎖を示し、かつ卵管通気検査で閉塞型を示した症例は82例で、その後の通水治療、卵管形成術による妊娠例は8例で妊娠率は9.8%であった。

HSG 実施後妊娠までの期間は図6のように6か月以内に53.5%、1年以内に78.5%の症例が妊娠している。

e) 妊娠例の転帰

妊娠例324例のうち他医への紹介、その他経過不明者を除くと転帰の明らかな症例は263例であった。成績は図7のように満期分娩に至った症例は経産産、帝王切開を合わせて203例(77.2%)である。自然流産例は51例(19.4%)で、原発例31例(19.1%)、続発例20例(20.2%)であった。人工中絶の2例は妊娠後、本態性高血圧症を指摘された医学的適応による中絶例である。

転帰の明らかな263例の妊娠時年齢と流産は表5のよ

表 3 妊娠例の治療内容.
原発 200例 続発 124例

		満期産		帝切		早産		流産		中絶		外妊		通院中		他医へ不明		計	
		原	続	原	続	原	続	原	続	原	続	原	続	原	続	原	続	原	続
妊娠成立 周期	AIH	11	4	4				6	2					3	1	4	1	28	8
	AIH+通水	1																1	
	AIH+Clomid	1						1						1				3	
	Clomid	7	4	1	2			1								4	1	13	7
	Clomid+PMS	1								1								2	
	Clomid+HMG	1																	1
	Sexovid		1	1		1										1		2	1
	HMG+HCG							2										2	
	HCG	1																1	
	progestin		2																2
	HSG 後	18	11		3	1		8	4		1		1			2	8	29	28
	性交指導	8	6					1	3						1	2		11	9
	AID																1		1
無処置	55	33	9	6	3		10	11					5	1	10	7	92	58	
妊娠成立 前迄の周期	通水	2			1	1		1	1							3		7	2
	卵管形成術後			1				1					1					2	1
	筋腫核出術後		1	3	1										1	1		4	3
	卵巣囊腫術後	2	1													1		2	2
	Strassmann術後				1														1
	Alexander術後												1					1	
計	107	63	19	14	5	1	31	20	1	1	0	1	10	4	27	20	200	124	

表 4 子宮卵管造影検査所見別分類と妊娠.

	症例数	妊娠例	妊娠率(%)	総妊娠率(%)	
正常 HSG	1008	265	26.3	26.3	
異常 HSG	片側 { 間質部 膨大部	72	18	25.0	26.9
		47	14	29.8	
	両側 { 間質部 間質部+膨大部 膨大部	40	2	5.0	9.8
		17	3	17.6	
		25	3	12.0	
計	1209	305		25.2	

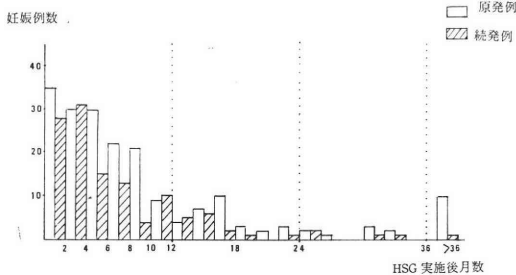


図 6 HSG 実施後月数と妊娠例数

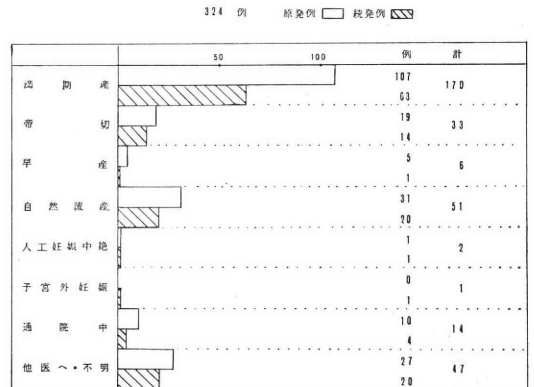


図 7 妊娠例の転帰

表 5 妊娠時年齢—流産例・流産率

年齢 (歳)	原発例		続発例		計	
	流産例/妊娠例	流産率(%)	流産例/妊娠例	流産率(%)	流産例/妊娠例	流産率(%)
20~24	2/17	11.8	1/12	8.3	3/29	10.3
25~29	22/109	20.2	4/26	15.4	26/135	19.3
30~34	6/31	19.4	12/53	22.6	18/84	21.4
35~39	1/6	16.7	3/9	33.3	4/15	26.7
40~	0/0	0	0/0	0	0/0	0
					51/263	19.4

通院中・他医へ・不明の症例を除く

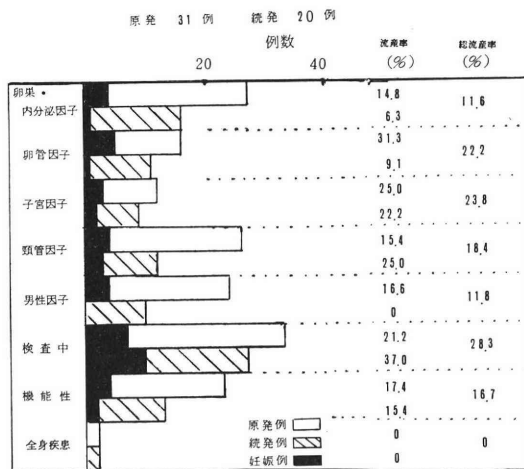


図 8 不妊因子別流産率

うに原発例では年代と流産率に一定の傾向はみられないが、続発例では加齢に伴って増加する傾向がみられる。

自然流産例51例の各因子別の流産率を図8に示した。原発例では卵管因子(31.3%)、子宮因子(25.0%)、検査中の症例(21.2%)、続発例では検査中の症例(37.0%)、頸管因子(25.0%)、子宮因子(22.2%)とそれぞれ20%以上の流産率を示した。

次に治療内容別では、自然流産は AIH 30例中 9例(30.3%)、排卵誘発剤使用例24例中 4例(16.7%)、通水治療例 7例中 2例(28.6%)、手術療法11例中 1例(9.1%)であった(表3)。

4. 考 察

医学的知識の普及に伴って、不妊期間の短い夫婦が受診する頻度が増加している。米国の不妊学会では1年以内に妊娠しないものを不妊症と規定しているが、今回われわれは初診時までの不妊期間が1年以上の症例を対象とした。

産婦人科受診患者のうち不妊患者の占める割合は各医療機関の性格、地域によって異なり2%以下からおよそ30%と大きな開きがある。当院の開院初期6年間のその割合は4.3%であった。不妊外来登録患者数は昭和46年から昭和51年まで増加傾向にある。

最近の報告では不妊因子の第1位を上田ら¹⁾、金岡ら²⁾、東出ら³⁾は「卵巣・内分泌因子」が、古賀ら⁴⁾は「卵管因子」、三上ら⁵⁾は「男性因子」、藤村ら⁶⁾、品田ら⁷⁾は「機能性因子」が多いとしている。われわれの成績は原発例では「男性因子」、続発例では「卵管因子」がそれぞれ第1位であった。

今回の調査では不妊因子の分類を行なうに当って金岡ら²⁾のように最大不妊因子を1つだけ挙げる方法をとったが、この方法は実地上止むを得ない点もあるが両性にみられる因子のいずれが「最大である」かの判断はかなり恣意的になりやすい欠点をも客観性に欠ける点があるので、今後このような臨床的評価方法は改善されるべきことと思う。

妊娠成立頻度に関して最近では高野ら⁸⁾(14.1%)、上田ら¹⁾(16.1%)、館野ら⁹⁾(19.5%)、藤村ら⁶⁾(21.1%)、古賀ら⁴⁾(26.9%)、伊東ら¹⁰⁾(27.7%)、金岡ら²⁾(36.4%)の報告がある。今回の不妊期間1年以上の患者を対象とした同様の統計と比較してみると、東出ら³⁾の16.7%、三上ら⁵⁾の26.4%があり、当院での成績は三上らに近い25.7%であったが、それらの成績の相違は対象の相違とともに診療施設の性格によるものであろう。

妊娠症例324例のうち他医への紹介、経過不明者を除いた転帰の明らかな263例(81.2%)のうち満期まで観察できた203例(77.2%)の妊娠例を検討した成績については既に報告した¹¹⁾。早産率は263例中6例(2.3%)で白水ら¹²⁾の報告のように高値ではなかった。

妊娠率を因子別にみると多くの医療機関が卵巣・内分泌因子による不妊例で治療効果が良好であったと報告している。排卵誘発剤の使用が健康保険で認められてから

は上田ら¹³⁾(23.9%), 藤村ら¹⁴⁾(41.5%), 東出ら¹⁵⁾(43.4%), 品田ら¹⁶⁾(45.0%), 古賀ら¹⁷⁾(45.7%), 金岡ら¹⁸⁾(48.4%)の報告がある。われわれの成績は40.0%であったが、対象の相違もあり厳密な比較はできない。

妊娠例324例中57例(17.6%)は基礎体温の低温期に実施された HSG 後の排卵が妊娠に結びついたことに注目したい(表3)。飯塚ら¹⁴⁾は AIH 実施第1周期の妊娠率は17.4%であったと報告しているが、HSG 実施周期にみられた妊娠率17.6%という数字はこの操作が AIH を行うことと同程度の治療的効果があることを示唆するとも考えられ非常に興味深い^{15,16)}。

流産率は最近の報告では古賀ら¹⁷⁾(6.2%), 白川ら¹⁷⁾(13.3%), 上田ら¹³⁾(15.1%), 白水ら¹²⁾(16.3%), 東出ら¹⁵⁾(19.2%), 品田ら¹⁶⁾(20.8%), 高野ら¹⁸⁾(25.6%)があり、われわれの結果は19.4%で不妊期間1年以上の患者を対象とした東出ら¹⁵⁾の19.2%とほぼ同値で、一般婦人の流産率10~15%に比べ高い傾向が認められた。

流産率を不妊因子別にみると原発例での卵管因子が31.3%と最も高く、子宮因子も原発例、続発例ともそれぞれ25.0%, 22.2%と高値であった。これに反し卵巣・内分泌因子は原発例、続発例各々14.8%, 6.3%平均11.6%と正常婦人の流産率と大差はなく、総じて卵巣・内分泌因子の不妊例にはより効果的な治療が期待できるといえる。

治療別にみると、排卵誘発剤使用妊娠例24例中流産例は4例で、その流産率は16.7%であった。Clomid による流産率の報告は三宅ら¹⁸⁾の13施設3427例に基づく統計からの23.6%をはじめ高い値が多い。われわれの成績では20例中2例(10.0%)であったが少数例でありなお検討を要する。

不妊症検査として HSG は不可欠なものとなっているが、初回 HSG 施行時期を基準にすると妊娠の成立をみた約8割が施行後1年以内であり、上田ら¹³⁾、白川ら¹⁷⁾、関本¹⁹⁾と同様な成績を得た。

つまり、全不妊患者のうちおよそ25%が妊娠し、しかも1年以内の例はそのうち20%であるという成績であった。

5. 結 語

当院開設以来昭和52年5月までの約6年間の不妊外来登録患者のうち不妊期間が1年以上の1262例について retrospective study を行つて次のような成績を得た。

- 1) 不妊を因子別に分類すると、原発例では男性因子、続発例では卵管因子がそれぞれ最大因子であった。
- 2) 妊娠率は原発例24.7%(200/811)、続発例27.5%(124/451)で、卵巣・内分泌因子の症例が最高を示し

(40.0%)、卵管因子(16.4%)、男性因子(16.0%)が最低を示した。流産率は原発例19.1%、続発例20.2%であった。

3) 全妊娠例の78.5%は子宮卵管造影検査実施後1年以内に妊娠している。

4) 全妊娠例の17.6%(57/324)は子宮卵管造影検査実施周期の排卵が妊娠に結びついたもので、この検査の意義について更に検討を要することを強調した。

(本論文の一部要旨は第23回日本不妊学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 上田一之, 宮内文久, 伊東武久, 藤野俊夫, 山下三郎, 森岡 均: 最近四年間の当科不妊症クリニックの現況, 日不妊会誌, 23: 373, 1978.
- 2) 金岡 毅, 岡田悦子, 清水潤司, 森 巍, 関場香: 当院不妊外来における最近二年間の妊娠例についての検討, 日不妊会誌, 18: 99, 1973.
- 3) 東出香二, 成田 収, 万羽 進, 木村 隆, 下須賀洋一, 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: 354, 1978.
- 4) 古賀詔子, 永井 泰, 永井 宏: 最近6年間の当院不妊症クリニックの現況, 日不妊会誌, 23: 367, 1978.
- 5) 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の統計, 日不妊会誌, 22: 203, 1977.
- 6) 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: 74, 1979.
- 7) 品田孝夫, 竹中恒久, 横田佳冒, 大和田信夫, 阿美邦栄: 不妊外来における臨床統計的観察, 日不妊会誌, 24: 80, 1979.
- 8) 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, 日不妊会誌, 20: 383, 1975.
- 9) 館野政也, 舌野 徹: 不妊における診断的治療法としての卵管疎通性検査の意義, 日不妊会誌, 19: 277, 1974.
- 10) 伊藤武久, 宮内文久, 木戸雄一, 右田満明, 福田栄: 最近二年間の当科不妊症クリニックの現況, 日不妊会誌, 21: 188, 1976.
- 11) 馬嶋恒雄, 中居光生, 西島正博, 黒江美知子, 尾崎周一, 前田 徹: 当院不妊外来登録患者の妊娠予後の検討, 日不妊会誌, 24: 185, 1979.
- 12) 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: 493, 1978.
- 13) 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: 208, 1977.
- 14) 飯塚理八, 林 方也: 現代産科婦人科学大系, 第9巻, 人工受精: 227, 中山書店, 1970.

- 15) Palmer, A: Ethiodol Hysterosalpingography for the Treatment of Infertility, Fertil Steril, 11: 311, 1960.
- 16) Gillespie, H. W.: The Therapeutic Aspect of Hysterosalpingography, Brit J Radiol, 38: 301, 1965.
- 17) 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: 361, 1978.
- 18) 三宅 侃, 青野敏博, 衣笠隆之, 宮崎正敏, 安田基, 塩路武徳, 近藤国男, 倉智敬一: Clomiphene 治療後の妊娠経過と新生児, 日産婦誌, 29: 467, 1977.
- 19) 関本昭治: 不妊患者の妊娠成功例の検討, 特に卵管不妊例について, 日不妊会誌, 12: 150, 1967.

Statistical study on the
infertile women

**Mitsuo Nakai, Tsuneo Majima,
Masahiro Nishijima, Shuichi Ozaki,
Tohru Maeda, Masao Arai
and Kuniomi Osanai**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kitasato University School of Medicine

A total of 1262 patients who had undergone

HSG for infertility for more than one year were registered at our infertility clinic from July 26, 1971 to May 31, 1978. Retrospective study yielded the following results:

1. In primary infertility, the male factor was the major factor implicated, while the tubal factor was the major one in secondary infertility.

2. Conception rates for women with primary infertility and with secondary infertility were 24.7% and 27.5%, respectively. Higher pregnancy rate of 40.0% was noted in endocrine infertility, while in infertilities due to tubal and male factors, the pregnancy rates were only 16.4% and 16.0%, respectively. The abortion rates were 19.0% in primary infertility and 20.2% in secondary infertility.

3. Nearly 80% of pregnancies occurred within one year of hysterosalpingography and 17.6% of them did immediately following this procedure. The value of hysterosalpingography as a therapeutic means is further to be investigated.

(受付: 昭和55年3月21日)

当科不妊外来における通水療法施行症例 の統計的検討

Clinical Analyses of Hydrotubation Practiced in Our Clinic

新潟大学医学部産婦人科学教室

須藤 寛人 森田 和雄 吉沢 浩志

Norihito SUDO Kazuo MORITA Hiroshi YOSHIZAWA

高橋 威 古谷 元康 竹内 正七

Takeshi TAKAHASHI Motoyasu FURUYA Shoshichi TAKEUCHI

Department of Obstetrics and Gynecology,
Niigata University School of Medicine

過去8年4ヶ月における当科不妊外来での通水施行症例の臨床的検討を行い、以下の事項が明らかとなった。

1) 通水施行を受けたものは、不妊外来受診者の4.8%であった。2) 通水後の妊娠成功率は19例(16.7%)であった。3) 原発性不妊における通水後の妊娠成功率は13.9%、続発性不妊のそれは21.4%であった。4) 通水施行例の44.7%が30歳以上であった。5) 通水施行例のうちで、卵管障害を推定できたものは15.8%に過ぎなかった。6) 通水施行回数は1回より最高8回までで、妊娠が成立した全例の68.4%は5回以内の通水回数であった。7) 通水療法によるHSG像上での改善度を、妊娠不成立例で検討したところ、58.7%に改善が認められた。悪化したと判断された症例は3例(6.5%)であった。8) 卵管水腫症例の10例において通水成功例は皆無であった。9) 卵管水腫型以外のどんなタイプの卵管障害型HSGを示しても、通水により妊娠成立例を認めえた。10) 拡散不良群と片側卵管正常群における通水療法後の妊娠成功率はその他の群よりやや高率であった。

これらの結果を総括して、著者らに反省として得られた事項は1) 腹腔鏡的診断法をより積極的に取り入れること。2) 通水療法5~6回(6ヶ月程度)で、再HSG像上での改善が認められない症例を手術的治療の適応と考えてよいのではないかと思われた。

はじめに

不妊症の原因として卵管因子は今日でも重要な部分を占める。従来より卵管障害に対する手術的療法が試みられてきたが、その成績は必ずしも良好なものではなかった。当科における卵管障害に対する治療法は主に通水療法であった。最近、教室においても、①腹腔鏡的診断、②積極的な卵管形成術の施行、③マイクロサージャリーの導入などが取り入れるようになってきた。これらの新しい試みが、どのくらい有益であるかの結論を将来的に推定する時、これまでの通水療法の成績がどのようであったかを明瞭に分析しておくことは意義あることと思わ

れ、以下の後方視的検討を行った。

研究材料

1971年1月より1979年4月30日までの8年4ヶ月における当科不妊外来患者カルテ、2367を参考とした。これらの患者のうちの一部における子宮卵管造影写真(HSG)を再検討した。

当科における子宮卵管造影法

中山式子宮卵管造影器を用い10mlのリピオドールを注入し、注入直後像写真と5分後像写真を撮った。可能な限りテレビの直視下による観察を行った。

当科における通水療法の手技

表 1 当科における通水療法.

HSG の方法
リビオドール 10ml
テレビ直視下にて観察
直後像
5分後像
通水療法
生食 20ml
ソルコーテフ 100mg
カナマイシン 1g
ウロキナーゼ 6000単位
治療の方針
通水 3 ~ 4 周期
良好化を認めれば HSG

ねじ込み式子宮卵管注入器を用い、ソルコーテフ100mg, カナマイシン1g, ウロキナーゼ6,000単位を生食20mlに溶解し注入した。

当科における通水治療の方針

HSG 上で①卵管通過障害, ②拡散不良所見の認められるものを通水治療の対象とした。通水は原則として1週期に1回(月経直後)としてなされ, 3~4週期続けて行い, 通水所見の良好化を目安として再びHSGを行なった(表1)。

成 績

1. 通水施行例の年度別分布と妊娠成立例

通水施行例は合計114症例であり, 不妊外来受診者の4.8%にあたった。妊娠成立は19例に認められ, 通水療法による妊娠成立率は16.7%であった。年度別にみた通水施行例と妊娠成立数を表2に示したが, 年度によるばらつきの大いことが示された。

2. 原発・続発不妊別にみた通水後の妊娠成功率

続発不妊における妊娠成功率は21.4%であり, 原発不妊におけるその成功率13.9%より高率であった(表3)。

3. 通水治療症例と年齢

通水治療施行例のうちで初診時年齢が30歳以上のものは44.7%と高率であった(表4)。

4. 通水施行例における卵管閉塞の推定原因

通水療法を必要とした114名の既往歴で, 卵管閉塞の原因として推定される可能性のあるものを取りだし, 表5に示した。ここでは機能的卵管閉塞はなく, 技術的問題はなかったとみなした。子宮筋腫, 既応内性器手術, 腹膜炎, 子宮内膜症, 結核, 既応子宮外妊娠などはかなり強く卵管障害をきたしうる原因として掲げられよう。これらの“かなりはつきりと推定される閉塞原因”をもつ患者数は合計23例で, 全体の15.8%に過ぎなかった。

表 2 通水施行例の年度別分布

年度	妊娠不成立例 (初診時年度)	妊娠成立例 (妊娠成立年度)
1979*	7	1
1978	10	5
1977	17	4
1976	8	1
1975	5	1
1974	11	0
1973	11	7
1972	15	0
1971	11	0
合計	95	19

* 4月30日まで

$$\text{妊娠成立率} = \frac{19}{114} = 16.7\%$$

$$\text{通水施行率} = \frac{114}{2367} = 4.8\%$$

表 3 経妊別と通水成功率

	原発不妊	続発不妊
通水施行例	72	42
妊娠成立例	10	9
妊娠成立率	13.9%	21.4%

表 4 高年不妊患者(30歳以上)と通水成功率

$$\text{高年不妊患者率} ; 51/114 = 44.7\%$$

$$\text{妊 娠 成 立 群} ; 10/19 = 52.6\%$$

$$\text{妊 娠 不 成 立 群} ; 41/95 = 43.2\%$$

特に結核, 腹膜炎などの既往症が多いようであった。子宮内膜症の合併は1例にしか疑われていなかった。

5. 通水施行回数と検査

通水施行回数は1回より最高18回までであった(表6)。妊娠成功例19名中5回以内での成功例は13名(68.4%)であった。通水療法を5回以上受けた症例は合計28名でこのうち6例(21.4%)が妊娠成立にいたった。

6. 最終通水より妊娠成立までの期間

通水療法をしたその周期に妊娠成立をみた例は10名, 次周期が8名であった。1名では通水後HSG所見の改善を認め, その後合併していた黄体機能不全に対して高単位HCG療法を行い妊娠成立にいたった。即ち, これら妊娠成立にいたった19名は, 全例通水療法の成果であると言えよう(表7)。

7. HSG 像別にみた通水後の妊娠成功率

HSG 像の所見を6つのグループに大別した。これら

表 5 通水施行例における卵管閉塞の推定原因.*

推定原因	妊娠成立例 (19)		妊娠不成立例 (95)	
	原発不妊 (10)	続発不妊 (9)	原発不妊 (62)	続発不妊 (33)
子宮筋腫	2	0	2	0
子宮手術	0	1	0	0
卵巣のう腫	1	0	0	0
腹膜炎	0	0	4	1(虫垂炎性)
子宮内膜症	0	0	1	0
結核	0	0	3(腹膜炎)	1(腎性)
子宮外妊娠	—	—	—	5
虫垂炎	4	0	6	0
人工妊娠中絶	—	1	—	2
自然流産	—	1	—	8
満期産	—	5	—	15
帝王切開	—	1	—	1
全く不明	3	0	46	0

* 機能的閉塞, 技術的問題を無しとみなした
 太字はかなりはつきりと推定される閉塞原因
 23/114=15.8%

表 6 通水施行回数.

