

日本不妊学会雑誌

第 26 卷

第 2 号

昭和 56 年 4 月 1 日

— 目 次 —

原 著

男子不妊症患者辜丸における減数分裂染色体の研究……………石川博通・他… 1
 Gonadotropin 療法により造精機能導入に成功した
 Kallman 症候群の一例……………吉田謙一郎・他… 7
 ヒト精管切除術と再吻合術前後における
 精漿中遊離アミノ酸値について……………中山孝一・他… 12
 抗精子抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響
 3. 精子不動化抗体結合精子の頸管粘液内通過性障害機序に
 関する研究……………伊熊健一郎・他… 17
 ストロー法によるヒト精子凍結保存法の研究……………真井徳幸… 24
 ステロイド合成を阻止したマウス卵子における
 卵割・胞胚形成能力の衰退……………新村末雄・他… 34
 初期胚の分化と細胞周期との相関に関する研究……………北井啓勝・他… 40
 月経周期における 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one の変動について…白須和裕・他… 47
 Clomiphene Citrate during the Luteal Phase in the
 Management of Infertility with Luteal Phase
 Defects……………Teruhiko TAMAYA・他… 53
 LH-RH test によるクロミフェンの有効性に関する検討……………大塚晴久・他… 56
 子宮内膜症に対する DANAZOL の効果と副作用……………永田行博・他… 61
 子宮内膜症に対する DANAZOL 投与効果とその内分泌学的
 背景について……………佐藤芳昭・他… 68
 油性造影剤 Lipiodol UF による子宮卵管造影法……………百瀬和夫・他… 75
 卵管形成術に対する microsurgery の応用
 —その基礎と臨床—……………真木健… 79
 IUD 挿入婦人の着床期子宮内膜の形態学的研究……………安江育代… 92
 Lymphocytes Subpopulation in Pregnant Women……………Yukihiko SHIOTSUKA・他…100
 地方部会講演抄録……………105
 お知らせ……………120

第26回日本不妊学会総会および学術講演会予告(第2回)

第26回日本不妊学会総会および学術講演会について、第2回の予告を下記のごとく御案内申しあげます。

多数の御出題を期待いたしております。

会期 昭和56年11月11日(水)、役員会(理事会、評議員会、幹事会)、総会、11月12日(木)、13日(金)、学術講演会

会場 役員会、総会は都ホテル(京都市東山区けあげ)
学術講演会は京都会館(京都市左京区岡崎最勝寺町13)

学術講演

1. 会長講演

京都大学 西村敏雄教授

2. 外人招請講演

① Physiology of fertilization

University of Pennsylvania

Prof. Luigi Mastroianni, Jr.

② Induction of ovulation with hMG/hCG— theoretical and clinical aspects

Soroka Medical Center

Prof. Vaclav Insler

3. 特別講演

① 排卵機構—卵胞の機能形態学—

京都大学講師 岡村均

② 黄体機能とその調節因子—最近の研究の歩み—

大阪府立大学教授 蘭守龍雄

③ 子宮内膜症の保存療法—ホルモン療法と手術療法—

大阪医科大学教授 杉本修

④ 男子不妊症の最近の問題

千葉大学教授 島崎淳

4. シンポジウム

“生殖細胞・初期胚の環境因子”

5. 一般講演

演題申込資格

すべての講演者は、本会会員に限ります。会員以外の方(共同発表者を含む)は、演題申込と同時に、昭和56年度会費(8,000円)を納入の上、会員となつて下さい。

演題申込方法

本誌第1号(昭和56年1月号)に挿入されてある所定の用紙を必ず使用し、800字以内の講演内容要旨を添付して書留郵便で送つて下さい。講演内容要旨は、そのまま写真印刷をして本誌第26巻4号(第26回日本不妊学会総会特集号)に掲載されます。なお演題の採否は会長に一任させていただきます。

演題抄録の記載要領につきましては本誌昭和56年1月号を御参照下さい。

演題申込締切

昭和56年6月15日(必着)

演題申込先

〒606 京都市左京区聖護院川原町54
京都大学医学部産婦人科教室内
第26回日本不妊学会総会事務局宛
(TEL 075-751-3288)

懇親会

評議員懇親会 昭和56年11月11日 総会終了後
総懇親会 昭和56年11月12日 学術講演終了後

参加申込方法

学会当日および役員会において受付けます。

学会参加費 7,000円

総懇親会費 7,000円

宿泊の御案内

学会期間中は紅葉の観光シーズンですので、本誌昭和56年1月号に御案内いたしました予約申込み書を御利用下さるようお願い致します。

第26回日本不妊学会総会

会長 西村敏雄

連絡先 〒606 京都市左京区聖護院川原町54

京都大学医学部産婦人科教室内

第26回日本不妊学会総会幹事

岡村均

TEL 075-751-3275

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 26, No. 2, 1981)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Studies on Meiotic Chromosomes in Male Infertility.....	<i>H. Ishikawa,</i> <i>H. Tazaki, S. Tamura & Y. Kinoshita</i>	1
Successful Induction of Spermatogenesis in a Case of Kallman's Syndrome by a Combined Treatment of hCG and hMG.....	<i>K. Yoshida, H. Oshima, K. Takagi,</i> <i>Y. Higashi, M. Ando & M. Yokokawa</i>	7
Changes of Free Amino Acids in Seminal Plasma with Vasectomy and Reanastomosis of the Vas Deferens.....	<i>K. Nakayama,</i> <i>N. Murakami, K. Miura, M. Shirai & K. Ando</i>	12
Effect of Sperm Immobilizing Antibodies on Sperm Penetration in the Cervical Mucus: 3. Impairment of Sperm Penetration in the Cervical Mucus by Binding the Sperm Immobilizing Antibody on Spermatozoa	<i>K. Ikuma, K. Kubota,</i> <i>Y. Takada, K. Koyama, S. Isojima & T. Kamata</i>	17
Study on the Freeze Preservation of Human Spermatozoa by Using Plastic Staw Method	<i>N. Sanai</i>	24
Failure in Cleavage and Blastocyst-transformation in the Steroid Synthesis-blocked Mouse Eggs	<i>S. Niimura & K. Ishida</i>	34
Cytofluorometric Studies on the Correlations between Differentiation and Cell Cycle of the Murine Embryo.....	<i>H. Kitai, S. Suzuki & R. Iizuka</i>	40
Changes in Plasma 20 α -Hydroxypregn-4-en-3-one during the Menstrual Cycle	<i>K. Shirasu, A. Matsuyama & T. Uemura</i>	47
Clomiphene Citrate during the Luteal Phase in the Management of Infertility with Luteal Phase Defects	<i>T. Tamaya, H. Urabe,</i> <i>Y. Ohono, H. Kusanishi, T. Yamada & H. Okada</i>	53
Usefulness of LH-RH Test to Clomiphene Therapy	<i>H. Otsuka,</i> <i>K. Takada, H. Kitada, S. Takaoka & N. Sono</i>	56
Clinical Effects and Side Effects of Danazol in the Treatment of Endometriosis.....	<i>Y. Nagata, G. Nakamura & M. Kusuda</i>	61
Clinical Effects and Hormonal Aspects of Danazol Therapy in Patients with Endometriosis	<i>Y. Sato, T. Ishiguro,</i> <i>A. Hoshino, N. Sudo, T. Takahashi & S. Takeuchi</i>	68
Hysterosalpingography Using Oily Contrast Media Lipiodol UF.....	<i>K. Momose</i> <i>K. Okada & K. Hayashida</i>	75

Application of Microsurgery to Tuboplasty —Its Basic and Clinical Studies—.....	
.....	<i>K. Maki</i> 79
The Morphological Study of the Endometrium of Women with IUD in Nidative Phase.....	<i>I. Yasue</i> 92
Lymphocytes Subpopulation in Pregnant Women.....	<i>Y. Shiotsuka,</i> <i>K. Kobayashi & S. Yamauchi</i>100

男子不妊症患者辜丸における減数分裂染色体の研究

Studies on Meiotic Chromosomes in Male Infertility

慶応義塾大学医学部泌尿器科

石川 博通 田崎 寛

Hiromichi ISHIKAWA Hiroshi TAZAKI

Department of Urology, School of Medicine, Keio University, Tokyo

慶応義塾大学医学部産婦人科

田村 昭蔵

Shohzoh TAMURA

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

慶応健康相談センター染色体室

木下 芳広

Yoshihiro KINOSHITA

Chromosome Unit, Keio Health-Counselling Center

男子不妊症患者39例における生検辜丸組織の減数分裂染色体を比較的簡易な空気乾燥法標本により観察し、個々の症例につき減数分裂の arrest の時期を判定し、それをわれわれの考案した Meiotic stage に従って stage 0 からIVに分類し、それと病理組織学的所見および Sperm count と比較検討し、以下の成績を得た。Meiotic stage 分類と病理組織学的所見 (Histopathological grade) による分類との間に相関はなく、後者が各 grade に亘り広く分布したのに対し、前者は low stage と high stage との2峰性分布を示した。Meiotic stage 分類と Sperm count による分類との関連をみると Azoospermia 群での減数分裂の arrest は全て stage I までにおこっており、他は減数分裂を完了していた。このような2峰性分布と Sperm count の所見との明らかな対応性は Prophase I に減数分裂の進行を左右する要素が介在することを示唆するものと言えよう。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 109-114, 1981)

I 緒 言

過去半世紀にわたり、辜丸組織の染色体の研究に関し数多くの報告がなされてきた。これらの報告における実験方法の大部分は、包埋固定法および押しつぶし法であり、ヒト染色体の数を決定することを目的としていた。従って減数分裂過程の染色体の詳細を明らかにするには至らなかった。一方、血液その他の体細胞染色体の研究は近年急速な進歩を示し、種々の方法が試みられそのひ

とつ的手段として空気乾燥法が確立された。1964年に至り Evans¹⁾らは、この方法を辜丸組織に応用し減数分裂の過程を観察することに成功した。さらに1966年に McIlree²⁾は Evans らの方法を用い、男子不妊症患者を含む16例の減数分裂染色体の phase による分析をおこなっている。本邦では高木³⁾が佐々木⁴⁾らの方法を用い、男子不妊症患者の臨床的所見と対比しながら減数分裂染色体の分析をおこない、異数性細胞の出現、XY bivalent と univalent の比について言及している。われわれは、

男子不妊症患者を対象としてその生検辜丸の減数分裂染色体標本を比較的簡易な低張液処理空気乾燥法を用いて作製し、減数分裂の進行過程にある染色体を幅広く観察し、個々の症例について arrest の時期を判定した。それをわれわれの考案した Meiotic stage に従って分類し、その所見と病理組織学的所見による分類および Sperm count による分類とを比較検討し臨床的に意義ある結果を得たので報告する。

II 研究対象および検索方法

1. 研究対象

昭和52年8月から昭和53年4月までに不妊を主訴として慶応義塾大学病院泌尿器科に来院し辜丸生検をおこなった39例を対象とした。

2. 検索方法

辜丸の開放生検を局所麻酔下で以下の如くおこなった。即ち、陰囊皮膚、辜丸固有膜を切開して、辜丸の一部を露出した後、白膜に切開を加え辜丸組織の一部を切除し採取した。その一部を染色体観察用とし、残りは直ちに Bouin 液で固定してから hematoxylin-eosin 染色をおこなって病理組織学的検索に供した。染色体標本の作製は、空気乾燥法により次の如くおこなった。

1) 生検によって得られた2~3mm角の辜丸組織を生理的食塩水に浮遊させ、直ちに実験室に運びシャーレ内で眼科用ハサミを用い粥状化するまで細切した。

2) これをスピッツにうつし、0.075MKCl を加え駒込ピペットで攪拌し、室温で15分間静置した(低張液処理)。次に1000r.p.m. で5分間遠沈をおこなった後、上澄液を吸引して捨てた。

3) 沈渣に Acetic Alcohol (Carnoy 液) を加え、軽く攪拌し直ちに1000r.p.m. で5分間遠沈しこの操作を3回繰返して最後に30分間静置し固定した(Carnoy 固定)。上澄の Carnoy 液を吸引除去し、2ml の Carnoy 液を加え攪拌した。

4) 表面を清潔にしたスライドガラス上にピペットで懸濁液を静かにまき、ブンゼンバーナーにかざして火をつけ、直ちに乾燥させた(空気乾燥)。

5) スライドガラスをメタノールで洗い、10% Giemsa 液中に15分間静置した(Giemsa 染色)。

6) 全開にした水道水で余分な Giemsa 液を洗いおとし、室温で乾燥させ、オイキットにて封入し、これを光学顕微鏡下で観察し、必要に応じて写真撮影をおこなった。

III 結 果

1. 減数分裂細胞の染色体像

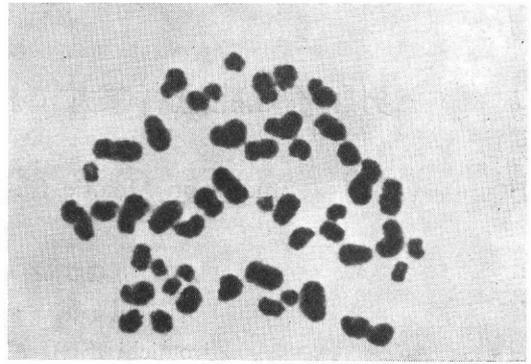


Fig. 1 Spermatogonium の Metaphase で 46XY である。前減数分裂期であるが A type か B type かは不明である。

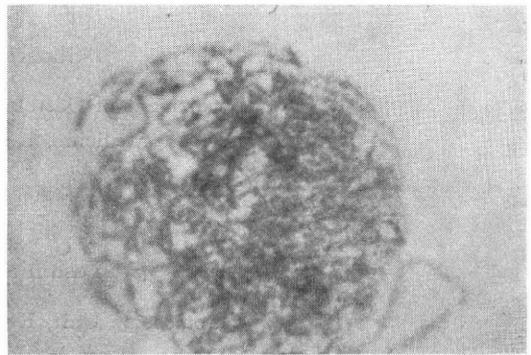


Fig. 2 Leptotene で減数分裂前期の最初の段階で前減数分裂期ではまったく見分けがつかなかった染色体が非常に細長い紐状に見えるようになる。

われわれの方法による減数分裂の各進行段階の染色体像を示すと次の如くである。

1) Fig. 1 は Spermatogonium の Metaphase の染色体像で、46XY の像がみられる。この像は、われわれの観察方法では Azoospermia で減数分裂細胞のない症例以外は全てに認められた。

2) Fig. 2 は Leptotene の染色体像であり非常に細い紐状の染色体が観察された。

3) Fig. 3 は Pachytene の染色体像であり Zygotene から始まった染色体の対合が完了し、染色体の短縮が認められた。この像は減数分裂が Prophase I まで達している症例では高率に出現し、形態の確認も容易であった。

4) Fig. 4 は Diakinesis の染色体像であり22個の常染色体性二価染色体と XY の対合が明瞭に観察できた。この像は形態が特徴的で他との区別は容易であり、出現頻度も比較的高かった。

5) Fig. 5 は Metaphase II の染色体像であり22+X

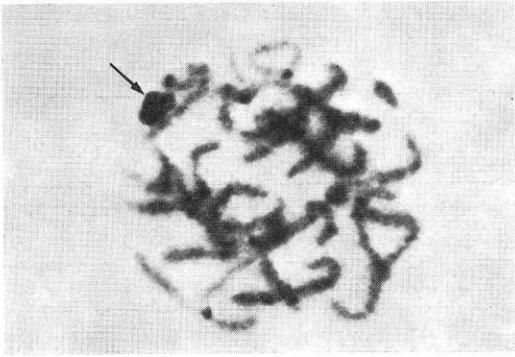


Fig. 3 Pachytene で相同染色体は対合を完了し、二価染色体となる。この時期に染色体の短縮がおこる。矢印は sex vesicle を表わす。

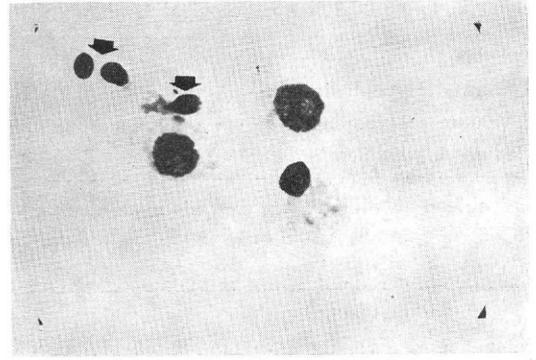


Fig. 6 Spermatid (矢印) でこれが見られれば減数分裂の完了とみなした。

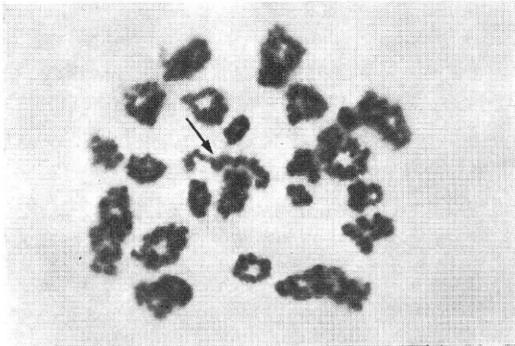


Fig. 4 Diakinesis で対合した22個の常染色体性二価染色体と XY bivalent (中央矢印) がみられる。

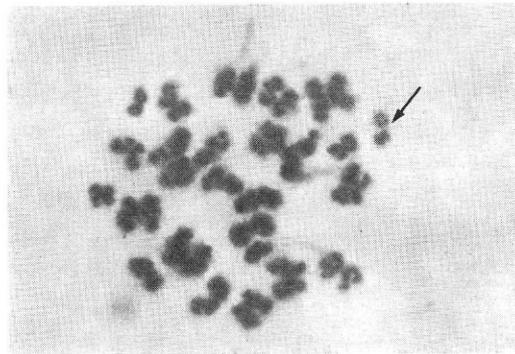


Fig. 5 第二減数分裂の Metaphase で22+X と22+Yの細胞に分けられる。これは Y染色体 (右上矢印) がみられる。

と22+Yの2種類に分類されるが、減数分裂を完了している症例でも出現頻度はあまり高くなかった。

6) Spermatid は Fig. 6 の如くであり、この像の出現により減数分裂の完了とみなした。

2. Meiotic Stage

Table 1 Meiosis

A. First Division		1. Leptotene
1. Prophase I	}	2. Zygotene
		3. Pachytene
		4. Diplotene
		2. Metaphase I (including Diakinesis)
3. Anaphase I		
4. Telophase I		
B. Second Division		
1. Metaphase II		
2. Anaphase II		

Table 2 Meiotic Stage

No Spermatocytogenesis.....	stage 0
Prophase I	I
Metaphase I	II
Metaphase II	III
Spermatid	IV

減数分裂は Spermatogonium から Spermatid に至る過程であり、染色体像により Table 1 の如くいくつかの段階に区分されるが、われわれはこれをその進行状態により5段階に区分する stage 分類を試みた (Table 2)。即ち stage 0 は、減数分裂を認めないもので39例中6例 (15%) がこれに相当し、stage I は Prophase I まで認めるもので8例 (21.5%) あり、stage II は Metaphase II まで認めるもので1例 (2.5%)、stage III は Metaphase II まで認めるもので1例 (2.5%)、stage IV は spermatid を認めるもので23例 (58.5%) という結果であった。

3. Histopathological grade

病理組織学的所見の分類は、白井⁵⁾らの分類に準じて

Table 3 Histopathological Grade

Aplasia	grade 0
Marked Hypoplasia	1
Moderate Hypoplasia	2
Slight Hypoplasia	3

Table 4 Meiotic stage and histopathological grade in 39 cases with male infertility

Histopathological grade	Meiotic stage					
	0	I	II	III	IV	Total
0	3	2	—	—	—	5
1	3	5	—	—	11	19
2	—	—	1	1	8	10
3	—	1	—	—	4	6
Total	6	8	1	1	23	39

grade 0 から 3 の 4 段階に grading した (Table 3). 即ち grade 0 は germinal cell aplasia で 5 例 (12.8%) あり grade 1 は marked hypoplasia で 19 例 (48.7%), grade 2 は moderate hypoplasia で 10 例 (25.7%), grade 3 は slight hypoplasia で 5 例 (12.8%) であった.

4. Meiotic stage と Histopathological grade との関係

結果は Table 4 の如くであり Meiotic stage 分類と Histopathological grade による分類との間に相関関係は認められず, 前者は high stage と low stage への 2 峰性分布を示したのに対し, 後者は grade 1 および grade 2 への分布が 29 例 (64.4%) と多かつた. 即ち stage 0 および I の 14 例は全例 grade 0 および 1 に分布したが, stage IV の 23 例は grade 1 が 11 例, grade 2 が 8 例, grade 3 が 4 例と, 各 grade に亘り広く分布した. また stage II および III の 2 例はともに grade 3 であった.

5. Meiotic stage と Sperm count との関係

個々の症例の Sperm count により Azoospermia と Oligozoospermia の 2 群に分類し, Meiotic stage との関係を見た (Table 5). stage 0 および stage I の 14 例中 13 例が Azoospermia で 1 例が Oligozoospermia であった. また stage II および stage III の 2 例は, ともに Oligozoospermia であり stage IV の 23 例では Azoospermia 10 例, Oligozoospermia 13 例であった. これを Sperm count の観点からみると Azoospermia 23 例中 13 例は stage I までに減数分裂の進行が全て停

Table 5 Meiotic stage and sperm count in 39 cases with male infertility

Sperm count	Meiotic stage					
	0	I	II	III	IV	Total
Azoospermia	6	7	0	0	10	23
Oligozoospermia	0	1	1	1	13	16
Total	6	8	1	1	23	39

止していたが, その他は減数分裂を完了していた. Oligozoospermia 群では全例減数分裂を完了しているべきであるが, 16 例中 3 例が stage I から III にそれぞれ 1 例ずつ分布した.

IV 考 案

男子不妊症の原因は (1) 精細管内精子形成機能障害, (2) 精子成熟障害, (3) 精子輸送路の通過障害, (4) 精子栄養障害, に分類される⁹⁾. これらの原因のうち 70% 以上が精細管内精子形成機能障害とされている⁷⁾. この精子形成時期において最も重大なのは, 減数分裂の進行であり, 種々の阻害要因により染色体レベルでの異常が惹起されるものと考えられるが, 染色体分裂機構の異常の詳細についてはなお不明な点が多い. 従来染色体レベルの分析としては Diakinesis の観察を中心に数または形態の異常が指摘されている⁸⁾. その重要性は言うまでもないが, 不妊症例において常にこのような観察に適するよい標本が得られるとは限らず, また染色体分裂障害をより幅広くとらえる必要があると考えた. このような目的からわれわれは, 辜丸組織の染色体標本作製法の改良を試みほぼ満足すべき方法を得た. 本法は甚だ簡易であるにも拘らず, 減数分裂細胞の詳細な観察が可能である. 方法は Evans らの方法を簡素化したもので, さらに低張処理に KCl を使用した. 低張処理に KCl を用いる方法については, Luciani⁹⁾らが報告しており, 細胞浮遊液を作製したときに塊をつくりにくく, 標本の広がりがよくいと述べている. われわれの経験でも, KCl を用いることにより減数分裂全過程における各段階の染色体像が容易に観察されることが判明した.