回数	妊娠成立例	妊娠不成立例
1	7	25
2	1	21
3	2	19
4	3	8
5	2	7
6	1	4
7	0	6
8	1	3
9	0	0
10	0	0
12	0	1
13	1	0
15	1	0
18	0	1
合計	19	95

表 7 最終通水より妊娠成立までの期間.

その周期	10人
次周期	8人
1年4ヵ月後	1人(HCG療法併用)

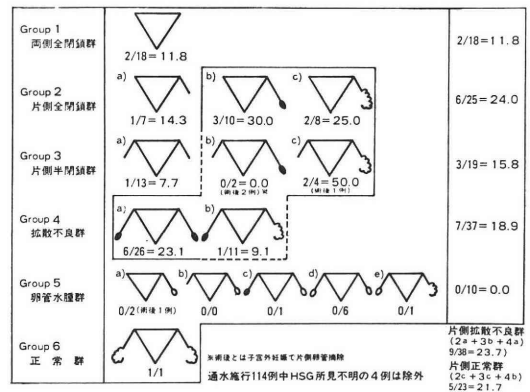


図 1 HSG 像別にみた通水成功率

通水 5 回以上で妊娠に至った例 6/28=21.4%
 妊娠例のうち通水 5 回以上の例 6/19=31.6%

は両側卵管全閉鎖群 (G-1), 片側卵管全閉鎖群 (G-2), 片側卵管半閉鎖群 (G-3), 拡散不良群 (G-4), 卵管水腫群 (G-5), 正常群 (G-6) とした(図 1). さらにこれらを a) より e) までに図のように細別することにより, HSG 所見をほぼタイプ分けできると考えた. これらをもとにした通水療法の対象者と妊娠成功例数を図 1 に記入した. 両側全閉鎖群では妊娠成功率は 11.8% であった.

以下, 各グループにおける妊娠成功率を右端に示した. 卵管水腫群では 10 例中妊娠成立を至った例は皆無であった. 一方, 図中の線で囲んだ片側拡散不良群だけを取りだしてみると, その妊娠率は 23.7% であった. また, 片側正常群だけを取りだしてみると妊娠率は 21.7% であった. 以上をまとめてみると, 少なくとも片側卵管の正常又は拡散不良群は他の群に比しやや通水治療による妊娠成功率は高いように示された.

通水治療後、再HSGが施行された症例	46例
全く正常化した症例	12例(26.1%)
最初のHSG 1(5), 2a(1), 2b(1), 4a(2), 4b(2)	
や、改善の認められた症例	15例(32.6%)
みるべき改善のなかった症例	17例(37.0%)
悪化したと判断された症例	3例(6.5%)

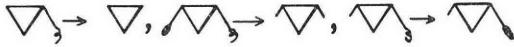


図 2 通水療法による改善度の検討
——妊娠不成立例での検討——

8. 通水療法による HSG 像上での改善度の検討

妊娠不成立例において、通水治療後、再び HSG が施行された症例は46例であった。このうち HSG 像が全く正常化した割合は26.1%であった。やや改善の認められたと判定できた割合は32.6%、みるべき改善のなかった割合は37.0%であった。悪化したと判断された症例は3例(6.5%)であり、その判定を図2の下部に示した。

9. 通水療法中の所見および所見の変化

妊娠成立に至った全例の通水所見と再 HSG 所見を妊娠成立までに要した通水回数順に表8に示した。通

水療法3回以内で妊娠成立をみたものは、通水所見では完全通過であるものが多かった。これを HSG 像のグループ別でみると、拡散不良群に属するものが多いようであった。妊娠成立群では、通水を繰り返すことにより通水所見の改善、HSG 像の改善が認められることが示された。

10. 症例

症例1 (図3)は32歳の続発不妊患者(G2P1011)で HSG 像ではタイプ2b(片側拡散不良群)を示した。最初の2度の通水は抵抗が強くわずか5ml程度の注入で中止となった。ひきつづく2回の通水では抵抗あり、漏出あるもどうにか全量20mlを注入できるようになった。第4回目の通水後その周期に妊娠成立をみた。

症例2 (図4)は30歳の原発不妊患者で HSG 像ではタイプ1(両側卵管全閉鎖)を示した。初めの通水所見は全く通過性なし、腹痛は強度であった。以後ブスコパンを前投与し通水療法を続けた。再 HSG では片側卵管の半分まで造影された。ひきつづく8回の通水が行われ、記載上では抵抗の減弱、漏出量の減少、疼痛の減弱を認められるようになった。再 HSG では両側拡散不良群を示す程度にまで、明らかに改善された。以後2

表 8 通水療法中の所見の変化。
——妊娠成立例での検討——

通水回数	症例	HSG (Type)	通水所見, 再 HSG
1		6	完全通過
1		4a	抵抗⊕, 漏出⊖
1		4a	完全通過
1		4a	完全通過
1		4a	完全通過
1		3c	完全通過
1		2b	抵抗⊕, 漏出⊖
2		3c	完全通過
3		1	完全通過
3		4b	抵抗⊕
4		2b	初回 5ml のみ, 2回目より序々に通過
4		2b	初回, 2回目 5ml のみ, 3~4回目漏出⊕
4		2a	初回, 2回目抵抗⊕, 漏出⊕ 3回目より抵抗あるも全部入る
5		2c	4回目まで10ml で漏出⊕, 5回目完全通過
5		2c	3回目まで 7ml, 4回目より完全通過
6		4a	抵抗⊕, ゆっくり通過
8		3a	抵抗⊕, 5回目より抵抗⊕, 漏出⊕ 8回目通過 再HSG→1
13		4a	3回目まで 10ml, 漏出⊕, 4回目より全部通過, 抵抗⊕→4b
15		1	初回~4回 5ml→2a 15回目→4a

症例： 32才 G2, P1011

1969.3 3ヶ月 自然流産
1971.9 10ヶ月 正常分娩
1972.2まで避妊
1975.4 初診

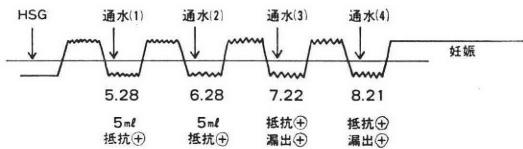


図 3 症例 1

症例： 30才 G0, P0

19才 虫垂切除
結婚 1970.4(24才)
初診 1976.7(不妊期間6年3ヶ月)

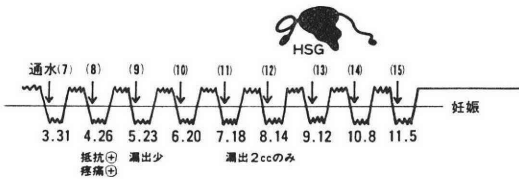
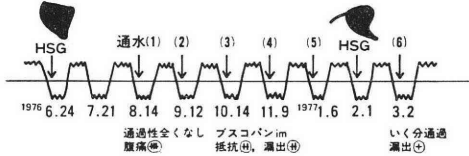


図 4 症例 2

回の通水で (合計15回) 妊娠成立をみるに至った。

考 按

卵管通過障害に対する治療法は、通気・通水療法と手術的治療法に2大別できる。1960年、1970年代に発表された通水療法の成績をまとめた高野¹⁾の報告によれば、通水成功率は3.6%より42.9%に分布しており、半数以上の報告は10%~20%に分布している。著者らの114名に対する妊娠成功率は16.7%で、100例以上を検討した林²⁾の報告の13.2%に近似であった。

通水施行症例の臨床的分析において、“かなりはつきりと推定される卵管閉塞原因”を指摘された症例の割合は15.8%に過ぎなかった。このことは、腹腔鏡や開腹術などによる診断が、当教室ではこれまであまり積極的に行われてこなかったためと思われる反省された。即ち、HSG 像所見と開腹時所見の不一致度はきわめて高率であることはかつてより強調されていることであり³⁾、不妊症診断における卵管因子の検索においては厳密な意味

では直視下での所見をとることが要求されているといえよう。

卵管障害の手術療法としてマイクロサージャリーの有用性が近年、認められるようになってきた⁴⁾。通水療法はもはや全く過去の治療法であるか？あるいは通水療法の限界はどの辺にあるのか？換言すれば、マイクロサージャリーの厳密な適応はどのようなかなどを整理しておくことは、今日の不妊診療を担当する者にとって検討されるべきことと思われる。今回の著者らのこれまでの通水療法に関する成績の検討から以下のことがまとめられた。

①HSG 像上の卵管水腫症例は、たとえ片側に認められたとしても、通水療法での成功例は認められなかった(10例中0)。

②HSG 像上、卵管水腫型以外のどのような卵管異常型を示しても、通水療法が妊娠成立に至らせることがある。

③片側または両側拡散不良例や片側卵管正常(他側は異常)例はその他のタイプを示す卵管障害群より、通水による妊娠成功率は若干高かった。

④通水療法で妊娠に至った例の80%弱は4回目までの通水で妊娠成立に至った。

マイクロサージャリーの経験に乏しい著者らに、ここで上記した設問に結論的なことは明示しえないが、上記①~④を参考として、新しい治療法のマイクロサージャリーを著者らも導入していきたいと考える。(論文の主旨は第27回日産婦北日本連合地方部会において発表した。)

文 献

- 1) 高野 昇：不妊の診断と治療(杉本修編：産婦人科 MOOK No. 5) p. 182, 1979.
2) 林 基之：女子不妊症の治療, 日産婦会誌, 16: 613, 1964.
3) 門田 徹, 松岡幸一郎：卵管機能検査法, 産と婦, 46: 1425, 1979.
4) 印牧義孝：卵管不妊のマイクロサージェリー, 臨婦産, 34: 215, 1980.

Clinical analyses of hydrotubation practiced in our clinic

Norihito Sudo, Kazuo Morita, Hiroshi Yoshizawa, Takeshi Takahashi, Motoyasu Furuya and Shoshichi Takeuchi
Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University School of Medicine

The retrospective analyses were made on the

efficacies of the hydrotubation, which had been practiced as a treatment for the tubal occlusion (diagnosed based on HSG abnormalities) at our infertility clinic for the past 8 years and 4 months.

The following data were obtained.

1) Totally, 114 patients underwent hydrotubation, and the pregnancies were achieved in 19 cases (16.7%). (13.9% in patients with primary infertility and 21.4% in patients with secondary infertility).

2) Two thirds of pregnancy-achieved patients succeeded their pregnancies within the 5th hydrotubation by the 5th months.

3) Slightly higher pregnancy rates were found in the group of tubal perfusion defects and in the group of unilaterally normal tube on HSG

than in the other types of HSG abnormalities.

4) Repeated HSG were taken in 46 patients who eventually were not pregnant, and the improvement of tubal findings on HSG showed in 58.7% in these patients.

5) None of 10 patients with hydrosalpinx achieved their pregnancies.

As conclusions,

1) There may well be a significant role of hydrotubation in updated infertility treatment.

2) The tubal surgeries especially microsurgical technic are probably indicated to the patients who do not success their pregnancies within the 5th cycle of hydrotubation.

(受付: 昭和55年5月12日)

ラットの実験的停留辜丸における 下垂体性腺系の機能について

Testicular-Hypophyseal Function Observed in Experimentally Induced Cryptorchism in Rat

東京慈恵会医科大学泌尿器科学教室 (主任: 町田豊平教授)

稲 葉 善 雄

Yoshio INABA

Department of Urology, School of Medicine,

Jikei University

(Director: Prof. Toyohei MACHIDA)

実験的に幼若ラットの両側停留辜丸を作成し、1, 2, 4週後の辜丸及び下垂体の変化を光顕観察し、加えて下垂体ホルモンも測定した。さらに、停留4週後に辜丸を陰嚢内に戻し、その3週後も検討した。

実験結果は

1. 辜丸の成長は著しく抑制され、Sertoli 細胞に依存する精母細胞や精子細胞は発育が止り、時間の経過と共に壊死、脱落する。
2. Leydig 細胞は精細管の萎縮とは逆に、増殖する。
3. 下垂体前葉の FSH 分泌細胞増加に伴い、LH 細胞の数も増え、停留4週目には去勢細胞も多数みられた。
4. 停留4週後に解除した辜丸の組織学的、内分泌学的改善はみとめられなかった。

以上の現象は停留辜丸により機能低下した Sertoli 細胞から発せられた feedback が、下垂体の FSH 分泌を増加させ、それに伴って LH 分泌も亢進させる。この増加した LH により Leydig 細胞の増殖が発現したものと考えられた。

緒 言

思春期以降まで放置された停留辜丸が機能不全に陥ることは、臨床的に周知の事実である。また実験的に辜丸を停留させたときにも同様にその機能不全がおこる。このように、先天的要因が加わらなくても辜丸が陰嚢内に下降しなければ、辜丸機能は確実に阻害される。この場合、造精子能はほぼ完全に止り、androgen の合成能も減退する¹⁾。こうした変化は、辜丸の環境が正常機能を営むに適さないためにおこる辜丸原発性の機能障害と解釈される²⁾³⁾。一方、停留辜丸に伴う下垂体 gonadotrophs の変化⁴⁾や gonadotropin 分泌の上昇は、片側停留辜丸でも起る⁵⁾が、両側の停留辜丸では一層著明である⁶⁾。これは、androgen 分泌の減少による negative feed-

back 機構によつておこるものと理解されてきた。この点に関する従来の研究には、除辜後の下垂体 FSH, LH 濃度の変化から検討されたものが多く⁷⁾、下垂体の gonadotrophs と辜丸精細管上皮および間質細胞 (Leydig) との関連性については、余り研究が行われていない。従つて、もし停留辜丸における下垂体-性腺系の feedback 機構が形態学的研究を土台として解明されれば、辜丸の病態生理を一層詳しく理解することも可能となるであろう。

以上の観点から、停留辜丸における下垂体-性腺系の機能を解明するため、実験的停留辜丸によつて次の点を研究した。

①停留辜丸の発症過程における精細管、間質細胞の形態変化に関する時間的推移、②停留辜丸が下垂体 gona-

dotrophs に及ぼす機能的、形態学的影響、③停留辜丸が解除された場合の辜丸組織および機能の回復と、下垂体機能との関連。

実験方法

動物実験は、離乳直後の幼若なウィスター今道系雄ラット(日本動物繁殖研究所産)40匹を用いた。生後21日齢に達した時点で、40匹のうち20匹に手術的に両側停留辜丸を作成し、のこりの20匹に偽手術を施行して対照群とした。実験的停留辜丸の作成は、エーテル麻酔下に両側辜丸を腹腔内壁上に固定したが、その際、辜丸の血流を遮断せぬように血管を避けて白膜に細いナイロン糸を通した⁹⁾。偽手術群には同様麻酔下で開腹のみを行った。術後第1週目、第2週目、第4週目にそれぞれ停留辜丸群ラット5匹づつと偽手術対照群ラット5匹づつを一組とし、ネブタールで麻酔の上、動脈採血したあとに脱血屠殺した。さらに、のこりの5匹の実験ラットの停留辜丸を、停留第4週目に解除し、その後3週間経過した時点で屠殺した。偽手術対照群の5匹に対しても、第4週目に再び開腹のみの偽手術を施行し、3週後に停留辜丸解除群の対照として屠殺した(図1)。

得られた辜丸は、すべてアクロレイン固定の上、包埋、薄切後に H-E 染色をして鏡検した。下垂体は昇汞ホルモルで固定し、alcian blue-PAS-orange G 染色を施して観察した⁹⁾¹⁰⁾。血清 LH, FSH 濃度測定にはラット用の Radioimmunoassay キット(栄研)を使用した。その手順は、まず被検血清100 μ l, NIAMDD-Rat FSH (LH)-RP 1 抗血清200 μ l, ¹²⁵I 標識 NIAMD-Rat FSH (LH)-I-3 200 μ l 及び緩衝液を混和後4°C で2昼夜放置、次いで第2抗体200 μ l を加え攪拌後1昼夜4°C に

放置、これを3000r.p.m. で30分遠心沈澱したのち上清を吸引除去した。沈澱をウェル型シンチレーションカウンターで計測し、標準曲線より濃度を求めた。

精細管組織の変化は、Leblond & Clermont の Stage 分類¹¹⁾に従い、組織定量的に検索した。すなわち、辜丸の一割面中から精細管上皮の発達具合をみて、各 Stage に当てはまる14の精細管の断面を選び、それに含まれる精子を除いた総細胞数と精祖細胞、精母細胞、精子細胞および Sertoli 細胞の数を数え、5匹づつのグループごとに平均値を算出した。精細管の総細胞数は、Stage 別放射軸上に中心部よりそれぞれの数値をとり、停留辜丸群は実線で、偽手術対照群は点線で結んで、面の広さをもつて細胞数の多少を表現した。種類別細胞数は、総細胞数を100としてそれぞれの割合を棒グラフ上に、停留辜丸群と対照群を並べて表示した。Leydig 細胞は精細管間隙10カ所を無作為に選び、その中に含まれる数を算定して1カ所当りの平均値を対照群と共に図示した。

下垂体の組織は、光学顕微鏡を用いて前葉の sex zone を400倍に拡大観察し、その視野の中に含まれる500ケの細胞の中に、いくつ LH, FSH および去勢細胞が存在するかを点描した。

結果

停留第1週目：

停留辜丸では対照群と比べ、重量および肉眼的観察に関する有意な変化はみられない。組織学的には、上皮の中に分裂を起した多くの精祖細胞や精母細胞がみられるが、対照群と異なることは、精子細胞が全く形成されないことである。また、対照群と同程度に間質細胞の数が少く、精細管間の結合組織も貧弱である(写真1, 2)。この時期の下垂体は、停留辜丸群、対照群共に28日齢幼若ラットとしての共通した所見で、PAS 陽性の gonadotrophs の発達が不十分で、acidophils や basophile 以外の chromophobes の存在が目立っている。Basophils では、alcian blue に染る小型で多核形の TSH 細胞(甲状腺刺激ホルモン産生細胞)がほとんどを占め、PAS 陽性の gonadotrophs の出現は目立たない。これらの gonadotrophs も小型の卵円形のもので、これは LH 分泌細胞と思われるが、大型で PAS に陽性で Golgi 輪を入れた、いわゆる FSH 分泌細胞は稀にしか見当たらない(写真3, 4)。血清中の LH, FSH 濃度は、停留辜丸群と対照群との間にほとんど差はなかつた(図4)。以上の結果は、手術後1週間では対照群に比して有意の変化がおこっていないことを示している。

停留第2週目：

辜丸重量増は明らかに抑制され、組織学的に停留辜丸

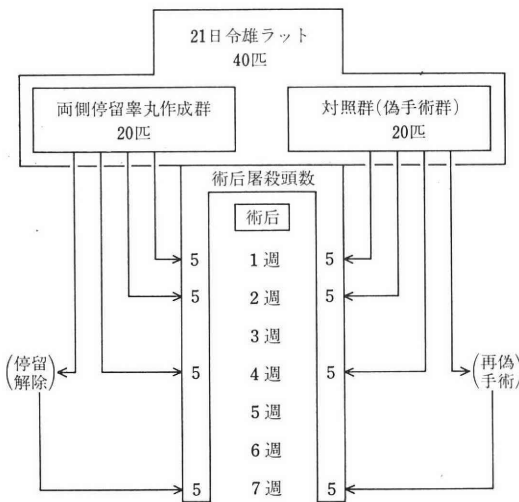


図1 実験動物仕分け

の精細管の直径は、対照群に比べ短縮し、精細管上皮も薄く、そのため管腔はかえって広がっていた。薄い精細管上皮では、第1次および第2次精母細胞の分裂は停止し、濃縮した上記細胞の鑑別がつきにくく、退化、変性している。一部は脱落消失するものと思われる。ま