一般に Prophase I 以外の時期における減数分裂染色体像の観察は容易で Metaphase I (Diakinesis も含む) の観察から多くの知見が前述の如く報告されている. しかし Prophase I に止まる異常, さらには Metaphase I において顕現される異常には Prophase I における異常に起因するものも多いと推察されることから思考すれば, Prophase I の観察こそ重要な位置を占める

ものと思われる。しかしこれについての報告は少ない。その原因としては Prophase I における各 phase 間での染色体の形態学的判別が困難であり、その上 phase によつては duration の短いものもあり¹⁰⁾、それが標本に出現する確率の低いことなどがあげられる。このような理由から本研究では、研究対象を幅広く選り本法を用い、Prophase I を中心に減数分裂の進行状態を詳細に観察し、その所見と臨床的所見との関係を明らかにすることを試みた。

われわれの Meiotic stage 分類では39例中14例 (36.5%) が stage 0 および I に23例 (58.5%) が stage IV に分布し、他の stage のものは2例 (5%) にすぎなかった。これに対し Histopathological grade による分類では、前者に比べ分布が幅広く、むしろ grade 1 が19例 (48.7%) で grade 2 が10例 (25.6%) と中間の部分に分布するものが多かった。この理由は、ひとつには前者は減数分裂の進行状態という単一のものでの分類であり、後者は種々の要素による分類であるためと考えられる。病理組織学的に多様な要素から不妊の原因を推測していくことも勿論重要ではあるが Meiotic stage 分類からそれを究明するのも重要な観点であると考えた。その結果、減数分裂の停止している16例中14例 (88%) において、それが Prophase I までにおこっているという結果を得た。これは Prophase I において減数分裂の進行を左右する何らかの要素が介在することを示唆するものと言えよう。既に Moses¹¹⁾らは全載電顕法により、Prophase I の時期において Synaptonemal complex (染色体相同装置) という減数分裂に特有な構造が出現することを証明しており、われわれの結論と併せ考えると甚だ興味深い。さらに Prophase I の分析については、最近 Oud¹²⁾らはマウスを用い DNA 合成阻害剤を負荷し Prophase I の減数分裂細胞のみをとり出し、その染色体像を観察しているが、今後、Prophase I の減数分裂細胞の染色体を形態学的な観察のみならず、分子生物学的および生化学的な方法等も用いて分析していく必要があると考える。

Meiotic stage 分類と Sperm count による分類との比較で Azoospermia 23例中 stage 0 および I が13例で stage IV が10例であり、stage II および III は全く存在しなかった。このことは、前述の如く減数分裂の arrest は Prophase I までにおこっていることを明らかに示している。また Oligozoospermia 群は当然 stage IV であるべきだが、stage I から III に3例が分布した。この理由としては、もともと標本が小さいうえに、Sperm count が極端に少ない症例では染色体標本作製の操作により、Spermatid が最終的に標本に出現しえないこと

を考えた。それに加えて、減数分裂細胞の wave により採取された精細管の場所によつては Spermatid の存在しないこともあり得ると思われ、これも結果に影響している可能性がある。

V ま と め

1. 男子不妊症患者39例の減数分裂染色体を低張処理に0.075MKCl を用いた空気乾燥法により観察した。
2. 減数分裂の進行状態による Meiotic stage を認定し、個々の症例を分類した。この結果減数分裂の arrest は、16例に認められたが、そのうち14例が Prophase I までにおこっており、この時期に減数分裂の進行を大きく左右する要素のあることが示唆された。
3. Azoospermia 23例中、減数分裂の arrest は13例に認められたが、全例 Prophase I までにおこっており、明らかな対応性を示し、本法による観察の有用性を示唆するものとする。

文 献

- 1) Evans, E. P., Breckon, G., and Ford, C. E.: An air-drying method for meiotic preparations from mammalian testes. *Cytogenetics*, 3: 289, 1964.
- 2) McIlree, M. E., Tulloch, W. S., and Newsum, J. E.: Studies on human meiotic chromosomes from testicular tissue, *Lancet I*: 679, 1971.
- 3) 高木健太郎: 男子不妊症における精細胞染色体の研究, *日泌会誌*, 62: 78, 1971.
- 4) Sasaki, M., and Makino, S.: The meiotic chromosomes of man, *Chromosoma (Berl)* 16: 637, 1965.
- 5) 白井将文: 症状よりみた男子性器疾患のすべて 124, 新興医学出版社, 1977.
- 6) 志田圭三, 浦野悦郎: 男子不妊症の臨床: 36, 金原出版株式会社, 1967.
- 7) 右神襄次: 男性不妊症に対するホルモン療法の適応と限界, *ホルモンと臨床*, 16: 433, 1968.
- 8) Hulten, M., Eliasson, R., and Tillinger, K. G.: Low chiasma count and other meiotic irregularities in two infertile 46, XY men with spermatogenic arrest, *Hereditas*, 65: 285, 1970.
- 9) Luciani, J. M., Devictor-Vuillet, M., and Stahl, A.: Hypotonic KCL: An improved method of processing human testicular tissue for meiotic chromosomes, *Clinical Genetics II*: 32, 1971.
- 10) Heller, C. G., and Clermont, Y.: Spermatogenesis in Man: An estimate of its duration, *Science* 2: 184, 1963.
- 11) Moses, M. J.: Synaptonemal complex, *Am. Rev. Genet.* 2: 363, 1968.

- 12) Oud, J. L., deJong, J. H., and de Rooij, D. G.: A sequential analysis of meiosis in the male mouse using a restricted spermatocyte population obtained by a Hydroxyurea/Triaziquone, Chromosome (Berl.) 71 : 237, 1979.

Studies on meiotic chromosomes
in male infertility

Hiromichi Ishikawa and Hiroshi Tazaki

Department of Urology, School of Medicine,
Keio University, Tokyo

Shohzoh Tamura

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

Yoshihiro Kinoshita

Chromosome Unit, Keio Health-
Counselling Center

In 39 male infertile patients, the meiotic

chromosomes in the germinal cells was studied through a relatively simple technique: namely, air drying method.

Our objective is to find when the arrest of meiosis is occurred.

Based on our meiotic stage, 39 cases were divided into 5 stages and relationships between the staging, histopathological grade and sperm count were examined.

There was no relationship between Meiotic stage and histopathological grade showed a wide distribution. In the contrast, two peaks were noted clearly in the staging; one was in the low stage and the other was in the high stage.

The study on the meiotic stage and sperm count disclosed the meiotic arrest had been occurred until stage I in the azoospermia group and in the other meiosis were completed.

A clear relationship between the two peaks and sperm count suggested there were some factors which played important roles on meiosis process in Prophase I.

(受付: 昭和55年10月25日)

Gonadotropin 療法により造精機能導入に 成功した Kallman 症候群の一例

Successful Induction of Spermatogenesis in a Case of Kallman's
Syndrome by a Combined Treatment of hCG and hMG

東京医科歯科大学医学部泌尿器科学教室

吉田 謙一郎 大島 博幸 高木 健太郎
Ken-ichiro YOSHIDA Hiroyuki OSHIMA Ken-Taro TAKAGI

東 四 雄 安藤 正夫 横川 正之
Yotsuo HIGASHI Masao ANDO Masayuki YOKOKAWA

Department of Urology, School Medicine, Tokyo
Medical and Dental University

28歳の Kallman 症候群の患者に hCG 投与を行ない二次性徴導入後、hMG を併用し二次性徴の完成及び造精機能の導入を見た。AIH により妊娠が成立し、健全な女兒を得た。この症例につき治療前及び造精機能導入後の睪丸組織の試験切除を行なった。治療前の睪丸組織所見では、精細管は小さく、管内細胞はそのほとんどが未熟な Sertoli 細胞であり、間質には明らかな Leydig 細胞はみられず、線維芽細胞様の細胞のみが認められた。これに対し造精機能導入後の組織では精細管は発育拡大し、各精細管断面には精子形成が認められ、Sertoli 細胞も Leydig 細胞も成熟型を呈していた。以上の症例を報告し、かつ hypogonadotropic hypogonadism の造精機能導入成功例について文献的考察を行なった。

(Jap. J. Fert. Ster., 26(2), 115-119, 1981)

緒 言

嗅覚障害を伴う hypogonadotropic hypogonadism は Kallman 症候群¹⁾と呼ばれる。その病因は発生学的に近接する鼻咽頭粘膜と嗅神経及び視床下部の発達障害²⁾と考えられており、このためにおこる嗅覚障害及び LH-RH 分泌不全による二次性の性腺機能不全が本症の本態と考えられている。われわれは28歳の本症例について、gonadotropin 療法を試み、二次性徴の完成と造精機能の導入に成功した後、人工受精により妊娠を成立せしめ、正常な女兒を得たので、その治療経過を報告する。

症 例

症例：28歳、男性。初診時には独身。
主訴：幼児様外陰部。
既往歴：特記すべきことなし。

家族歴：父方・母方の兄弟姉妹まで調べたが特記すべきことなし。

現症及び検査成績：体格は表1に示すごとく、四肢は長く、瘦身の典型的な類宦官体型で陰茎は小指大、前立腺は触知せず、睪丸容積は右1.8ml、左1.6mlであった。恥毛はわずかに認めるが、腋毛・鬚髯は認めなかつた(Tanner³⁾の分類 stage I ~ II)。血中LH、FSH、testosterone はいずれも低値を示した。コーヒー、樟脳等を用いた嗅覚試験にて嗅覚障害がみられ、以上より Kallman 症候群と診断した。

治療経過

経過の概要を図1に示す。gonadotropin 投与に先んじて睪丸の生検を行なった。精細管及びその内腔は狭く精細胞として、わずかに gonocyte を認めるが、管内細胞のほとんどが未熟な Sertoli 細胞であった。精細管壁

表 1 体格及び血中ホルモン値

体重	56kg	陰茎	小指大
身長	182cm	前立腺	触れず
指極長	188cm	恥毛	わずかに認む
下肢長	91cm	腋毛	認めず
肩峰間	30.7cm	鬚髯	認めず
大転子間	33.7cm	睾丸容積	右 1.8ml 左 1.6ml
胸囲	86.5cm		
血中ホルモン値			
FSH	<1.0m I.U./ml	(4~42m I.U./ml)*	
LH	2.6m I.U./ml	(2~32m I.U./ml)*	
Testosterone	1.49ng/ml	(3~8 ng/ml)*	

* 成人男子の測定範囲
(血中ホルモン測定は帝国臓器に依頼した)

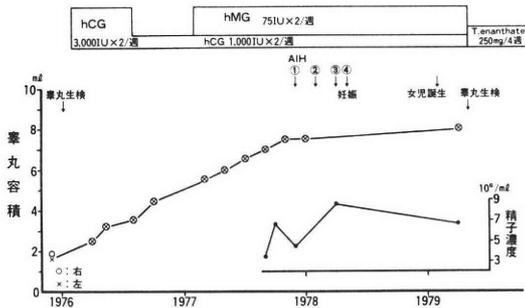


図 1 治療経過と睾丸容積, 精子濃度

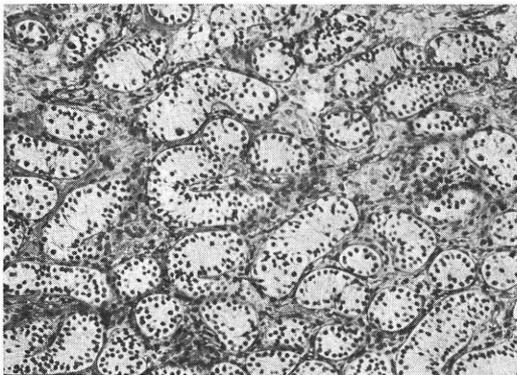


図 2 治療前の睾丸組織 (×60, H.E 染色)

は薄く未発達で, 間質組織には線維芽細胞様の細胞をみるのみで, Leydig 細胞は識別されなかつた(図2)。以上の所見から判断すると, この患者の睾丸は未だ gonadotropin が低値の幼児期の状態にあると思われた。

創部の治療をまち hCG (プレグニル, 日本オルガノン社), 1回, 3,000I.U. 週2回の投与を開始し, 10回投与を1クールとして経過観察を行なつた。1クール終了後, 陰毛はやや増加し陰茎も多少大きくなり, 睾丸容

積は両側とも2.5ml と増加した。しかし未だ腋毛は認めず, 前立腺もほとんど触知し得なかつた。2クール終了後には陰茎は母指大となり, 前立腺は左右とも一横指近くの幅に触れ, 両側睾丸容積は3.0ml となつたが, 未だ腋毛は認められなかつた。

3クール終了後には睾丸容積は両側とも3.5ml, 外陰部も成年男子様 (Tanner²⁾ の分類 stage V) となり, 前立腺も正常大, 腋毛も多少認められる様になつた。その後は二次性徴の促進と維持を目的として hCG 1,000 I.U. 週2回投与を続けた。この hCG 量にても投与後3日目の血中 testosterone 値は5.4ng/ml と男子成人レベルに保たれており, hCG 1,000I.U. 週2回の投与にて二次性徴の促進維持が充分可能である事が証明された。この投与量にて睾丸は漸次増大し, およそ2ヵ月後には4.5ml に達した。

この時期に患者の結婚に伴ない造精機能の導入を目的とし, hCG 1,000I.U. に加え hMG (ヒュメゴン, 日本オルガノン社) 75I.U., 週2回の投与を開始した。10回投与を1クールとし効果を観察した。1クール終了後の睾丸容積は両側とも5.5ml となり, 2クール終了後は6.0ml, 3クール終了後は6.5ml, 4クール終了後は7.0 ml と漸次増大した。4クール終了後の精液検査では精液量6 ml, 精子数337×10⁴/ml, 5クール終了後には精液量4.0ml, 精子数670×10⁴/ml, 運動率は51% となつた。この時点で本学婦人科に依頼して人工受精を試みた。hCG 及び hMG 投与11クール目, 4回目の AIH にて妊娠の成立をみた。妊娠経過は順調で満期正常分娩により3390g の健全なる女兒の誕生をみた。その後患者の承諾を得て再度睾丸生検を行なつた。治療前に較べると精細管及び管腔は著明に拡大しており, Sertoli 細胞は成熟型を示していた。精細管の各断面に精子を認めるものの, 精子数の多い他の成年男子の組織と比較すると, やや精細胞の数は少ない。間質組織には明らかに Leydig 細胞を認めるが, 全体にやや粗であつた(図3)。現在は月1回 testosterone depot (エンアルモンデポー, 帝臓) 250mg の筋肉内投与を継続している。

考 案

Kallman 症候群は嗅覚障害を伴なう hypogonadotropic hypogonadism と定義される。これが睾丸及び下垂体に起因する疾患ではなく, 視床下部から下垂体への LHRH 分泌欠如によるものであることは純化したovine LH-RH を本症患者に投与すると LH が上昇することや, および合成 LH-RH を50μg 5日間投与すると, LH 及び FSH が有意に上昇する事³⁾から明らかである。したがつて理論的には本疾患の治療は LH-RH を投与する

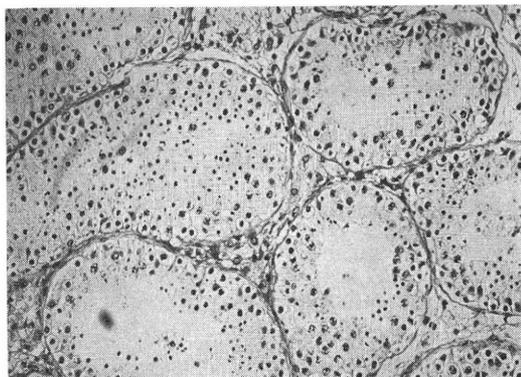


図 3 Gonadotropin 療法による造精機能導入後の睾丸組織 (×60, H.E 染色)

ことであるといえる。しかしながら LH-RH の生物学的半減期がわずか4分で、500 μ g を皮下投与した場合、血中 LH の上昇持続時間は5~7時間、FSH のそれは5時間と短時間であり⁶⁾、持続的に血中の LH 及び FSH を保つためには少なくとも1日3回は LH-RH の投与を行なう必要があり、この様に頻回な注射を長期間行なうのは実際上困難である。そのため LH-RH は hypogonadotropic hypogonadism においては検査目的のみに使われている場合が多い。これに対し hCG と hMG の循環血中の半減期は30~40時間以上⁷⁾であり、hCG 投与後の testosterone 値は4~5日間高値を示す⁸⁾。このため hypogonadotropic hypogonadism の実際の治療には hCG と hMG の併用療法が試みられている^{9,10)}。

Johnsen⁹⁾は、hypogonadotropic hypogonadism の患者に hCG 1回3,000I.U. 週3回投与し、漸次睾丸容積の増大を認めるとともに hCG 投与前と、32週間に hCG 288,000I.U. 投与後の 睾丸生検組織を検査し、投与後では Leydig 細胞の分化、精細管腔の拡大及び精細胞の精母細胞までの分化を認めたと報告している。われわれの症例でも hCG 単独投与のみで睾丸容積の増大がみられている。

また Johnsen は hMG 単独投与では何ら睾丸組織に変化がみられず、造精機能の導入は hCG と hMG の併用が必要であると報告している。すなわち精子形成の導入には hCG と hMG、いかえれば LH、FSH の両者が必要であるという事であり、この詳細は後に Steinberger¹¹⁾が解説している。

Rosemberg¹⁰⁾及び Schill¹²⁾の文献の集計によれば、現在まで33例の hypogonadotropic hypogonadism の患者に hCG、hMG の併用療法が試みられており、28例に造精機能が導入されたとしている(表2)。これ等の症例について投与量を検討すると、始めに hCG を週5,000

表 2 Hypogonadotropic hypogonadism 患者に対する hCG, hMG 併用療法例 Rosemberg¹⁰⁾, Schill¹²⁾ の集計をまとめた

報告者	患者数	造精機能導入例
Davies and Crooke	1	1
Paulsen	2	2
Johnsen	2	2
Martin	1	1
Crooke et al.	5	3
Paulsen et al.	5	4
Sherins et al.	9	8
Lunerfeld et al.	7	6
Schill	1	1
計	33	28

I.U. から12,000I.U. 4週間投与し、Leydig 細胞の分化成熟をまち、引き続き hMG を週3回、1回につき75~100I.U. 併用投与を行なうのが一般的である。又この hMG 量で造精機能の導入が困難な場合には、hMG の1回投与量を300I.U. に増量する事をすすめている研究者もある¹³⁾。しかし過剰の hCG 投与は Leydig 細胞の反応性を低下せしめたり¹⁴⁾、過剰刺激により Leydig 細胞を変性に陥らせる可能性¹⁵⁾もあるので、われわれの症例では最終的に2,000I.U./週と少ない hCG 投与量を選んだが、この量で血中 testosterone を充分正常成人レベルに保ちうる事が認められた。Rosemberg¹¹⁾は症例によつては hCG に対する反応性が異なる事を報告しており、hCG は一律に一定量を投与すべきではなく、hCG 投与後の血中 testosterone 値を測定し、それにより必要な hCG 投与量を判断すべきものと考えられる。

適切な hCG、hMG 投与量は今後も検討されるべきものであるが、理論的治療法である LH-RH 投与を簡便に行なうための投与方法も追求されるべき課題である。最近では長期に作用する LH-RH の analogue¹⁶⁾も見出されており、また投与方法として鼻粘膜への噴霧法^{17,18)}も臨床的にその有効性が認められて来ており、今後の発展と実用化が期待される。

参考文献

- 1) Kallman, F. J., Schoenfeld, W. A. and Barre, S. F.: The genetic aspects of primary eunuchoidism, Amer, J. Ment. Defic., 48: 203, 1944.
- 2) DeMonsier, G.: Etudes sur les dysraphies cranio-encephaliques. 1. Agénésie des lobes olfactifs (télencephaloschizis latéral) et des commissures calleuse et antérieure (télence-

- phalloschizis median). La dysplasie olfacto-genitale. Schweiz., Arch. Neurol. Psychiat., 74 : 309, 1954.
- 3) Marshall, W. A. and Tanner, J. M.: Variations in the pattern of pubertal changes in boys, Arch. Disc. Child., 45 : 13, 1970.
 - 4) Naftolin, F., Harris, G. W. and Bobrow, M.: Effect of purified luteinizing hormone releasing factor on normal and hypogona dotropic anosmic men, Nature. 232 : 496, 1971.
 - 5) Zarate, A., Kastin, A. J., Soria, J., Carrales, E. S. and Schally, A. W.: Effect of synthetic luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) in two brothers with hypogonadotropic hypogonadism and anosmia, J. Clin. Endocrinol. Metab. 36 : 612, 1973.
 - 6) Mortimer, C. H., McNeilly, A. S., Fisher, R. A., Murray, M. A. F. and Besser, G. M.: Gonadotrophin-releasing hormone therapy in hypogonadal males with hypothalamic or pituitary dysfunction, Brit. Med. J. 4 : 617, 1974.
 - 7) 青野敏博, 宮崎正敏, 南川淳之裕, 三宅侃, 衣笠隆之, 倉智敬一, 松本圭史: HMG-hCG 療法による排卵誘発時の血中ホルモン動態, 日内分泌会誌, 50 : 1263, 1971.
 - 8) Rosemberg, E., Crigler, J. F. Jr., Jan, W. F., Bulat, G., Nakano, R. and Lee, S. G.: Biological effect of human pituitary lateinizing hormone and human chorionic gonadotropin., Adv. Exp. Med. Biol., 10 : 381, 1970.
 - 9) Johnsen, S. G.: A study of human testicular function by the use of human menopausal gonadotrophin and of human chorionic gonadotrophin in male hypogonadotropic eunuchoidism and infantilism, Acta. Endocri. 53 : 315, 1966.
 - 10) Rosemberg, E.: Gonadotropin therapy of male infertility. In: Human semen and fertility regulation in men. Ed. Hafez, E. S. E., p 464. St. Louis, Miss., Mosby Corp. 1976.
 - 11) Steinberger, E.: Hormone control of mammalian spermatogenesis., Physiol. Rev., 51 : 1, 1971.
 - 12) Schill, W. B.: Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility, Andrologia. 2 : 77, 1979.
 - 13) Glezerman, M. and Lunenfeld, B.: Hormone therapie männlicher Fertilitätsstörungen. In: Male fertility and sterility. Eds. Kaden, R., Lübke, F., and Schirren. C., p 17. Berlin, Grosse. 1976.
 - 14) Cigorruga, S. B., Dufau, M. L. and Catt, K. J.: Regulation of luteinizing hormone receptors and steroidogenesis in gonadotropin-desensitized Leydig cells, J. Biol. Chem. 253 : 4297, 1977.
 - 15) 公平昭男: 停留辜丸の内分泌学的研究, 第3報: hCG 刺激による内分泌学的及び組織学的変化の検討, 日泌尿会誌, 67 : 807, 1976.
 - 16) Jaramillo, C. J., Pérez-Infante, U., Maciá, A. L., Salgado, A. C., Coy, D. H., and Schally, A. V.: Serum LH, FSH and testosterone response to the administration of a new LH-RH analogue, D-Try⁶-LH-RH, in normal men. Int. J. Fertil. 27 : 77, 1977.
 - 17) Bartsch, G. and Frick, J.: Therapeutic effects of luteinizing hormone releasing hormone (LH-RH) in cryptorchidism. Andrologia, 6 : 197, 1974.
 - 18) Potaahnik, G., Ben-Adereth, N., Lunenfeld, B., and Rofe, C.: Assessment of pituitary response to nasal application of synthetic gonadotropin-releasing hormone in men. Fertil. Steril, 28 : 650, 1977.

Successful induction of spermatogenesis in a case of Kallman's syndrome by a combined treatment of hCG and hMG

Ken-Ichiro Yoshida, Hiroyuki Oshima, Ken-Taro Takagi, Yotsuo Higashi, Masao Ando and Masayuki Yokokawa

Department of Urology, School of Medicine, Tokyo Medical and Dental University

The patient 28 years old of single man visited us complaining infantilism of his genitalia and a dignosis of Kallman's syndrome was established through his eunuchoidal statur with associated hyposmia and extremely low plasma LH, FSH and testosterone level. Testicular biopsy was performed before the gonadotropin treatment. The seminiferous tubules were tiny and contained indifferent Sertoli cells and gonocytes. No apparent Leydig cells were recognized in the interstitial tissue. The hCG administration was followed the biopsy with a dose of 3,000 I. U. twice a week for 22 weeks and induced him secondary sexual characteristics. Then, he received another regimen of 1,000 I. U. two times weekly in order to accomplish and maintain his maleness.

Immediately after his marriage, hMG of 75 I. U. was added to hCG administration to induce pemratogenesis. After combined therapy of hCG and hMG for 25 weeks, his semen was examined with resulted sperm count of $670 \times 10^4/\text{ml}$ and with active motility. His wife got

pregnant at fourth AIH and delivered a healthy female baby. The patient's testicular tissue was biopsied again with his co-operation for comparison with the one without treatment.

After the treatment, the seminiferous tubules

were enlarged and active spermatogenesis was recognized in each tubular section with mature spermatozoa. There were well differentiated Sertoli cells and Leydig cells in the tissue.

(受付: 昭和55年10月27日)

ヒト精管切除術と再吻合術前後における 精漿中遊離アミノ酸値について

Changes of Free Amino Acids in Seminal Plasma with
Vasectomy and Reanastomosis of the Vas Deferens

東邦大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 安藤弘教授)

中山孝一 村上憲彦 三浦一陽
Koichi NAKAYAMA Norihiko MURAKAMI Kazukiyo MIURA

白井将文 安藤弘
Masafumi SHIRAI Ko ANDO

Department of Urology, Toho University School of Medicine
(Director: Prof. Ko Ando)

精漿中には各種遊離アミノ酸が存在することが知られている。避妊の目的で精管切除術を行なった11例と精管再吻合術を行なった2例の計13例について手術前後における精漿中遊離アミノ酸を全自動アミノ酸分析装置を用い測定した。その結果、1) 精管切除術前後の比較では、術後 proline が51%, aspartic acid は48.9%, threonine, glycine, alanine, valine, leucine, lysine, arginine は30%以上, isoleucine は29.9%, serine は29%, phenylalanine は26.4%, tyrosine は24.1%, glutamine は23.6%術前値に比し減少した。2) 精管再吻合術を行なった2例のうち妊娠した1例は、術前著明に減少していたアミノ酸が術後4カ月目には術前の1.5~9.5倍と増加した。他の1例は術後2週目で術前の1.4~6.3倍と増加していたが精子の出現を認めなかった。(組織所見で造精機能障害あり)、3) 以上の事実より精管再吻合術の成否の判定に精漿中遊離アミノ酸測定は有用な手段となると思われる。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 120-124, 1981)

緒言

精漿中には各種の遊離アミノ酸が存在することが比較的古くより知られており、精子に対して悪影響を及ぼす重金属イオンと結合して精子の生存期間を延長させる作用のあることが知られている¹⁾。

しかしこれらの研究は主としてヒト以外の動物について研究されたものであり、ヒト精漿中の遊離アミノ酸に関する研究は極めて少なく^{2,3)}、いまだにその存在意義すら解明されていない状態であった。

最近になり、ようやく正常人や男子不妊症患者の精漿中遊離アミノ酸に関する詳細な報告がみられるようになったが^{4,5,6,7,8)}、精管切除術と再吻合術前後の精漿中遊離アミノ酸値の変動について言及した論文はほとんどみ

られない。

このような背景から、著者らは精管切除術と精管再吻合術前後で精漿中遊離アミノ酸値が如何なる変化を示すか。またこれらの症例に対して精漿中の遊離アミノ酸値測定がいかなる臨床的意義をもたらすかをあわせて検討し2~3の知見を得たのでここに報告する。

検査対象者と遊離アミノ酸測定方法

検査対象者は既に子供があり避妊の目的で精管切除術を希望し来院した29歳~46歳までの11症例と、既往に避妊の目的で精管切除術を受けているが再婚を契機に再び子供を希望し精管再吻合術を要請して来院した2例を含めた13例である。後者の第1例目は、M.S. 35歳で3年前に精管切除術を受け、第2例目は、T.S. 47歳で4年

前に精管切除術を受けている。

精液採取時期は、精管切除術施行症例においては術直前と術後1カ月目に、また精管再吻合術施行症例では術直前と術後2週目に用手法で採取するのを原則としているが、後者のうちの1例は術後4カ月目に延びた。

採取された精液は3時間以内にアミノ酸分析を完了するように配慮した。なお精管切除術施行例では、術直前の精液はいずれも精子数、運動率、形態などは全く正常であり、術後1カ月目には全例無精子状態であった。一方精管再吻合術施行の2症例は、術前には無精子状態であり、1例では術後2週目に精子の出現を認めたが運動は全くみられなかった。しかし4カ月目には妊娠が成立し、その時点の精子数は $25 \times 10^6/ml$ 、運動率は40%であった。他の1例は術後2週目では精子の出現は認められなかった。本症例の睾丸組織所見は Fig. 1 にみられるように造精機能の低下を示していた。

遊離アミノ酸の分析には日本電子製の JLC-6 AH 型

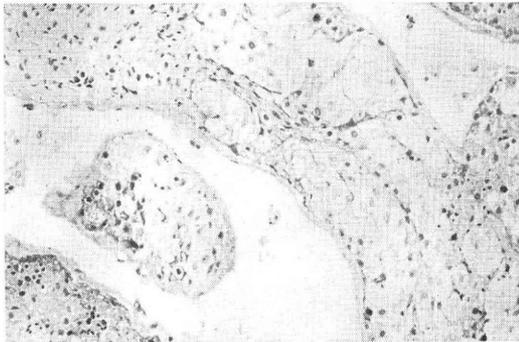


Fig. 1 Hypospermatogenesis (case 2)

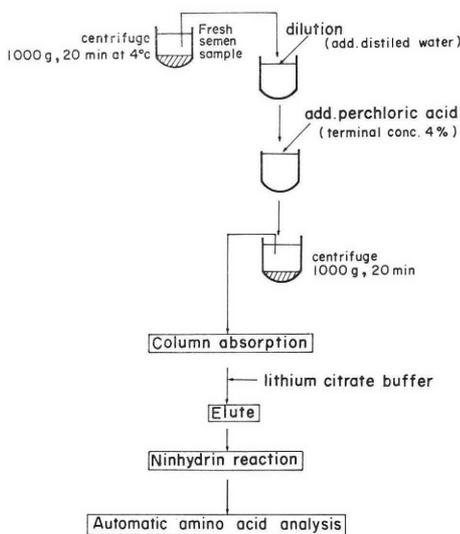


Fig. 2 Amino acid analysis

全自動アミノ酸分析装置が使用された。その方法を簡単に説明すると(Fig. 2)、まず精液を4°Cで1000g 20分間遠心し、その上清を蒸留水で20~30倍に稀釈し、最終濃度が4%になるように過塩素酸を加え1000g 20分間遠心し除蛋白した上清をイオン交換樹脂、日本電子製 LC-R-2 に吸着させ、クエン酸リチウム buffer で溶出し、nynhydrin 反応で発色させた後吸光度法で測定した。なお使用した波長は570mμ と440mμ である。

測定結果

正常者の分析チャートを Fig. 3 に示したが、左より Aspartic acid, Threonine, Serine, Asparagine + Glutamic acid, Glutamine, Proline, Glycine, Alanine, Valine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Phenylalanine, Ornithine, Lysine, Histidine, Arginine, が出現している。

次に精管切除術施行前の11例の精液についてみると Table 1 の如く必須アミノ酸のみでなく多数のアミノ酸が測定されたが、その値については各症例ごとにかんがりの変動値を示したが表中の数値は11例の平均値である。次にこれら症例の精管切除術施行前後でアミノ酸値を比較してみると(Table 1, Fig. 4)、術後において大部分のアミノ酸値は術前値より減少し、最も大きな減少率を示したものは proline で術前より51%も減少していた。また aspartic acid も48.9%減少したほか、threonine, glycine, alanine, valine, leucine, lysine, arginine などとはみな30%以上の減少率を示した。その他 serine も29%, glutamine は23.6%, iso-leucine 29.9%, tyrosine 24.1%, phenylalanine も術前より26.4%減少したが、ornithine と histidine については手術前後で著明な変化は認められなかった。

次に精管再吻合術施行症例のうち術後妊娠の成立した症例1 (Table 2, Fig. 5) においては術前ほとんど大

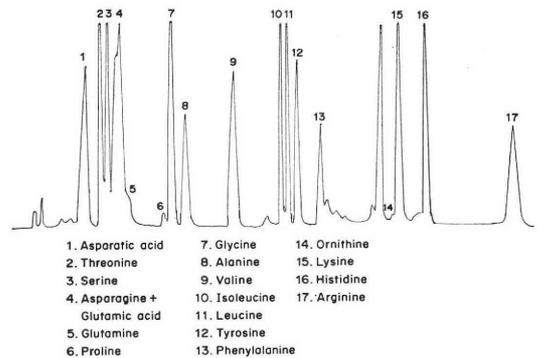


Fig. 3 Amino acid analysis of normal semen

Table 1 Amino acid concentration before and After vasectomy

	before operation	after operation
Aspartic acid	2.951	1.512 (-48.9%)
Threonine	4.825	3.309 (-31.6%)
Serine	15.724	11.176 (-29.0%)
Asparagine + Glutamic acid	13.126	8.222 (-37.0%)
Glutamine	5.698	4.352 (-23.6%)
Proline	1.048	0.515 (-51.0%)
Glycine	6.999	4.823 (-31.1%)
Alanine	2.701	1.800 (-33.4%)
Valine	4.600	3.207 (-30.5%)
Isoleucine	3.994	2.806 (-29.9%)
Leucine	5.434	3.700 (-31.5%)
Tyrosine	5.296	3.952 (-24.1%)
Phenylalanine	1.938	1.402 (-26.4%)
Ornithine	0.174	0.202 (+16.0%)
Lysine	8.094	5.411 (-33.2%)
Histidine	4.533	3.850 (-9.8%)
Arginine	4.689	3.258 (-30.6%)

Values are mean concentrations [$\mu\text{mol/ml}$]
 (): the rate of increase or decrease
 n : 11 cases

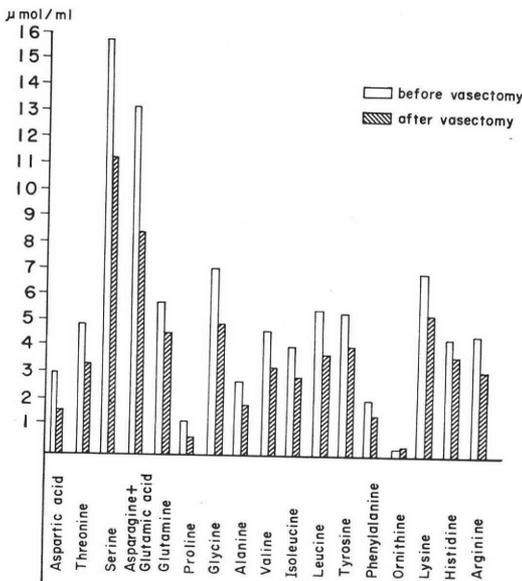


Fig. 4 Amino acid concentration before and after vasectomy

部分のアミノ酸値が正常値に比し著しく減少していたが、精管再吻合術施行後は精子の出現と共に遊離アミノ酸値は増加し、妊娠が成立した術後4カ月目の時点でさらに各種アミノ酸値は増加し、術前の1.5~9.5倍の増加率を示したが、prolineは検出されなかつた。その理由については正常人でも精漿中のproline含有量は微量で

Table 2 Amino acid concentration before and after reanastomosis

	before operation	Case 1. (M.S.)		Case 2. (T.S.)	
		after operation at 2 weeks	after operation at 4 months	before operation	after operation
Aspartic acid	0.02	0.04 (2.0)	0.19 (9.5)	0.29	0.95 (3.2)
Threonine	0.34	0.52 (1.5)	1.10 (3.2)	1.97	2.86 (1.4)
Serine	1.64	2.54 (1.5)	3.30 (2.0)	6.79	10.8 (1.5)
Asparagine + Glutamic acid	0.37	0.50 (1.3)	0.56 (1.5)	2.81	5.91 (2.1)
Glutamine	0.26	0.62 (2.3)	1.00 (3.8)	3.56	7.31 (2.0)
Proline	—	—	—	—	—
Glycine	0.21	0.43 (2.0)	1.11 (5.2)	1.96	3.82 (1.9)
Alanine	0.02	0.06 (3.0)	0.18 (9.0)	0.48	1.31 (2.7)
Valine	0.06	0.14 (2.3)	0.53 (8.8)	1.68	3.09 (1.8)
Isoleucine	0.40	0.76 (1.9)	1.00 (2.5)	1.75	2.72 (1.5)
Leucine	0.31	0.63 (2.0)	0.97 (3.1)	1.90	3.21 (1.6)
Tyrosine	0.71	1.34 (1.8)	1.77 (2.4)	2.95	4.31 (1.4)
Phenylalanine	0.16	0.18 (1.1)	0.59 (3.6)	0.84	1.52 (1.8)
Ornithine	—	0.03	0.09	0.03	0.19 (6.3)
Lysine	0.13	0.33 (2.5)	0.94 (7.2)	2.18	4.55 (2.0)
Histidine	0.21	0.55 (2.6)	0.98 (4.6)	1.59	2.87 (1.8)
Arginine	0.35	0.70 (2.0)	1.02 (2.9)	2.09	3.32 (1.5)

(): the rate of increase ($\mu\text{mol/ml}$)

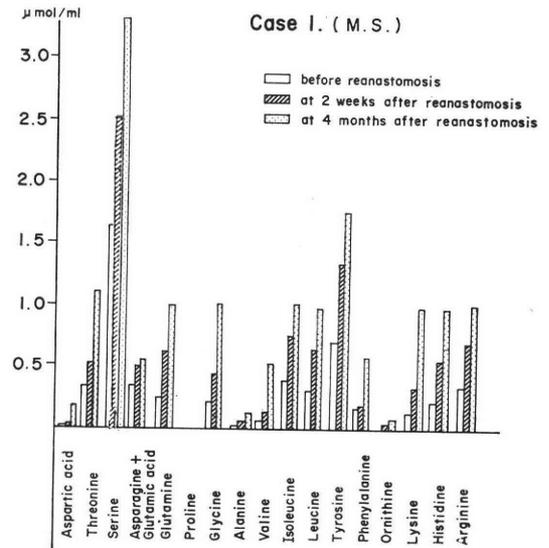


Fig. 5 Amino acid concentration before and after reanastomosis

あるため吻合術施行後には検出できなかったものと思われる。なお Table 2 の () 内は術前のアミノ酸値に対する術後値の増加率を示す。

このように精管の再疎通により精漿中の各種アミノ酸値は術前値に比し次第に増加する傾向を示しているが正常値を対比すると、なお著しい低値を示していることが明らかである。

一方精管再吻合術が施行され、術後2週目で精子の出現をみない症例2 (Table 2, Fig. 6) については、術

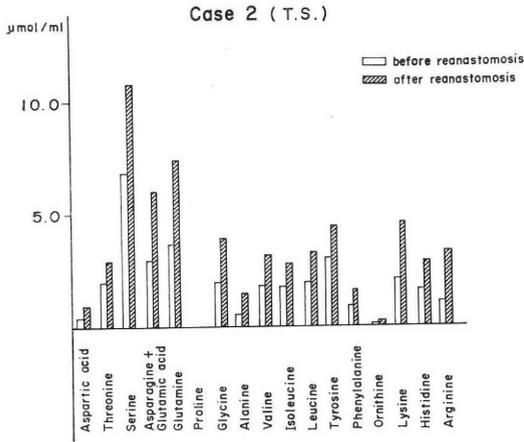


Fig. 6 Amino acid concentration before and after reanastomosis

前の各種アミノ酸値は正常値に比し明らかに著明な減少を示しているが、症例1と比較すると各項目とも相当高値を示している。再吻合術施行後のアミノ酸値は術前の1.4倍～6.3倍の増加率を示し、その増加率は症例1とほぼ同じであった。また症例1と同様に proline は術前および術後2週目では測定値を得ることは出来なかった。

考 察

ヒト精漿中のアミノ酸の研究は、1941年 Wagner-Jauregg⁹⁾がタイロシンの結晶化に成功した事から始まり、その後主としてペーパークロマトグラフィーによる同定が行なわれていたが、その後 Krampitz⁹⁾ (1962) や吉田^{6,7)} (1972, 1974) はアミノ酸自動分析装置を用いて研究し遊離アミノ酸は30種ほど含まれていると報告している。このような精漿中の遊離アミノ酸は精漿中の蛋白が各種蛋白分解酵素の作用により分解されたものと考えられ、射精後時間の経過と共に増加していることが知られている^{2,7,10)}。

今回著者らは精管切除術施行前後で精漿中のアミノ酸値を測定し比較検討した。その結果大部分のアミノ酸値は術後著明に減少していることが判明した。したがって精漿中のアミノ酸値減少という現象は、睾丸や副睾丸からの分泌物の遮断に基因するものと考えられる。

一方精管再吻合術により精管が再疎通すると精漿中の各種遊離アミノ酸値は増加した。このことは精管の通過障害が除去されて睾丸や副睾丸から分泌される液の中に含まれる各種遊離アミノ酸が加わりその結果精漿中のアミノ酸値が増加したものと思われる。

しかしヒト精子にあつては尖体の部分でアミノ酸の利用が行なわれているとの報告¹¹⁾があることや精子含有の

精漿と無精子症の精漿中総アミノ酸量の対比では明らかに精子含有精液の精漿アミノ酸値が高いことも知られている⁸⁾。これらの事実より精管切除術施行後に精漿中遊離アミノ酸が減少することは術後精液中に精子を含まないためにアミノ酸値が減少し、反対に精管再吻合術施行後にアミノ酸値が増加することは術後精子が出現するためにアミノ酸値が増加するとも考えられる。しかし著者らの今回の測定結果では精管再吻合術を行なった症例2で精液中に精子が出現しないにもかかわらず術後各種遊離アミノ酸が増加したことより精管切除術施行後あるいは精管再吻合術施行後の精漿中の遊離アミノ酸値の変動の由来は精子の存在と直接的関係があるとは考え難い。

これらの事実は視点を変えてみると、精管再吻合術施行例の手術の成否を間接的に証明する上で重要な意義を有する。つまり再吻合術施行後遊離アミノ酸の増加があれば精管は再疎通しておりそして遊離アミノ酸の増加はありながら精子のみられない例においては精管の再疎通は成功しているが睾丸、副睾丸に何らかの病変が存在する根拠となり得ると思われる。

結 語

著者らは精管切除術を施行した11例と精管再吻合術を施行した2例の計13例についてその手術前後の精漿中遊離アミノ酸値の測定を行なった。その結果、精管切除術施行後の精漿中各種遊離アミノ酸値は著明に減少し、精管再吻合術施行後には増加することが判明した。したがって、手術後に増減するアミノ酸量については精管より上位の睾丸や副睾丸が関与するものと思われる。

以上の結果から精漿中遊離アミノ酸測定法は、精管再吻合術の成否を占う一つの検査法となりうるものと考えられる。

本論文の要旨は著者の1人、白井が第20回医学会総会シンポジウム“避妊の諸問題”(1979, 東京)および第10回世界不妊学会(1980, マドリッド)において発表した

文 献

- 1) Mann, T.: Biochemistry of semen and of the male reproductive tract. London, Methuen, 1964.
- 2) Jacobson, L.: Free amino acids in human semen. Acta Physiol. Scand. 20: 88-90, 1950.
- 3) Kentel, H. J. und Gabsch, H. C.: Studien am menschlichen sperma. Urol. int. 6: 206-226, 1958.
- 4) Doepfmer, R. und Krampitz, G.: Die Aminosäuren im menschlichen Ejakulat. Arch. Klin. exp. Derm. 213: 751-757, 1961.

- 5) Doepfmer, R. und Krampitz, G.: Determination of free amino acids in human ejaculate by ion exchange chromatography. *Nature*, Lond. 194: 684-686, 1962.
- 6) 吉田英機, 近藤常郎, 今村一男, 甲斐祥生, 佐藤永雄, 飯島武: 男子不妊症の研究 I: 健康者および正常精子保有者群における精漿遊離アミノ酸の同定と定量, 日泌尿会誌, 63: 878-883, 1972.
- 7) 吉田英機: 男子不妊症における精漿中遊離アミノ酸の研究, 日泌尿会誌, 65: 467-487, 1974.
- 8) Fröhlich, J. U., Nissen, H. P., Heinze, I., Schirren, C. and Kreysel, H. W.: Free amino-acid composition of human seminal plasma in different andrological diagnosis. *Androl.* 12: 162-166, 1980.
- 9) Wagner-Jauregg, Th.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. chem.*, 269: 56, 1941.
- 10) Lundquist, F.: Liberation of amino acids in human seminal fluid. *Fed. proc.* 9: 198 (Abstr.), 1950.
- 11) Bhargava, P. M., Bishop, M. W. H. and Work, T. S.: Incorporation of [¹⁴C] amino acids into the proteins of bull spermatozoa. *Biochem. J.* 73: 242-247, 1959.

Changes of free amino acids in
seminal plasma with vasectomy
and reanastomosis of
the vas deferens

Koichi Nakayama, Norihiko Murakami,
Kazukiyo Miura, Masafumi Shirai
and Ko Ando

Department of Urology, Toho University
School of Medicine

In 11 cases undergoing vasectomy for the purpose of contraception and in 2 vasectomized cases receiving reanastomosis to regain impregnation potentiality, their semen samples were obtained before and after operation and changes in their seminal levels of a variety of amino acid were comparatively studied.

Seminal levels of amino acid were determined by employing auto amino acid analyzer (JLC-6AH).

Preoperative values for seminal amino acids in their 11 patients underwent notable changes with vasectomy. The most prominent among general decreases was a drop by as much as 51% for proline, followed by 48.9% for aspartic acid, over 30% each for threonine, glycine, alanine, valine, leucine, lysine and arginine, 29.9% for isoleucine, 29% for serine, 26.4% for phenylalanine, 24.1% for tyrosine, and 23.6% for glutamine.

On the other hand, of the two patients undergoing reanastomosis of the vas deferens, the one who achieved impregnation after operation showed remarkably low preoperative levels in almost all seminal plasma amino acids. After operation and with the appearance of sperm in the semen, however, amino acid level rose; at 4 months, when impregnation was confirmed, some varieties were noted at a 1.5 to 9.5 fold increase over preoperative values. In the other reanastomosis patient, though sperm did not appear at the 2-week postoperative sampling, values of various amino acids in the seminal plasma had risen 1.4 to 6.3 times the preoperative level.

The fact that vasectomy caused various free amino acids to decrease markedly in seminal plasma may tell us that amino acids — equivalent in amount to their decreases — probably had originated from the testicles and epididymides located above the vas deferens.

On the other hand, reanastomosis of the vas deferens caused various free amino acids within the fluid of the testicles and epididymides to flow into the semen, elevating the level of total seminal amino acids. Therefore, when increases in free amino acids in seminal plasma do not accompany the appearance of sperm, it may be interpreted that some problems in the testicles or epididymides are responsible for impairing otherwise successful reanastomosis of the vas deferens.

Thus., it seems appropriate to conclude that success or failure of reanastomosis of the vas deferens can be judged by determining amino acids in seminal plasma without resorting to seminalvesiculography.