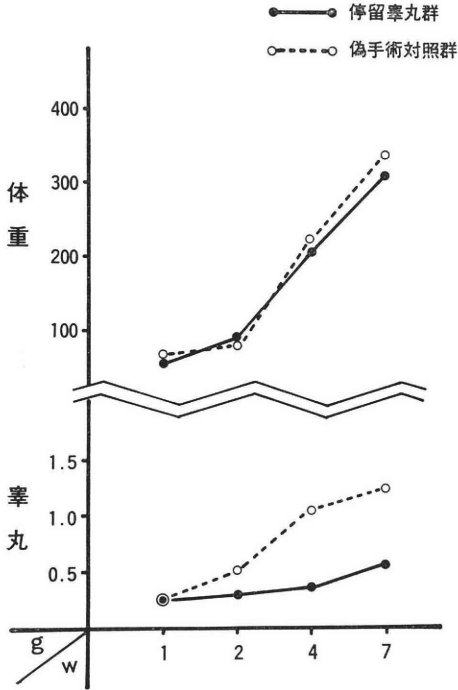
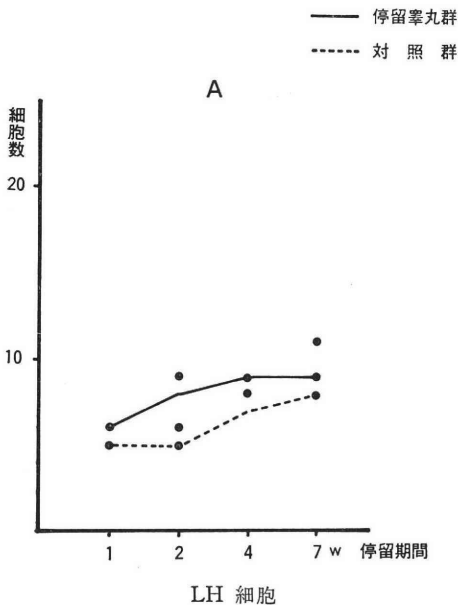
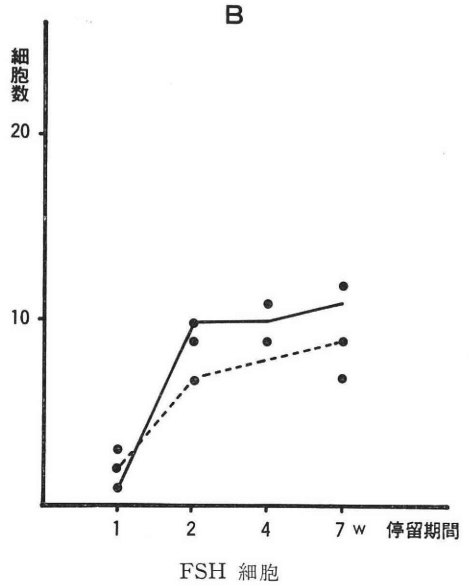


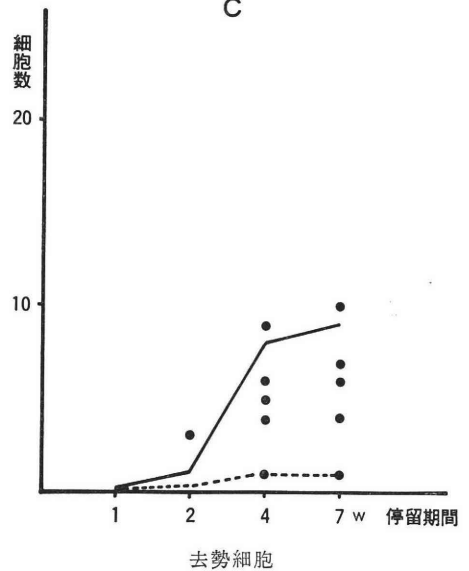
図 2 実験ラットの体重と睪丸重量
7w は停留4週間、解除後3週目を表す。停留睪丸の重量増加は著明に抑えられる



A



B



C

図 3 下垂体細胞数

註) 嫌色素性細胞500個中の各細胞数の平均値を示す、実線は停留睪丸群、点線は対照群、7w は停留4週間、解除後3週目

た、精子細胞もみられず、従って精子の出現もない(写真5)。このような退縮像を同日齢対照群と比較すると、明らかな差が認められた。即ち、35日齢では前の28日齢よりも精子形成能は進展し、精祖細胞、分裂しつつある精母および精子細胞が豊富に出現していた。精子も一部にみられる(写真6)。注目すべき組織所見は、間質細胞の数が停留睪丸においては対照群の2倍以上にも増え、明らかな異常増殖を示したことである(図5)。睪丸重量

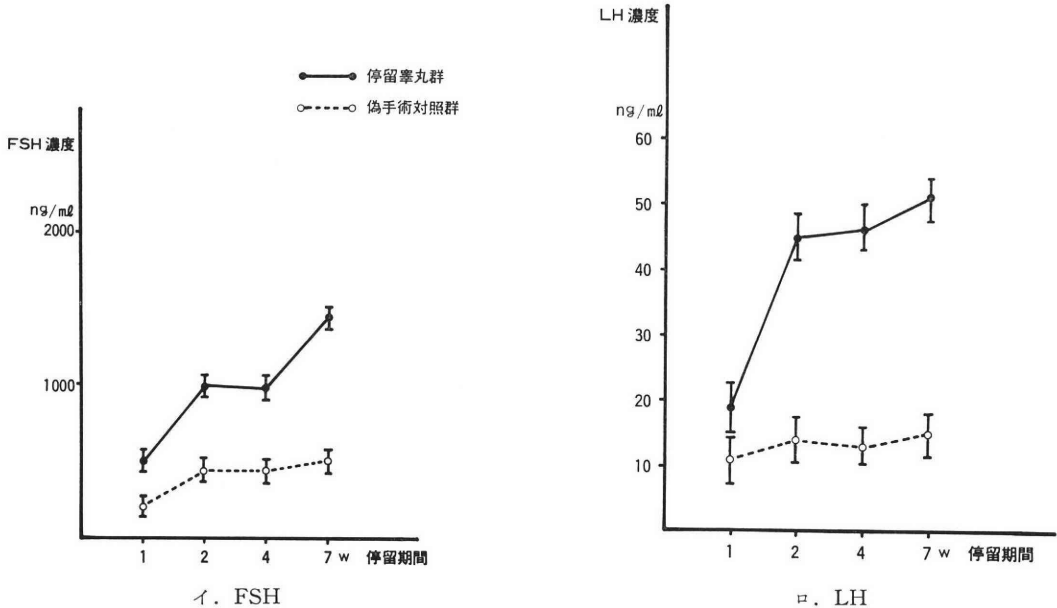


図 4 血清 gonadotropin 値
 註) 7 週は停留期間 4 週間, 解除後 3 週目を指す

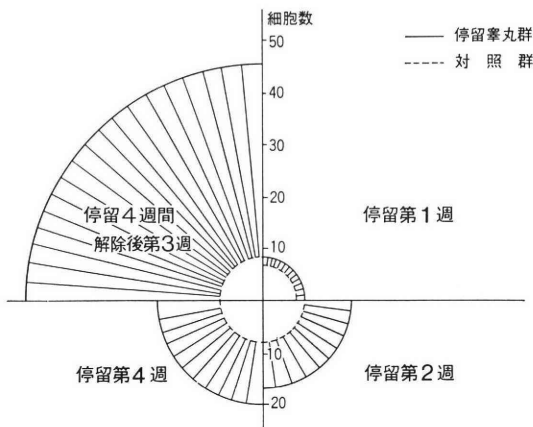


図 5 Leydig 細胞数の変化
 註) 精細管間隙内の Leydig 細胞の平均値を示す, 斜線部分は対照群との差

は, 対照群の約 $\frac{1}{2}$ であることは, 精細管の萎縮が甚だしいことを物語っている (図 2).

停留率丸群の下垂体は, PAS 陽性で小型の gonadotrophs (LH 細胞) がやや増加している傾向がある. 一方, 大型の PAS 陽性の FSH 細胞は対照群と比して有意の変化がみられなかった. 加齢に伴い (28日齢→35日齢) FSH 細胞の数がふえることは当然である (写真 7, 8, 図 3) が, しかし停留率丸で TSH 細胞が対照群に比べ, むしろ減少傾向にあったことが特徴的であった. 血清中の LH, FSH 量は著明に増加し, 対照群に比べ

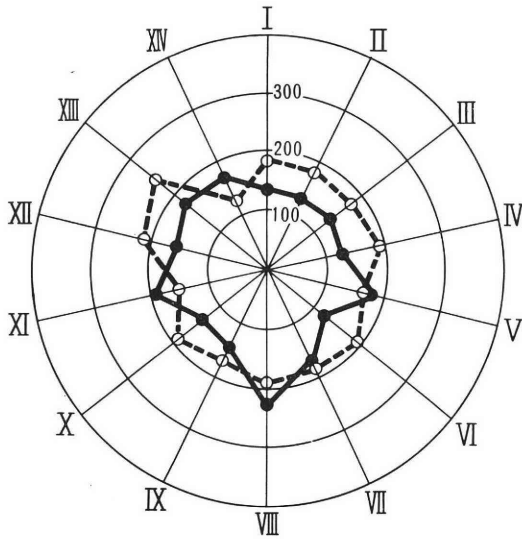
て有意の差がみられた (図 4).

停留第 4 週目:

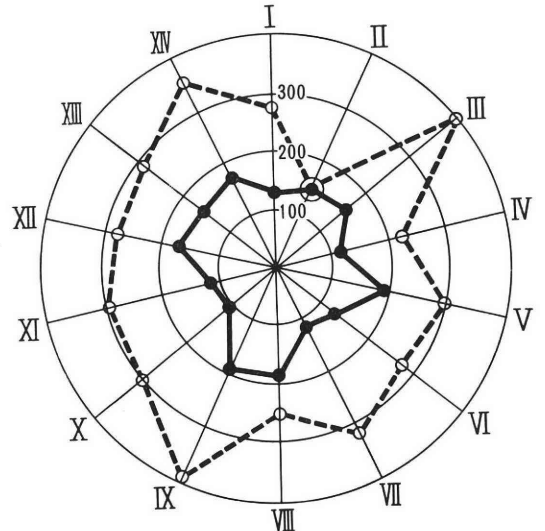
50日齢に達した対照群の率丸重量は, ほぼ成熟重量に近いが, 停留率丸では約 $\frac{1}{3}$ の重量しかない (図 2). 精細管上皮が極度に萎縮した結果, 管腔は著明に拡張し, 上皮細胞が分裂を停止するのは勿論のこと, ほとんどすべての細胞が濃縮性変性を起し, 特に精母細胞の核が不揃いになっていた. かなり多くの細胞が変性して脱落するものと思われる. 精祖細胞および Sertoli 細胞を除くほとんどすべての細胞が, 著しく減少していた (写真 9). 残存する精祖細胞は, 幹細胞と称される A 型細胞だけになっており, 精母細胞への分化の前段階にある B 型細胞が欠除していた. 一方, 間質細胞は 2 週のものよりさらに増殖し, 広くなった精細管の間隙を埋めた. 精細管の基底膜にも一部の肥厚がみられるが, 硝子化変性は起っていない.

下垂体組織は, 50日齢の対照群では性成熟期に達するために LH および FSH 細胞が増加するが, 停留率丸群では上記 gonadotrophs がさらに増加し (写真 11), 去勢細胞 (Castration cell) も急激に増えていることから, gonadotropin の分泌亢進状態が推察された. しかも, 血中の LH および FSH 値は正常対照群のそれぞれ 4 倍と 2 倍に達していた (図 4). なお, TSH 細胞の数は不変か, やや増加の状態を示した.

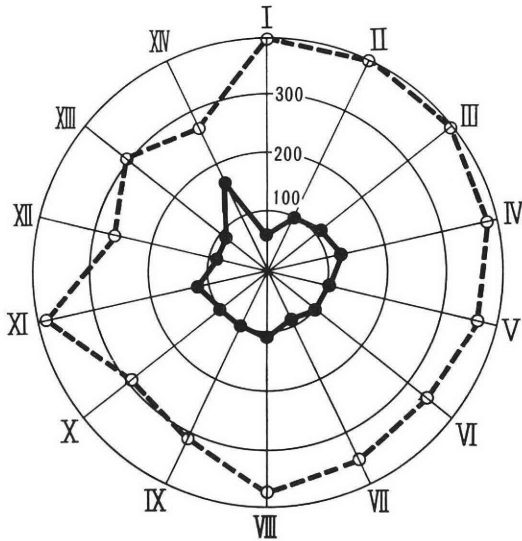
停留 4 週間, 解除後 3 週目:



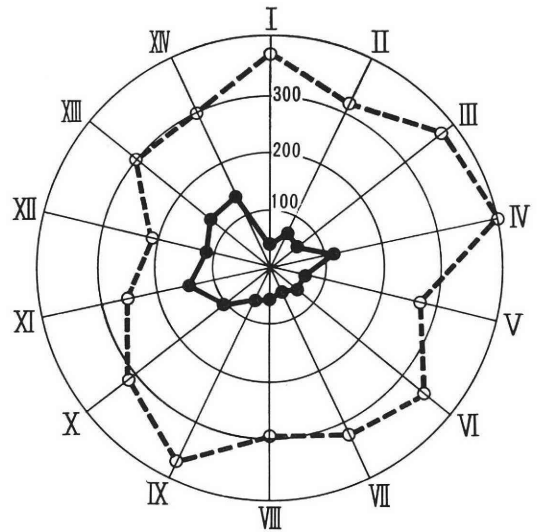
a. 停留第1週
対照群とほぼ差はない



b. 停留第2週
停留率丸は1週目と余り変化ない



c. 停留第4週
停留率丸の萎縮著明となる



d. 停留4週、解除後3週
細胞増加なく、むしろ減少する

図 6 精細管内細胞数の変化

- 註 1. アラビア数字は率丸の stage を示す (Leblond & Clermont の分類)¹⁴⁾
- 2. 実線は停留率丸群, 点線は偽手術対照群

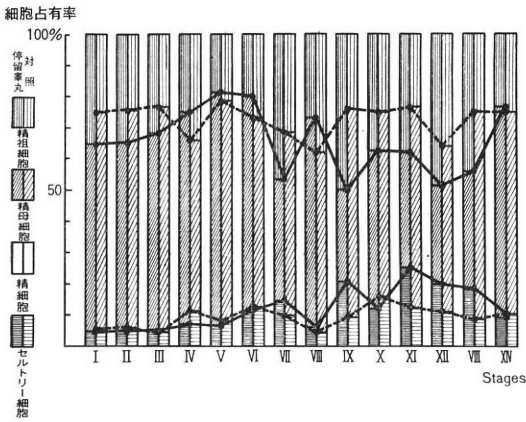
4 週間を経過した停留を再手術によつて腹壁から陰囊内に戻した率丸は、3 週後も同日対照群の 1/2 の重量を示し、精細管の萎縮、変性の回復も示さなかつた。すなわち、解除後の停留率丸で間質細胞の増殖をもとの状態にもどすことは不可能であつた(写真13)。しかし、停留解除前と解除後を比較すると、組織学的に回復は認めないまでも、その増悪は進行していなかつた。

下垂体の gonadotrophs の変化も、停留解除によつて

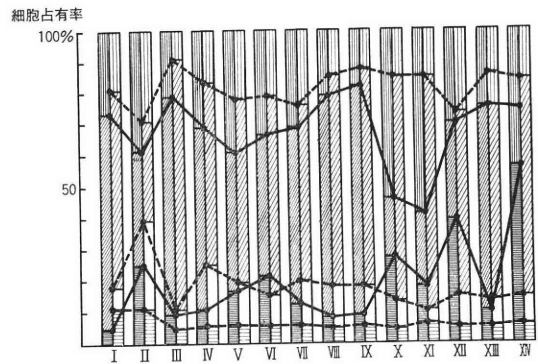
回復を示す像はみられなかつた。即ち、依然として去勢細胞が存在していた(写真15)。血清 LH および FSH 値は緩徐ながら継続的にさらに増加しており、下垂体の分泌は減退していなかつた(図 4)。

精細管の形態学的計量

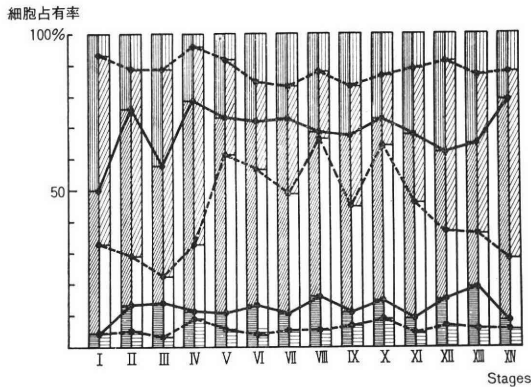
図 6 は Leblond & Clermont の精細管 Stage 分類法¹⁴⁾を用いて、停留率丸の時間経過別に精細管の総細胞数を面の広がりで示したものである。停留第1週目



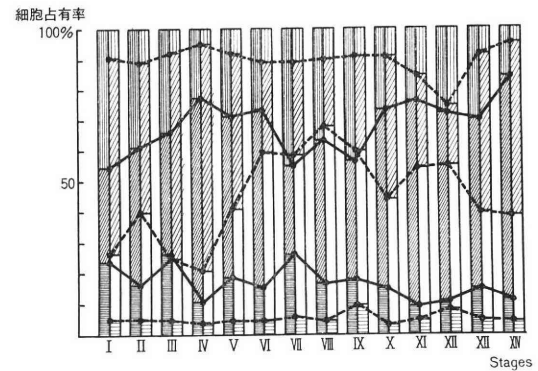
イ. 停留第1週目
精母細胞の減少が stage XI, XII を中心にみられる



ロ. 停留第2週目
精母細胞の出現はみられない



ハ. 停留第4週目
精祖細胞の割合がむしろ増える



ニ. 停留4週間, 解除後第3週目

図7 精細管内各細胞群の比率
註) 実線は停留辜丸群, 点線は対照群の変化を示す

は、全 Stage にわたりほぼ均等な細胞数を示し、対照群との間に差はない。しかし、第2週以降は停留辜丸群に著明な細胞数の減少があり、この傾向は停留解除後第3週目の辜丸にも及び、回復の徴候はみられなかった。

図7は各 Stage の精細管の総細胞数を100とした場合に構成する細胞の占める割合を1本の棒線上に示したものであるが、これで見ると停留辜丸第1週目にして分裂期の精母細胞を含む Stage IX, X, XI, XII, XIIIに減少傾向がみられる。第2週目になると、pachyten 期の精母細胞は、さらに明確に減少する。停留辜丸解除後も精母細胞の数は増加の傾向になく、平均的な占有率が52%と解除前とほぼ同じであった。精祖細胞は、辜丸の停留期間にかかわらずその絶対数はほぼ一定であるが、精母細胞の減少と共に占める割合が高くなった。同様の変化は、Sertoli 細胞にもみられ、その絶対数は不変であつ

た。精子細胞は、停留辜丸の実験全期を通じて出現せず、従つて精子もみられなかった。

精細管間隙に含まれる Leydig 細胞の数は、対照群においてはほぼ一定であるのに対し、停留辜丸では停留期間をおくにしたがつて著明に増加し、この傾向は停留解除後にもつづいて増加していたことが示されている(図5)。

結果の小括

21日齢ラットに実験的に停留辜丸をつくつた場合、時間の経過と共に如何なる変化が辜丸および下垂体 gonadotrophs に出現するかを形態学的並びに定量形態学的にしらべ、さらに下垂体 LH および FSH 量を測定した。

停留辜丸の第1週目には先づ、精母細胞の分裂増殖が

表 停留率丸/対照(偽手術)群比較総図

検討事項 停留期間	率 丸						下 垂 体				Gonadotropin		
	重量 g	精 細 管			ライディック	LH 細胞	FSH 細胞	去勢細胞	LH ng/ml	FSH ng/ml	RIA 法		
		精子細胞数	精子	精子細胞/精母細胞							精祖細胞	セルトリ	1 精細管間隙内の数
1 週	0.25/0.25	159/186	0/0	0/0	83/117	55/51	21/18	7/6	6/5	1/2	0/0	19/11	500/200
2 週	0.30/0.50	157/292	0/+	0/30	84/197	53/49	20/16	17/7	8/5	10/7	1/0	45/14	1000/440
4 週	0.40/1.10	111/359	0/+	0/131	65/166	33/42	13/20	20/7	9/7	10/8	8/1	46/13	980/440
4 週間停留解除後3週目	0.60/1.30	88/318	0/+	0/124	50/146	26/33	12/15	45/7	9/8	11/9	9/1	51/15	1440/500

(注)

止り, 第2週目には一部の細胞が変性に陥り脱落するものがあり, さらに Leydig 細胞が異常に増殖しはじめ, 停留第4週目に到るとこの傾向は著明になった。精細管腔は拡張し, 上皮は極めて薄く, 精祖細胞と Sertoli 細胞以外のすべての細胞は退化, 脱落傾向を示した。この時点で停留率丸を解除しても, その3週後の率丸は組織学上, 特に改善された様子はみられなかった。

下垂体は形態学的に, 停留率丸第1週目は対照群に比べて有意の変化はみられなかったが, 第2週目以降は LH および FSH 分泌細胞の増加は対照群より著しく, 第4週目には gonadotropin の分泌過多の状態を示す去勢細胞の増加が顕著になった。これら下垂体の組織変化を反映するように, 血清中の gonadotropin が増加しはじめ, 停留率丸第1週目ですでに有意の差がみられたが, LH, FSH 共に停留2週目に急激な分泌増加がみられた。2週目以降は両者共緩徐な上昇をたどり, 停留解除後にも増加の傾向を示した(表参照)。

考 按

実験的停留率丸が発生する経時的な組織学的変化に関しては, すでに多くの報告がある。停留初期には Sertoli 細胞に変化が起り, 続発的に生殖細胞に変化が波及すると言われる¹²⁾。一般に Sertoli 細胞は, 精子発生における精母細胞以降の時期に対する栄養細胞の役割を果たすと考えられており¹³⁾, 停留率丸においては, この細胞と血液の関門 (blood-testis barrier) が加温されることによつて酵素異常を来し, 蛋白の合成能が落ち, その結果依存細胞の栄養障害を起すと説明されている¹⁴⁾。しかし, 今回の実験では Sertoli 細胞の初期における機能低下を示唆する光顕的所見は得られなかった。停留四週目にみられたごとく, 精子形成細胞が退化しても, この細胞の形態はよく保持されており, 強い抵抗力を示した。これらの所見は, 停留率丸における Sertoli 細胞の変化に基づいて生殖細胞の退行変性が起ると言う従来の説とは相入れない。しかし, 本研究の検索は光顕レベルでの形態的観察であり, さらに微細な変化は電子顕微鏡的に検討される必要がある。そこでここでは Sertoli 細胞と FSH 細胞の間の feedback 機構から考えてみたい。多くの研究者は, Sertoli 細胞が FSH の受容体をもつ細胞であると同時に, negative feedback の信号を前葉に送る発信器の役割を果たすものと考えている。Sertoli 細胞から如何なる物質が出され, これが下垂体の FSH 細胞に feedback して多量の FSH を放出させるかについては, Inhibin 等の物質の果たす役割が論じられている¹⁵⁾¹⁶⁾。では, 停留率丸において FSH が上昇しているにも拘らず Sertoli 細胞がこれに反応しないのは何故