(受付: 昭和55年12月22日)

抗精子抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響

3. 精子不動化抗体結合精子の頸管粘液 内通過性障害機序に関する研究

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

3. Impairment of Sperm Penetration in the Cervical Mucus by Binding the Sperm Immobilizing Antibody on Spermatozoa.

兵庫医科大学産科婦人科学教室

伊熊健一郎 窪田耕三 高田喜嗣
Kenichiro IKUMA Kozo KUBOTA Yoshitsugu TAKADA

香山浩二 磯島晋三
Koji KOYAMA Shinzo ISOJIMA

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

香川県坂出市回生病院産婦人科

鎌田敏雄
Toshio KAMATA

Department of Obstetrics and Gynecology
Kaisei Hospital, Sakaide, Japan

前報で報告した精子不動化抗体を結合した正常精子の頸管粘液通過性障害を究明する為、同種及び異種精子不動化抗体を用いて、その IgG, Fab 及び F(ab')₂ 分画処理精子の運動性並びに頸管粘液内通過性につき検討した。

補体が存在する場合、同種及び異種抗精子抗体 IgG が結合した精子は強い運動障害を受けることを認められたが、その IgG fragment である Fab 及び F(ab')₂ が結合した精子は不動化を起さなかつた。補体が存在しない場合、IgG, Fab, F(ab')₂ が精子に結合しても精子不動化作用は認められなかつたが、抗体 IgG が結合した精子のみ強い頸管粘液内通過性障害を示し、Fc 部分を欠如した Fab 並びに F(ad')₂ が結合した精子では通過性障害は認められなかつた。

以上の結果は、補体の有無にかかわらず、抗精子抗体である精子不動化抗体が結合すると精子の頸管粘液内通過性が著しく障害されるという前報での結果を再確認するものであり、また精子不動化抗体 IgG の結合による頸管粘液内精子通過性障害には、IgG の Fc 部分が必要であることを示しており、Fc 部分が粘液 micell に存在すると考えられる Fc receptor に結合することが、粘液内通過性障害の原因と考えられる。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 125-131, 1981)

緒言

抗精子抗体による不妊症発生機序解明の一端として、

原因不明不妊婦人血中に検出される精子不動化抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響につき検討を加えてきた^{1,2)}。

すでに第1報において¹⁾、血中精子不働化抗体保有不妊婦人の頸管粘液中に補体依存性の精子不働化因子が検出されること及び、血中にこの様な精子不働化抗体を保有しない原因不明不妊婦人の15.3%に頸管粘液中に補体依存性の精子不働化因子が検出されることを報告した。またこれらの婦人では、in vivo (Huhner test) 並びに、in vitro (Kremer test) 頸管粘液精子適合試験の結果、精子の頸管粘液内通過性が障害されている頻度が高いことから、精子通過性障害の原因として、頸管粘液中に存在する補体と精子不働化抗体による精子不働化作用の結果であると考えてきた。

更に第2報においては²⁾、補体が存在しない場合精子不働化抗体を健常精子に作用させると、運動性には障害が認められないにもかかわらず、正常婦人の頸管粘液(非働化)内通過性が著しく抑制されることが判明したので、精子不働化抗体が結合するだけで、頸管粘液中を通過出来ないことを報告した。

以上の結果よりみて、抗体結合精子の頸管粘液通過性障害が、いかなる機序によるかを解明する為、不妊婦人の血中精子不働化抗体及び、家兎で作製した人精子不働化抗体の IgG、及び IgG の Fc 部分を除去した Fab、F(ab')₂ 分画を用いて、これらが結合した精子の運動性並びに、頸管粘液通過性について、精子不働化試験 (Isojima et al.)^{3,4)} 及び in vitro 頸管粘液精子貫通試験法 (Kremer)⁵⁾ を用いて検討した。

実験材料及び実験方法

1. 抗精子抗体

a) 同種抗体：精子不働化抗体保有不妊婦人血清

当科不妊外来通院中の患者で、血中に高力価精子不働化抗体 (定量的精子不働化試験で SI₅₀ 値：18.4) を保有する原因不明不妊婦人より採血後、分離した血清を 56°C、30分間非働化した後、後述する方法で血清 IgG 並びにその Fab、F(ab')₂ 分画を作製して実験に用いた。

b) 異種抗体：家兎人精子不働化抗体

用手法で採取した健康男子精液を30分放置した後、3倍量の生食水を加え、よく攪拌した後、1,350g、5分間遠沈し、その沈渣に更に、10ml の生食水を加え攪拌後遠沈した後、沈渣に生食水を加えて10×10⁶/ml 濃度の洗浄人精子浮遊液を作り、この1ml に等量 (1ml) の complete Freund's adjuvant を混合して emulsion とし、その2ml を各家兎の足蹠および背皮内に0.1ml ずつ分割注射した。2週間後同様の注射を行い、さらに2週間後より Freund's adjuvant を用いない精子浮遊液 (10×10⁶/ml 生食水) 1ml を隔日、計3回 booster 注射として腹腔内に注射し、最終注射より1週間後、心臓

穿刺により全採血した。分離血清は56°C で30分間非働化し Isojima らの定量的精子不働化試験 (SI₅₀)^{4,10)} によつて抗体価を測定し、高力価抗体価 (SI₅₀ : 1,900 及び 7,450) を示す血清より同種抗体の場合と同様に、その IgG、Fab 及び F(ab')₂ 分画を作製して実験に用いた。

2. 血清 IgG、Fab 及び F(ab')₂ 分画の分離精製

精子不働化抗体保有不妊婦人血清、家兎人精子不働化血清並びに正常家兎血清より同様な方法で IgG 分画を分離し、又分離 IgG を papain 及び pepsin 酵素処理によつて、それぞれ Fab 及び F(ab')₂ 分画を得た。

a) IgG の分離精製

家兎人精子不働化血清 (SI₅₀ : 1,900、非働化済) 10ml を0.1M acetate buffer (pH 4.5) で十分に透析した後 Sephadex G-200カラム (3.0×93cm) を通すことにより第1ピークに IgM 含有分画、第2ピークに IgG 含有分画が分離された。後者を Diaflo XM 100A メンブレン (分画分子量100,000) を用いて濃縮した後、Sober 法⁶⁾ に従つて0.0175M phosphate buffer (pH 6.3) で透析し、DEAE cellulose カラム (1.2×25cm) を用いて最初に溶出してきたピークを IgG 分画として採取し、ゲル内沈降反応で確認した。これを XM 100A メンブレンで濃縮後 (10.4mg/ml, 10ml)、生食水で十分に透析した後実験に用いた。

b) Fab の分離精製

上記の方法で分離した家兎人精子不働化血清 IgG を Porter の方法⁷⁾ に従つて papain 酵素分解を行い Fab 分画を分離した。IgG、50mg (乾燥重量) を2ml の0.01M phosphate buffer (pH 7.0) に溶解し0.01M cysteine-HCl と0.02M EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) の存在下で1N NaOH を用いて pH 7.0 に調節しながら papain (Sigma chemical Co. St. Louis) を基質蛋白の1/100量 (25mg/ml を20μl) 加えて、37°C で22時間反応させた後、0.2M 濃度になるように1M iodoacetamide (pH 7.0, 0.5ml) を加えて反応を停止した。これを生食水で2日間透析した後、9,500g で30分間遠沈して不溶成分を除去した後、上清 (16.8mg/ml, 2.45ml) を Sephadex G-100カラム (1.5×40cm) を用いて分画し、最初に溶出してきたピークを Fab 分画として実験に用いた。

c) F(ab')₂ の分離精製

Utsumi らの方法⁸⁾ に従つて家兎人精子不働化血清 IgG 溶液 (10.48mg/ml, 5ml) を0.05M acetate buffer (pH 4.5) にて十分に透析した後、同様の buffer に溶解した pepsin 溶液 (Sigma chemical Co. St. Louis) を基質蛋白の1/50量 (1mg/ml, 1ml) 加えて37°C、48時間反応させた後、1N NaOH を加えて pH を8.5と

した。これを生食水にて透析し、さらに Diaflo PM 10 メンブラン (分画分子量10,000) で濃縮 (8.55mg/ml, 3.05ml) した後、Sephadex G-75 (1.5×70cm) で分画し、最初に溶出してきたピークを F(ab')₂ 分画として実験に用いた。

3. 抗精子抗体処理精子の調製

健康男子より用手法にて採取した精液を室温で液化させた後、遠沈 (1,350g, 5分間) にて精子を分離し、これを10%非働化未婚女性血清 (精子凝集抗体及び精子不動化抗体が陰性であることを確認したもの) 含有生食水にて2回洗浄した後、精子濃度80×10⁶/ml に調製した。この精子浮遊液に同量の各種、各濃度の抗精子抗体 (同種及び異種抗精子抗体 IgG, Fab 及び F(ab')₂) 含有生食水を加えて小試験管内で37°C, 60分間反応させた後、in vitro 頸管粘液精子貫通試験用の精液貯留槽に移し実験に供した。

4. in vitro 頸管粘液精子通過試験 (Kremer's test)⁹⁾

頸管粘液は血中及び粘液中に精子不動化抗体を保有せず、2相性の基礎体温パターンを示す正常月経周期婦人の排卵前1~2日に採取したもので、性状検査で異常を認めず (半透明、低粘稠性、索糸性10cm 以上、シダ状結晶++~卅, pH 6.8~7.8, 量0.25ml 以上)、前以て行った健康男子精液に対する Kremer test で精子の通過性が良好なものを選んで実験に用いた。使用前に56°C 30分間非働化した後、ヘマトクリット測定用の毛細管ガラス (1.5×75mm) に約6cm 吸引し、一端をテルモシール (仁丹テルモ K.K.) で密閉し、他の開放端を精子貯留槽に浸して直立させ、精子の経時的上昇距離並びに上昇精子数、運動率、先行精子の生存時間等を顕微鏡下 (100倍視野) で判定した。本実験には先行精子の経時的上昇距離のみを判定基準に選び、下記に示す4段階に分類して判定した。

Good : 2時間以内に運動精子が5cm 以上上昇するもの

Fair : 2及至6時間で運動精子が5cm 以上上昇するもの

Poor : 6時間で運動精子が1及至4.9cm の範囲にとどまるもの

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

5. 精子不動化試験 (Isojima's test)

己に詳細に報告した定性的^{8,9)}及び定量的精子不動化試験^{4,10)}を用いた。定性的精子不動化試験による精子不動化値 (SIV : sperm immobilization value) は、対照血清中の精子運動率 (C%) を被検血清中の精子運動率 (T%) で割った値 (C/T) であり、これが2.0以上の場

合を精子不動化試験陽性と判定する。また、定量的精子不動化試験においては、被検血清を倍数稀釈してゆき、精子運動率 (T%) がちょうど対照血清中の精子運動率 (C%) の50%になる血清稀釈倍数を求め、これを SI₅₀ 値 (50% sperm immobilization unit) として表現した。SIV 値及び SI₅₀ 値とも値が大きくなる程精子不動化抗体活性の強いことを示すが、前者は定性的であり、値が大きくなるに従って量的比較に対する正確度は乏しくなる。

実験結果

家兎抗人精子不動化血清 (SI₅₀ 値 : 1,900) IgG 及びその F(ab')₂ 分画処理精子を用いて行った in vitro 頸管粘液精子適合試験の結果を第1表及び第2表に示す。IgG 及び F(ab')₂ 処理精子とも抗体濃度、1mg/ml では強い精子凝集が起り、頸管粘液内への精子の侵入は認められなかった。IgG (1mg/ml) の場合1 : 4稀釈まで SIV 値は2.0以上を示し、補体が存在しない場合、凝集していない運動精子が存在するにもかかわらず頸管粘液内での精子通過性は著しく抑制された。F(ab')₂ (1mg/ml) では IgG の場合に比しより強い精子凝集が認められ、原液濃度では全く free の活動精子がみられず、従って頸管粘液内への精子貫入は完全に抑制された。しかし1 : 2稀釈以下の濃度においては強い精子凝集があるにもかかわらず、尚凝集に加らない運動精子は、自由に頸管粘液内を通過した。F(ab')₂ の精子不動化作用については1 : 2稀釈までは精子凝集の為 SIV 値を求め得なかったが、1 : 4稀釈では SIV 値1.0であり、補体が存在しても精子不動化作用は認められなかった。別な家兎人精子不動化抗体 (SI₅₀ : 7,450) の IgG 及びその Fab 分画を用いて同様の実験を行った結果を第3及び第4表に示す。この血清 IgG では0.1mg/ml 濃度において精子凝集はほとんど認められなかった。又補体依存性の精子不動化作用は、IgG (0.1mg/ml) において1 : 16稀釈まで認められ、この濃度で処理された精子は、強い頸管粘液内通過性障害を示した。Fab (0.1mg/ml) を精子に結合させた場合は、精子不動化のみでなく頸管粘液内通過性障害も全く認められなかった。

同種抗体として用いた精子不動化抗体保有不妊婦人血清 (SI₅₀ : 18.4) の IgG 及び F(ab')₂ 分画処理精子の頸管粘液内通過性を第5表及び第6表に示す。IgG (6.25mg/ml) を用いた場合1 : 4稀釈まで精子不動化作用が認められ、また IgG 抗体で精子を処理した場合頸管粘液内通過性も厳しく抑制されたにも拘らず、F(ab')₂ (6.25mg/ml) 分画を用いると、補体を加えても全く精子運動性は障害されず、また頸管粘液内での通過性抑制

Table 1 Kremer's sperm penetration test by using spermatozoa pretreated with IgG of rabbit anti-human spermatozoa.

Dilutions of IgG (1.0mg/ml)	SIV*1	SPT*2	Sperm*3 agglutination	Moving*4 Spermatozoa
1 : 1	∞	Negative	Large	+
1 : 2	∞	"	Moderate	++
1 : 4	2.1	Poor	"	++
1 : 8	1.1	Fair	"	++
1 : 16	1.0	Good	Isolated	+++
1 : 32	1.1	"	"	+++
1 : 64	1.0	"	—	+++
Control V-NHS*5	1.0	Good	—	+++

*1 SIV : Sperm immobilization value.

*2 SPT : In vitro sperm penetration test.

*3 Sperm agglutination : The criteria of WHO workshop in Aarhus, Denmark, 1974.

*4 Freely moving spermatozoa.

(— : 0%, + : <25%, ++ : 25-50%, +++ : 50-75% : >75%)

*5 Control V-NHS : Normal human serum from unmarried women.

Table 2 Kremer's sperm penetration test by using spermatozoa pretreated with divalent antibody [IgG-F(ab')₂] rabbit anti-human spermatozoa.

Dilutions of F(ab') ₂ (1.0mg/ml)	SIV*1	ST*2	Sperm*3 agglutination	Moving*4 Spermatozoa
1 : 1	N.D.	Negative	Gross	—
1 : 2	N.D.	Good	Large	+
1 : 4	1.0	"	Moderate	++
1 : 8	1.1	"	"	++
1 : 16	1.0	"	"	++
1 : 32	1.0	"	Isolated	+++
1 : 64	1.0	"	"	+++
Control V-NHS*5	1.0	Good	—	+++

N.D. : Could not be determined.

*1 SIV : Sperm immobilization value.

*2 SPT : In vitro sperm penetration test.

*3 Sperm agglutination : The criteria of WHO workshop in Aarhus, Denmark, 1974.

*4 Freely moving spermatozoa.

(— : 0%, + : <25%, ++ : 25-50%, +++ : 50-75%, >75%)

*5 Control V-NHS : Normal human human serum from unmarried women.

も認められなかった。

考 察

抗精子抗体結合精子が頸管粘液中を通過出来ない原因として、①精子凝集が起り物理的原因で精子の通過性が障害される場合、②粘液中に存在する補体によって、精子不活化抗体結合精子の運動性が障害される場合、あるいは③精子に結合した抗体グロブリンのFc部分と頸管粘液成分とのinteractionによって精子の上行が妨げら

れる場合等の機序が考えられるが、本論文では in vitro の実験系を用いて第3の機序につき検討を行なった。表1及び2で示した如く、精子不活化抗体 IgG 又はその F(ab')₂ で精子を反応させた場合、強い精子凝集が生じ free の活動精子が殆んど認められない時は当然精子の凝集によって精子の頸管粘液中への侵入が障害されるが、抗体 IgG と反応させて精子凝集と共に free の活動精子が存在してもこれらの精子は殆んど粘液中を通過出来ないのに反して、抗体 F(ab')₂ と反応させた活動

Table 3 Kremer's sperm penetration test by using spermatozoa pretreated with IgG of rabbit anti-human spermatozoa.

Dilutions of IgG (0.1mg/ml)	SIV*1	SPT*2
1 : 1	∞	Negative
1 : 4	∞	"
1 : 16	6.6	Poor
1 : 64	1.3	Fair
Control*3	1.0	Good

*1 SIV : Sperm immobilization value.

*2 SPT : In vitro sperm penetration test.

*3 Control : IgG (0.1mg/ml) of normal rabbit serum.

Table 4 Kremer's sperm penetration test by using spermatozoa pretreated with univalent antibody[IgG-Fab] of rabbit anti-human spermatozoa.

Dilution of Fab (0.1mg/ml)	SIV*1	SPT*2
1 : 1	1.1	Good
1 : 4	1.2	"
1 : 16	1.1	"
1 : 64	—	"
Control*3	1.1	Good

*1 SIV : Sperm immobilization value.

*2 SPT : In vitro sperm penetration test.

*3 Control : Fab (0.1mg/ml) of normal rabbit serum IgG.

精子は容易に粘液内を通過出来る点よりみて、抗体 IgG 処理精子の頸管粘液内通過障害を単に精子凝集のみによつて説明することは出来ない。本実験に用いた頸管粘液は使用前にすべて補体活性を熱処理によって非働化しているため、抗体 IgG 結合精子が粘液内で不動化されることはない。精子不動化抗体結合精子の頸管粘液内通過障害の原因が、抗体による精子凝集、精子不動化（補体共存下で）以外の機序で、抗体として divalent(IgG 又は F(ab')₂) な抗体を用いた場合と、univalent (Fab) な抗体を用いた場合の差でなくて、Fc 部分の存在が、粘液内精子通過性障害に関係していることが明らかになって来た。

Kremer らは¹²⁾精液中あるいは頸管粘液中に存在する抗精子抗体の検出法として、Sperm-Cervical Mucus Contact Test (SCMC-test) を提唱しており、いずれかに抗体が存在する場合には頸管粘液内で精子の振り様

Table 5 Kremer's sperm penetration test by using spermatozoa pretreated with IgG from sterile woman (T. T.) with sperm immobilizing antibody.

Dilution of IgG (6.25mg/ml)	SIV*1	SPT*2
1 : 1	8.6	Negative
1 : 2	6.9	Poor
1 : 4	2.6	"
1 : 8	1.1	Fair
1 : 16	1.1	Good
1 : 32	1.1	"
1 : 64	1.1	"
Control V-NHS*3	1.0	Good

*1 SIV : Sperm immobilization value.

*2 SPT : In vitro sperm penetration test.

*3 Control V-NHS : Normal human serum from unmarried women.

Table 6 Kremer's sperm penetration test by using spermatozoa pretreated with divalent antibody [IgG-F(ab')₂] from sterile women (T.T.) with sperm immobilizing antibody.

Dilution of F (ab') ₂ (6.25mg/ml)	SIV*1	SPT*2
1 : 1	1.0	Good
1 : 2	0.9	"
1 : 4	1.0	"
1 : 8	1.0	"
1 : 16	1.0	"
1 : 32	1.1	"
1 : 64	1.0	"
Control V-NHS*3	1.0	Good

*1 SIV : Sperm immobilization value.

*2 SPT : In vitro sperm penetration test.

*3 Control V-NHS : Normal human serum from unmarried women.

運動 (shaking phenomenon) が観察されると報告している。彼らはその機序として精子に結合した抗精子抗体 IgA が頸管粘液の糖蛋白 micelle に存在すると思われる IgA の Fc 受容体に捕捉され、精子の前進運動が障害される為だと考えている^{13,14)}。Lorton らは¹⁵⁾牛精子で家兔を免疫して作製した家兔抗牛精子血清の免疫グロブリン分画とその papain 酵素処理分画 (univalent 抗体) を牛精子と反応させ、抗体結合精子の牛頸管粘液通過性

を検討しているが、我々の実験結果と同様に、IgG 分画と反応させた精子では精子凝集反応と共に精子の粘液内への進入は完全に阻止されたが、univalent 抗体処理精子では進入阻害は全く認められなかったと報告している。

我々の結果では、家兎抗人精子不働化抗体 IgG を用いた場合も、精子不働化抗体保有不妊婦人血清 IgG を用いた場合にも共に IgG と反応させた人精子は、婦人の頸管粘液内通過性の著しい障害を示したが、papain 又は pepsin 酵素処理によつて抗体 IgG の Fc 部分を除去した Fab 又は F(ab)₂ 分画結合精子では全く通過性障害が認められなかった点よりみると、人頸管粘液 micelle に存在すると考えられる抗体グロブリン Fc 部分に対する受容体には Kremer らによつて示された IgA に対するものだけでなく、家兎 IgG 及びヒト IgG Fc 部分に対する受容体も存在するものと考えられる。ヒト IgG の Fc 部分に対する受容体が家兎 IgG に対しても親和性を示すということは決して不思議なことではなく、リンパ球細胞の他、羊膜や胎盤絨毛に存在する Fc 部分に対する受容体もやはりヒト IgG と同様に家兎 IgG に対しても親和性を示すことが報告されている^{16,17)}。しかし頸管粘液の糖蛋白 micelle に実際に Fc 受容体が存在するか否かは今後の課題で、今まだ推定の域を出ていない。

文 献

- 1) 伊熊健一郎, 窪田耕三, 高田喜嗣, 鎌田敏雄, 香山浩二, 磯島晋三: 抗精子抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響; 1. 血中精子不働化抗体保有不妊婦人における頸管粘液精子適合試験並びに頸管粘液中微量精子不働化試験, 日不妊会誌, 25: 1, 1980.
- 2) 伊熊健一郎, 窪田耕三, 高田喜嗣, 鎌田敏雄, 香山浩二, 磯島晋三: 抗精子抗体の頸管粘液内精子通過性に及ぼす影響; 2. 不妊婦人血中精子不働化抗体で予め処理を受けた精子の頸管粘液内通過性について, 日不妊会誌, 25: 157, 1980.
- 3) Isojima, S., Li, T. S. and Ashitaka, Y.: Immunological analysis of sperm immobilizing factor found in sera of women with unexplained infertility, *Am. J. Obst. Gynecol.*, 101: 677, 1968.
- 4) Isojima, S. and Koyama, K.: Quantitative estimation of sperm immobilizing antibody in the sera of women with sterility of unknown etiology: The 50% sperm immobilization unit (SI₅₀), *Recent Advances in Human Reproduction (Proceeding of the First International Congress on Human Reproduction, Rio de Janeiro, 1974) p. 10, Excerpta Medica, Amsterdam.*
- 5) Kremer, J.: A simple sperm penetration test, *Int. J. Fertil.*, 10: 209, 1965.
- 6) Sober, H. A., Cutter, F. J., Wyckoff, M. M. and Peterson, E. A.: Chromatography of proteins. II. Fractionation of serum protein on amino-exchange cellulose, *J. Am. Chem. Soc.*, 75: 756, 1956.
- 7) Porter, R. R.: The hydrolysis of rabbit gamma-globulin and antibodies with crystalline papain, *Biochem. J.*, 73: 119, 1959.
- 8) Utsumi, S., Fred, K.: Peptic fragmentation of rabbit γ G-immunoglobulin, *Biochemistry*, 4: 1766, 1965.
- 9) 磯島晋三: 妊孕現象に関する免疫学的研究, 第23回日産婦總會宿題報告要旨, 1971.
- 10) 香山浩二, 伊熊健一郎, 窪田耕三, 鎌田敏雄, 磯島晋三: 定量的精子不働化試験とその臨床応用, 日産婦誌, 31: 1906, 1979.
- 11) Rose, N. R., Hjort, T., Rümke, P., Harper, M. J. K. and Vyazov, O.: Techniques for detection of iso- and auto-antibodies to human spermatozoa, *Clin. exp. Immunol.*, 23: 175, 1976.
- 12) Kremer, J. and Jager, S.: The sperm-cervical mucus contact test; A preliminary report, *Fertil. Steril.*, 27: 335, 1976.
- 13) Kremer, J., Jager, S. and Kuiken, J.: Treatment of infertility caused by antisperm antibodies, *Int. J. Fertil.*, 23: 270, 1978.
- 14) Kremer, J., Jager, S. and Van Slochteren-Draaisma, T.: The "unexplained" poor post coital test, *Int. J. Fertil.*, 23: 277, 1978.
- 15) Lorton, S. P. and First, N. L.: Inhibition of sperm migration through cervical mucus in vitro, *Fertil. Steril.*, 28: 1295, 1977.
- 16) Thomas, J. H., MacArthur, R. I. and Humphrey, L. J.: Fc receptors on the human placenta, *Obstet. Gynecol.*, 48: 170, 1976.
- 17) Wild, A. E. and Dawson, P.: Evidence for Fc receptors on rabbit yolk sac endoderm, *Nature*, 268: 443, 1977.

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

3. Impairment of sperm penetration in the cervical mucus by binding the sperm immobilizing antibody on spermatozoa

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

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

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

In our previous reports, it was suggested that two mechanisms must be considered as the cause of impairment for sperm penetration in the cervical mucus of sterile women with sperm immobilizing antibody: One is the complement dependent sperm immobilization in cervical mucus and the other is the complement independent inhibitory effect of the sperm antibody. To elucidate the latter mechanism, the penetration of spermatozoa pretreated with sperm antibody IgG and its F(ab) or F(ab')₂ fragment in

the cervical mucus was studied by using Kremer's in vitro sperm penetration test.

IgG fractions were isolated from rabbit antiserum to human spermatozoa (heterologous antiserum) and also from the serum of sterile women with sperm immobilizing antibody (isologous antiserum), and F(ab) and F(ab')₂ fragments of IgG were prepared by papain and pepsin digestions. Washed motile human spermatozoa were incubated with various concentrations of IgG and its F(ab) or F(ab')₂ in the absence of complement and examined for their penetration in the cervical mucus which were obtained from preovulatory fertile women and were inactivated by heating (56°C, 30 min.).

The penetration of spermatozoa pretreated with IgG of heterologous or isologous antiserum was completely blocked in the normal cervical mucus, even though their motility was well retained. Whereas, motile spermatozoa pretreated with F(ab) or F(ab')₂ fragments of IgG could penetrate freely in the cervical mucus.

These results indicate that the spermatozoa bound sperm antibody could not penetrate in the normal cervical mucus even though they retained good mobility. Thus the Fc portion of IgG antibody was necessary to impair the sperm passage in the cervical mucus.

(受付: 昭和55年10月25日)

ストロー法によるヒト精子凍結保存法の研究

Study on the Freeze Preservation of Human Spermatozoa by Using Plastic Straw Method

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

真井 徳 幸
Noriyuki SANAI

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

ヒト精子凍結保存は、1953年はじめて凍結精子による妊娠例が報告されて以来種々検討されている。しかし新鮮精液に比べ運動率の低下、妊孕性の低下は否めない。今回ストロー法とアンプル法につき凍結保存後の精子蘇生率をより向上させるべく種々比較検討すると同時に臨床応用し妊娠成立例をみた。

- (1) ストロー精液管による凍結保存融解成績はアンプル法に比べ精子蘇生率で有意差で良好である。
- (2) Thiamine propyl disulfide を添加した KS 保存液を用いた凍結後融解成績は生存指数で有意に良好な結果である。
- (3) 精液と保存液を混合する際、分割希釈法と一回希釈法では両者間に有意差ない。
- (4) 凍結保存精液を融解する際、30~35°C 微温湯による急速融解が生存指数で有意差をもつて良好である。
- (5) 保存期間による精子蘇生率の低下は認めない。
- (6) 新鮮精液中の Glutamic oxalacetic transaminase, Alkaline phosphatase と凍結融解後精子蘇生率の間に相関はない。
- (7) ストロー法により凍結保存した精液を人工授精に応用し、妊娠成立例 (2例) をみた。

(Jap. J. Fert., Ster., 26(2), 132-141, 1981)

I 緒 言

近年の人工授精適応症例の増加にともない授精に供する精液を確保し保存する必要性はより大となっている。

精子の保存は精子の生存に必要な最少限のエネルギー消費で、しかも精子の消耗をできるだけ防ぎ、その生存性と受精能を良好な状態で維持する方法でなければならない。この条件に適した保存法が凍結保存法である。

ヒト精子の凍結保存の歴史は1886年 Mantegazza¹⁾が「ヒト精子を-17°C に凍結してもなお生存する」と報告したのを嚆矢とする。1949年 Polge, Swith, Parkes²⁾らが凍結保護物質としてグリセリンを使用し、その効果を報告して以来急速にこの方面の研究は進展した。

1953年 Sherman, Bunge³⁾はドライアイスを用いヒト精子を-70°C に凍結保存し、融解後精子を蘇生させる

ことに成功した。その後アメリカにおいて1954年より1959年までに凍結保存後融解精子による妊娠で16例の正常新生児が報告されている。本邦では飯塚⁴⁾が1958年同様に4例の凍結精子による妊娠を報告した。1963年 Sherman⁵⁾は液体窒素を用いヒト精子を-196°C に凍結、この方法で6人の妊娠例を発表した。当教室の中田⁶⁾も1969年同様に3人の妊娠例を報告し、また持丸⁷⁾は当教室における191例の凍結精子による妊娠例につき追跡調査し、その妊娠経過、分娩、新生児に特別な異常は認められないことを確認している。

今回著者は凍結保存後の精子蘇生率をより向上させることを目的とし、現在までのアンプル法に換え、畜産界で用いられているストロー法をヒト精子凍結保存に応用するとともに至適凍結融解条件について検討した。また凍結融解後の精子蘇生率と新鮮精液中の生化学

的成分の関係についても検討し、さらにストロー法を実際の人工授精に応用し、2例の妊娠例を得たので併せて報告する。

II 研究対象および方法

1. 研究対象

研究に供した精液は慶応義塾大学家族計画相談所で精液検査時に採取された精液および一部配偶者間人工授精施行中の精液で、精子濃度 $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上、精子運動率50%以上、精子奇形率20%以下のものを用いた。

2. 研究方法と使用器具、保存液

1) 研究に用いた保存容器

(1) 細型綿栓付人工授精用ストロー精液管 (以下ストローと略す.)

i) 0.5ml ストロー : 内径約2.5mm, 長径125mm, 容量0.5ml

ii) 1.0ml ストロー : 内径約3.5mm, 長径125mm, 容量1.0ml

(2) ガラスアンプル

内径約7.5mm, 長径60mm, 容量2 ml の特殊ガラス容器 (写1)

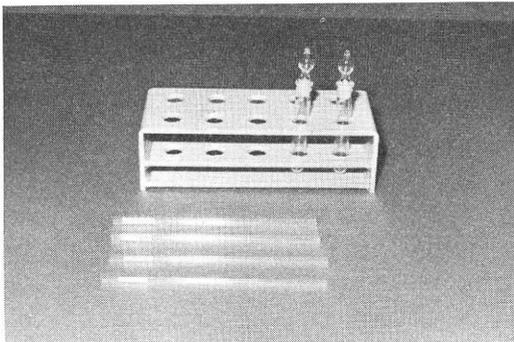


写真 1 保存容器
 上 : ガラスアンプル
 中 : 1.0ml ストロー精液管
 下 : 0.5ml ストロー精液管

2) 研究に用いた凍結保護物質としての保存液

(1) KS 保存液

(2) KS 保存液より抗生物質 (エリスロマイシン : 以下 EM と略す.) を除いた保存液

(3) KS 保存液に Thiamine Propyl Disulfide (VB₁ 誘導體で以下 TPD と略す.) を添加した保存液

(4) ネオセミン L・B 液 (ウシ精子凍結保存液で以下 NSL・B と略す.) (図1)

3) 対象精液の評価

(1) 精子濃度

白血球計算板を用い3回算定し、近似した2回の数値

成分	KS	KS+TPD (-EM)	NSL-B
卵黄	25ml	25ml	15ml
グリセリン	15ml	15ml	14ml
2%グリシン	2g	2g	—
クエン酸ナトリウム	2.9% (40.6ml)	2.9% (40.6ml)	1.21g
ブドウ糖	5% (17.4ml)	5% (17.4ml)	1.42g
第二リン酸ソーダ	—	—	0.14g
乳糖	—	—	0.21g
滅菌蒸留水	適量	適量	適量
TPD	—	1.5~3.0mg	1.5~3.0mg
抗生物質	エリスロマイシン	ペニシリンG 9万U ストレプトマイシン 90mg力価	ペニシリンG 9万U ストレプトマイシン 90mg力価

図 1 保存液の組成

の平均値をもって算出した。

(2) 精子運動率および活力, 奇形率

37~38°C の恒温下でおこなうため精子活力検査用加温装置上で農研式精液性状検査板を用い、精子運動率は全視野中の全精子に対する肉眼的に運動する精子の割合、活力は目測で最活発な前進運動を卍、活発な前進運動を卄、緩慢な前進運動を+, 旋回または振子運動を±とした。奇形率は全視野中の全精子に対する奇形精子の割合で示した。

4) 凍結保存融解後精液の評価

精液を凍結保存し融解後精子運動率, 精子蘇生率, 生存指数をもって判定した。精子蘇生率は凍結融解後精子運動率を凍結前運動率で除したものである。

生存指数⁸⁾とは活力の4段階記号中, 卍に100, 卄に75, +に50, ±に25なる数値をあたえこの数値に該当する運動率をかけ総和し, 100で除したものである (図2)。

(西川の提案による4段階(卍, 卄, +, ±)にかけてそれぞれ4段階に卍に100, 卄に75, +に50, ±に25なる数値をあたえ, この数値に該当の生存率をかけ総和して100で割る。

$$\text{生存指数} = \frac{100 \times \text{卍}(\%) + 75 \times \text{卄}(\%) + 50 \times \text{+}(\%) + 25 \times \text{±}(\%)}{100}$$

図 2 生存指数

5) 精液と保存液の混合 (希釈) 法

約35°C の温度条件にてアンプル法ではガラスアンプルに精液を直接, ストロー法では10ml のガラス容器に精液を入れる。この時精液は低温衝撃をうけると生存性が低下するので低温感作に注意し, あらかじめ容器も同温度にしておく。そして精液と等量の保存液を等温条件で一回法あるいは分割法で静かに温度を下げながら混合する。

(1) 一回法 : 精液と保存液を混合する際に精液量と等量の保存液を一度で混合する方法。

(2) 分割法 : 精液と保存液を混合する際に精液量と等量の保存液を3~4回に分け10~15分間隔で徐々に混合

する方法.

混合後アンプル法ではこのまま5°C まで60~90分以上かけ徐々に温度を下げる. ストロー法ではガラス容器よりストローへ吸引分注後やはり60~90分以上かけ5°C まで徐々に温度を下げる.

6) ストロー法における精液保存液混合液のストローへの吸引分注方法

保存液と混合した精液をガラス容器からストローへ吸引注入, 先端を下にして軽く1~2回振り余分の精液を落下させ, ストロー先端部に精液が少しある状態とし空間部を約2 cm つくる. この先端部にストローパウダーを約5 mm 程度入れ栓となるようにする. パウダーは水分を吸収し糊状に変化し栓を形成し閉封される.

7) 凍結操作法

キャニスター (ストロー用およびガラスアンプル用) をあらかじめ凍結前の精液と同じ温度すなわち5°C にし, ストロー法ではストローの綿栓部を下にしてストロー用キャニスターに, アンプル法ではガラスキャップをかけアンプル用キャニスターに入れる. 凍結は写2に示す DR-17 保管器を用い, 低温温度計にてあらかじめ一定のストロー内精液温度下降曲線を描くようにキャニスターの下降度と時間を決定しておき図3に示す温度下降曲線でおこなった.

8) 凍結精液の融解方法

凍結したガラスアンプルおよびストローを以下の3種の方法で融解し検討した.

- (1) 4~5°C 冷水中で融解
- (2) 室温 (20°C 前後) に放置し融解
- (3) 30~35°C 微温湯中で融解

9) 精漿中の Glutamic oxalacetic transaminase (以下 GOT と略す), Alkaline phosphatase (以下 Al-P と略す) の測定方法.

(1) 測定試液

GOT の測定はヤトロン社の血清トランスアミナーゼ測定用試液を用い, 日立102光電比色計で比色定量し Karmen unit/ml (KU/ml と略す) で示した. Al-P の測定はヤトロン社のアルカリ性ホスファターゼ測定用試液 S (King-Kind 法) を用い日立102光電比色計で比色定量し, King Armstrong unit/dl (KAU/dl と略す) で示した.

(2) 試料作成

新鮮精液を均等となるように二分する. 一方は先に示した KS+TPD 保存液を用い, 分割法で希釈し凍結保存した. 他方は精液量, 精子濃度, 精子運動率, 精子活力, 奇形率などを検した後, 1分間2000回転, 20分遠沈のうえ上清を約-20°C に凍結した. のちに融解し GOT,



写真 2 DR-17凍結精液保管器

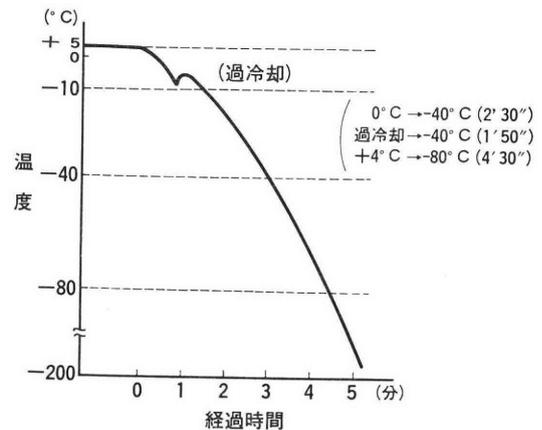


図 3 凍結温度下降曲線

Al-P を測定した. ただし測定まで72時間以内とした.

10) ストロー法の臨床への応用

ストロー法により凍結保存した精液を11名の妊孕性のある不妊患者に1周期1回, 融解精液を人工授精した.

III 研究成績

1. 保存容器による凍結融解後精子蘇生率の比較

1) ガラスアンプルと0.5ml ストローの比較

精液凍結融解条件は, KS 保存液を用い, 分割希釈法で精液と混合し, 図3の凍結プログラムに従い凍結, 室温融解法にて融解し凍結融解後精子蘇生率を比較した. 使用精液の凍結前平均精子運動率は69.5%で融解後精子運動率は0.5ml ストロー使用群で $34.0 \pm 13.8\%$ (mean \pm SD), アンプル使用群で $27.8 \pm 11.7\%$ であった. 精子蘇生率はそれぞれ $49.3 \pm 17.2\%$, $40.4 \pm 14.8\%$ で有意の差を認め ($P \leq 0.05$), ストロー法がより良好な結果を得た (表1).

表 1 保存容器と精子蘇生率 (1)

保存容器	融解後精子運動率 mean±SD (%)	精子蘇生率 mean±SD (%)
0.5ml ストロー 精液管	34.0±13.8	49.3±17.2
ガラス アンプル	27.8±11.7	40.4±14.8

(N=60)

とくに臨床上有用な精子蘇生率30%以上(ストロー法)の標本例での両者の精子蘇生率はストロー使用群が57.1±11.0%, アンプル使用群が45.8±12.4%とさらに有意差を認めた(P≤0.01).

2) 0.5ml ストローと1.0ml ストローの比較

1) と同条件で凍結, 30~35°C 微温湯で融解し, 凍結融解後精子蘇生率を比較した. 使用精液の凍結前平均精子運動率は66.4%で凍結融解後精子運動率は0.5ml ストローで38.1±10.7%, 1.0ml ストローで36.4±9.3%, したがって平均精子蘇生率は57.3±14.5, 55.4±13.4%であった. 精子蘇生率に有意差を認めなかった(表2).

表 2 保存容器と精子蘇生率 (2)

保存容器	融解後精子運動率 mean±SD (%)	精子蘇生率 mean±SD (%)
0.5ml ストロー 精液管	38.1±10.7	57.3±14.5
1.0ml ストロー 精液管	36.4±9.3	55.4±13.4

(N=36)

2. 保存液による比較

1) KS 保存液と KS+TPD 保存液の比較

精液を分割希釈法で保存液と混合し凍結, 30~35°C 微温湯にて急速融解し精子蘇生率について検討した. 使用精液の凍結前平均精子運動率は68.8%で凍結融解後運動率は KS 保存液使用群は32.8±11.7%, KS+TPD 保存液使用群は35.0±11.6%であった. 精子蘇生率は KS 液使用群51.8±16.8%, KS+TPD 液使用群55.8±17.0%, 生存指数はそれぞれ23.6±9.1, 26.9±9.3であった. なお KS 使用群が KS+TPD 群よりも凍結融解後運動率で良かった例は40例中9例存在した. 精子蘇生率については有意差を認めなかったが生存指数で KS+TPD 使用群が KS 使用群に比べ有意に良好な結果であった(P≤0.10) (表3).

2) KS 保存液と NSL・B 液の比較

1) と同条件でおこなった. 凍結前平均精子運動率は70.8%で凍結融解後精子運動率は KS 液使用群が32.3±14.6%, NSL・B 液使用群は34.6±18.9%で, 精子蘇

表 3 保存液による精子蘇生率の比較 (1)

保存液	融解後精子運動率 mean±SD (%)	精子蘇生率 mean±SD (%)	生存指数 mean±SD
KS	32.8±11.7	51.8±16.8	23.6±9.1
KS+TPD	35.0±11.6	55.8±17.0	26.9±9.3

(N=40)

表 4 保存液による精子蘇生率の比較 (2)

保存液	融解後精子運動率 mean±SD (%)	精子蘇生率 mean±SD (%)
KS	32.3±14.6	44.7±18.7
NSL・B	34.6±18.9	47.7±24.4

(N=26)

生率はそれぞれ44.7±18.7%, 47.7±24.4%となった.

KS 液使用群と NSL・B 液使用群において精子蘇生率に有意差を認めなかった(表4).

3) KS+TPD 液と KS 保存液より EM を除いた液 (以下 KS-EM 液とする)

凍結融解条件は 1) と同様におこなった. 凍結前平均精子運動率は64.0%, 凍結融解後精子運動率は KS+TPD 使用群が41.8±11.6%, KS-EM 使用群が38.9±12.4%で精子蘇生率はそれぞれ56.1±17.9%, 54.5±14.2%であった. また生存指数は KS+TPD 液使用群が29.0±9.2, KS-EM 液使用群が28.4±7.0であった. KS+TPD 液使用群および KS-EM 液使用群との間に精子蘇生率, 生存指数ともに有意差を認めなかった(表5).

表 5 保存液による精子蘇生率の比較 (3)

保存液	融解後精子運動率 mean±SD (%)	精子蘇生率 mean±SD (%)	生存指数 mean±SD
KS-EM	38.9±12.4	54.5±14.2	28.4±7.0
KS+TPD	41.8±11.6	56.1±17.9	29.0±9.2

(N=36)

3. 希釈方法による比較

KS+TPD 保存液を用い, 30~35°C 微温湯にて融解し, 融解後精子蘇生率, 生存指数で比較した. 凍結前平均精子運動率は70.0%で, 凍結融解後精子運動率は分割法が35.8±16.2%, 一回法が30.5±17.1%, 精子蘇生率はそれぞれ50.3±20.7%, 43.7±22.8%, 生存指数は分割法が27.5±15.8, 一回法が24.2±15.6であった. 精子蘇生率, 生存指数ともに両者間の有意差はなかった(表

表 6 希釈方法と精子蘇生率

希釈方法	融解後精子運動率 mean±SD (%)	精子蘇生率 mean±SD (%)	生存指数 mean±SD
分割法	35.8±16.2	50.3±20.7	27.5±15.8
一回法	30.5±17.1	43.7±22.8	24.2±15.6

(N=38)

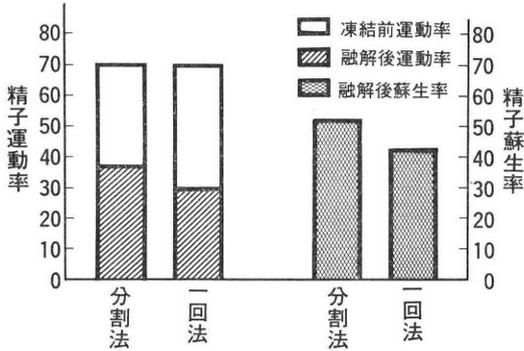


図 4 希釈方法と精子運動率, 蘇生率

表 7 融解時温度と精子蘇生率

融解時温度	融解後精子運動率 mean±SD (%)	精子蘇生率 mean±SD (%)	生存指数 mean±SD
30~35°C 微温湯	38.6±12.0	60.9±16.7	28.8±10.7
室温下	35.6±10.0	56.3±14.4	25.6±7.8
4~5°C 冷水	37.0±11.6	58.4±15.8	26.8±9.7

(N=36)

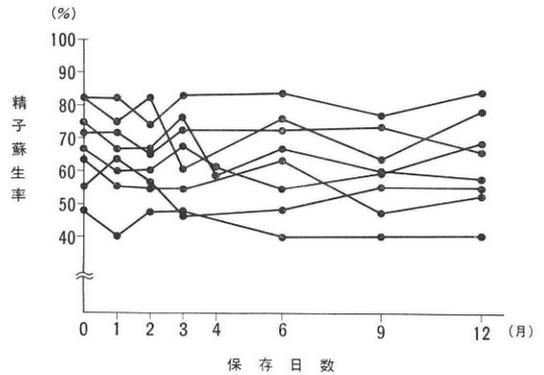


図 6 精子蘇生率の経時的変動

6). 図式化したのが図 4 である.

4. 融解方法による比較

保存液は KS+TPD 液を使用し, 分割希釈法で混合し凍結した. 凍結前平均精子運動率は63.0%で, 凍結融解後精子運動率は30~35°C 微温湯38.6±12.0%, 4°C 冷水37.0±11.6%, 室温35.6±10.0%で精子蘇生率および生存指数はそれぞれ30~35°C 微温湯が60.9±16.7%, 28.8±10.7, 4°C 冷水が58.4±15.8%, 26.8±9.7, 室温が56.3±14.4%, 25.6±7.8であった. 蘇生率につき最高, 最低, 平均を図式化したのが図 5 である. 凍結融解後精子蘇生率においては有意差はみられなかったが生存指数において30~35°C 微温湯が有意差をもつて良好であった(P≤0.10) (表 7).

5. 保存日数による精子蘇生率の経時変化

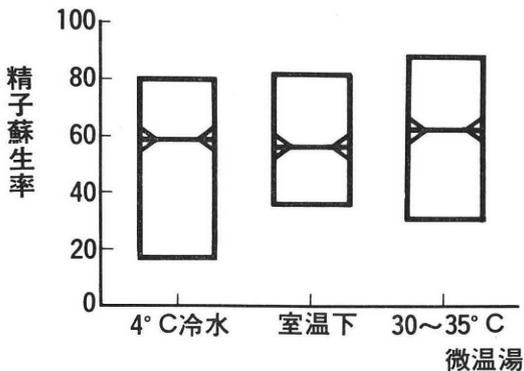


図 5 融解時温度と精子蘇生率

図 6 は同一標本における蘇生率の経時的変動を 1 年観察したものである. 標本により多少低下傾向にある例も存在するがほとんどが凍結直後と 1 年間凍結保存後の精子蘇生率に差を認めなかった(図 6).

6. 精子蘇生率と GOT, Al-P の関係

精液中の GOT, Al-P の含有量と耐凍能との間に関係があるか否かを検討する目的で精液を耐凍能力良好群と不良群の 2 群に分け, 両群の新鮮精液中の GOT, Al-P 含有量を測定し以下の成績を得た.

1) 耐凍能良好群 (精子蘇生率50%以上)

(1) 16例での GOT 値は284~438KU/ml でその平均は356.1±43.4KU/ml (mean±SD) であった.

(2) 16例での Al-P 値は13.1~62.7KAU/dl, その平均は28.9±14.4AU/dl であった.

この群の新鮮精子濃度は32~137.6×10⁶/ml で精子運動率は50~80%, 精子蘇生率は50~88.2%であった.

2) 耐凍能力不良群 (精子蘇生率49%以下)

(1) 14例での GOT は186~452KU/ml で, 平均324.3±48.9KU/ml であった.