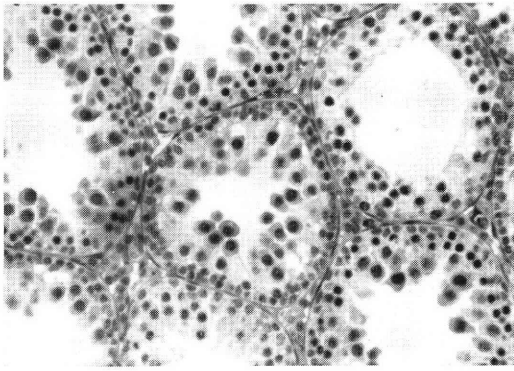


写真 1 停留第1週目睾丸
精母細胞の数がやや少ない

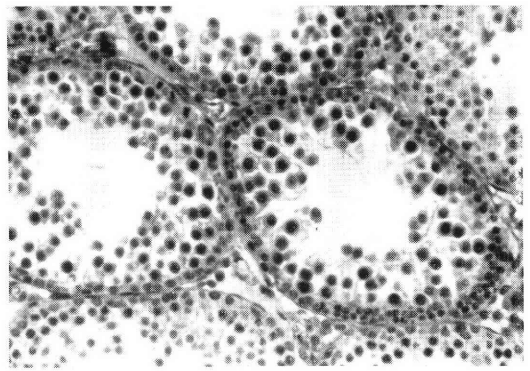


写真 2 偽手術第1週目睾丸
活発な精母細胞の造成がみられる

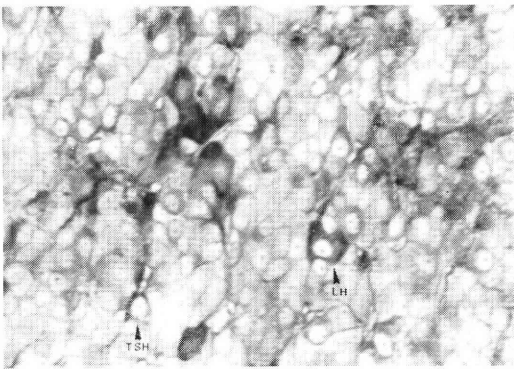


写真 3 停留睾丸第1週目下垂体前葉
左下角にみられるような TSH 分泌細胞が散在しているが、右下中心部の LH 分泌細胞は少い。周囲の明るい細胞は chromophobe 細胞

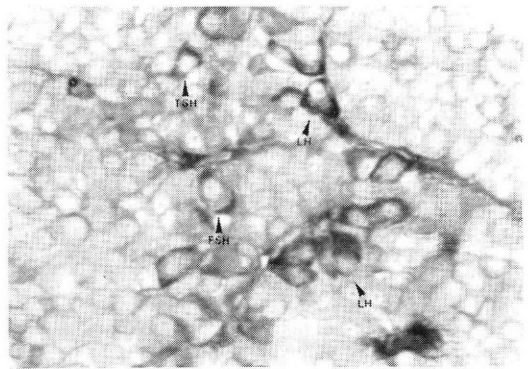


写真 4 偽手術第1週目下垂体前葉
小型の basophils (TSH 分泌細胞) が主体で
LH, FSH 分泌細胞は少い

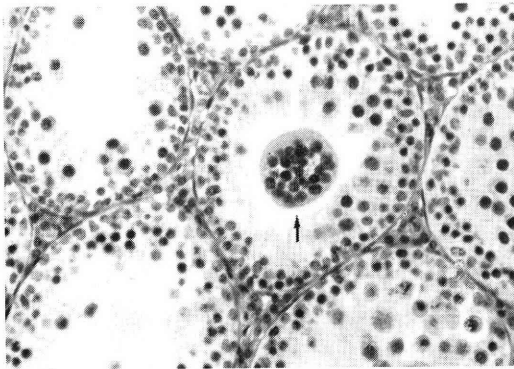


写真 5 停留第2週目睾丸
脱落した精母細胞が一塊となり精細管内を流れる
様子がみられる(矢印)

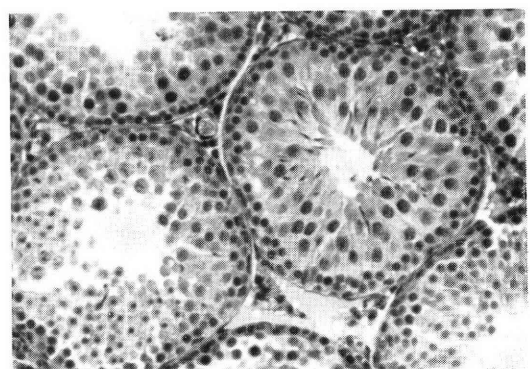


写真 6 偽手術第2週目睾丸
活発な精母細胞の分裂と精子細胞の発達がある

か？ これは温度変化によつて Sertoli 細胞の受容体が不活性化したことに原因があると考えられる。しかし、これは確な証拠のない推論であつて、この説明は今後の基礎的研究にまつよりほかない。

一方、睾丸の間質細胞 (Leydig) は幼若ラットを使つた停留睾丸の実験では、精細管の萎縮が起るのとは反対に増殖することが知られている¹⁷⁾。このことは著者の実験でも確認されたが、特に成長過程にあるラットが性成

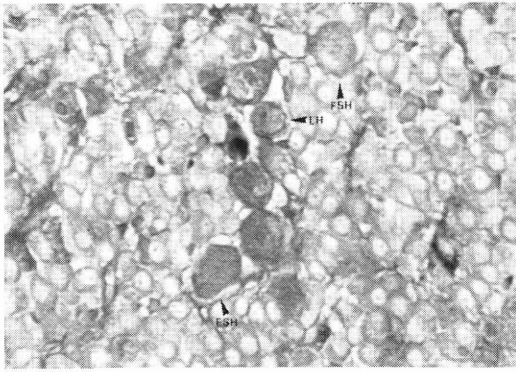


写真 7 停留率丸第2週下垂体前葉
小型の LH 分泌細胞の他 FSH 分泌細胞も増加

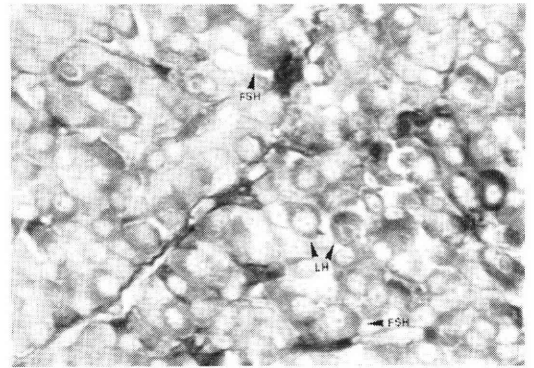


写真 8 偽手術第2週目下垂体前葉
LH 及び FSH 分泌細胞が増加傾向

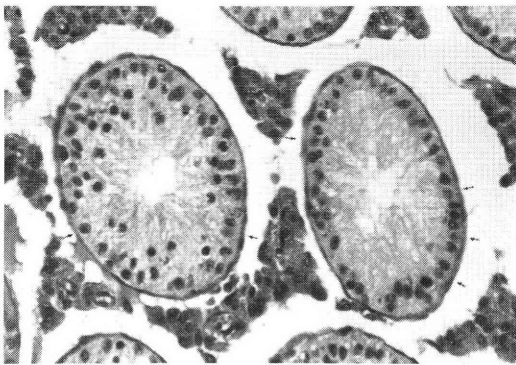


写真 9 停留率丸第4週目率丸
精細管が空虚で精母細胞の核の不整が目立つ。
精祖細胞はA型(矢印)である。間質細胞の著
明な増殖がみられる

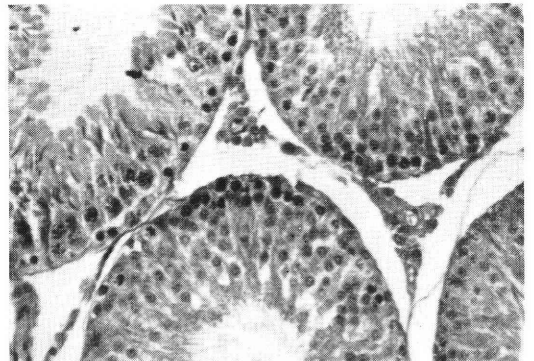


写真 10 偽手術第4週目率丸
成熟率丸像で精子が精細管腔にみられる

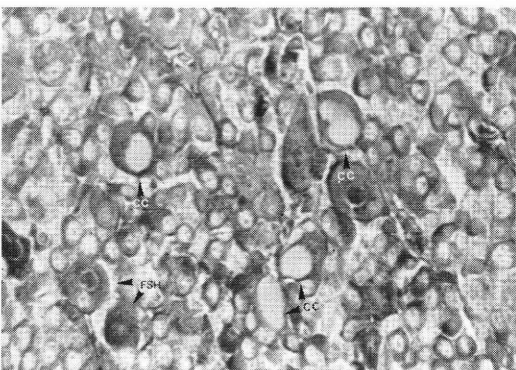


写真 11 停留率丸第4週下垂体前葉
去精細胞(CC)が散在, FSH 分泌細胞も増加
している

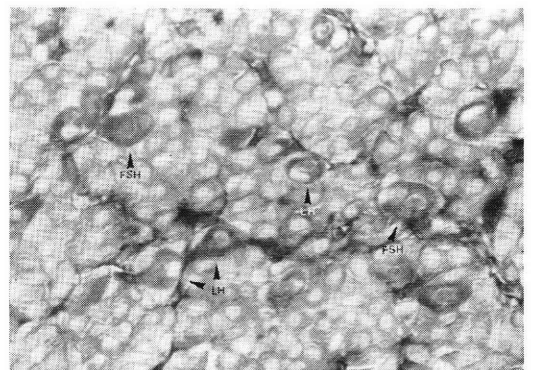


写真 12 偽手術第4週目下垂体前葉
分泌顆粒を含んだ LH, FSH 分泌細胞が多数
みられる

熟期に達する頃から、Leydig 細胞が急激に数を増す傾向がみられる。これは、多量の LH が長期にわたって作用したためとも考えられる。この LH の分泌亢進は、次の様なメカニズムによって生ずることが想定される。

すなわち、停留率丸において温度上昇が Sertoli 細胞の機能を低下させることにより、feedback を介して下垂体を刺激し、FSH の分泌を促す。これに伴って、恐らく同じ生産細胞であろうと考えられる gonadotrophs か

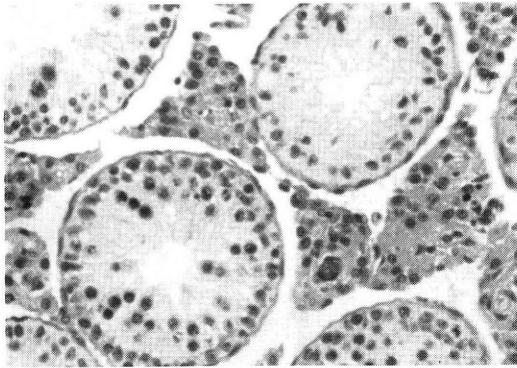


写真 13 停留 4 週解除後第 3 週目辜丸
やや精母細胞の数を増した部分もあるが、全般的に精細管は小さく空虚である。Leidig 細胞は依然増加した状態がづく

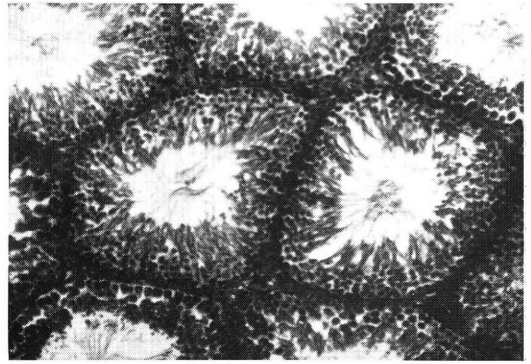


写真 14 偽手術対照第 7 週目辜丸
活発な造精能を保つ

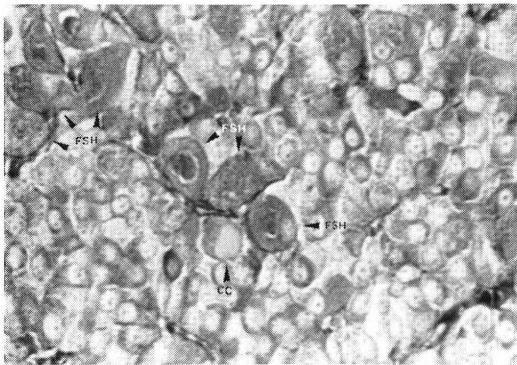


写真 15 停留辜丸 4 週, 解除後第 3 週目下垂体前葉
FSH 分泌細胞が目立つ中で去勢細胞もみられる。(CC 去勢細胞)

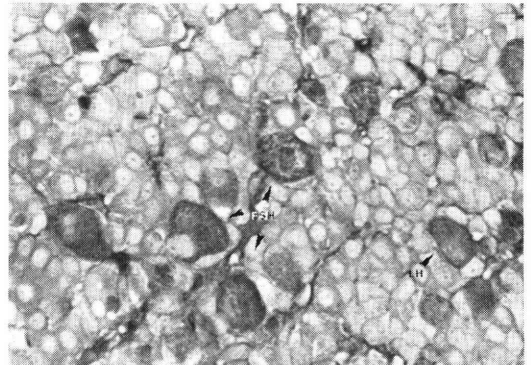


写真 16 偽手術対照第 7 週目下垂体前葉
活動的な LH 及び FSH 分泌細胞が存在する

ら LH も附随的に放出されると言うものである。さらに最近の免疫組織学的研究によれば、Classical LH や FSH 細胞は同じ細胞だとする説があり、現在のところ両細胞が全く別々の機能をもつことについては懐疑的である¹⁸⁾¹⁹⁾。こうした見方から、血中 LH の上昇が Leydig 細胞の増殖を起したものと解釈される。しかし、増殖した Leydig 細胞から余分に androgen が分泌された様子がないことは、谷野等²⁰⁾²¹⁾の bioassay でも指摘されている。この理由は矢張り、温度上昇による androgen の合成酵素に何等かの障害があるのではないかと推測される。

若し停留辜丸が比較的早期に解除されるなら、Sertoli 細胞や Leydig 細胞の機能が回復し、gonadotropin が有効に作用するに違いない。事実、著者が観察し得た実験 4 週までの停留辜丸では、本来の基幹細胞が残存しているので、Sertoli 細胞の機能さえ回復すれば栄養能力

が FSH により再開し、精母細胞から精子形成が履行される可能性が認められた。しかし、実際にはこの時点で停留解除は、辜丸組織の退化をそれ以上に進行させないだけで、完全に回復させるには至らなかった。また、血中の LH, FSH 濃度もそれほど低下しなかつた。このことは、Sertoli 細胞が再び低温環境に戻された場合、当然受容体が賦活するはずではあるが、長期間にわたって高温に曝されたために受容体が完全に非活性化し、元にもどれなくなつたためと解釈される。いずれにしろ、未熟期から性成熟期に至る期間に停留辜丸は最も強い変化を受け、その後に停留が解除されても、ほとんど機能回復が望めないことが実験的に証明された。

結 論

成熟ラットを使った実験的停留辜丸は、Sertoli 細胞依存の精母細胞や精細胞が成育を止め、これらの細胞の壊死、脱落を招くとされているが、幼若ラットを使った

本実験でも同様の結果を確認し、加えて間質細胞 (Leydig) の著明な増殖を観察した。

Leydig 細胞の増殖は、成熟ラットのそれよりもはるかに強い LH 分泌亢進による影響と考えられ、次のような睪丸-下垂体間の関係が想定された。

① 実験的停留睪丸は、Sertoli 細胞の機能低下をもたらし、下垂体への negative feedback を促進させる。

② この feedback を受けて下垂体は、FSH 分泌を増加させるが、恐らくは FSH, LH 共通細胞の分泌亢進により LH も増える。

③ 増加した LH が刺激になって睪丸の Leydig 細胞が過剰に増殖する。

停留解除後の睪丸及び下垂体組織も観察したが、組織学上睪丸の回復はみられず、下垂体前葉細胞の変化も gonadotropin の分泌亢進状態が持続したままで、睪丸からの feedback は継続しているものと思われた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始深甚なるご指導、御校閲を賜った恩師、町田豊平教授、組織学的検索に際しご指導並びにご校閲を賜った本学第二解剖学教室、吉村不二夫教授に厚く感謝の意を表します。また本研究に際しご協力をいただいた谷野誠助手、小寺重行助手はじめ泌尿器科学教室各位に、心から感謝いたします。なお、本論文の要旨は第67回日本泌尿器科学会総会で発表した。

文 献

- 1) Lloyd, B. J.: Plasma testosterone and accessory sex glands in normal and cryptorchid rats. *J. Endocrinol.* 54: 285, 1972.
- 2) Chowdhury, A. K. and Steinberger, E.: A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testis. *Am. J. Anat.* 115: 509, 1964.
- 3) Chowdhury, A. K. and Steinberger, E.: Early changes in the germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. *J. Reprod. Fertil.* 22: 205, 1970.
- 4) Morehead, J. R. and Morgan, C. F.: Cryptorchidism, Its pre- and postpubertal effects on the hypophysis of the rat. *Fertil and Steril.* 18: 530, 1967.
- 5) Clegg, E. J.: Studies on artificial cryptorchidism: Compensatory changes in scrotal testes of unilaterally cryptorchid rats. *J. Endocrinol.* 33: 259, 1965.
- 6) Altwein, J. E. and Gittes, R. F.: Effect of cryptorchidism and castration on FSH and LH levels in the adult rat. *Invest. Urol.* 10: 167, 1972.
- 7) 川上正澄: [II] 雄性機能と内分泌, A. 視床下部-下垂体-精巣系の基礎内分泌, 内分泌学, 吉村不二夫他編, 796, 南山堂, 東京, 1978.
- 8) 藤井儔子: 動物実験手技, 409, 協同医書出版社, 東京, 1975.
- 9) Yoshimura, F., Soji, T., Kumagai, T. and Yokoyama, M.: Secretory cycle of the pituitary basophils and its morphological evidence. *Endocrinol. Japon.* 24: 185, 1977.
- 10) 吉村不二夫: 下垂体前葉 Basophils の生活史および分泌サイクル, 第4回河口湖カンファレンス, 下垂体-基礎と臨床, 井村裕夫他編, 184, 医歯薬出版, 東京, 1976.
- 11) Leblond, C. P. and Clermont, Y.: Definition of Stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Soci.* 55: 548, 1952.
- 12) Jones, T. M., Anderson, W., Fang, V. F., Landau, R. L. and Rosenfield, R. L.: Experimental cryptorchidism in adult male rats: Histological and hormonal sequelae. *Anat. Rec.* 189: 1, 1977.
- 13) Fawcett, D. W.: Ultrastructure and function of the Sertoli cell. *Handb. of Physiol., Sect. 7, Endocrinology Vol. V*: 21, Am. Physiol. Soci., Washington, D. C. 1975.
- 14) Main, S. T. and Waites, M. H.: The blood-testis barrier and temperature damage to the testis of the rat. *J. Reprod. Fert.* 51: 439, 1977.
- 15) Johnsen, S. G.: Human testis, 231, Plemun press, N. Y., 1970.
- 16) Lacy, D. and Petit, A. J.: Sites of hormone production in the mammalian testis and significance in the control of male fertility. *Brit. Med. Bull.* 26: 87, 1970.
- 17) Davis, J. R. and Firlt, C. F.: The germinal epithelium of cryptorchid testes experimentally induced in prapubertal and adult rats. *Fertil and Steril.* 17: 187, 1966.
- 18) Herbert, D. C.: Immunocytochemical evidence that luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) are present in the same cell type in the rhesus monkey pituitary gland. *Endocrinology.* 98: 1554, 1976.
- 19) Yoshimura, F., Nogami, H., Shirasawa, N. and Yashiro, T.: Whole range of fine structure criteria of immunohistochemically identifiable L. H. cells in rats. *Cell. Tiss. Res.* 投稿中.
- 20) 谷野 誠, 稲葉善雄, 小寺重行, 町田豊平: 停留睪丸の研究 (第一報) 実験的停留睪丸の組織学的検討, 日不妊会誌, 21: 557, 1976.
- 21) 谷野 誠, 稲葉善雄, 小寺重行, 町田豊平: 停留睪丸の研究 (第二報) 実験的停留睪丸の組織学的検討, 日不妊会誌, 22: 362, 1977.

Testicular-hypophyseal function observed in experimentally induced cryptorchism in rat

Yoshio Inaba

Department of Urology, School of Medicine, Jikei University
(Director: Prof. Toyohei Machida)

Bilateral experimental cryptorchism created in the three weeks old rats and sacrificed them on the first, second and fourth week and examined for the testicles and the hypophyses under the light microscope. The serum gonadotropines were measured. Some cryptorchid testes were released on the fourth week and then examined them four weeks later. The results were...

1) The testis was extremely depressed of its normal growth and those cells like a spermatocyte or a spermatid depending on the Sertoli cell were ceased their development and gradually degenerated and dropped off.

2) The Leyding cell increased of its number while the seminiferous tubules became to be atrophic.

3) The number of FSH secretory cell of the anterior lobe of the pituitary gland increased as well as LH cells, and the many castration cells appeared in the fourth week.

4) There was no improvement either histologically or hormonally in the rats after released cryptorchid testes.

These changes are thought to be as follows: The Sertoli cell impaired by the cryptorchism sends feedback to the hypophysis and stimulates to increase FSH secretion that accompanies LH acceleration. Increased LH then brings the Leydig cell population to be rising up.