(2) 14例での Al-P, は13.8~52.2KAU/dl, その平均は25.6±13.3KAU/dl であった.

この群の新鮮精子濃度は30.4~105.6×10⁶/ml, 精子運動率は50~80%, 精子蘇生率は2~42.9%であった (表 8, 9).

表 8 GOT と精子蘇生率

耐凍能力	mean±SD	range
良好群 (精子蘇生率50%以上)	356.1±43.4	284~438
不良群 (精子蘇生率49%以下)	324.3±48.9	186~452

表 9 AI-P と精子蘇生率

耐凍能力	mean±SD	range
良好群 (精子蘇生率50%以上)	28.9±14.4	13.1~62.7
不良群 (精子蘇生率49%以下)	25.6±13.3	13.8~52.2

7. ストロー法の臨床応用

1) 症例 1

患者は24歳, BBT 2相性. 既往歴とくになし, 不妊期間4年.

不妊検査は(1)月経血培養(陰性). (2)子宮内膜検査(BBT 24日目に分泌期, 結核なし). (3)通気検査(正常型). (4)子宮卵管造影(左右ともに通過性良好). (5)精液検査(2度ともに無精子症), 染色体46+XY, テストステロン正常, 生検で萎縮し精子形成能なし, であつた.

当初, 非配偶者間人工授精 artificial insemination with donors' semen (以下 AID と略す)をおこなうも妊娠せず, 希望により夫の弟とでの artificial insemination with brother's semen (以下 AIB と略す)に変更した. 新鮮精液で AIB を3周期施行するも妊娠成立しなかつた. その後毎周期の授精施行日に義弟が来院することが不可能となり, そのため精液の凍結保存をおこなつた. 凍結前精子運動率80%, 精子濃度 $55 \times 10^6/ml$, 精液量2.5cc であつた. 凍結条件は KS 保存液を使用し, 分割希釈法で精液と混合, 図3の凍結プログラムで凍結した. この際8本の0.5ml ストローに分割凍結保存することができた. 凍結精液による人工授精2周期目に妊娠成立した(図7). 妊娠成立時の授精に用いた凍結保存

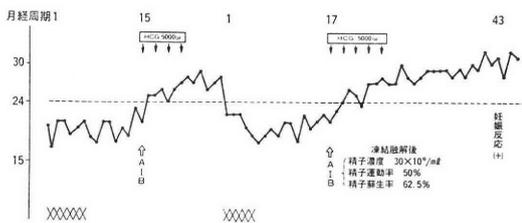


図 7 AIB 妊娠例の BBT

精液の融解後精子濃度は $30 \times 10^6/ml$, 精子運動率50%, 精子蘇生率は62.5%であつた. その後妊娠経過に異常なく妊娠39週で2846g の女児を正常分娩した. 児に奇形はなく, その他とくに異常を認めていない.

2) 症例 2

患者は29歳, 初潮13歳, BBT 2相性, 不妊期間3年. 不妊検査は(1)月経血培養(陰性). (2)子宮内膜検査(BBT 高温10日目に分泌期後期). (3)通気検査(正常型). (4)子宮卵管造影(正常). (5)精液検査(精子濃度 $80 \times 10^6/ml$, 精子運動率70%, 奇形率10%以下で正常). (6)性交後検査(陰性), であつた.

他医にて artificial insemination with husband's semen (以下 AIH を略す)を5周期するも妊娠成立しなかつた. 夫が船員で不在が多く, 凍結精液による AIH 希望のため当院を紹介されて来院した. 夫精液の凍結は症例1と同条件でおこない, 0.5ml ストロー6本に分割凍結保存した. 凍結精液による AIH 変更後4周期目に妊娠成立をみた. この精液の凍結融解後精子濃度は $40 \times 10^6/ml$, 精子運動率40%で精子蘇生率は57.1%であつた. 妊娠経過に異常なく, 妊娠40週に3435g の男児を正常分娩した. 児に奇形はなく, その他に異常は認めていない.

IV. 考 察

1. 精液保存容器としてのストローとアンプルの比較
現在畜産界では広くストロー法が用いられており良好な成績を得ている. 現在までヒト精液凍結保存におけるストローの使用は本邦では報告されていない. 今回著者はヒト精液凍結保存容器としてアンプル法とストロー法の良否を比較検討した結果, 以下の点でストロー法が精液保存容器として利点があることを確認し得た.

1) ストロー法は融解後精子蘇生率が $49.3 \pm 17.2\%$ とガラスアンプル法の $40.4 \pm 14.8\%$ に比べ有意差 ($P \leq 0.05$) をもつて良好である. Salisbury⁹⁾らは凍結保存中にも精子の aging が認められると報告しており, 保存中精液と空気の接触面をできるだけ少なくし精子生存性と受精能力を延長しなければならない. この点ストローはアンプルに比べ空間部が少なく, 保存中における精液と空気の接触面が少なく, したがつて良好な成績が得られるものと思う. また凍結に際しても有害温度域¹⁰⁾の $0 \sim -30^\circ C$ を一定の速度で通過させ, 氷晶形成量の減少および水分子の急激な移動を抑制し超定温にしなければならない. ストローは容器表面積が大であるのに比し容器内精液量が少量なため, 容器内精液が均一に凍結され, この点においても有利である.

0.5ml と1.0ml ストローの比較では精子蘇生率, 生存指数ともに大差ない. 人工授精の際, 子宮腔内注入法

では0.5mlの精液で十分であることを考慮すれば、容量の少ない0.5ml ストローでよいと考える。

2) 凍結融解操作時に破損する危険が少ない。凍結および融解操作時は急激な温度差がおこるため保存容器の破損がおこることがあるが、ストローは材質がプラスチックなためガラスアンプルに比べ破損の危険が少ない。

3) ストローは精液を一回注入量として多数に分割保存できる。

4) 人工授精の際、感染の機会が少なくなる。授精器を考案することによりストローから子宮腔内にそのまま注入可能となり、授精時の感染機会が少なくなる。

2. 保存液による比較

1) TPD 添加群と非添加群

TPD 添加群と非添加群において精子蘇生率に有意差を認めなかったが、活力を示す生存指数では有意差を認めた($P \leq 0.10$)。

西川ら^{14,12)}は Vitamin B₁ (以下 VB₁ と略す) そのものは精子内に入りにくいのが TPD の型では精子内に容易に入り、それがやがて精子内で VB₁ に変わり、精子代謝が亢進しウシやヤギ精子の運動の活性化や生存性の延長に効果があると報告している。ヒト精子においては凍結融解後精子蘇生率では大差ないが生存指数では有意差を認めた。

2) 抗生物質添加について

KS 保存液と KS 保存液より抗生物質を除去した保存液による凍結保存融解成績は、精子蘇生率、生存指数とも有意差はなかった。

しかし一般に精液中には細菌が混在しており、Sherman は淋菌が凍結保存中にもなお生存していると報告しており、今回著者の症例では有意差はなかったが抗生物質を添加することは無意味でないと思われる。

3. 希釈方法

ウシの精子濃度は $1000 \sim 5000 \times 10^6/\text{ml}$ で保存液で最終的に約10倍に希釈される。このように高倍率で希釈される場合いわゆる浸透圧衝撃^{13,14)}を受けて生存性が低下する。一方ヒト精子濃度は $50 \sim 100 \times 10^6/\text{ml}$ でウシ精子濃度の数十分の1であり、凍結融解後の精子濃度を考慮すると保存液と精液の混合は1:1の低倍希釈となる。このような2~3倍程度の低倍希釈ではほとんど浸透圧衝撃を受けないと云われている。一方浸透圧衝撃は時間をかけて徐々に低張の液にさらしていけば、より影響が少ないという報告¹⁵⁾もある。今回著者は精液と保存液を徐々に混合する分割法と一度に混合する一回法を比較してみた。表6より分割法と一回法に有意差はみられなかったが、図4より分割法が融解後精子蘇生率で約7%良好である。また一回法が分割法より良い結果を示した例

は少なく、精液と保存液を混合する際は分割法を用いることが望ましい。

4. 融解方法

凍結精子は超低温から昇温の際、高張液からもとの等張液までの浸透圧の変化および細胞の脱水、細胞内凍結などの変化を受ける。

一般に精子は冷却に対し感受性が高いが、昇温に対してはほとんど影響を受けないと云われている。しかし凍結中の水は全く無構造ではなく非常に微細な氷晶が存在する¹⁶⁾ことがわかり、ゆつくりした融解ではこの微細な氷晶は昇温に伴い急速に完全な氷晶に成長するから細胞内凍結を起こし精子に不利である。ヒト凍結精液融解方法は Ulstein¹⁷⁾は37°C 5分の急速融解法を用い、Beck^{18,27)}は室温による緩徐融解法を提唱している。また Matheson¹⁹⁾らは37°C および4°C における融解が低蘇生率を示したと報告している。著者はこれら急速融解法および緩徐融解法を比較すべく30~35°C 微温湯、室温下、4°C 冷水中について検討した。その結果この3種の融解法の間凍結融解後精子蘇生率に有意差はみられなかったが、生存指数において30~35°C 微温湯による急速融解が有意差($P \leq 0.10$)をもつて良好であり、30~35°C 微温湯による急速融解が良いと考える。

5. 保存日数による精子蘇生率の経時的変化

凍結精液の保存期間は半永久的と云われており、Matheson らは180日以上保存し運動率の著明な低下は認めていない。Sherman²⁰⁾も1年後、4年後、10年後と観察し本質的に運動率の低下をみていない。一方ウシにおいては超低温で保存しても精子の老化が認められるという報告⁹⁾もあるし、反対の報告²¹⁾もある。飯塚²²⁾はヒト精子を1400日以上にわたり凍結保存し平均精子蘇生率は71~73%で最長保存日数は1401日、その蘇生率は63%であり、蘇生率の著明な低下はみとめていない。著者のストロー精液管での成績は保存期間365日であるが、アンプル法と同様凍結保存期間の長短は蘇生率に大きな影響を与えず、長期間の凍結保存に支障のないことが証明された。

6. 精子蘇生率と GOT, Al-P の関係

精液凍結融解に際し、同じ精子濃度、精子運動率であっても凍結融解後の精子蘇生率に非常に差があることはよく経験されることであり、原因はよくわかっていない。Beck¹⁹⁾も凍結前より凍結に耐えうるかどうか(耐凍能)は予知できないとしている。精子濃度と GOT の関係について石部²³⁾、高岸²⁴⁾、志田²⁵⁾らは正常群は高い平均値を示し無精子群は有意に低いと報告しており、Al-P との関係についても石部²⁶⁾は正常精子群は無精子群に比し有意に高い活性を示すと報告している。一方 Beck²⁷⁾ら

は精子濃度別に精子を凍結保存し、その融解成績は精子濃度の高いものが精子蘇生率が良いとしている。そこで今回著者は新鮮精液中の GOT, Al-P 値により耐凍能を判定できるかどうか検討した。しかし新鮮精液中の GOT, Al-P と凍結融解後精子蘇生率との間の相関はともに得られなかった。

7. 臨床応用

ヒト精子凍結保存の目的は人工授精による妊娠であり、1953年をはじめ凍結精液による妊娠例が報告されて以来種々検討されている。しかし新鮮精液による人工授精に比べ妊娠率は低いのが現状である。今回ストロー法による凍結融解後精子蘇生率が良好な結果を得たので臨床応用し、2例の妊娠成立をみた。症例1, 2ともに妊娠成立周期の授精時精子濃度は 30×10^6 , $40 \times 10^6/\text{ml}$ と新鮮精液では精子減少症に分類される。これは凍結保存の際、精液を保存液で2倍希釈するため1mlあたりの精子数が約半分になるためである。凍結融解後運動率は50%, 40%であった。Matheson¹⁹らは凍結融解精子による妊娠例の融解後精子運動率は25~45%, Behrman & Sawada²⁰らは25~30%と報告している。妊娠経過は症例1, 2ともに順調であり、すでに正常分娩している。Friberg²⁰らの報告は26人中21人が正常分娩、4人が3カ月で自然流産、1例が27週早産であった。Tyler³⁰は妊娠92例中4例が自然流産で1例の指の奇形以外に大きな奇形は認めていない。Sanger らによると1953年以来1000以上の凍結精子による分娩が報告され、流産率は12%としている。当教室の持丸⁷は凍結精子による非配偶者間人工授精で妊娠した191例中25例が自然流産し、その流産率は15.2%と少し高いと報告している。しかし不妊外来における流産率とは大差なく、分娩および児の発育は全く正常であったとしている。他に10年以上凍結保存した精液による妊娠で正常分娩した例が Sherman より報告されている。著者の例においても児の生下時所見およびその後の発達に異常は認めていない。

V 結 論

アンプル法とストロー法による凍結保存を比較し至適凍結融解条件について以下の結論を得た。

1. 0.5ml ストロー精液管を用いた凍結保存法は凍結融解後の精子蘇生成績が良好である。

また同法は精液を人工授精時子宮腔内注入量である0.5ml に分割保存できる利点を有する。

2. TPD を添加した KS 保存液は精子運動率、精子蘇生率、とくに精子活力をあらわす生存指数を増強させる。

3. 精液と保存液を混合する際、一回法と分割法とで

は有意差は認められない。

4. 凍結保存精液の融解方法は、30~35°C 微温湯による急速融解が生存指数において有意に良好である。

5. 凍結精液は保存期間により融解後精子蘇生率に大なる影響は受けない。

6. 新鮮精液中の GOT と凍結融解後精子蘇生率とは相関がみられない。

7. 新鮮精液中の Al-P と凍結融解後精子蘇生率との間に相関はない。

8. ストロー法により、凍結保存した精液を11例に人工授精し2例に妊娠成立した。

稿を終るにあたり御懇篤な御指導、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いただいた小林講師に感謝の意を表します。

さらに御指導、御助言をいただいた農林省畜産試験場和出靖博士、および御協力いただいた産婦人科相談所諸姉に謝意を表します。

なお本論文の要旨は第21回不妊学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Mantegazza, J.: Fisiologia sullo sperma umano. Rendic. reale Instit. Lomb. 3: 183, 1866.
- 2) Polge, G., Smith, A. U., and Parkes, A. S.: Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature (London) 164: 666, 1949.
- 3) Bunge, R. G., and Sherman, J. K.: Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature (London) 172: 767, 1953.
- 4) Iizuka, R. and Sawada, Y.: Successful artificial inseminations with frozen-pooled human semen. Jap. J. Fertil. Steril. 3: 241, 1958.
- 5) Sherman, J. K.: Improved methods of preservation of human spermatozoa by freezing and freeze-drying. Fertil. Steril. 14: 49, 1963.
- 6) Nakada, T.: Studies on the preservation of human spermatozoa by using a liquid nitrogen refrigerator. Jap. J. Fertil. Steril. 14: 212, 1969.
- 7) Mochimaru, F.: Artificial insemination with frozen donor semen: Its current status and follow up studies. Keio. J. Med. 28: 33, 1979.
- 8) 加藤浩, 星修三, 西川義正: 新家畜繁殖講座, II: 69, 朝倉書店, 1973.
- 9) Salisbury, G. W. & R. G. Hart: Gamete

- aging and its consequences. Biol. Reprod. Supplement, 2: 1, 1970.
- 10) Polge, C.: Low temperature storage of mammalian spermatozoa. Proc. Roy. Societ., B, 147: 498, 1957.
 - 11) 西川義正: 牛凍結精子用のための活性ビタミン B₁ を含む新しい精液希釈剤について, 獣医界, 94: 37, 1970.
 - 12) Nishikawa, Y., T. Fukukawa, K. Utsumi, & Y. Sasae: Effect of Vitamin (Thiamine) derivatives on motility and viability of bull and goat spermatozoa. Cong. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif., Paris, 11: 1287, 1968.
 - 13) Drevious, L. O.: Spiralization in tails of mammalian spermatozoa in hypotonic media. Nature, 197: 1123, 1963.
 - 14) Drevious, L. O. & Eriksson, H.: Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. Exptl. Cell. Res. 42: 136, 1966.
 - 15) Quinn, P. J. & White, I. G.: Osmotic shock of ram spermatozoa. J. Reprod. Fert., 18: 375, 1969.
 - 16) Meryman, H. T.: The interpretation of freezing rates in biological materials. Cryobiology, Acad. Press, 2: 165, 1966.
 - 17) Magnar, U.: Fertility, motility and penetration in cervical mucus of freeze-preserved human spermatozoa. Acta. Obstet. Gynec. Scand. 52: 205, 1973.
 - 18) Beck, W. W.: Artificial insemination and preservation of semen. Urologic clinics of North America 5: 593, 1978.
 - 19) Matheson, G. W., Carlborg, L. and Gemzell, C.: Frozen human semen for artificial insemination. Am. J. Obstet. Gynecol. 104: 495, 1969.
 - 20) Sherman, J. K.: Synopsis of the use of human semen since 1964: State of the art of human semen banking. Fertil. Steril. 24: 397, 1973.
 - 21) Mixner, J. P.: Fertility of bullsemen frozen for twelve years. Proc. VI te Cong. Intern. Reprod. Anim. Insem. Artif., Paris, 2: 1095, 1968.
 - 22) 飯塚理八, 大野虎之進, 河上征治: 人工授精の臨床: 40, 金原出版, 1972.
 - 23) 石部知行: ヒト不妊精液の生化学, IV Glutamic oxalacetic transaminase について, 日不妊会誌, 20: 315, 1975.
 - 24) 高岸秀俊: 男子不妊症の研究 (第8報) 男子不妊症患者精漿の生化学的所見について, 日不妊会誌, 20: 319, 1975.
 - 25) 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, 日不妊会誌, 16: 217, 1971.
 - 26) 石部知行: ヒト不妊精液の生化学, I. Alkaline phosphatase について, 日不妊会誌, 18: 18, 1973.
 - 27) Beck, W. W., and Silvertsein, I.: Variable motility recovery of spermatozoa following freeze preservation. Fertil. Steril., 26: 863, 1975.
 - 28) Behrman, S. J. and Sawada, Y.: Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. Fertil. Steril. 17: 457, 1966.
 - 29) Friberg, J. and Gemzell, C.: Inseminations of human sperm after freezing in liquid nitrogen vapors with glycerol or glycerol-egg-yolk-citrate as protective media. Am. J. Obstet. Gynecol., 116: 330, 1973.
 - 30) Tyler, E. T.: The clinical use of frozen semen banks. Fertil. Steril., 24: 413, 1973.

Study on the freeze preservation of human spermatozoa by plastic straw method

Noriyuki Sanai

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

The major draw-back of freeze-preservation is the loss of spermatozoan motility which occurs during the process of freezing and thawing of human semen.

In this study for improvement of the motility recovery rate of human spermatozoa after freeze-preservation, plastic straws, instead of glass ampoules of conventional use, were applied for clinical cases and optimal conditions of freezing preservation were investigated.

The results led to the following conclusions;
(1) A 0.5 ml plastic straw tube as a container of semen significantly improved the motility and the motility recovery rate after thawing as compared to glass ampoule method.

(2) Human spermatozoa, when preserved frozen in the KS medium added with thiamine propyl disulfide, were found to maintain higher motility, motility recovery rate and especially higher survival index after thawing.

(3) When seminal specimens was mixed with protective medium in a 1:1 ratio by volume, no significant differences in the motility, the motility recovery rate and the survival index following thawing were observed between stepwise dilution and one-step dilution.

(4) Quick thawing in lukewarm water at 30-35°C proved better survival index of spermatozoa as compared to those by other thawing methods.

(5) The motility recovery rate of spermatozoa

after thawing was not significantly influenced by the time of preservation.

(6) There was no significant correlation between glutamic oxalacetic transaminase activity in fresh semen and the motility recovery rate of spermatozoa after thawing.

(7) No correlation was also noted between

alkaline phosphatase activity in fresh semen and the motility recovery rate of spermatozoa after thawing.

(8) Two successful pregnancies of 11 infertile patients were induced by artificial inseminations used the semen of straw tube method.

(受付: 昭和56年1月14日)

ステロイド合成を阻止したマウス卵子に おける卵割・胞胚形成能力の衰退

Failure in Cleavage and Blastocyst-transformation in the Steroid Synthesis-blocked Mouse Eggs

新潟大学農学部畜産学科

新村末雄 石田一夫
Sueo NIIMURA Kazuo ISHIDA

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture,
Niigata University

2細胞期と8細胞期のマウス卵子を isoxazole に浸漬して hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) 活性を阻止した後体外培養を行い、卵子のステロイド合成と卵割・胞胚形成との関係を調べた。

1. 卵子の HSD 活性を阻止するために必要な培養液中の isoxazole の濃度と卵子の浸漬時間は、2細胞卵子、8細胞卵子共に isoxazole 6%で5分間または4%で4時間であった。

2. isoxazole によって、卵子の 4^5 - 3β -HSD (基質, dehydroepiandrosterone, pregnenolone, 17α -hydroxypregnenolone), 17β -HSD (基質, estradiol- 17β , testosterone), 20α -HSD (基質, 20α -hydroxyprogesterone) 及び 20β -HSD (基質, 20β -hydroxyprogesterone) の活性は阻止されたが, NADH_2 dehydrogenase 及び NADPH_2 dehydrogenase の活性は阻止されないことが組織化学的に証明された。

3. 無処理の2細胞卵子を52時間、8細胞卵子を33時間培養すると、それぞれ79.5%、86.5%が胞胚にまで発生したが、isoxazole に浸漬した2細胞卵子と8細胞卵子を培養しても全く発生しなかった。このことから、卵子においてステロイド合成を阻止すると、卵割や胞胚形成が起こらないことが明らかとなった。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 142-147, 1981)

緒言

最近、ウサギの胞胚¹⁻⁶⁾に progesterone と estradiol- 17β 、ブタの胞胚⁷⁾に estrone、ウシの胞胚⁸⁾に progesterone と testosterone が含まれていることが生化学的な研究によって明らかにされている。さらに、これらの胞胚にはステロイドの代謝能があり⁸⁻¹³⁾、ステロイド合成に関与している酵素系の存在が示唆されている^{9,11-13)}。組織化学的には、マウス、ハムスター、スナネズミ、ラット、モルモット、ウサギ、ブタ及びウシの排卵後の卵子に 4^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (4^5 - 3β -HSD) が検出されている¹⁴⁻²³⁾。また、ハムスターとブタの卵子の HSD 活性は、ゴナドトロピンやプロスタグランジンによって影響されることも報告されている²⁴⁻²⁶⁾。

卵子におけるステロイド合成の生理的役割について、Dey and Dickmann²⁷⁾及び Dickmann and Dey²⁸⁾は次のように考察している。すなわち、ラット卵子の 4^5 - 3β -HSD 活性は桑実胚が胞胚に変形する時期にはじめて出現し、胞胚で最も高くなるが、その後急速に低下して着床すると消失することから、卵子が合成するステロイドは桑実胚から胞胚への変形と、胞胚の着床を制御しているのではないかと推察している。

17β -hydroxy-4,4,17 α -trimethyl-androst-5-en-[2,3d]-isoxazole (isoxazole)は dehydroepiandrosterone(DHA)の2-3d isoxazole analog で、細菌 (*Pseudomonas testosteroni*)、ラットの副腎と性腺及びウシの副腎の 4^5 - 3β -HSD 活性を抑制する効果があるといわれている²⁹⁻³⁴⁾。また、この物質は合成ステロイドであるが、それ自体には estrogen, androgen または progestagen

の作用はないという³⁵⁾.