(受付: 昭和55年3月14日)

男性不妊とカリクレイン

—高単位カリクレイン錠の有用性について—

Kallikrein and Male Infertility : Usefulness of High-unit Kallikrein Tablets

神戸大学医学部泌尿器科学教室

松本 修 羽間 稔 高田 健一
Osamu MATSUMOTO Minoru HAZAMA Ken-ichi TAKADA
富岡 収 守殿 貞夫 石神 襄次
Osamu TOMIOKA Sadao KAMIDONO Joji ISHIGAMI

The Department of Urology, Kobe University
School of Medicine

男性不妊に対する高単位カリクレイン錠の長期間投与について検討した。精子運動不良な対象26症例を精子運動率40%未満のA群9症例、40%以上のB群17症例にわけ、A群には600k.u./日6カ月間、B群には前半3カ月300k.u./日、後半3カ月600k.u./日を投与した。その結果、精液所見に対する効果は以下のとおりであった。a) 精子濃度の改善はなし、b) 量的・質的精子運動の有意な改善、c) 精子形態の改善、d) 総活動精子数の有意な増加、e) 精液量の増加傾向。

治療中の血漿中テストステロン、FSH、LH レベルは有意な変動がなかった。精漿中の果糖、コレステロール、ALP、ACP、GOT、LDH の変動を検討し、ACP、GOT の上昇傾向、ALP の低下傾向を認めたものの治療効果と相関するパラメーターはなかった。26症例中8症例に配偶者の妊娠成立を認めた(妊娠率30.8%)。また特記すべき副作用は認めなかった。

緒言

Kallikrein-Kinin 系の歴史は1925年に Frey が尿中に非透析性の血圧降下物質を発見し、これを Kallikrein と命名したことに始まる。その本態が血中の特定の蛋白質からペプチドを解離させる酵素であることが1937年 Werle らによって明らかにされ¹⁾、そのペプチドが kallidin と名づけられるに至って急速な発展をとげた。その後の研究により Kininogenase たる kallikrein は血漿カリクレインあるいは組織カリクレインとして生体内に広く存在し、それぞれ主に bradykinin, kallidin を解離せしめ²⁾、Kallikrein-Kinin 系として全身血圧降下、平滑筋収縮、血管透過性亢進、発痛などの種々の生理作用を有することが明らかにされてきた(Fig. 1)。臨床的には、循環器系疾患などに広く応用されている。

一方、近年になり Kallikrein-Kinin 系が受精、生

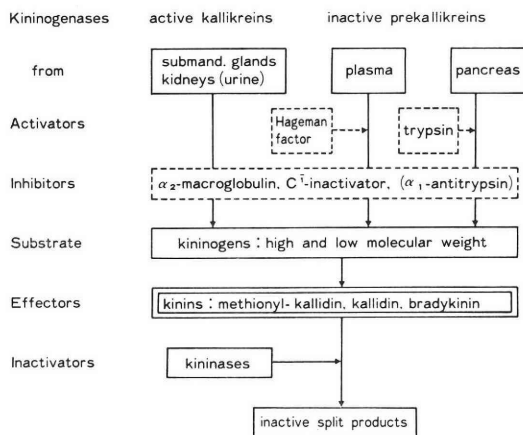


Fig. 1 Components of the Kallikrein-Kinin-system
From H. Fritz 1975²⁾

殖, 特に雄性生殖機能や精子生理などにおいても重要な役割を演じていることが明らかにされてきた. この事実から Kallikrein-Kinin 系と生殖に関する臨床的研究が積極的に進められ, 欧米においては Kallikrein 製剤はすでに男性不妊の治療法の一つとして評価されている⁴⁾. 我々も第20回不妊学会総会などにおいて男性不妊に対する Kallikrein Depot 剤の有効性を発表した⁴⁾. しかし男性不妊の治療においては depot 剤よりも錠剤による治療の方が便利で治療継続も比較的容易と思われるので, 今回は高単位カリクレイン錠の長期投与による男性不妊の治療効果を検討し, かつ本剤投与による各種の血中, 精液中パラメーターの変動を観察したので報告する.

対象および方法

対象は神戸大学医学部附属病院泌尿器科不妊外来を受診した精子無力症および乏精子症患者である. 使用した Kallikrein 製剤はバイエル社製 hog pancreatic Kallikrein 製剤 ®Kallikrein で, 1錠50K.U. (Kallikrein unit) の高単位錠剤である (現在市販の ®Kallikrein 錠は10K.U.). Kallikrein が主に精子運動の改善に効果がある⁴⁾ことから, 患者は原則として精子運動不良のものを選び, 対象群を精子運動率により40%未満のA群, 40%以上の比較的良好的なB群の2群に分けた. 投与方法としては, A群には Kallikrein 錠を1日12錠 (600K.U./day) 6カ月間連続投与, B群には同剤1日6錠 (300K.U./day) を3カ月間, 続く3カ月間には1日12錠 (600K.U./day) と増量し計6カ月間投与した. A, B両群ともに Kallikrein 投与期間中1カ月毎に来院させ精液検査を施行した. 精液検査は禁欲7日目に用手法によつて採取した検体を30分間室温静置後よく混和し, その精液量, 精子濃度, 運動率, 奇形率および精子活動度を測定した. 精子濃度算定は0.5% formalin 液による希釈法を, 奇形率算定には Mayer-Stiasny 染色法を用いた. 精子活動度については運動精子をその運動速度によつて quick moving spermatozoa, moderately moving spermatozoa, slow moving spermatozoa の3段階に評価し運動精子におけるそれぞれの比率を記録した. また Kallikrein による精漿構成成分に対する影響をみるため, 精漿中の fructose, ALP, ACP, GOT, LDH および cholesterol の各濃度あるいは活性を測定した. fructose は30分静置後の精液について resorcin methanol 法によつて測定した. 他については精液を1500g 30分間遠沈し精漿を分離し-70°C に凍結保存, 7日以内に測定する様にした. ALP および ACP は Bessey-Lowry 法, GOT は Karmen 法, LDH は

Babson-Philips 法, cholesterol は Zurkowski 法により測定した. また精液検査と同時ににおける血中 Testosterone, FSH および LH 各 level を RIA 法により測定した.

Kallikrein 投与総症例はA群13例, B群27例の計40症例であるが, 脱落例が14症例あり対象症例は26例である. なお6カ月以内に配偶者の妊娠成立が判明したためにその後の精液検査を行なかつた症例は精液所見の評価からは除外した. したがつて最終的に精液所見の検討をしえたのはA群9症例, B群14症例の計23症例であつた. この23症例について精液所見の変動を投与前の結果と比較検討した. Kallikrein の有用性を検定するため, 投与による精液所見の変動について Friedmann's test⁷⁾を行ない有意傾向 ($P < 0.2$) のものについては, Wilcoxon の符号順位検定法 (Wilcoxon signed rank test)⁷⁾により1カ月毎に各精液所見を治療前値と比較検定した.

成績

高単位 Kallikrein 錠を6ヶ月間投与しえたA群9例およびB群14例の年齢分布などは以下に示すとおりである. A群9症例の年齢分布は28~37歳, 平均34.1歳で不妊期間は2年7カ月~7年, 平均4年9カ月である. 本群の治療前の精液所見は精子濃度 $13 \sim 25 \times 10^6/\text{ml}$, 平均 $17.3 \times 10^6/\text{ml}$, 精子運動率 $5 \sim 38\%$, 平均 27.2% であつた. B群14症例の年齢分布は25~39歳, 平均30.9歳, 不妊期間は1年8カ月~8年3カ月, 平均4年2カ月である. B群の治療前精液所見は精子濃度 $10 \sim 35 \times 10^6/\text{ml}$, 平均 $21.5 \times 10^6/\text{ml}$, 精子運動率 $41 \sim 77\%$, 平均 57.5% であつた.

精液量

Fig. 2は治療前および治療中の精液量の変動をA, B各群の平均精液量で表わしたもので, A, B両群ともに治療終了時においてやや増量の傾向を示す. 特にA群では前平均 1.7ml から徐々に増加し, 6カ月後には 2.4ml へと増量していたが, 推計学的には有意な増加ではなかつた.

精子濃度

精子濃度はA, B両群ともに治療後濃度がやや低下する傾向を認めた (Fig. 3). 特にB群においては治療開始後1カ月目の精子濃度が治療前平均 $21.5 \times 10^6/\text{ml}$ から $18.1 \times 10^6/\text{ml}$ まで低下したが推計学的には有意の変動ではなかつた.

精子運動率

Fig. 4に示すように Kallikrein 投与によつて精子運動率は, 治療前運動率の不良なA群において著明に改善

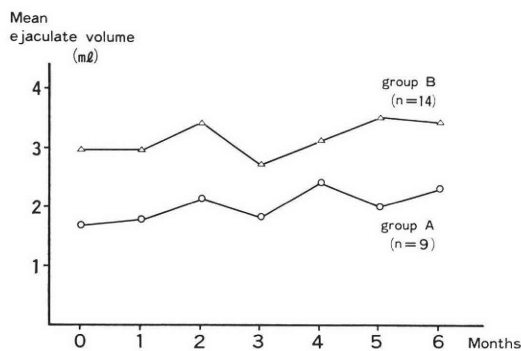


Fig. 2 Mean ejaculate volume during oral administration of Kallikrein

group A: sperm motility rate < 40% administered 600KU/day orally during a period of 6 months

group B: sperm motility rate ≥ 40%, but qualitative motility is poor administered 300KU/day orally during first 3 months and 600 KU/day during next 3 months

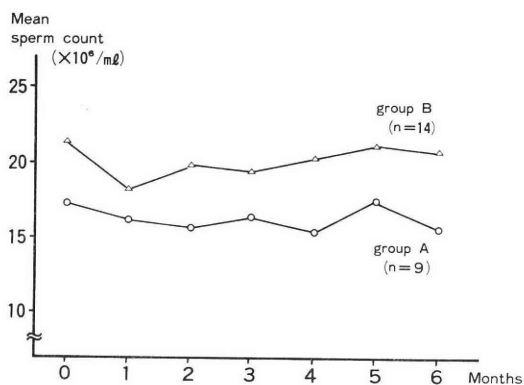


Fig. 3 Mean sperm count during oral administration of Kallikrein

している。Friedmann's test において $P < 0.01$ と有意で、Wilcoxon signed rank test においては 2, 4, 5 および 6 カ月目にて $P < 0.01$ と、3 カ月目で $P < 0.05$ と治療前に比し推計学的に有意な改善がみられた。B 群については治療前平均精子運動率が 57.5% と比較的良好なため、Kallikrein 投与により軽度の運動率改善傾向は認めるものの推計学的に有意ではなかった。精子運動率の改善が Kallikrein 投与終了後いつまで持続するかについては、投与終了後の精液検査が少数例にしか施行しえていないが、投与終了後 2 ~ 3 カ月目まで持続しその後徐々に治療前の状態まで戻ることが観察された。

精子活動度

Fig. 5 は A 群症例における運動精子の活動度を前述

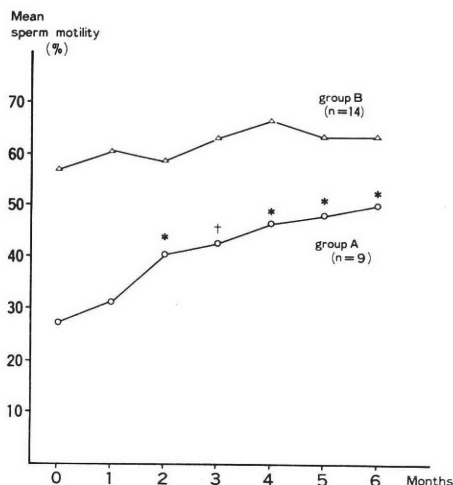


Fig. 4 Mean sperm motility during oral administration of Kallikrein

Statistical analysis : * $p < 0.05$
* $p < 0.01$

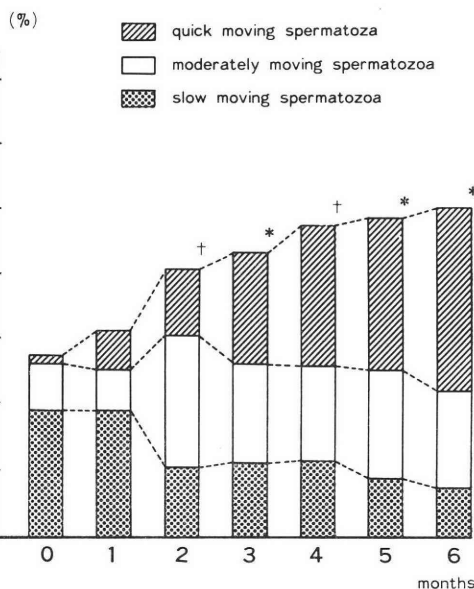


Fig. 5 Mean qualitative sperm motility during treatment of group A (n=9) with Kallikrein

The percentage of quick moving spermatozoa increased significantly (* $p < 0.05$, * $p < 0.01$)

の 3 段階に評価し、各症例の構成比を平均した成績である。治療前は quick moving spermatozoa が殆んどなく slow moving spermatozoa が大部分であり精子活動度が不良であった。Kallikrein 投与によつて精子運動率の改善と同時に質的にも精子運動が著明に改善し

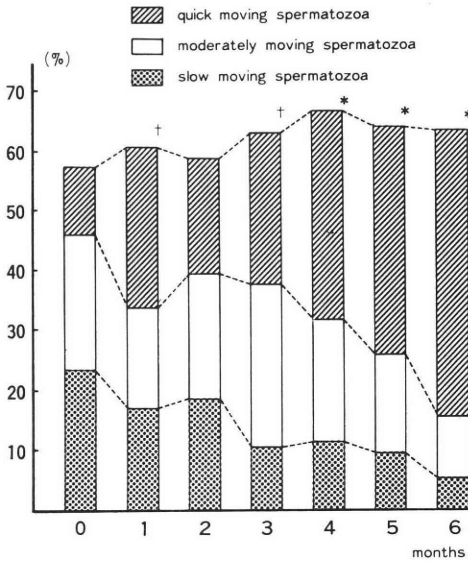


Fig. 6 Mean qualitative sperm motility during treatment of group B (n=14) with Kallikrein. The percentage of quick moving spermatozoa increased significantly (*p<0.05, *p<0.01)

quick moving spermatozoa が著増しているのがわかった。全精子に占める quick moving spermatozoa の割合を Friedmann's test で検定すると P<0.01で推計学的に有意な増加であった。Wilcoxon test では2, 4カ月目が P<0.05で, 3, 5, 6カ月目は P<0.01で治療前に比し有意な増加であった。Fig. 6はB群において同様に精子活動度の変動をみたものである。前述したように精子運動率は特に改善していないが, やはり quick moving spermatozoa が著明に増加している。特に12錠投与した後の4ヶ月目より精子活動度の改善が著明となっている。quick moving spermatozoa の増加は, Friedmann's test で P<0.01, Wilcoxon test で1, 3カ月目が P<0.05, 4, 5, 6カ月目が P<0.01と推計学的にも有意であった。

以上のように精子活動度の改善傾向は Kallikrein 投与後早期よりあらわれる。また検討した少数例においては精子活動度の改善効果が Kallikrein 投与終了後3~6カ月持続していた。

総活動精子数

総活動精子数=精液量×精子濃度×運動率として総活動精子数を求め, 治療による変動をみると Fig. 7のごとくA群では治療開始後徐々に増加している。4, 5, 6カ月目が推計学的に有意な増加であった。主として運動率の改善が総活動精子数の増加に関与しているものと

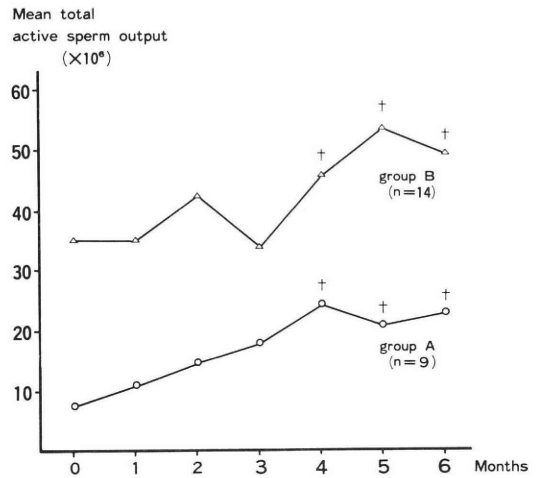


Fig. 7 Mean total active sperm output during oral administration of Kallikrein. Statistical analysis: *p<0.05

Mean rate of abnormal shaped Spermatozoa (%)

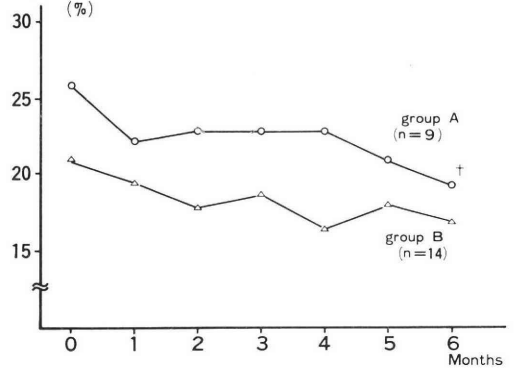


Fig. 8 Mean sperm morphology (% abnormal shaped spermatozoa) during Kallikrein treatment. Statistical analysis: *p<0.05

思われる。B群では1日6錠から12錠投与に変更した後の4カ月目より総活動精子数の増加が認められ, 推計学的にも4, 5, 6カ月目が有意であった。B群では精液量, 精子濃度, 運動率ともに有意な改善は認められなかったが, 総活動精子数でみると有意に増加しているのがわかり注目される。

精子奇形率

Kallikrein 投与により徐々に奇形精子の減少がみられた(Fig. 8)。特にA群では治療前25.6%が治療6カ月目には平均19.4%と減少し推計学的に有意であった。

精漿構成成分

Kallikrein 投与による精漿構成成分の変動を Fig. 9

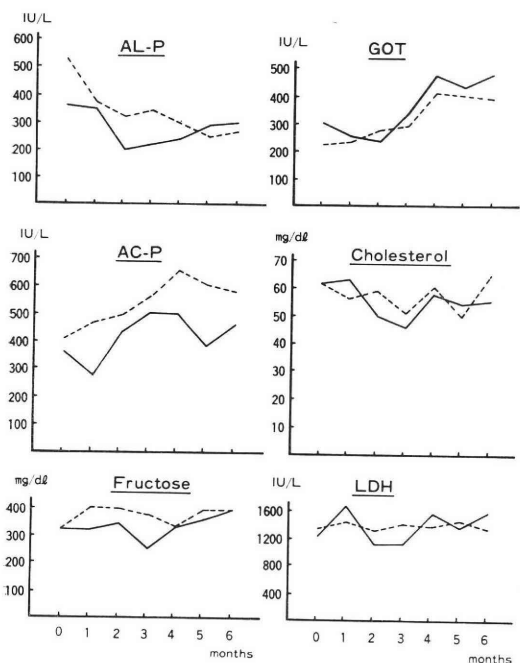


Fig. 9 Various parameters in seminal plasma during Kallikrein treatment
— group A. ···· group B.

に示した。ALP は低下傾向を示し、特にB群においてその傾向が著しかった。しかし精子濃度をふくめ精液所見との間に明らかな相関は認められなかった。ACP, GOT は逆に上昇傾向を認めた。fructose, cholesterol 各濃度および LDH 活性には一定の傾向は認められなかった。

血中ホルモン

Testosterone, FSH および LH ともに有意の変動を示さなかった(Fig. 10, 11).

妊娠例

対象症例26例のうち Kallikrein 投与終了後6カ月目までに配偶者の妊娠成立をみたのは8例であった(妊娠率30.8%)。妊娠例はすべてB群の症例で、A群の症例には妊娠例がなかった。妊娠例8例の不妊期間は平均48.3カ月と比較的長期であった。Kallikrein 投与開始後妊娠成立までの期間は、それぞれ1.5カ月、2カ月、3カ月、3.5カ月、5カ月、8カ月(投与終了後2カ月)および11.5カ月(投与終了後5.5カ月)2例であった。Fig. 12は1例の経過を示すもので、quick moving spermatozoa が飛躍的に増加したことが妊娠に結びついたものと考えられる。

副作用

600K.U./day という高単位の Kallikrein 療法を6ケ

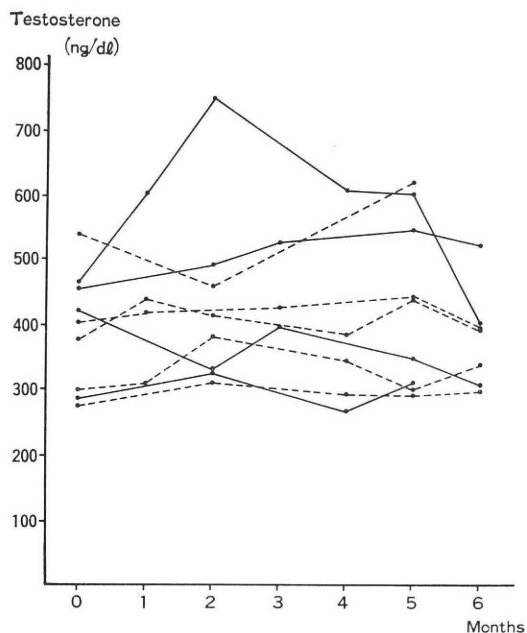


Fig. 10 Plasma Testosterone level during Kallikrein treatment
— group A. ···· group B.

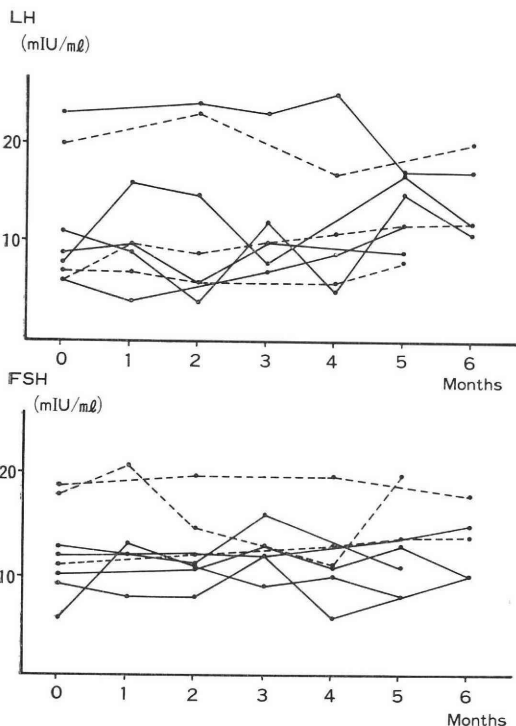


Fig. 11 Plasma LH and FSH level during Kallikrein treatment.
— group A. ···· group B.

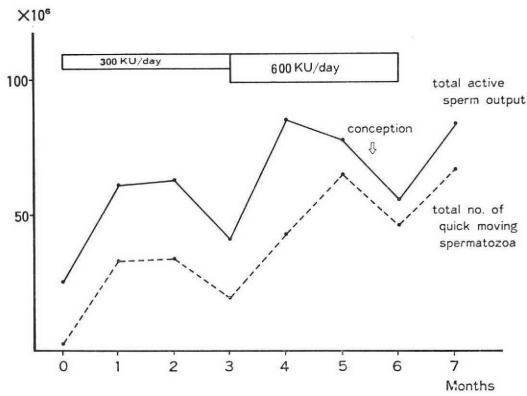


Fig. 12 Clinical course of one successful case

月間の長期にわたり施行したが、特記すべき副作用は認めなかった。

考 察

Kallikrein によって造精能が促進されることを Stüttgen⁹⁾が示唆して以来、多くの研究者によって Kallikrein の男性不妊治療への応用が試みられ、その有用性が報告されている⁵⁻⁷⁾⁹⁻¹⁵⁾。特に Schill は Kallikrein の open clinical trial¹⁴⁾をはじめとして、placebo との double blind study¹⁵⁾を行い、男性不妊に対する有用性を報告し、その中で Kallikrein の臨床効果として①精子数の増加、②量的、質的な精子運動の改善、③正常形態精子の増加傾向の3つをあげている。その機序として Schill は Kallikrein による精子の有意な増加は一般的に3~5カ月目と比較的 late effect として観察されるため、本剤は spermatogenesis へ作用するとしている。一方 Schirren は Kallikrein 注射により4週という早期にも精子数の増加を認めることから、射精機構(精管、副睾丸の transport function を含む)に Kallikrein-Kinin系が関与する結果とも推測している⁷⁾。それでは本剤が spermatogenesis にいかに作用するかを病態生理学的にみた場合、本剤の広い生理作用から種々の説明がなされる。即ち、睾丸、副性器の血流改善¹⁶⁾、血管壁透過性の亢進による局所栄養状態の改善、blood-testis-barrier 透過性亢進による Seltori 細胞の機能への影響¹⁷⁾、および細胞増殖の賦活作用¹⁸⁾などである。そして実験的にも Kallikrein が実際に spermatogenesis に関与する¹⁹⁾との報告もみられる。

しかし、Stüttgen⁹⁾は Kallikrein 注射により精子過多および正常精子数患者の精子数の減少を報告している。また、Schill¹⁴⁾は Kallikrein 投与により一部の症例に精子数の減少を認め、その原因は不明であるとしながらも、そのような症例では副睾丸あるいは精管に部分

的閉塞が存在し、Kallikrein 投与による男性性器系のうづ血のためにその閉塞が増強されるとの推論をしている。ところで前述のごとく、今回の成績では平均精子濃度の増加は認められずむしろ低下する傾向にあり、特に B 群では治療開始後早期に精子濃度の低下が観察された。この成績は Schill らの精子濃度に関する成績と相反するとともに、前述の本剤による精子濃度低下に関する Stüttgen や Schill の考えによっても説明しえない、したがって我々としてはこの問題に結論を下すことは現状では不可能である。これについては、さらに症例を重ね今後の課題としたい。

精子濃度の成績に比べ、本剤による精子運動に対する治療効果は最も良好で、精子無力症において全般的な精子運動率の改善および quick moving spermatozoa の増加をもたらした。Schirren⁷⁾も本剤による精子運動率の改善および quick moving spermatozoa の増加を報告し、その効果は治療開始後比較的早期よりあらわれ、Kallikrein 療法の最も重要な効果であるとしている。一方、in vitro で精液に Kallikrein を加えると精子運動率の増加⁶⁾¹⁵⁾²⁰⁾²¹⁾、very good forward progressive spermatozoa の増加⁶⁾¹⁵⁾²⁰⁾、平均精子運動速度の増加²²⁾、あるいは精子の頸管粘液通過性の改善⁶⁾²³⁾などをもたらすことが明らかにされている。これらは Kallikrein が seminal plasma 中の Kininogen から Kinin を解離せしめ、この Kinin が精子の代謝を促進せしめることによりもたらされることが fructolysis の増加²⁴⁾や酸素消費の増大²⁵⁾から示唆されている。そして、その本態として、Kinin による精子膜の透過性の亢進、Kinin の物質移動への直接作用、あるいは Kallikrein 処理精子細胞内 cyclic AMP 濃度の増大¹⁵⁾から示唆される細胞内代謝系への関与などが考えられている。この in vitro での事実から Kallikrein 全身投与における精子運動の改善は、Kallikrein が男性性器系へ分泌され、精漿中に存在する²⁶⁾ Kininogen に作用し Kinin を解離せしめることによってもたらされるものとされている。しかし、Schirren⁷⁾、Schill¹⁴⁾および我々の成績で、Kallikrein 投与終了後も長期にわたり精子運動の改善がみられた事実は前述の in vitro の成績のみでは現在のところ説明しえない部分が残されている。この一つの説明として Kallikrein が副睾丸機能の直接賦活作用を有するとの可能性が考えられている。また、最近 Tauber ら²⁷⁾は Kallikrein 治療中、後の精漿中 albumin 濃度が精子運動の改善と平行して動くことより、精子運動の改善に albumin を中心とする精漿構成成分の変化が関与している可能性をのべており、精子運動改善の持続との関連からも注目される。

次に我々は精子奇形率の減少を報告したが、Schirren⁷⁾ および Schill¹¹⁾ も正常形態精子の増加を認めている。これは Kallikrein が spermatogenesis ないしは spermiogenesis にも影響をもたらしていることを示唆するものと思われる。

Ishigami ら⁹⁾ は Kallikrein 療法により少数例に血中 Testosterone level の上昇を認めたが治療効果には結びつかずかつたとしている。今回も投与前、中に Testosterone, LH, FSH を測定したが、投与期間を通じて精液所見などとの関連において有意な変動を示さなかつた。しかし、Schill¹¹⁾ は Kallikrein 療法中に血中 LH および Testosterone の有意な上昇を認めたとし、spermatogenesis および副睾丸機能との関連を示唆している。しかし、この点に関してはなお検討を要するところであり、現状においてこれら内分泌学的効果を結論づけることは時期尚早で、さらに今後の追試を必要とすると考えている。

Kallikrein 療法の妊娠効果について、Schill はその double blind study¹⁵⁾ において Kallikrein 錠投与群の妊娠率が 37.8% で placebo 群の 16.1% に比し有意に高かつたとしている。今回の成績では対象例 26 例で妊娠率 30.8%、脱落例も含めた全投与症例 40 例で 20% であつた。これを著者らの過去における男性不妊の妊娠成立率、約 11%²⁹⁾ の成績と比べると満足すべき成績であつた。

本剤の副作用について Hofmann ら¹²⁾ は急性、慢性的副性器の炎症がある症例に投与すると炎症を増悪させ精液所見も悪くなるので、このような症例には本剤は禁忌であるとしている。しかし、この他には本剤の投薬を中止するに至るような著明な副作用の報告はなく、著者らも本研究を通じ副作用と考えられる所見を認めなかつたことから、本剤は長期間の投薬が必要な男性不妊の治療に適するものと考えられる。

本剤の臨床使用において治療効果判定に有用なパラメーターが存在するかどうかを知ると同時に、いかなる背景因子が本剤の治療効果に寄与するかを検索する目的で、治療前および経過中を通じ精漿中 ALP, ACP, fructose, GOT, cholesterol および LDH を測定した。その結果 ACP および GOT が漸次上昇傾向を示し ALP が低下した。これらに対し fructose, cholesterol および LDH は一定の傾向をもつて変動しなかつた。これらパラメーターと精子数や精子運動率との関連については従来より多くの報告があり²⁹⁻³²⁾、それぞれ種々の因子との相関が報告されているが、一定の傾向ありと確立されたパラメーターはいまだ少ない。これら現状からして当然の結果といふべきか、治療成績と一致するよ

うな当初の目的にかなう成績は得られなかつた。精子運動率と相関する³³⁾との報告がある ACP が運動率の改善につれて上昇する傾向が認められたが、個々の症例においては必ずしも運動率の改善と一致しないという結果が得られた。

今回の 300~600K.U./day を投与する高単位の Kallikrein 経口療法は、男性不妊とくに精子運動の障害例に非常に有用との成績を得た。本剤の投与量について Schirren⁷⁾ は経口 Kallikrein の吸収率が約 3% であるため 100K.U./day の投与では無効であつたとしている。また欧米では 600K.U./day の 3 カ月またはより長期の投与が一般的とされている⁸⁾。

以上より男性不妊の治療法の一つとして、高単位 Kallikrein 療法の役割は重要と思われ、今後一般化されることを期待する。

謝 辞

精漿中酵素活性測定に際し協力いただいた神戸救済会病院中央検査室の杉町葉子先生に深謝致します。

文 献

- 1) Werle, E.: History of Kallikrein and some aspects of its chemistry and physiology. In: Kininogenases—Kallikrein, 1st symposium on physiological properties and pharmacological rational: p. 7, Schattauer, Stuttgart—New York., 1973.
- 2) Fritz, H.: The Kallikrein-Kinin-System in reproduction-biochemical aspects. In: Kininogenases—Kallikrein 2: p. 9, Schattauer, Stuttgart—New York., 1975.
- 3) Schill, W.-B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility—a review. *Andrologia*, 11: 77, 1978.
- 4) 守殿貞夫, 谷風三郎, 高橋靖昌, 石神襄次: 男性不妊に対する Kallikrein の応用 (第 20 回日本不妊学会講演), *日不妊誌*, 21: 240, 1976.
- 5) Ishigami, J. and Kaminono, S.: Clinical experiences with Kallikrein in male infertility. In: Kininogenases—Kallikrein 2: p. 155, Schattauer, Stuttgart—New York., 1975.
- 6) Schill, W.-B., Wallner, O., Palm, S. and Fritz, H.: Kinin stimulation of spermatozoa motility and migration in cervical mucus. In: human semen and fertility regulation in men: p. 442, Mosby, Saint Louis, 1976.
- 7) Schirren, C., Schill, W.-B. and Hofmann, N.: The influence of Kallikrein on semen parameters of subfertile patients. In: Kininogenases—Kallikrein 2: p. 112, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
- 8) Stüttgen, G.: Clinical substantiation of the

- effects of Kallikrein. In: Kininogenases—Kallikrein, 1st symposium on physiological properties and pharmacological rational: p. 189, Schattauer, Stuttgart—New York, 1973.
- 9) Schill, W.-B.: Erste Ergebnisse der Behandlung von männlichen Fertilitätsstörungen mit Kallikrein: Asthenozoospermie. *Hautarzt* 26 : 430, 1975.
 - 10) Schill, W.-B.: Erste Ergebnisse einer parenteralen Behandlung von männlichen Fertilitätsstörungen mit Kallikrein: Oligozoospermie. *Hautarzt* 26 : 541, 1975.
 - 11) Schill, W.-B.: Influence of Kallikrein on sperm count and sperm motility in patients with infertility problems: preliminary results during parenteral and oral application with special reference to asthenozoospermia and oligozoospermia In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 129, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 12) Hofmann, N. and Hornstein, O. P.: The influence of Kallikrein on the semen of subfertile men, with particular regard to sperm morphology. In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 147, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 13) Fromantin, M., Perin, G., Gautier, D. and Thaubaut, A.: Treatment of oligoasthenospermias with Kallikrein. In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 151, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 14) Schirren, C.: Clinical experiences with Kallikrein on subfertile males. In: Kininogenases—Kallikrein 4 : p. 247, Schattauer, Stuttgart—New York, 1977.
 - 15) Schill, W.-B.: Kallikrein as a therapeutical means in the treatment of male infertility. In: Kininogenases—Kallikrein 4 : p. 251, Schattauer, Stuttgart—New York, 1977.
 - 16) Tauber, A., Petrowicz, O., Erhardt, W., Musselmann, R. and Blumel, G.: Experimental study in rats on the influence of Kallikrein on the testicular blood flow. In: Kininogenases—Kallikrein 4 : p. 225, Schattauer, Stuttgart—New York, 1977.
 - 17) Rohen, J. W. and Buschhüter, H.: Karyometric measurements on the Sertoli cell nuclei in Kallikrein-treated albino rats. In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 85, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 18) Rixon, R. H., Whitfield, J. F. and Bayliss, J.: The stimulation of mitotic activity in the thymus and bone marrow of rats by kallikrein. *Horm. Metab. Res.* 3 : 279, 1972.
 - 19) Rohen, J. W. and Stuttmann, R.: The early postnatal development of the germinative epithelium of the testis in the albino rat under the influence of Kallikrein. In: Kininogenases—Kallikrein 4 : p. 217, Schattauer, Stuttgart—New York, 1977.
 - 20) Schill, W.-B.: Influence of the Kallikrein-Kinin-System on human sperm motility in vitro. In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 47, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 21) 光川史郎, 石井延久, 白井将文: 精子運動と Kallikrein, *日不妊誌*, 21 : 195, 1976.
 - 22) Steiner, R., Hofmann, N., Hartmann, R. and Kaufmann, R.: The influence of Kallikrein on the velocity of human spermatozoa measured by laser-doppler-spectroscopy. In: Kininogenases—Kallikrein 4 : p. 229, Schattauer, Stuttgart—New York, 1977.
 - 23) Wallner, O., Schill, W.-B., Grosser, A. and Fritz, H.: Participation of the Kallikrein-Kinin-System in sperm penetration through cervical mucus—in vitro studies. In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 63, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 24) Schill, W.-B.: Increased fructolysis of Kallikrein-stimulated human spermatozoa. *Andrologia* 7 : 105, 1975.
 - 25) Leidl, W., Prinzen, R., Schill, W.-B. and Fritz, H.: The effect of Kallikrein on motility and metabolism of spermatozoa in vitro. In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 33, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 26) Palm, S. and Fritz, H.: Components of the Kallikrein-Kinin-System in human midcycle cervical mucus and seminal plasma. In: Kininogenases—Kallikrein 2 : p. 17, Schattauer, Stuttgart—New York, 1975.
 - 27) Tauber, P. F., Propping, D., Niesel, A., Kurz, E. and Zaneveld, L. J. D.: Effect of Kallikrein treatment on the composition of human split ejaculates. In: Kininogenases—Kallikrein 4 : p. 237, Schattauer, Stuttgart—New York, 1977.
 - 28) 石神襄次: 男子不妊の治療, *臨泌*, 31 : 475, 1977.
 - 29) 志田圭三, 島崎 淳, 古谷信雄, 田谷元佑: 男子不妊症の精液内化学的成分の研究, *日不妊誌*, 16 : 217, 1971.
 - 30) 石部知行: ヒト不妊精液の生化学, I. Alkaline phosphatase について, *日不妊誌*, 18 : 18, 1973.
 - 31) 石部知行: ヒト不妊精液の生化学, II. Acid phosphatase について, *日不妊誌*, 18 : 80, 1973.
 - 32) Samuel, N., Musacchio, I. and Epstein, A. J.: Variations in seminal plasma constituents from fertile, subfertile, and vasectomized azoospermic men, *Fertil. Steril.* 23 : 357, 1972.

Kallikrein and male infertility :
Usefulness of high-unit
Kallikrein tablets

**Osamu Matsumoto, Minoru Hazama,
Ken-ichi Takada, Osamu Tomioka,
Sadao Kamidono and Joji Ishigami**

Department of Urology, Kobe
University School of Medicine

We studied the therapeutic effect of long-term oral administration of ®Kallikrein tablets on male infertility. Subjects were 26 patients with poor sperm motility and divided into two groups according to the rate of motile spermatozoa: less than 40% (Group A: 9 cases) and 40% or more (Group B: 17 cases).

Patients in Group A administered with 600 K.U./day orally for 6 months and those of Group B received 300 K.U./day for initial 3 months and 600 K.U./day for the ensuing 3 months.

The changes of semen parameters during the

treatment were as follows.

- a) No increase in sperm count.
- b) Significant improvement of quantitative and qualitative sperm motility.
- c) Improvement of sperm morphology.
- d) Significant increase in total number of motile spermatozoa.
- e) Volume of semen was increased without statistical significance.

Testosterone, FSH and LH levels in blood plasma did not change significantly.

The constituents of seminal plasma (fructose, cholesterol, ALP, ACP, GOT and LDH) were determined.

Although ACP and GOT showed an increasing tendency and ALP tended to decrease during treatment, we found no biochemical parameter changing parallel with therapeutic results.

Eight out of the 26 subjects successfully impregnated their wives (conception rate: 30.8%).

No remarkable adverse effect was detected.

(受付: 昭和55年 4月30日)

地方部会講演抄録

第85回 日本不妊学会関西支部集談会

昭和55年3月1日

京大会館

1. hMG-hCG 刺激に対する Baboon 卵巣の反応について

高橋 晃・松岡賢光・蘇 鈞煌
堀江克行・泰井俊造・麻生武志
西村敏雄(京大産婦)

hMG-hCG 投与の大きな副作用である卵巣過剰刺激症候群、多発排卵各々の発症予知、その両者の関係についての分析は未だ充分ではない。そこで hMG-hCG 投与の際に卵巣で実際に起こる形態的变化を直視下に確認することは非常に興味深いと思われる。我々は生殖内分泌学的にヒトに近い Baboon 3頭を用いて hMG-hCG 投与を行ない、経目的な採血による血中 steroid hormone の動態と同一 case での1回ないし2回の反復回復術による卵巣の肉眼的変化の分析を行なった。case 1は卵胞形成をしたものの排卵には至らず、case 2は2個の黄体を、case 3では形成時期の異なる多数の黄体を認めた。最後の case で特徴的だった点としては、hMG 投与中の estrogen の異常高値、hCG 投与後の 17-P の高値1週間持続、hCG 投与後に頂値となった際の P、20-P 値の比の逆転、その後の P 値の急速な減少が観察された。これらの hormone 動態は肉眼的な卵巣所見からよく説明された。

2. 既成黄体の誘発排卵に対する抑制効果

福田操男・辻本大治・片山和明
東条伸平(神大産婦)

〔目的〕：前回排卵後の既成黄体が次回の排卵にいかなる効果を示すかについて幼若雌ラットを用いて検討を加えた。

〔方法〕：生後22日目に PMS を 5iu, 10iu, 20iu, 40iu 皮下投与し、その56時間後に HCG 10iu の一定量を投与した。一部のラットは、HCG 投与後20時間目に排卵数を算定した。またその他のラットは開腹せずに1回目の PMS 投与後14日目の36日齢に PMS 20iu を投与

し、その56時間後に HCG 10iu の一定量を皮下投与し、HCG 投与の20時間目に排卵数の算定を行った。

〔結果〕：1回目の PMS-HCG 投与後の平均排卵数は PMS 5iu, 10iu, 20iu, 40iu の投与時に、それぞれ 10.2, 49.8, 75.2, 17.3となった。また2回目の PMS-HCG 投与後の平均排卵数は、1回目に PMS 5iu, 10iu, 20iu, 40iu 投与した各群でそれぞれ28.4, 10.9, 2.4, 3.9となった。

3. クロミフェンによる乏精子症の治療(第II報)

大野洋介・玉舎輝彦・岡田弘二
(京都府立医大産婦)

昭和52年より現在まで67例の乏精子症患者に対し、クロミフェン25mg/日を投与し、うち53例について効果を検討した。うち有効例は29例(55%)で妊娠例は6例(11%)に認められた。クロミフェン療法の効果は、投与前精子数に左右される。投与前精子数1,000万/ml以上(34例)での有効率が68%(23例)であるのに対し、1,000万/ml未満(19例)では有効率が32%(6例)であった。さらに妊娠例6例はすべて投与前1,000万/ml以上の症例に限られ、いずれも投与開始後3~5か月または1クール(6か月間)投与後1~2か月の間に妊娠に至った。投与前の血中 FSH, LH 値は治療効果の指標となりえず、血中 PRL 値が無効例で有効例にくらべ、正常範囲内であるが、高いことが認められた。さらに乏精子症の程度と血中 FSH, LH 値または PRL 値の間には関係を認めなかった。

4. 当教室における AIH 治療

西野照代・田中文男・根来孝夫
若尾豊一・佐治文隆・中室嘉郎
倉智敬一(大阪大産婦)

大阪大学産婦人科を、昭和46年9月から昭和54年5月までの7年8ヶ月の間に、挙児希望で来院した者のうち、BBTにより排卵が認められるにもかかわらず不妊である864名に治療を行なった。

このうち①乏精子症63名、②頸管粘液不良25名、③抗精子抗体陽性7名、④Huhner test 不良群29名、中間群11名、⑤その他11名の計146名に対し AIH を行ない、

29名 (20%) が妊娠に成功した。AIH によって妊娠した症例の転帰は、正常分娩18名(うち双胎1名)、現在経過中3名、流産5名、不明2名であった。出生児20名の男女比は、男児10名、女児10名で、かたよつた傾向は見られていない。流産率 (17%) は一般よりやや高率であった。