本実験は、卵子のステロイド合成能と卵割・胞胚形成との関係を調べるために、2細胞期と8細胞期のマウス卵子を isoxazole に浸漬して HSD 活性を阻止した後、体外培養を試みたものである。

材料および方法

供試動物として ICR 系の成熟マウスを使用した。飼育はコイトロン内で行い、室内の温度は常時24°C、点灯は午前4時から午後6時までの14時間とした。卵子を採取するために、PMSG (セロトロピン、帝国臓器) 5 IU を皮下注射し、48時間後に HCG (ゴナトロピン、帝国臓器) 5 IU を皮下注射して過排卵誘起を行った。2細胞卵子は HCG 注射後48時間、8細胞卵子は67時間にそれぞれ採取した。

1. HSD 活性を阻止するために必要な isoxazole の濃度と浸漬時間の検討

isoxazole (Aldrich Chemical Co., U.S.A.) をそれぞれ0.1%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%含む Whittingham の培養液³⁶⁾に2細胞期と8細胞期の卵子を5分間、30分間、4時間、24時間浸漬した。浸漬は炭酸ガス培養装置を用い、炭酸ガス5%空気95%の気相下で37°Cで行った。浸漬した卵子は0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) で十分に洗浄した後、 4^5 - 3β -HSD の組織化学的検出に用いた。 4^5 - 3β -HSD 検出のための基質液の組成は Dickmann and Dey の使用した処方³⁷⁾によった。すなわち、DHA 1.8mg, NAD 4.0mg, nitro blue tetrazolium 2.0mg, 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.5) 10 ml で、DHA はあらかじめ0.5ml のアセトンに溶解して使用した。なお、isoxazole を含まない液で培養した卵子を対照として使用した。また、一部の卵子は培養後直ちに位相差顕微鏡で形態を観察した。

2. isoxazole によつて阻止される HSD の種類の検討

4^5 - 3β -HSD (基質, DHA) 活性が阻止される条件で卵子を isoxazole に浸漬し、 4^5 - 3β -HSD (基質, pregnenolone, 17 α -hydroxypregnenolone), 17 β -HSD (基質, estradiol-17 β , testosterone), 20 α -HSD (基質, 20 α -hydroxyprogesterone) 及び20 β -HSD (基質, 20 β -hydroxyprogesterone) の組織化学的検出を行った。基質液の組成は Dickmann and Dey の使用した処方³⁷⁾によつたが、17 α -hydroxypregnenolone はジメチルホルムアミドに溶解し、20 α -HSD を検出するための補酵素には NADP を使用した。また、HSD の組織化学的反応は NADH₂ dehydrogenase (NADH₂-DH) または NADPH₂ dehydrogenase (NADPH₂-DH) の反応に依

存している³⁸⁾、これらの酵素を Barka and Anderson 法³⁹⁾によつて検出した。

3. 体外培養

2細胞卵子と8細胞卵子を 4^5 - 3β -HSD 活性が阻止される条件で isoxazole に浸漬した後、培養液³⁶⁾で十分に卵子を洗浄して新しい同種培養液 1 ml の入った時計皿に移した。ここで、一部の卵子を用いて 4^5 - 3β -HSD 活性が完全に阻止されていることを確かめた。次に、培養液の表面をパラフィンオイルでおおい、炭酸ガス培養装置により炭酸ガス5%、空気95%の気相下に37°Cで、2細胞卵子は52時間、8細胞卵子は33時間それぞれ培養した。

結果および考察

1. HSD 活性を阻止するために必要な isoxazole の濃度と浸漬時間

isoxazole をそれぞれ0.1%, 1%, 2%, 4%, 6%, 8%及び10%含む液で5分間ないし24時間浸漬した2細胞卵子と8細胞卵子の形態を位相差顕微鏡で観察すると、いずれの浸漬時間の卵子においても isoxazole の濃度が8%を越すと透明帯が溶解し、10%では細胞質が顆粒状を呈したが、6%以下の濃度では形態に影響は現われなかった(図1)。

次に、培養液に含まれる isoxazole が卵子の 4^5 - 3β -HSD (基質, DHA) 活性に及ぼす影響について検討したところ、表1に示すような成績が得られた。すなわち、浸漬時間が5分間と30分間の場合には、培養液に含まれる isoxazole の濃度が4%までは2細胞期と8細胞期の卵子に 4^5 - 3β -HSD 活性が現われ、6%では見られなかった。また、浸漬時間が4時間と24時間の場合には、

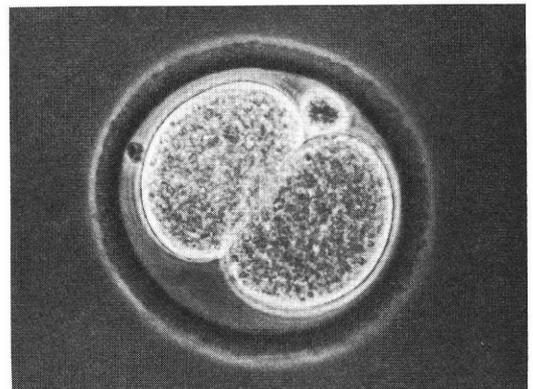


Fig. 1 Phase-contrast microscopic figure of a 2-celled mouse egg incubated 5 minutes in Whittingham medium containing 6% of isoxazole, showing normal morphological features. $\times 250$.

Table 1 The activity of Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in mouse eggs incubated in isoxazole-containing media

Concentration of isoxazole %	Incubation time			
	5 min	30min	4 hr	24hr
0.1	+	+	+	+
1.0	+	+	+	+
2.0	+	+	+	+
4.0	+	+	-	-
6.0	-	-	-	-

- negative reaction, + positive reaction



Fig. 2 Strong activity of Δ^5 - 3β -HSD (DHA as the substrate) still shown in a 2-celled egg incubated 5 minutes in Whittingham medium containing 4 % of isoxazole. Dickmann and Dey method. $\times 250$.

isoxazole の濃度が 2 % までは酵素活性が現われたが、4 % からは見られなかった。

酵素活性によつて沈着したジホルマザン顆粒は、いずれの条件下においても分割球の細胞質に一樣に分布しており、その量は isoxazole を含まない培養液に浸漬したものと変らなかった(図 2)。

以上のことから、isoxazole で 2 細胞卵子と 8 細胞卵子の Δ^5 - 3β -HSD 活性を阻止するための最も好ましい条件は、isoxazole を 6 % 含む培養液に 5 分間浸漬するか、4 % 含む培養液に 4 時間浸漬するかのいずれかであるように思われる。

2. isoxazole によつて阻止される HSD の種類

isoxazole を 6 % 含む培養液に卵子を 5 分間浸漬した後、 Δ^5 - 3β -HSD (基質, pregnenolone, 17α -hydroxypregnenolone), 17β -HSD (基質, estradiol- 17β , testosterone), 20α -HSD (基質, 20α -hydroxyprogesterone)

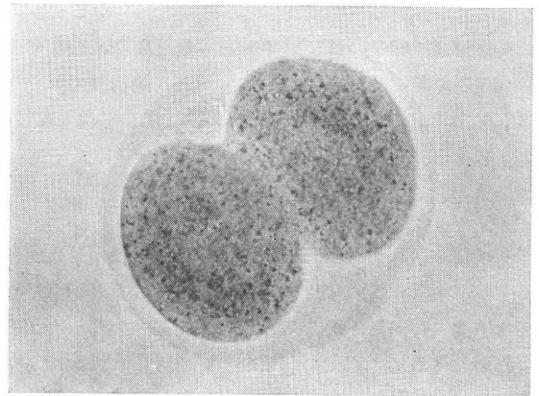


Fig. 3 Activity of Δ^5 - 3β -HSD (DHA) turned negative in a 2-celled egg incubated 5 minutes in Whittingham medium containing 6 % of isoxazole. Dickmann and Dey method. $\times 250$.

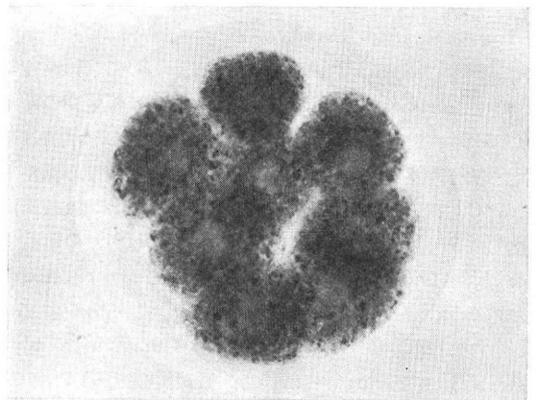


Fig. 4 Strong activity of $NADH_2$ -DH shown in an 8-celled egg incubated 5 minutes in Whittingham medium containing 6 % of isoxazole. Barka and Anderson method. $\times 250$.

及び 20β -HSD (基質, 20β -hydroxyprogesterone) の検出を試みたが、いずれの種類も HSD も検出されなかった(図 3)。なお、isoxazole で阻止される HSD の種類は 2 細胞卵子と 8 細胞卵子で同じであった。

細菌 (*Pseudomonas testosteroni*) では、isoxazole は Δ^5 - 3β -HSD と 17β -HSD の活性を抑制する効果があるといわれているが³⁵⁾、哺乳動物については Δ^5 - 3β -HSD (基質, DHA) 活性の抑制効果しか報告されていない。本実験の結果から、卵子では isoxazole は Δ^5 - 3β -HSD ばかりでなく、その他の多くの種類の HSD も阻止することが明らかとなった。

HSD の組織化学的検出は $NADH_2$ -DH または $NADPH_2$ -DH を介して出現する反応を見ているので、

Table 2 Issues on the culture of isoxazole-treated mouse eggs and of non-treated ones

	Stages of eggs cultured	No. of eggs cultured	No. of developed blastocysts	No. of undeveloped eggs
Isoxazole-treated	2-Cell	200	0(0)	200(100)
	8-Cell	200	0(0)	200(100)
Non-treated	2-Cell	200	159(79.5)	41(20.5)
	8-Cell	200	173(86.5)	27(13.5)

Numerals in parentheses show percentage

isoxazole の浸漬によつてこれらの酵素活性に影響がないことを確認するために検出を試みたが、isoxazole に浸漬した卵子においてもジホルマザン顆粒が沈着して酵素活性を示し、その強さは isoxazole を含まない液に浸漬した卵子と同様であつた(図 4)。従つて、isoxazole では HSD 活性のみが阻止され、その他の酵素は影響を受けないことが推察された。

3. 体外培養

isoxazole を 6% 含む培養液に 5 分間浸漬処理した卵子と処理しない卵子を培養して得られた成績は表 2 に示す通りである。すなわち、isoxazole 処理を行わない 2 細胞卵子と 8 細胞卵子を 200 個ずつ培養したところ、前者で 159 個(79.5%)、後で 173 個(86.5%) が胞胚に発生した。しかし、isoxazole で処理した卵子は 2 細胞期のものも、8 細胞期のものも全く発生しなかつた。

なお、isoxazole で処理した後培養した卵子に 4^5 - 3β -HSD の検出を試みても、活性は全く観察されなかつたが、NADH₂-DH と NADPH₂-DH の活性は認められた。このことは、ラット精巣で isoxazole が 4^5 - 3β -HSD 活性を 7 日間抑制していたといわれているように³⁴⁾、卵子においても抑制効果の長いことを示唆している。

以上のことから、isoxazole で卵子のステロイド合成を阻止すると、2 細胞期からの分割、8 細胞期から胞胚への変形が起こらないことが明らかとなり、卵子のステロイド合成と卵割・胞胚形成との間には密接な関係のあることが推察された。なお、これらの結果は、Dickmann and Dey²⁹⁾ が示唆しているように、卵子のステロイド合成は桑実胚から胞胚への変形を制御しているという考えを支持するものである。

文 献

- 1) Lutwak-Mann, C.: The rabbit blastocyst and its environments: physiological and biochemical aspects. In *The Biology of the Blastocyst* (Blandau, R. J. ed.), p. 243, The Univ. of Chicago Press, Chicago, 1971.
- 2) Seamark, R. F. and Lutwak-Mann, C.: Progesterins in rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 29: 147, 1972.
- 3) Fuchs, A. R. and Beling, C.: Evidence for early ovarian recognition of blastocysts in rabbits. *Endocrinology*, 95: 1054, 1974.
- 4) Dickmann, Z., Dey, S. K. and Gupta, J. S.: Steroidogenesis in rabbit preimplantation embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 72: 298, 1975.
- 5) Boland, R. M., Erickson, G. F. and Ducibella, T.: Accumulation of steroids in rabbit preimplantation blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 49: 219, 1977.
- 6) Fujimoto, S. and Sundaram, K.: The source of progesterone in rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 52: 231, 1978.
- 7) Wiel, D. F. M. and Everts, H.: Oestrogen and oestrone sulphate in the blastocyst, uterus mucosa and uterine blood at day 14 of pregnancy in the pig. *Acta Endocr. Copenh.* 85, Suppl., 212: 130, 1977.
- 8) Shemesh, M., Milaguir, F., Ayalon, N. and Hansel, W.: Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 56: 181, 1979.
- 9) Huff, R. L. and Eik-Nes, K. B.: Metabolism in vitro of acetate and certain steroids by six-day-old rabbit blastocysts. *J. Reprod. Fert.*, 11: 57, 1966.
- 10) Sugawara, S. and Takeuchi, S.: Transfer of ³H-progesterone into rabbit blastocysts and its physiological role in early development. In *Fertility and Sterility* (Hasegawa, T., Hayashi, M., Ebling, F. J. and Henderson, I. W. eds.), p. 714, Excerpta Medica Amsterdam, American Elsevier Publishing Co., Inc. New York, 1973.
- 11) Perry, J. S., Heap, R. B. and Amoroso, E. C.: Steroid hormone production by pig blastocysts. *Nature*, 245: 45, 1973.
- 12) Gadsby, J. E., Burton, R. D., Heap, R. B. and Perry, J. S.: Steroid metabolism and

- synthesis in early embryonic tissue of pig, sheep and cow. *J. Endocr.*, 71 : 45, 1976.
- 13) Singh, M. M. and Booth, W. D.: Studies on the metabolism of neutral steroids by preimplantation rabbit blastocysts in vitro and the origin of blastocyst oestrogen. *J. Reprod. Fert.*, 53 : 297, 1978.
 - 14) Dickmann, Z., Dey, S. K. and Gupta, J. S.: A new concept: Control of early pregnancy by steroid hormones originating in the preimplantation embryo. *Vitamins and Hormones*, 34 : 215, 1976.
 - 15) Flood, P. F.: Steroid-metabolizing enzymes in the early pig conceptus and in the related endometrium. *J. Endocr.*, 63 : 413, 1974.
 - 16) 新村末雄, 石田一夫: 発生初期におけるハムスター卵子のステロイド脱水素酵素の組織化学的研究, 家畜繁殖誌, 22 : 13, 1976.
 - 17) Niimura, S. and Ishida, K.: Histochemical studies of Δ^5 - 3β -, 20α - and 20β -hydroxysteroid dehydrogenases and possible progestagen production in hamster eggs. *J. Reprod. Fert.*, 48 : 275, 1976.
 - 18) 新村末雄, 石田一夫: ハムスター卵子における Δ^5 - 3β -ヒドロオキシステロイド脱水素酵素の組織化学的研究, 日畜会報, 48 : 173, 1977.
 - 19) 新村末雄, 石田一夫: 発生初期におけるウサギ卵子のステロイド脱水素酵素の組織化学的研究, 日不妊会誌, 23 : 64, 1978.
 - 20) Ishida, K. and Niimura, S.: Histochemical studies of Δ^5 - 3β -, 20α - and 20β -hydroxysteroid dehydrogenases and possible progestagen production in pig embryos. *Jap. J. Zootech. Sci.*, 49 : 295, 1978.
 - 21) 新村末雄, 佐藤栄治, 石田一夫: スナネズミの卵子における脂肪及び関連酵素の組織化学的研究, 家畜繁殖誌, 24 : 147, 1978.
 - 22) 新村末雄, 石田一夫: マウス, ラット及びモルモットの卵子におけるヒドロオキシステロイド脱水素酵素の組織化学的研究, 家畜繁殖誌, 26 : 89, 1980.
 - 23) Lauria, A., Oliva, O., Aureli, G. and Rognoni, G.: Histochemical demonstration of steroidogenic activity in preimplantation bovine embryos. *Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.*, 19 : 1631, 1979.
 - 24) 新村末雄, 石田一夫: HCG 及び prolactin がハムスター卵子のヒドロオキシステロイド脱水素酵素活性に及ぼす影響に関する組織化学的観察, 家畜繁殖誌, 25 : 126, 1979.
 - 25) 新村末雄, 石田一夫: プロスタグランジンがハムスター卵子のヒドロオキシステロイド脱水素酵素活性に及ぼす影響に関する組織化学的観察, 家畜繁殖誌, 25 : 176, 1979.
 - 26) 新村末雄, 石田一夫: ゴナドトロピン及びプロスタグランジンがブタ胞胚のヒドロオキシステロイド脱水素酵素活性に及ぼす影響に関する組織化学的観察, 家畜繁殖誌, 25 : 180, 1979.
 - 27) Dey, S. K. and Dickmann, Z.: Δ^5 - 3β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in rat embryos on days 1 through 7 of pregnancy. *Endocrinology*, 95 : 321, 1974.
 - 28) Dickmann, Z. and Dey, S. K.: Steroidogenesis in the preimplantation rat embryo and its possible influence on morula-blastocyst transformation and implantation. *J. Reprod. Fert.*, 37 : 91, 1974.
 - 29) Goldman, A. S.: Further studies of steroidal inhibitors of Δ^5 , 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and Δ^5 - Δ^4 , 3-ketosteroid isomerase in *Pseudomonas testosteroni* and bovine adrenals. *J. Clin. Endocr.*, 28 : 1539, 1968.
 - 30) Goldman, A. S.: Maternal and fetal effects of two inhibitors of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase and Δ^5 - Δ^4 , 3-ketosteroid isomerase in the rat. *Endocrinology*, 85 : 325, 1969.
 - 31) Goldman, A. S.: Effect of ACTH on enzymatic defect produced in vivo by a competitive inhibitor of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 86 : 583, 1970.
 - 32) Goldman, A. S.: Specific retention of an inhibitor of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase in enzyme-containing tissues of the rat. *Endocrinology*, 86 : 678, 1970.
 - 33) Goldman, A. S. and Kenneck, C. Z.: Persistence of label in rat offspring after maternal administration of a ^{14}C -labeled inhibitor of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology*, 86 : 711, 1970.
 - 34) Begne, R. -J., Gustafsson, J. -A. and Goldman, A. S.: New potent inhibitors of 3β -hydroxy- Δ^5 -steroid oxidoreductase with short duration of action. *Endocrinology*, 95 : 238, 1974.
 - 35) Goldman, A. S.: Inhibition of 3β -hydroxy- Δ^5 -steroid dehydrogenase. In *Hormones and Antagonists* (Hubinont, P. O., Hendeles, S. M. and Preumont, P. eds.), p. 213, S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York and Sydney, 1972.
 - 36) Whittingham, D. G.: Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert.*, Suppl., 14 : 7, 1971.
 - 37) Dickmann, Z. and Dey, S. K.: Two theories: the preimplantation embryo is a source of steroid hormone controlling (1) morula-blastocyst transformation, and (2) implantation. *J. Reprod. Fert.*, 35 : 615, 1973.
 - 38) Baillie, A. H., Ferguson, M. M. and Hart, D. McK.: *Developments in Steroid Histochemistry*, p. 1, Academic Press, London and New York, 1966.
 - 39) Barka, T. and Anderson, P. J.: *Histochemistry*, p. 296, Hoeber Medical Division,

Harper and Row, Publishers, Inc., New York, Evanston and London, 1965.

Failure in cleavage and blastocyst-transformation in steroid synthesis blocked mouse eggs

Sueo Niimura and Kazuo Ishida

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University

In order to examine the physiological role of steroid synthesis in eggs in cleavage and blastocyst-transformation, culturing was performed on 2-celled and 8-celled mouse eggs whose activity of hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) had been inhibited by isoxazole.

As the first of the preliminary tests, the minimum conditions necessary to inhibit HSD activity in eggs at 2-cell and 8-cell stages were decided to be the two following: either incubation for 5 minutes in Whittingham medium containing 6% of isoxazole, or incubation for

4 hours in the same medium containing 4% of isoxazole.

As the second of the preliminary tests, the inhibitory effect of isoxazole was checked, and it was such that the activities of Δ^5 -3 β -HSD (DHA, pregnenolone and 17 β -hydroxypregnenolone as the substrates), 17 β -HSD (estradiol-17 β and testosterone), 20 α -HSD (20 α -hydroxyprogesterone) and 20 β -HSD (20 β -hydroxyprogesterone) in eggs were wholly inhibited by isoxazole, but those of NADH₂ dehydrogenase and NADPH₂ dehydrogenase were not.

Our investigation showed that the success rate with intact 2-celled eggs in cleavage and blastocyst-formation was 79.5% and that with intact 8-celled eggs in the latter activity was 86.5%, while the rates with the HSD-inhibited mouse eggs were 0% in the both activities. The results seem to suggest that there is almost an unconditional relationship between steroid synthesis in eggs and cleavage or blastocyst-transformation.