5. 男子不妊症精液よりの *Ureaplasma urealyticum* の培養ならびに精液中 minocycline 濃度について

桐山 雷夫 (京大泌尿)

Taylor and Robinson 液体培地10cc に精液0.2cc を採種し、37°C 48時間炭酸ガス培養し、48時間までに陽性となつたものを A₃ 培地に接種・培養し48時間後に、ときに Dienes のコロニー染色法を施して鏡検して *Ureaplasma urealyticum* を同定した。

現在までに、不妊を訴えて来院した38名の男子の精液を培養して *Ureaplasma urealyticum* が陽性だったものは18名 (47.4%) であつた。精子濃度、運動率との関係では乏精子症、無力精子症のものにやや多く検出された。

治療と関連させて minocycline 1日200mg 1週間ついで1日100mg 1週間投与後の精液中および血漿中 minocycline 濃度を3名の healthy volunteers で測定した結果も併せて発表した。

6. Zona-free ハムスター卵の in vitro 受精系でみた頸管粘液のヒト精子 capacitation への影響

長谷川昭子・伊熊健一郎・窪田耕三
繁田 実・高田 喜嗣・香山浩二
磯島 晋三 (兵庫医大産婦)

頸管粘液が生殖過程に果たす役割としては精子の通過性、貯蔵、エネルギー補給、及び capacitation への影響が考えられている。今回、頸管粘液通過精子の in vitro での受精能について Zona-free ハムスター卵を用いて検討した。

方法は培養液滴と精液滴を頸管粘液を充てんした毛細管で連結し、精子が目的濃度まで移行した後毛細管をはずし、Zona-free ハムスター卵を加えて各時間培養した。対照として3回培養液で洗浄した精子を頸管粘液通過精子と同じ濃度に調整して用いた。

頸管粘液通過精子は対照と同程度の受精率を示し、精子濃度は対照と同様 $2 \sim 3 \times 10^6/\text{ml}$ 必要であつた。時間的には対照よりやや早くから受精した。また精子濃度が高い場合でも高率に受精し、これは対照より精漿成分

の除去が完全に行れるためと考えられる。頸管粘液の機能の一つは受精能をマスクしている物質を除去することであり、また精子の選択や濃度の調節、維持にも関与していると思われる。

7. マウスおよびラット胎盤の抗原について

宮野 隆・佐藤英明・入谷 明
(京大農)

マウスおよびラット胎盤の特異抗原と、それぞれの抗体が妊娠に及ぼす影響について調べた。妊娠14~15日の成熟雌マウスおよびラットよりそれぞれ胎盤を摘出し、ホモジナイズした後遠心分離し、上清をフロイント完全アジュバントとともに、10日間隔で6回にわたつて雌ウサギに免疫注射し、最終免疫の10日後に採血して、抗マウス胎盤血清および抗ラット胎盤血清を得た。この抗血清を用いて、胎盤抗原の他の臓器抗原との共通性および特異抗原性を、寒天ゲル二重拡散法および免疫電気泳動法を用いて調べた結果、胎盤中には他の臓器との共通抗原が多く存在するが、マウスおよびラットにおいてそれぞれ少くとも3種の特異抗原が存在することが判明した。また未吸収および腎臓・肝臓吸収抗血清より抗体を精製し、それぞれの動物に受動免疫して妊娠に及ぼす影響を調べたところ、マウスでは妊娠は顕著に阻害されたが、ラットではほとんど影響を受けず、変性胎児率にわずかの増加が認められたにすぎなかつた。

8. マウスおよびラット胚の急速凍結

葛西孫三郎・丹羽皓二・入谷 明
(京大農)

最近、卵子の急速凍結法が報告されたが、本実験では、マウスおよびラット桑実胚の凍結条件と DMSO 除去方法について検討した。マウス胚は ICR 系過排卵誘起雌より、ラット胚は Wistar 系自然交配雌より採取した。2 M-DMSO と共に -196°C まで凍結したのち $360^{\circ}\text{C}/\text{分}$ の速度で融解した。回収卵子は DMSO 除去後 mKRB 液で培養し、胚盤胞に発育した胚を生存胚とした。マウス胚を -20 および -100°C に10分間ずつ保持して凍結し、融解後種々の方法で DMSO を除去した結果、最も高い生存率は、2 M-DMSO + 0.5 M-蔗糖加 PBS および 0.5 M-蔗糖加 PBS 中に胚を順次移して除去した場合に得られた。マウス胚を -10 、 -20 、 -30 あるいは -40°C に10分間静置後 -190°C LN ガス中で急冷した場合の生存率は21, 54, 24, 9%であり、 -20°C に5, 10, 20分間保持後に急冷した場合の生存率は41, 58, 41%であつた。一方、ラット胚を -10 、 -20 、 -30 、 -40°C

に10分間保持後に急冷した場合の生存率は、16, 24, 19, 0%であった。

第81回 日本不妊学会関東地方会

昭和55年3月8日
学士会館分館

1. Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤の精液所見に与える影響

福谷恵子・横山正夫(東大分院泌尿)

Sulfamethoxazole-Trimethoprim 合剤(以下 S-T 合剤と略)はともに細菌の葉酸代謝拮抗剤で、現在尿路感染症に対し広く用いられている抗菌剤である。特に Trimethoprim はヒトにおいても分裂の盛んな細胞に悪影響をもたらはしないかという危惧があり、事実本剤投与により精子数の減少をみたという報告もある。著者らは慢性前立腺炎患者13例に S-T 合剤で治療を行い、投与前後の精液検査所見を比較した。対象は21~51歳(平均38.5歳)の男子で、S-T 合剤1日2~4錠(TMPとして160~320mg)を投与した。13例中10例は治療前後に検索を行い、その治療期間は10週以上44週まで(平均18週)、3例は長期治療後にのみ検索し、治療期間は6~16カ月(平均11カ月)である。10症例の治療前後の精子濃度の平均値および標準偏差は 63.4 ± 47.8 (10⁶/ml), 80.1 ± 71.7 で有意差はない。1例で 53×10^6 から 31×10^6 に減少し、1例で 1×10^6 から 88×10^6 へ増加した。長期治療後の3例はいずれも正常な精子濃度であった。精子運動率は前後で 42.2 ± 27.4 (%)、 50.0 ± 23.8 で有意差を認めず、著しく低下したものはなく、2例で0%, 20%から60%以上に上昇した。4症例において治療経過中数回検査を行ったが、治療開始時の炎症症状の強い時に比較し、治療後症状が安定した時期の方が精子濃度も運動率も好転している傾向がみとめられた。以上、通常の投与量による S-T 合剤は10週以上投与しても精液所見に悪影響を及ぼさないと考えられた。

2. 停留辜丸の研究

—術後経過観察症例—

浜田吉通・山本隆次・松本 泰
(帝京大泌尿)

帝京大学医学部泌尿器科を受診した174名の停留辜丸患者のうち59例に辜丸固定術を施行した。我々は停留している辜丸を組織学的に検討した結果などから、第IV度の腹部に存在するものでは3歳までに、第I度の鼠径管

外から第三度の鼠径部高位までに存在するものでは、少なくとも6歳までに辜丸固定術を施行した方が望ましいと考えており、今回術後観察症例をもとにその妥当性を検討した。年齢的な因子及び辜丸の停留部位から見ると、少なくとも5歳までに手術を施行した方が良いのではないかと思われる結果も得た。ただし今回は手術時の辜丸組織との比較検討をしていないので、この点に関しては更に追求する必要があると考えられる。又術後の辜丸発育に関し内分泌学的なアプローチとして LH-RH test を施行したが、特別な事は認められなかった。以上主に臨床的観点から59例の手術後経過観察症例について報告し、若干の検討を加えた。

3. 終夜睡眠ポリグラフィによるインポテンスの客観的診断

高波真佐治・森山堅重・村上憲彦
三浦 一陽・中山孝一・白井将文
安藤 弘(東邦大泌尿)
奥平 進之・鳥居鎮夫
(東邦大第一生理)

インポテンスの診療にあたって、最も大切なことは、まず正しい診断を下すことである。すなわち、インポテンズ個々の症例の発生原因が器質的障害によるものか、機能的障害によるものかを正確に鑑別することが必要である。しかし、一般にはその原因を客観的に鑑別する方法に乏しく、正しい治療計画の確立が困難であった。そのため、インポテンズの治療を複雑化し、既婚者にあつては離婚問題、交通外傷、労働災害後のインポテンズにあつては、補償問題など厄介な問題が登場している。

そこで、これらの問題を解決すべく、上記鑑別診断法として私共は Visual sexual stimulation (VSS) 負荷前後の陰茎皮膚温度の変動を指標にして、その鑑別に応用してきたが、VSS で反応を示さない患者や、この方法に対する嫌悪感から検査に非協力的な患者などが出現するに及んで、他の鑑別法の開発の必要にせまられてきた。

そこで、最近私共は VSS 負荷に対して反応を示さない症例に、終夜睡眠ポリグラフィを施行し、REM 睡眠時の勃起現象を利用する事によって、機能的インポテンズと器質的インポテンズの鑑別を行なっている。

検査は午後10時より翌朝6時までの8時間行ない、REM 睡眠と N Penile Tumescence (NPT) および陰茎皮膚温度との関係を観察した。VSS 負荷時およびREM 睡眠中の陰茎皮膚温度、NPT の変化について正常者と比較検討した結果を報告する。

4. 妊娠・出産に成功した単純男性化型先天性副腎皮質過形成の2例

篠原 充・簗和田 滋・石田 肇
 新島端夫(東大泌尿)
 福谷恵子(東大分院泌尿)
 木下健二(都立駒込病院泌尿)
 多賀理吉・中林正雄・荻野満春
 (東大産婦)

先天性副腎皮質過形成(CAH)は適当なステロイド補充療法により、理論的には完全な治療が可能である。しかし実際には、小児の成長、成人の性機能の発現など残された問題も多い。我々は25歳、17歳とそれぞれ比較的遅い時期より治療を開始したにもかかわらず、妊娠出産に成功した、単純男性化型 CAH の2例を経験したので、治療経過を主体に報告し、若干の考察をおこなった。症例1:25歳女性、外生殖器異常を主訴に初診。種々の内分泌学的、細胞遺伝学的検討により単純男性化型 CAH と診断。Paramethasone 2 mg にて治療開始、男性化の消失を見るも月経発来の無いため3 mg に増量し、月経の発来を見た。その後月経周期にあわせて調節し、規則的な月経維持に成功し、8年目、妊娠出産を見た。症例2:17歳女性、外生殖器異常、無月経を主訴に初診、同様に、単純男性化型 CAH と診断。Paramethasone 3 mg にて治療開始、規則的な服薬にて排卵性の月経を見、8年目、妊娠出産に成功した。尚、症例1の妊娠中の詳細は第20回本学会総会で報告した。

5. ラットの着床部位におけるマクロファージの動態について

館 鄰(東大理動物)
 館 澄江(筑波大解剖)

マクロファージは生体内で様々な防衛反応に参加しており、着床時の胚-子宮相互作用にも関与していることが推測される。妊娠時の内膜マクロファージ数が増大していることは、19世紀後半から20世紀初頭にかけて記載されているが、胚-子宮相互作用の見地からの解析は殆んど行なわれていない。また、マクロファージとして記載されている喰細胞の同定も明確でない。

我々はラットを用いて着床時における子宮内膜マクロファージの動態を解析した。

正常性周期(P, E, D1, D2)、妊娠及び疑妊娠の各時期(D2, D3, D4, D5, D6, D7)に尾静脈から、1 ml の Hank's 液中に調製した墨汁液を注入し、24時間後に子宮組織を固定し、組織学的及び電子顕微鏡による検

索を行なった。非特異的エステラーゼの組織化学的検出には、凍結切片を用いた。

正常性周期、及び疑妊娠各時期の子宮内膜には、喰細胞は殆んど見出されないが、妊娠第5日に注射を行ったグループでは、着床胚附近に多数の喰細胞が認められた。これら喰細胞は脱落膜組織内には分布していない。妊娠第6日に注射を行なったグループでは着床胚附近の喰細胞の数は著しく減少した。

電子顕微鏡による解析、非特異的エステラーゼの組織化学的解析から、1)喰細胞の大部分がマクロファージであること、2)脱落膜がマクロファージの移動に対する障壁となつているらしいことが強く示唆された。

6. 界面活性剤 Polyoxyethylene(10) nonylphenylether (TA-RO-CAP) の殺精子効果について

高木繁夫・柳沢洋二・高根雅夫
 遠藤章夫・本田孔久・小笠原仁
 前田 勇・吉田竹郎(日大産婦)

我々は非イオン性界面活性剤 Polyoxyethylene(10) nonylphenylether を主剤とする TA-RO-CAP 膈錠の殺精子効果を検討する目的で当教室を訪れた21歳から39歳までの避妊を希望した経産婦101例についての臨床実験を行ない、次の如き結論を得た。

すなわち

- 101例の経産婦で延385月経周期に及んだ使用中、妊娠例は1例であり、Stix-notestein 指数は3.2となるため、本剤の避妊効果はかなり良好である。
- 副作用は殆どみられなかった。
- 本剤は確実に使用することによつて避妊効果が上昇するものと思われる。

7. 胚-子宮内膜相関について

ラット着床期周辺における胚と内膜細胞の糖残基の性格

木下英夫・花岡 茜・篠塚正一
 木村英三・中島敏男・徳倉昭治
 安江育代・蜂屋祥一

(慈恵医大産婦)

細胞と細胞の接着機構には細胞表層での Cell-Receptor Site として働く特異的な接着物質が存在し、それが相補的結合をすることにより細胞接着が完成され、この現象には細胞表層複合糖質(糖鎖)が関与すると考えられている。

従来より細胞表層の構造と接着機構の追求に植物性赤血球凝集素が、ある種の糖に特異的に結合する事実が知

られているが、今回は種々の発育段階における胚ならびに、妊娠子宮内膜細胞表層における糖鎖の分布とその機能を知るとともに、胚の子宮内膜への接着機構を知る手がかりとして、Fluorescein isothiocyanate と結合せしめた3種の Lectin, Concanavalin A (Con A) Wheat Germ Agglutinin (WGA), Ricinus Communis Agglutinin-60 (RCA) を用い、WI 系ラットの胚と内膜に対する Lectin 結合能を検討した。

方法：WI 系ラットを交配、翌朝精子の確認をもって D₁、とし、D_{2.5} より D_{9.5} (D_{2.5} は第2日午後)に至る子宮を剔出、P. B. S. にて卵を子宮腔より洗い出し、顕微鏡下にて採取、卵の stage を同定したのち、直ちに FITC-Lectin を含む glycerin-Buffer (pH 7.2) にて 37°C, 30分 incubation を行なった。

剔出せる子宮は直ちに冷凍切片を作成(10 μ)、同様に FITC-Lectin を含む Buffer をもって incubation, その後、卵と子宮内膜組織を蛍光顕微鏡により Lectin 結合能を検討した。

結果：WGA の結合性は未分割卵では弱い、透明層を有する胚盤胞に強く、脱透明層の後は漸次弱い結合性を示した。Con. A, RCA は8~16cell 期から透明層を保持する胚盤胞に至る間は透明層には結合性は認められないが、細胞表層に弱い結合性があり、さらに脱透明層の後は強い蛍光が認められた。

子宮内膜に対する Lectin の結合性は着床期に相当する D_{9.5} において WGA が最も強く Con A, RCA はその後次第に強くなっていく。

以上の事実は、子宮内膜における N-Acetyl-D-Glucosamine と di-N-Acetyl-Chitobiose 等のオリゴ糖が露出し、一方、脱透明層以後の卵では、透明層表層の N-Acetyl-D-Glucosamine と di-N-Acetyl-Chitobiose に代り胚盤胞表層に α -D-Mannose, α -D-Glucose ならびに β -D-Galactose 等の糖残基が存在することが明らかとなった。

8. 体重減少による無月経の病態について

橋原浩二・安江育代・杉田 元
木下英夫・蜂屋祥一

(慈恵医大産婦)

従来体重減少に伴う無月経として神経性食思不振症が有名である。今回は体重減少による無月経のうち定型的食思不振症を除外した単純性の体重減少性無月経について検討した。対象は20例で平均年齢は22.6歳と比較的若く、体重減少率は-18.24%であった。

体重減少の誘因には美容を目的とした食餌制配が最も

多くその他ストレス、消化管障害などである。本症の内分泌機能について検討した結果、LH, FSH の基礎値では LH は有意に低値で FSH は正常月経周期の卵泡期とほぼ同一である。LH-RH test では低反応型と正常反応型にわかれ本症の下垂体機能は正常ないし低下を示した。また Estradiol は低値で正常月経周期の月経期に相当し、17OHCS, 17KS は正常である。また甲状腺機能では TSH, T₃, T₄., BMR も正常範囲内であった。

治療結果では20例中7例が Clomid にて排卵した。しかし全症例中16例の第2度無月経では Clomid に反応する例は少なくうち4例について HMG-HCG 療法を行ない全例排卵した。また体重増加と排卵との関係では7例が体重が回復し、うち4例は自然排卵した。しかし残り3例はなお Clomid にて排卵しない。以上より体重の回復が性機能の回復に関与する事は明らかである一方体重回復後もほぼ無月経例もみとめられた。

9. 避妊の外來統計と今後のあり方について

村山 茂 (大田原日赤/広尾クリニック)

①外来患者の面接により避妊法の実態を調査した。コンドームの使用が圧倒的に多く(86.3%)、荻野式(25.0%)、BBT(15.9%)がこれにつき、IUD(4.2%)、Pill(4.2%)は少数であった。この傾向は毎日新聞の調査と大差を認めなかった。②上記荻野式の25%について見るとこの約半数近く(11%)が間違つて行っており、これは当然「オギノ式」の失敗(実際は「オギノ式」を行わなかったための失敗)につながる。③荻野式の理解度については、正確なもの5.5%、不正確だが安全33.0%、間違っている者34.5%、知らない者27.0%(計100%)であり、正しい理解者は少いが、関心を有する者が多いことを示した。④BBTについては483名中現在行っている者15.9%、過去に利用した経験のある者45.9%、計61.8%の高率であった。頸管粘液の自覚については「はっきり分る」24.6%、「分る」が39.7%、「分らない」35.6%であった。この値は前以て指導を行わなくても外来患者の64.3%が粘液徴候を感じ得ることを示した。尚この比率は前以て指導を行えば上昇すると考えられる。⑤年齢、経産については特記すべきことはない。⑥頸管粘液の分る人と分らない人とに分けて月経の順、不順、初潮年齢の差異との関係を調査した。月経が順調でも粘液徴候の不明なものがある。反面、月経が不順でも粘液徴候の分る人がある。このことは更年期や分娩後の月経の不順な時でも粘液徴候が表われ得ること、又この時期の排卵の予知が可能であることを示している。初潮年齢に差は認められなかった。

以上の成績と文献を参照し、今後の避妊のあり方について考察した。

特別講演

性腺分化と H-Y 抗原

山田清美 (国立病院医療センター)

不妊症と染色体異常とが密接な関連性をもっていることは周知のことです。本講演では、最初に染色体異常の面から女性および男性不妊症についての知見を要約してみました。次いで、最近のトピックスであります H-Y 抗原と性腺分化との関連性について、いろいろな性腺発生異常疾患における H-Y 抗原の検索結果を提示して考察を加えた。

1. H-Y 抗原の発見

Eichwald & Silmsler (1955) によるマウスの移植実験から最初に発見された。雌の皮膚を雄に移植しても拒否反応が起こらないけれども、この逆は拒否反応を起こすことから Y 染色体上に組織適合性を規定する遺伝子があると考えられ、この抗原を Histocompatibility-Y antigen (H-Y antigen) と命名された。その後、正常な雄の細胞の膜表面に存在する抗原で、哺乳動物・鳥類・両棲類・魚類などの多くの動物にも広く存在することが明らかにされた。ヒトの場合の H-Y 抗原は、リンパ球などの細胞膜表面で HLA 抗原と複合体を作っており、分子量 18,000 の subunit からなると解明されている。また、生体内で遊離した形でも存在してホルモン様の行動をとり、性腺のみがその受容体をもつことが知られている。

2. H-Y 抗原の働き

正常女性ではすべて H-Y 抗原は陰性であり正常男性ではすべて陽性であることから、動物実験などの証拠を基盤として、H-Y 抗原は未分化の性腺を精巣に発生誘導する決定因子であろうと考えられている。発生誘導の具体的なメカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。

3. H-Y 抗原の検査法

純系マウスを使つて作らせた抗体が、他の動物の H-Y 抗原とも交叉反応をすることを利用して、ヒトの細胞における H-Y 抗原の有無を判定することができる。純系マウスの C57BL/6 の雌に雄の脾臓細胞を移入して抗体を作らせ、抗血清を得る。H-Y 抗原の有無は Goldberg (1971) らによつて開発されたマウスの sperm cytotoxicity test により判定される。

4. 種々の性腺発生異常疾患における H-Y 抗原の検

討

この解析の結果、この H-Y 抗原の存否によつて例外なく患者の性腺の種類を説明できることが明らかになった。これまで性染色体型からは説明することができなかった XX 男性および XX 型の真性半陰陽においても、自験例および報告例において例外なく H-Y 抗原が陽性であることが明らかになった。したがつて、遺伝学的には Y 染色体由来の H-Y 遺伝子が 46, XX のゲノムの中に存在すると考えられる。

5. H-Y 抗原をめぐる問題点

XX 男性や XX 真性半陰陽が Y-linked gene (s) の X または常染色体への転座によるならば、これらの疾患では家族発生例がきわめて少ないという事実は説明が困難である。また、最近 XY gonadal dysgenesis に H-Y 抗原の量的な減少や陰性の例外が報告されている。H-Y 抗原と性腺分化との関連性はヒト以外の動物においても類似した現象がみられるのでそれについて述べ、ヒトの場合に類推される疾患発生の細胞遺伝学的なメカニズムについて論じた。

H-Y 抗原の具体的な働きは明らかではないが、性腺分化の方向づけが H-Y 抗原を介して起ることが明らかになったことは大きな進歩であり、未解決の問題が多いけれどもこれからの研究によつて性腺分化のしくみが明らかになることを期待したい。

第86回 日本不妊学会関西支部集談会

昭和55年 5月31日

第1生命ビル 好文クラブ

1. ラット誘発排卵過程におけるプロゲステロン依存性ステップ

甲田平吾・森 崇英・西村敏雄
(京大産産婦)

排卵刺激に呼応して卵胞内に急増する性ステロイドのうち、Progesterone (P) と Androgen が卵胞破裂に必須であることを、わたくしどもは幼若ラットの誘発排卵実験系を用いて証明してきた。今回は排卵過程のどのステップが P に依存しているかを、抗 P 抗血清 (anti-P) を用いて検討した。生後 22 日齢の幼若 Wistar 系ラットに 5 単位の PMS と 10 単位の hCG を順次投与して排卵を誘起し、hCG 投与後 18 時間目に開腹し卵数を算定した。抑制実験では hCG と同時投与で完全に排卵を抑制する充分量の anti-P を、1.5, 3, 6, 9 時間後に投与した。回復実験では 0 時間に充分量の anti-P 投与後、90 μ g の P を上記 4 時点で補充した。抑制実験の結

果、6時間までは対照群に比し平均排卵数は有意に抑制され、回復実験では、6時間以後では対照群に匹敵する回復は認められなかった。以上より、本実験後においては、排卵過程前半期である hCG 投与後6時間までがP依存性ステップであると考えられた。

2. ラット黄体細胞におけるプロティン・カイネースによる Progesterone 産生促進作用について

稲葉俊夫・藺守龍雄 (大阪府大獣医)

黄体細胞における Progesterone 合成経路で cholesterol 側鎖断裂酵素 (CSCC) は LH の調節を受ける最も重要な部位だと言われている。今回の実験では LH の細胞内伝達因子プロティン・カイネース (PK) が CSCC に及ぼす影響について、ラット黄体細胞のミトコンドリアを用いて検討した。

PK 活性の細胞内分布については、70%以上の PK が可溶性分画に存在していた。Ca²⁺ 存在下では、PK の添加により、ミトコンドリアの CSCC 活性が有意に上昇したが、Ca²⁺ のない状態ではそのような変化は認められなかった。また Ca²⁺ 存在下で、ミトコンドリア内の cholesterol 量が少ない場合は、多い場合に比べて、PK による CSCC 活性の促進作用はより著明であった。一方、可溶化した CSCC には Ca²⁺ の存在しない状態でも、PK の刺激作用が認められた。

以上の結果より、ミトコンドリアの膜は Ca²⁺ によって透過性が変化し、PK はミトコンドリア内の CSCC に直接作用して progesterone 合成促進をすることが示唆された。

3. 女性不妊に対する腹腔鏡検査の臨床的意義

——最近五年間の統計的考察——

後山尚久・柳川泰彦・奥田喜代司
杉本 修 (大阪医大産婦)

女性不妊患者に対して、子宮卵管造影、子宮鏡とともに、腹腔鏡は重要な検査法の一つである。昭和50年から昭和54年までの5年間に本学で腹腔鏡検査を実施した213例中、不妊症は、約50%であった。子宮卵管造影、精液検査、基礎体温などの基本的諸検査に大きな異常を示さない症例71例に腹腔鏡検査を施行した。その結果、子宮内膜症、内性器周囲癒着、その他の器質的病変が確認されたものが原発性不妊症で75%、続発性不妊症で86%であった。疾患別では、原発性不妊症では子宮内膜症、続発性不妊症では癒着が多かった。

腹腔鏡検査により癒着が認められたものは妊娠率がきわめて低く、特別な異常所見のみられなかったものは妊

娠率が高いという結果が得られた。

女性不妊患者に対する腹腔鏡検査は以上のように重要な検査であり、病態把握の上で意義があると思われる。

4. 補体依存性精子不動化作用を有する monoclonal 抗精漿抗体の作製

繁田 実・高田 喜嗣・長谷川昭子
藤原敬子・伊熊健一郎・窪田 耕三
香山浩二・磯島 晋三

(兵庫医科大産婦)

原因不明不妊症婦人の血清中に精子精漿に対する精子不動化抗体の存在する事が証明され、現在この抗体の対応抗原の精製が待たれている。我々は、ポリエチレングリコールを用いた細胞融合法を応用する事により、補体依存性の精子不動化作用を有する、ヒト精漿抗原に対するモノクローナル抗体の作製に成功した。さらに、このモノクローナル抗体の対応抗原を検索した所、Immunodiffusion 法にてこの抗体は、精管結紮患者精漿蛋白、並びに人乳蛋白と沈降線を1本形成し融合した。さらにこの沈降線は抗ラクトフェリン抗体とそれぞれの抗原との間の沈降線とは完全に交叉した。そして免疫電気泳動度からも、対応抗原は、我々が発見した第2の精漿人乳共通抗原成分 No.7 である事が明らかとなった。今回の研究にて、このモノクローナル抗体を用いたマフィニティクロマトグラフィーを応用する事により単一の精子不動化抗体対応抗原の精製が可能である事が証明された。

5. Salazosulfapyridine の雄性ラット性腺および副性器に及ぼす影響について (予報)

桐山晋夫 (京大泌尿)

1979年 Toth が salicylazosulfapyridine (SASP) を服用中の潰瘍性大腸炎患者6例の精液検査を施行し、いずれもが乏ないしは無精子症であることを報告した。さらに Levy さんも同様な4例を追加した。SASP の投与を中断しえた8例のうち5例が投与中断後3カ月以内に、他の1例が1年以内に妊娠が成立した。

この SASP の性腺および副性器に及ぼす影響を雄ラットで検討した。粉末飼料 (I 群)、80mg サラゾピリン/20g 粉末飼料 (II 群) および200mg サラゾピリン/20g 粉末飼料 (III 群) で飼育した3群とした。①体重測定、1、2、4、8週後に脱血屠殺し、②両側辜丸および③副辜丸、精管、精のう腺、前立腺、膀胱を一塊にして摘出して重量を測定した。その結果①が I 群と III 群の間に有意の差がみとめられた他には②、③および③/②重量比には3群の間に有意の差はなかった。III 群ではサ

ラゾピリンが両側腎盂尿管に充満しこのため体重の増加しなかつたラットがみられた。

6. アンドロロジーについて

石神襄次 (神戸大泌尿)

アンドロロジーの定義、及びその学問的体系の歴史的発展過程について述べ、さらにわれわれの経験した過去24年間の男性不妊患者の病態、治療結果について報告し、又最近教室で始めた、精子治療の客観的証価法についてストロボ撮診を応用した結果を述べた。

日本不妊学会中部支部学術集会

昭和55年6月14日

岐阜大学医学部講堂

1. 漢方薬を西洋医学的に用いた不妊症の治療経験

森下宗司・松原一太・森川敏夫

(名古屋市)

青木孝充 (愛知保健センター)

漢方治療は証により治療するので、その効果判定の為の対照がとりにくい。従って西洋医学者の納得が得られないのが現状である。

特に不妊、流産防止、或いは安産に導くという問題についてはその証明が難しい。そこで、今回は西洋医学的治療では仲々妊娠しない為、漢方治療を渴望して来院した患者に一律に当帰芍薬散エキスを(証は無視して)投与し、その後後夫々14日毎に採血、血中の Estradiol, Progesteron, FSH, LH, 及び Prolactin の5種類のホルモンを夫々定量し、毎日の基礎体温とを対比しながらその消長を検討した。現在迄に16例8例が妊娠している。

次回からは個々の証に従った処方投薬した成績を求め、彼比検討した上で一定の法則を発見したいと考えている。

2. 女子 Kallmann syndrome の1例

内田雄治・戸谷良造・安江弘之

黒木尚之・三輪 是・鈴置洋三

(国立名古屋病院)

山岸英世 (南生協病院)

Kallmann syndrome は男性に多く女性に少ない。我々は既に2例の女子の Kallmann syndrome を経験し発表したが、今回さらに1例の経験を得たので報告す

る。

症例は27歳の未婚婦人で原発性無月経と二次性徴の遅れを主訴として来院し、無嗅覚症であり、ゴナドトロピン及び性ステロイドホルモンの分析より Kallmann syndrome と診断した。

試験開腹により原始卵胞の存在を確認し、現在、類宦官体型を改善すべく性ステロイド補充療法を施行中であるが、二次性徴の発現が完成されれば、ゴナドトロピン療法に切りかえる予定である。

3. 連続4回胎盤早剥をきたした不育症例

脇田勝次・鷲見裕之・野田克己

(岐阜大医産婦)

不育症は、妊娠はするが生児の得られないものをさす。即ち、習慣性流産、周産期死亡を総合した症候群である。我々は、4回の妊娠すべてが、常位胎盤早期剥離(以下早剥と略す)による不育症を経験したので報告する。

患者は30歳の主婦で、家族歴、既往歴には特記すべきものはない。

第1回目は、妊娠9カ月末に早剥が起り死産する。

第2回目は、高血圧にて通院治療中の妊娠10カ月初め、突然早剥が起り死産す。その後、DIC を起したが新鮮血輸血、フィブリノーゲン、トラジロール投与で止血する。

第3回目は、前回とほぼ同様であつた。但し、DIC は起らなかつた。

第4回目は、妊娠26週に下腹部痛が出現した為、入院安静、薬物療法等を行い順調に経過する。又血液検査、肝腎機能等の検査結果は、正常範囲内であつた。しかし、妊娠29週、突然下腹部痛が出現し、胎動を感じなくなり、児心音聴取不能となり死産する。胎盤は組織学的にも異常を認めなかつた。

早剥は、妊娠20週から妊娠末期までに児の娩出に先だつて、正常位にある胎盤が、完全又は不完全に剥離することによりおこる症候群であり、高齢者ほど、又分娩回数が多いほどその頻度は大きくなるといわれている。その成因としては、高齢、妊娠中毒症、外力、子宮内圧変化、胎盤の異常等あげられているが、どれも断定しえない。更に、早剥の半数以上は、妊娠中毒症を呈しない例があるという報告もある。ただ、我々の症例のごとく、特別な原因がなくして、所謂“反復早剥”が起ることから考えると、中毒性毒素因の存在は否定できないと考えられるので、今後、更に検討したいと思う。

4. 切迫流産と児の予後

生田 克夫・奥村 豊・高木 孝
水野金一郎・八神喜昭

(名古屋市立大産婦)

小川 雅彦

(名古屋市立城北病院産婦)

昭和54年1年間における124例の切迫流産患者の児の予後について調査した。なお、切迫流産の治療方法としては出来る限り胎児に影響を与えないために止血剤としてのトランサミンのみの使用とした。流産率は33.9%、生児獲得率は65.3%であった。母体の年齢では35歳以上の症例に、流産徴候発現の時期では妊娠3ヶ月、4ヶ月に発症した症例において流産率は高率であった。生産児81例(双胎の2児を含む)の生下時児体重は在胎週数に比して特に減少傾向は認められず、発育においては特に異常は認められなかったが、3例の児に奇形を認め、そのうち2例の児に心臓奇形(VSD, VSD+PDA)が認められた。

5. 精液中の遊離脂肪酸について

辻 幸三・山田昌夫・藪下広光
樋口和良・伊藤祐正・中西正美

(愛知医大産婦)

男性不妊についての精液に関する多くの研究がなされている昨今であるが、未だ不明の点が多いのが現状である。今回我々は、生体の種々のEnergy源として非常に重要な役割を持つ遊離脂肪酸(以下FFAと略す)について検討を加えた。そして一部のものでは、過酸化脂質も測定し合せて検討した。対象は、不妊夫婦で女性側には異常を認めない夫の精液43例とコントロールとして2年以内に児を得た夫の精液5例を用い、早朝、用手法にて採取し、臨床検査施行後、遠心分離して精漿を採り使用した。測定方法は、FFAはNEFAキットSを使用し、比色定量法にて、過酸化脂質はLiperoxide Test(Wako)にて蛍光定量した。結果として、精漿中のFFA値は、血清中の値とよく相関しoligo-azospermiaについては高値を示すものが多くそれら高値のもの運動率はすべて50%以下であった。さらにoligo-azospermiaのものでは、精漿中のFFAと過酸化脂質とは高い相関を示した。

6. 当院における galactorrhoea-amenorrhoea syndrome の検討

能登裕志・小林隆夫・水谷栄彦
寺尾俊彦・川島吉良

(浜松医大産婦)

当院において、約2年間で、12例の乳汁分泌、無月経の患者が受診した。6例は、頭蓋単純レ線で、明らかなトルコ鞍の変形があり、プロラクチン異常高値であった。1例が1/4の視野欠損を来した。6例とも脳外科で手術された。腫瘍の状態と、LH-RHテスト、TRHテストとの間には、相関はみられなかった。残り6例中4例は、正常プロラクチン値で、薬剤、ストレス等が原因と思われた。全例中4例は乳漏の自覚がなく、医師も気づかずに見のがしていた。経過の長い患者を、診察する時は、注意が必要であろう。現在迄に、手術例中、2例が妊娠し、残存腫瘍の増大を予防する意味で、プロモクリプチンの投与を継続してうけている。

7. Bromocriptine 治療により妊娠・分娩に至った下垂体 Microadenoma の2症例

本橋 亨(伊勢総合病院産婦)

ヒトプロラクチン(以下PRL)に対するラジオイムノアッセイの普及により、高PRL性無月経症の診断が容易となり、又本症に対する有効な治療薬剤としてBromocriptine(CB 154)が治験的に用いられるようになって以来、本薬剤の驚異的な有効率と相俟って本邦に於ても各地の医療機関より妊娠・出産例が報告されるようになってきた。しかるに文献的には下垂体腺腫に伴う高PRL症に対し、外科的剔除を行わずに対症的にCB 154投与を行つた場合、妊娠経過中に下垂体の生理的肥大に伴う症状を来すとする報告もみられる。今回は長期に亘る不妊に対し、血中PRL測定により高PRL性無月経と診断し、CB 154投与により妊娠、当院にて出産した2症例について、妊娠中および分娩の経過さらに産褥の状態につき報告し、併せて他の自験例および文献的に考察を加える。

8. 当科における排卵障害患者の臨床像とその治療成績について

米谷国男・伊藤 誠・広田 稔
高橋正明・近藤正利・上田 真
金子享一・馬島秀泰、福島 稔

(名古屋保健衛生大産婦)

排卵障害患者の診療にあたって間脳-下垂体-卵巢系を

主軸とした内分泌系における障害部位を正確に診断し排卵誘発を適確に行わねばならない。当大学病院においては昭和52年10月より LH-RH テストを手始めに血中 E₂, P, PRL などの R.I.A. が排卵障害患者の診療に routine に測定できるよう努力してきた。本日は過去約 2 年間に LH-RH テストを実施した排卵障害患者 49 例についてその臨床像, LH-RH テストにもとづく排卵誘発成功率, 妊娠率について統計的解析を行ない若干の成績を得たので報告したい。49 例の内訳は第 1 度無月経 14 例, 第 2 度 12 例, 無排卵性月経 15 例, その他機能的出血など 8 例であった。49 例中中性成熟期の既婚婦人が大半を占めたが 15~20 歳までの未婚婦人 6 例を含んでいた。初診時主訴は続発無月経 17 例と最も多く, 次いで挙児希望 15 例, 月経不順 8 例, 不正性器出血 8 例, 過少月経 1 例であった。排卵障害患者の臨床分類と LH-RH テストの成績との関係についてみると, 第 1 度無月経は 14 例中間脳性 8 例, 下垂体性 5 例, 卵巣性 1 例であり, 第 2 度無月経は 12 例中それぞれ 1 例, 6 例, 5 例であり, 無排卵性月経ではそれぞれ 7 例, 8 例, 卵巣性なしであった。排卵誘発率は間脳性が 20 例中 13 例 (65%) と最も高く, 下垂体性は 23 例中 11 例 (47.8%) であり, 卵巣性 6 例はすべて排卵しなかつた。これを臨床分類別における排卵誘発率と妊娠成功率からみると第 1 度無月経では 14 例中 8 例 (57.1%) が排卵しうち 6 例 (42.9%) が妊娠した。第 2 度無月経では 12 例中 4 例 (33.3%) が排卵しうち 2 例 (16.7%) が妊娠したが, うち 1 例は子宮内胎児死亡 (妊娠 15 週) に終わった。無排卵性月経では 15 例中 9 例 (60%) が排卵しうち 4 例 (26.4%) が妊娠した。排卵誘発成功 24 例における誘発方法は HMG-HCG 使用例が 11 例と圧倒的に多く不妊症診療で A.I.H., A.I.D. を行なう関係上第 1 度無月経例にも HMG を使用する機会が増えてきているのが注目される。

9. 腹腔鏡で見た重複黄体

可世木辰夫・可世木公美子
(可世木病院)

最近, 腹腔鏡使用例に重複黄体を再三認めたので, 過去一年前を遡上つて, 147 例中に 7 例を見出した。それ以前と比較して明らかに増加している。患者の平均年齢 33.6 歳, 全例不妊症で, 不妊期間は平均 7.7 年, 1 例の流産経験者以外は, 一次不妊である。

手術は排卵直後をねらつて実施した。手術の周期に CLOMID を投与した者は 5 例で, 第 5 例は手術の前の周期が無排卵のため増量し, 第 2 例は前周期 43 日のため始めて, 1 × 5 錠投与した。

排卵日 (粘液法を参考として BBT 表で推定した) は周期の平均 13.3 日目, 手術日は 22.1 日目, 排卵後平均 3.8 日後に施術したことになる。

観察した黄体は 2 個が 4 例で, 3 個が 2 例, 第 4 例では 5 個の黄体を認めた (CLD 4 × 5 使用)。19 黄体中 4 は巨大細胞状で排卵口が認められず, 総て左側であった。

卵巣の白膜は黄体部分を除いて全例肥厚しており, 3 例は硬化型と診定した。PCO は 3 例に著明で, 母指頭大 CYST を持つ者 2 例があった。

CLD の使用は常に必要最小量に止め, 排卵がない場合のみ投与, 増量して, 過剰使用には充分留意していたが, 実情はこのようである。

最近 CLD 使用例で, 排卵はしても妊娠率が低いと言う声を耳にするが, その理由は詳かでない。卵胞状でなく, 白膜にかくれた黄体を認めることも多いので, 本来これも閉鎖黄体と考えるべきであろう。また, 内膜症の強度ゆ着の剝離部分に黄体を認めることは珍らしくないから, これも妊娠の機会はない。

白膜肥厚, PCO, ゆ着と CLD の組み合わせに, 不妊原因の存在を求めてよいものか今後の宿題としたい。

10. 不妊症患者のラパロスコプ所見からの検討

小池皓弑・小川統久・三村三喜男
池内政弘・八神喜昭
(名古屋市立大産婦)

不妊症の原因並びに治療について, 種々の点から改善してきていますが, 今なお原因の不明な例も多い。その様な原因不明な症例並びに内膜症の検索を含めて, 腹腔鏡を併用して, 卵管因子並びに腹膜因子等についての検討している。

腹腔鏡の所見により, HSG, ルビネテスト等にて把握出来なかつた子宮内膜症, 卵管の異常並びに骨盤腔内の癒着等について, より確実に診断出来ると同時にその後の治療にもその結果を反映させうる事を認めた。更に, 治療面での有用性について, 例えば, PCO における両側卵巣に対して, 腹腔鏡下にて切開を加える小手術を行う事により排卵に引きつづいて妊娠させた症例の報告をした。

11. 子宮内膜症とダナゾール療法

後藤 孝・野崎 誠・下須賀洋一

鈴木正利・友田 豊

(名古屋大産婦)

中島 豊・成田 収

(名古屋大分院産婦)

子宮内膜症は不妊の原因として重要な因子であり、当教室の最近の統計でも不妊症の10%近くを占めている。これら子宮内膜症患者に対し従来より行われてきた偽妊娠療法及び保存的手術療法と Danazol 療法と比較検討した。

対象は最近12年間に当科不妊外来を受診し子宮内膜症と診断された182例で、偽妊娠療法61例、手術療法104例、Danazol 療法17例で、以下の結果を得た。

妊娠率は偽妊娠療法21%、手術療法44%、偽閉経療法29%で、手術療法が他に比し良好な成績だった。進行度からみると、偽妊娠療法及び Danazol 療法は軽症例には良好な妊娠率をみるが、進行が進むにつれ低下し、進行している症例では手術療法の方が良好な成績を示した。又、Danazol 療法は月経困難症等の自覚症状の改善には極めて有効であったが、内診及び手術時所見からはあまり改善されてなく、自覚症状の改善と他覚所見とは相異が認められた。

Second Pan American Congress of Andrology

開催のお知らせ

期 日 : 1981年1月26~30日

開催地 : HOTEL FIESTA PALACE, MEXICO CITY, MEXICO

主要プログラム

- I. Anatomy and Physiology of Reproduction.
- II. Sperm production, maturation and transport in male Genital tract.
- III. Sperm transport in Female Genital tract as well as Fertilization.
- IV. Clinic evaluation of the infertile male.
- V. Medical treatment of the infertile male.
- VI. Surgical treatment of the infertile male.
- VII. Therapeutic insemination (ADI).

その他特別講演

会長 Dr. Edmundo Alpuche

登録料 : \$ 3,000,00 Mexican pesos

内容について知りたい方は不妊学会事務所まで御連絡下さい。

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、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。特に号数を必要とする場合は、巻数と頁数との間に括弧で囲む。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4号

昭和55年9月25日 印刷
昭和55年10月1日 発行

編集兼 発行者	芦原慶子
印刷者	中村清雄
印刷所	東京都品川区上大崎3-12-15 一ツ橋印刷株式会社
発行所	東京都品川区上大崎3-12-15 社団法人 日本不妊学会 東京都新宿区 市ケ谷砂土原町1丁目1番 保健会館別館内 Tel (03) 267-4635 振替口座番号 東京 7-93207