(受付: 昭和55年9月26日)

初期胚の分化と細胞周期との相関に関する研究

Cytofluorometric Studies on the Correlations between Differentiation and Cell Cycle of the Murine Embryo

慶応義塾大学医学部産婦人科

北井啓勝 鈴木秋悦 飯塚理八
Hiroktsu KITAI Shuetsu SUZUKI Rihachi IIZUKA

Department of Obstetrics and Gynecology
School of Medicine, Keio University

初期胚において分割球の分裂の順序が分化を決定し、4細胞期に最初に分裂した細胞は内細胞塊となる傾向があるという報告がなされている。本実験では蛍光測光法を用い、マウス胚の細胞周期を測定し、各分割球の細胞周期のずれについて検討した。

7 mg/dl の propidium iodide にて30分染色の後、胚を25 μ m 間隙のカバーガラスとスライドガラス間に置き核の部分のみを測光、細胞質の蛍光との差を求めた。この値は DNase により除去される蛍光量に一致し、DNA による蛍光と考えられた。DNA 量の基準としては、3ないし5細胞胚の分裂直前の核を用いた。

細胞周期は、2細胞期にはG₁期ほぼ0時間、S期6時間、G₂期12時間、4細胞期にはG₁期ほぼ0時間、S期6~7時間、G₂期3時間となり、G₁期の認められぬことと2細胞期の長いG₂期が特徴的であった。分割球相互の細胞周期のずれは、4細胞期のS期にあたる hCG 投与57時間後の胚で有意に認められた。

(*Jap. J. Fert., Ster.*, 26(2), 148-154, 1981)

I はじめに

受精より着床に到る初期発生の期間に、受精卵は胞胚へと分化する。この胞胚は内細胞塊と栄養芽細胞という二種類の細胞から出来ている。透明層を除去した後に胚を融合させるキメラの実験により、胚の表面に位置し外界と接触している分割球は栄養芽細胞となり、分割球でとり囲まれた胚の内部にある細胞が内細胞塊となることが明らかにされた¹⁾。また生化学的に内細胞塊に特有はなタンパク質も見出された²⁾。このような分化の現象は、細胞のDNA合成および分裂、すなわち細胞周期と密接に関連することが推定される。

比較的研究が進んだウニの初期胚の細胞周期には次のような特色がある³⁾。すなわち、受精後に形成された各前核のDNA合成、細胞の成長等に必要と考えられるG₁期の欠如、受精より第一分裂までの期間が60分以後の一周期は40分に短縮するなどである。DNA合成にはタンパク合成依存性があり、普通の細胞ではG₁期

にこのタンパク合成がおきるが、初期胚ではG₂期がこれに相当すると考えられる。

マウスについては、オートラジオグラフィ、cytometry⁴⁾により細胞周期の検討がなされてきた。DNA合成は受精後9時間に雄性および雌性前核において始まり約4時間つづく^{5,6)}。合成後約4時間で第1分裂がおきるが、次の2細胞期以後のG₁期とG₂期については、意見が一定していない。G₁期については、2~16細胞期には見出されないとする報告^{7,8)}と、2~4細胞期に既に存在するという報告^{9,10)}がある。また、第2細胞期のG₂期は約15時間にわたり非常に長いとする報告^{9,10)}と、4時間に過ぎないとする報告⁹⁾がみられる。

蛍光測光法は、試料を蛍光色素で染色後ある特定の波長の光を照らして励起し、発する蛍光を測定してその量を定量する方法である¹⁰⁾。光の吸収を用いた方法と異なつて試料の平面上の分布に影響をうけないという特色をもち、また、試料の蛍光観察により測定と同時に核小体をふくむ核の内部構造を検討できるという利点がある。

マウス胚については、抽出された DNA の測定に使われた¹¹⁾が、個々の細胞核を測光した報告はなされていない。

今回の実験では、DNA の染色に propidium iodide¹²⁾ (以下 PI と略す) を用い、DNase, RNase 等を用いて染色物質の同定を試み、又、細胞質の染色および自然蛍光に対しても検討を加えた。そして、マウス胚の第 2 および第 3 細胞周期の各期の測定を行い、オートラジオグラフィおよび cytophotometry の結果と比較した。また単一の胚の各分割球の細胞周期のずれにつき、S 期の核 DNA 量を比較することにより検討し、以後の分化にもたらす影響について考察した。

II 実験方法

Zeiss の万能顕微鏡に、MPM 0 1 の光量計と HBO 100 の水銀灯を取りつけ、電源には安定光電源を用いた。光量計は、視野の特定の部分のみを測定できるような絞りが付いており、2 細胞期の核には 1mm、4 細胞期の核には 0.63mm の口径を使用した。また、紫外線による照明光線についても、測定する核のみに光があたるように絞りを付けた。測定装置には、3 つの連動シャッターが付き、観察用の可視光線、紫外線、光量計もしくは接眼レンズへの光路を制御する。試料は位相差像により可視光線で測定部位を決定の上、紫外光にて蛍光測光され、測光の時間は機械的にごく短期間に制限されている。このため紫外光線による蛍光の低下は殆んど無視できる¹³⁾。

PI の蛍光測定の際は、紫外光線つまり励起光には 546 m μ の光を透過するフィルターを入れ、測定部すなわち蛍光の通路には 580m μ 以上の光を透過させるフィルターを入れ蛍光のみを測定した。また蛍光値の較正には、Zeiss の標準板 GG 17 を対物レンズに付け、370~460 m μ のフィルター BG 12 を通過した励起光を用い、500 m μ 以上のフィルターを測定側に付け、値が 100 を示すようにした。

マウス胚は、ddy 系 8~12 週の雌を 5 単位の PMS 腹腔内投与後 48 時間に、5 単位 hCG 投与と同時に雄と支配し、所定の時間の後頸椎脱臼によりと殺し卵管より採取した。2% のグルタル・アルデヒドを含む pH 7.4、0.1M のリン酸緩衝液中で固定した後、10% の緩衝ホルマリン液中で保存した。透明層は測定までにハンクス液に溶解した 0.3% pronase 液中で除き、蛍光測光までの期間は 2 週間以内とした。胚は所定の濃度の PI 液中で染色後、25 μ m の厚さにカバーガラスとスライドガラスの間で圧迫して測定器に移した。カバーガラスの四隅には、25 μ m 径ラテックス粒子 (Polyscience) を含むワセリンを付け、間隔を一定とした。また、乾燥

を防ぐためカバーガラス周囲は透明マニキュアにより封印した。

適当な PI の染色濃度と染色時間を知るために、PI を 5mM、pH 9.1 のトリス緩衝液にて、3.5、7、および 14mg/dl の濃度に溶解し、hCG 投与後 48 時間に採取した 2 細胞胚を各 20 個づつ染色し、同じ染色液のまま封入して蛍光値を、20、35、および 60 分後に測定した。

次に PI により染色される物質が DNA か否かを検討するため、一度 PI で染色した胚を 2mg/dl の DNA ase (Sigma) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に入れた後封入し、37°C 中に置き蛍光値の低下を見た。PI の染色は、緩衝液中では溶出してしまうため、染色した胚をトリス緩衝液および PBS 中に移した標本を対照として蛍光を測定し、また、DNase により蛍光値が最低となった胚をさらに PI 溶液中に戻し、蛍光値の戻りを測定した。

PI は 2 重鎖 RNA を染色するとの報告もあるため、染色前の胚を 4mg/ml の RNase (Sigma) を含む PBS 中に入れ 37°C で処理後染色、蛍光値の減少を測定した。対照としては、トリス緩衝液を用いた。PI の濃度は 7mg/dl とし、80 分および 130 分 RNase 処理した胚を使用した。

胚は球状であり、25 μ m の間隙に圧迫したとしても細胞質は通常の培養細胞に比較してかなり厚い。細胞質の PI 染色性を見るため、核の部分と同大の視野で細胞質の蛍光値を求めた。また、PI 染色以外の自己蛍光 auto-fluorescence を同様の視野で核と細胞質について測定した。詳細は後述するが、核の領域の蛍光値より、細胞質の領域の蛍光値を除いた値を核の DNA 量と考えた。

以上のような胚の核 DNA 量に関する予備実験を基に、2 細胞期および 4 細胞期の核 DNA 量を測定した。胚は、hCG 腹腔内投与後 30~66 時間のマウスより、3 時間毎に採取し各時刻における 2 細胞胚と 4 細胞胚の割合を求めた。DNA 量の標準としては、3 細胞胚ないし 5 細胞胚などの中の分裂前の核の DNA 量を、分裂直前とみなし 4C とした。また、一部の胚の核を、PI の測定には影響をおよぼさない 0.03mg/dl FITC を含むトリス緩衝液であらかじめ染色しておき、これを基として各封入標本間の比較を行って DNA 量を求めた。

hCG 投与後 30 時間 (30p.i.h) と 36 時間の 2 細胞胚、また hCG 投与後 57 時間と 63 時間の 4 細胞胚については、各胚ごとの分割球の核 DNA 量を大小の順で分け、各の平均値を求めて比較し、一つの胚の中での細胞周期のずれについて検討した。胚は各々 10 個ずつ用い、圧迫などの操作中に分離し胚の由来を決定できない分割球は



図 1 マウス 3 細胞胚 (450×). PI 染色

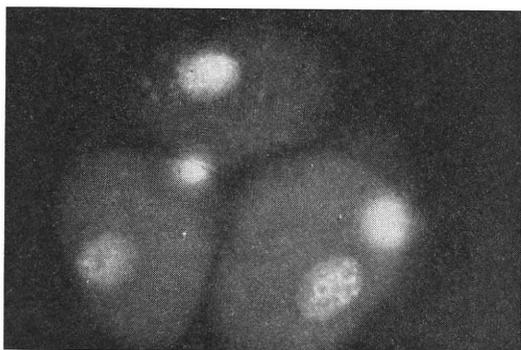


図 2 マウス 4 細胞胚 (450×). PI 染色

測定より除いた。

III 実績成績

胚を PI にて染色すると、図 1, 2 のように核および染色体が明瞭に染まる。核内には、核小体が染色されない円形の領域として認められ、このような明瞭な核小体はマウス胚の特徴である。細胞質は通常の扁平な培養細胞に比べ蛍光が強く、やや顆粒状に染まる。豊富な細胞質と球状という形態が、細胞質が良く染まる原因であろう。図 2 は 4 細胞胚であるが、圧迫が不足しており分割球間の重なりが強い。このような標本では DNA 定量は不正確になる。図 1 は 3 細胞胚であり、1つの分割球は分裂中期にある。この時期の分裂直後の 2つの分割球の核は、一応 2C の DNA 量の標準になると考えた。

図 3 は各 PI 濃度における核の領域の蛍光値を、平均値と標準偏差を示してある。単位は方法に述べたように校正した後、測定機に表示された値を A.U. (arbitrary unit) として示した。PI の蛍光は、20分で既に飽和に達し、以後60分間まで観察しても変化は見られない。また、胚の核では PI 濃度により DNA の染色性は変化する。したがって今回の実験では、染色時間を最低30分間とし、7 mg/dl の濃度を用い、染色液の

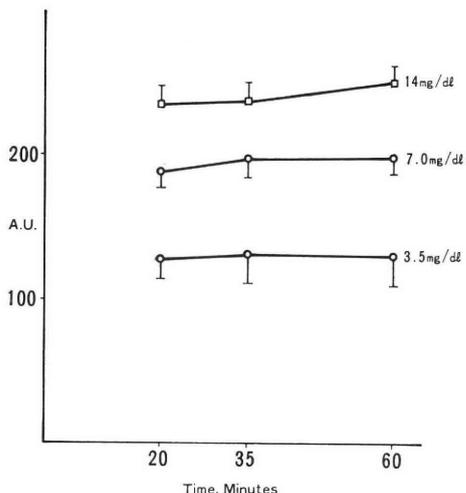


図 3 Relationship of Fluorescence Intensity with Propidium Concentration and Staining Time

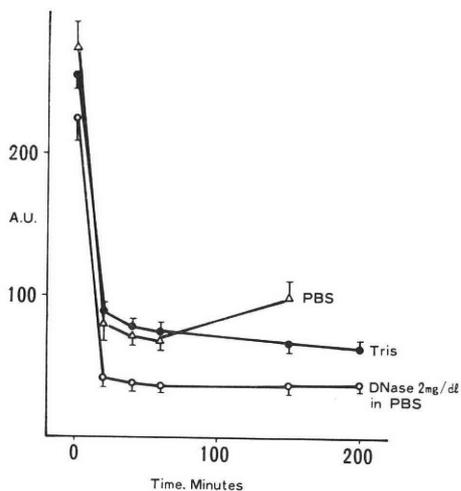


図 4 Fluorescence Intensity in DMase solution, PBS and Tris buffer after Propidium Staining

希釈と濃縮の防止に努めた。

DNase 溶液にて染色した胚を処理すると、図 4 の如く約 50 分で蛍光は低下するが、完全にゼロにはならず、17% 程の蛍光は残る。しかし、対照としての PBS やトリス緩衝液に比べて著しく低下し、200 分後にはトリス緩衝液中の胚の蛍光の半分になる。この胚を再び PI 液中に戻すと、蛍光は DNase 処理前の 54% となった。また蛍光顕微鏡下で観察すると、核の輪郭は完全に失われていた。

RNase 溶液において、80 分間および 130 分間処理した

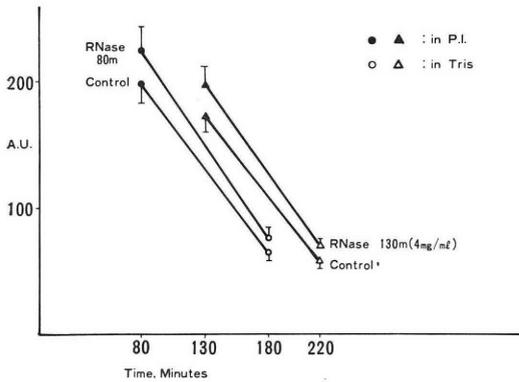


図 5 Fluorescence Intensity after RNase Treatment and its Decrease in Tris buffer

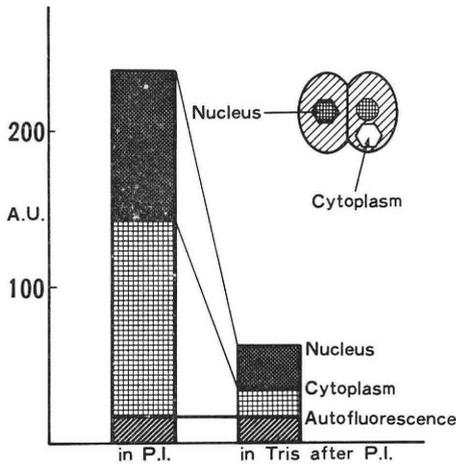


図 6 Fractions of Fluorescence Intensity

胚とも対照との有意差はみられなかった。また、染色後トリス緩衝液に移した後も、蛍光に相違は見られなかった。顕微鏡下では、RNase 処理後も対照と同様に核小体が認められ、核と細胞質の蛍光の比にも変化はみられなかった(図5)。

次に、核周囲の細胞質の蛍光値および未染色の胚の自己蛍光を測定すると、それぞれ核の領域の蛍光値の60%、7%となった。この細胞質の蛍光値は、DNase 処理後の蛍光値に匹敵し、胚は細胞質に PI に染まる成分を相当量持つことがわかる。また、7%の自己蛍光は、他の細胞に比べて高く、DNA 測定には PI 染色後その溶液のまま測定すべきことを示している(図6)。自己蛍光の値は、細胞の厚さと相関し、核と細胞質間の差は認められない。したがって核 DNA 量は、核の領域の蛍光値より、核周囲の細胞質部分の蛍光値を除いた値に比例すると考えた。

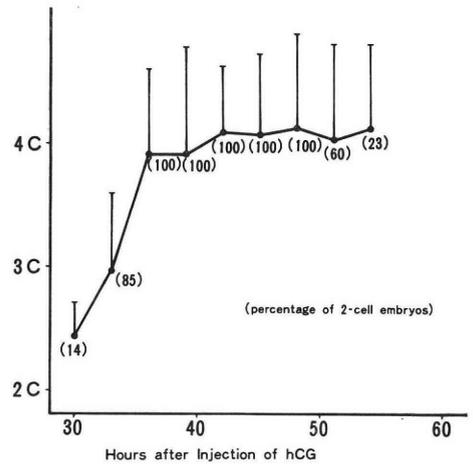


図 7 Nuclear DNA content in the 2-cell Embryo

2細胞期の核 DNA 量を3時間毎に図7に示した。()内はその時点の2細胞胚の比率を示している。hCG 投与後27時間には2細胞胚はみられず、30時間に出現した2細胞胚の DNA 量は2C以上であることから、G₁期は存在しないか非常に短かく、分裂後すみやかにS期に移ることがわかる。S期は約6時間であり、次のG₂期が約12時間と2細胞期の世代時間の3分の2を占める。各時点の DNA 量の標準偏差を縦線で示してあるが、0.3~0.8Cと大きい。また、胚の比率にみられるように、2細胞胚の出現時期にも比較的幅が認められる。

4細胞胚の核 DNA 量の値は図8のようになり、やはり G₁期は非常に短いことを示している。世代時間は、50%の卵が4細胞胚である時期をとると約10時間となり、G₂期は2細胞期より短かく、3~4時間になるものと推定される。S期は、DNA 合成速度から考えて、第2細胞周期より少し長くなると思われる。DNA 量の標準偏差は0.4~1.0Cとなり、2細胞期より大きくなり、また実測値では、4分割球のうち2個ずつがほぼ同じ値を示す胚が多くみられた。

同じ胚の中の分割球の核 DNA 量を比較するため、それぞれの胚の核 DNA 量に順位をつけ同じ順位ものを平均した値を表に示す。2細胞胚では、単一胚の各分割球の DNA 量には有意差は認められないが、4細胞胚ではhCG 投与後57時間(57h p.i.h.)には、最大のDNA 量をもつ分割球と最小のものとの間に、 χ^2 検定で $p < 0.05$ にて有意の差が認められた。この時期は図8に示すように、4細胞期のS期に相当する。63時間後には、DNA 量が4Cを超える核もみられるが、前述の標準を用いた時の結果としてそのまま示した。

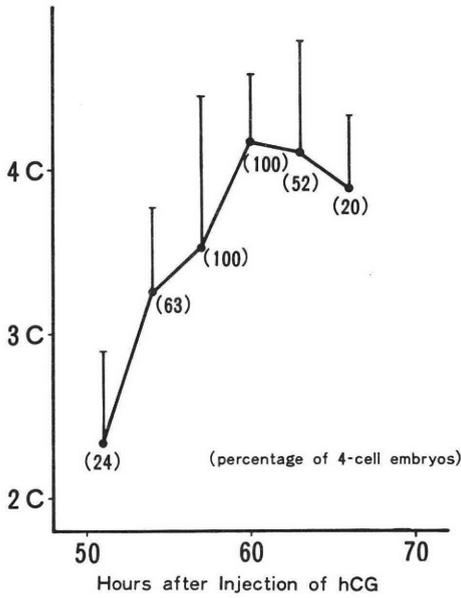


図 8 Nuclear DNA content in the 4-cell Embryo

表 1 Nuclear DNA Contents of Each Blastomere in an Embryo

2-cell Embryo	30h p.i.h.	2.55±0.45	2.33±0.51
	32h p.i.h.	3.81±0.24	3.67±0.25
4-cell Embryo	57h p.i.h.	3.47±0.25*	3.23±0.18
		3.10±0.15	2.99±0.17*
	63h p.i.h.	4.08±0.28	3.97±0.30
		3.75±9.35	3.64±0.35

* P<0.05

IV 考 察

現在までにマウス胚の細胞周期は、オートラジオグラフィと cytophotometry により測定されてきた。オートラジオグラフィには、³Hチミジンが用いられてきたが、これには胚の細胞膜の透過性が一定しないとの報告もあり、他に、細胞質の厚さによる乳剤の感光の減少、また、標識時の体外培養の細胞周期への影響などの問題が残されている。cytophotometry については、詳細な測定方法は不明であるが、試料の分布の差による誤差が伴い、またこれに用いられる Feulgen 反応では PI ほど充分な N/C 比が得られないと思われる。蛍光測光法を胚に応用するにあたっての問題は、細胞質の蛍光であり、前述のように25μmの厚さに圧迫することと、核と細胞質の蛍光の差をとることにより、胚の細胞周期測定への応用が可能となった。マウス胚の DNA は、

無脊椎動物胚と異なり、染色質つまり核内に集中するといわれている¹¹⁾。また、DNase 処理の結果でも細胞質の PI 染色性は変化せず、細胞質部分の蛍光は DNA によるものではない。核領域の蛍光のうち細胞質由来の部分は、核周辺の細胞質の蛍光に等しいと推測される。したがって、核と核周辺の細胞質との蛍光値の差は、核 DNA 量と相関すると考えられる。胚の自己蛍光は、差をとる際に相殺されることになる。

胚の細胞周期測定におけるもう一つの問題は、発生時期の同調の困難さである。同調に関しては受精の時期を制限する必要があるが、交配時期を区切つても排卵の時期を短期間に集中させることはできない。今回の実験では、ゴナドトロピン投与による同調を試みたが、発生時期のずれは同一動物由来の卵にも認められた。

細胞周期の各期の値については、測定間隔が3時間と長く結論的なことはいえないが、2細胞期、4細胞期ともに G₁ 期が非常に短いことは、cytophotometry⁹⁾の報告およびオートラジオグラフィ⁷⁾の報告に一致している。G₁ 期は桑実期より出現し^{7,9)}細胞周期の調節および分化に関与するといわれ、この時期に G₁ 期が欠如することは胚の分割球がすべての胚への分化能 (totipotency) を保つたまま分裂することと関係すると思われる。G₁ 期を正確に同定するには、BUdR 取り込みによる色素 Hoechst 33258 の染色性の変化を蛍光測光法に応用する必要がある。S 期は2細胞期、4細胞期とも6~7時間で、4細胞期が少し長いことは cytophotometry¹⁰⁾の結果と一致する。S 期は前核の4~5時間と比べると延長する傾向がみられる。G₂ 期に関しては、2細胞期では約12時間と長く、cytophotometry の結果と一致する。しかし、オートラジオグラフィによる測定では、2細胞期より桑実期まではほぼ4時間と一定になるという報告もみられる。2細胞期は、受精後では最初の通常の細胞周期であり、G₁ 期の欠如している初期胚の分裂に必要な成分が合成されると推測される。マウス体外受精胚は、しばしば2細胞期にて分裂を停止するが、長い G₂ 期と代謝との関連が興味深い。2細胞胚の S 期にはほぼ同調していた分割球の細胞周期が、4細胞期でずれてくる要因の一つにこの G₂ 期の差が推測される。

同一胚の各分割球間の細胞周期のずれは、cytophotometry でも同様に4細胞期より認められる¹⁰⁾。この報告では、各分割球の DNA 量の比率を経時的に比較しているが、細胞周期のずれは S 期初めには認められていない。しかし、図1の如く3細胞の時期も存在し、細胞周期は S 期以前よりずれているはずである。この細胞周期のずれは、内細胞塊と栄養芽細胞の分化に関与すると思われる。Kelly¹⁴⁾の報告では、4細胞胚の中で最初に分

割した細胞した細胞は、内細胞塊に分化する傾向があるという。早く分裂した細胞は、より早く細胞間結合¹³⁾を作る能力を持ち、内側に位置する可能性が高いと思われる。内細胞塊および栄養芽細胞の細胞周期の相違は未だ十分に検討されていないが、分化と細胞周期の相違を知る上で注目される。

蛍光測光法はこれまで培養細胞のような扁平な細胞に用いられてきたが、本実験で示されたように球状の胚細胞にも充分応用が可能である。同時に染色体および核小体などの構造が観察できるので、より多くの情報を得られる。また、測定する細胞数が少くとも、顕微鏡下ですべてを測定できる利点がある。卵胞卵の成熟の際の物質合成についても、胚と同様に未知の部分が多いが、蛍光測光法は有効な測定方法になると思われる。

文 献

- 1) Hillman, N., Sherman, M. I. and Graham, C.: The effect of spatial arrangement on cell determination during mouse development. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 28, 263-278, 1972.
- 2) Van Blerkom, J., Barton, S. C. and Johnson, M. H.: Molecular differentiation in the preimplantation mouse embryo. *Nature*, 259, 319-321, 1976.
- 3) 真野嘉長: 初期卵割期における高分子合成の調節, 初期発生における細胞, 88-158, 1971, 岩波書店.
- 4) Sawicki, W., Rowinski, J. and Abramczuk, J.: Image analysis of chromatin in cells of preimplantation mouse embryos. *J. Cell Biol.* 63, 227-233, 1974.
- 5) Luthardt, F. W. and Donahue, R. P.: Pronuclear DNA synthesis in mouse eggs. *Exp. Cell Res.* 82, 143-151, 1973.
- 6) Abramczuk, J. and Sawicki, W.: Pronuclear synthesis of DNA in fertilized and parthenogenetically activated mouse eggs. *Exp. Cell Res.* 92, 361-372, 1975.
- 7) Gamow, E. I. and Prescott, D. M.: The cell life cycle during early embryogenesis of the mouse. *Exp. Cell Res.* 59, 117-123, 1970.
- 8) Mukherjee, A. B.: Cell cycle analysis and X chromosome inactivation in the developing mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1608-1611, 1976.
- 9) Luthardt, F. W. and Donahue, R. P.: DNA synthesis in developing two-cell mouse embryos. *Dev. Biol.* 44, 210-216, 1975.
- 10) Sawicki, W., Abramczuk, J. and Blaton, O.: DNA synthesis in the second and third cell cycles of mouse preimplantation develop-

ment. *Exp. Cell Res.* 112, 199-205, 1978.

- 11) Olds, P. J. Stern, S. and Biggers, J. D.: Chemical estimates of the RNA and DNA contents of the early mouse embryo. *J. Exp. Zool.* 186: 39-46.
- 12) Stöhr, M., Vogt-Schaden M., Knobloch, M., Vogel, R. and Futterman, G.: Evaluation of eight fluorochrome combination for simultaneous DNA-protein flow analysis. *Stain technol.* 53, 205-215, 1978.
- 13) Cowell, J. K. and Franks, L. M.: A rapid method for accurate DNA measurements in single cell in situ using a simple microfluorimeter and Hoechst 33258 as a quantitative fluorochrome. *J. Histochem. Cytochem.* 28, 206-210, 1980.
- 14) Kelly, S. J., Mulnard, J. G., and Graham, C. F.: Cell division and cell allocation in early mouse development. *J. Embryol. Exp. Morph.* 48, 37-51, 1978.
- 15) Ducibella, T.: Surface changes of the developing trophoblast cell. In *Development in Mammals* ed. by M. H. Johnson. vol. 1. 1-32, 1977.

Cytofluorometric studies on the correlations between differentiation and cell cycle of the murine embryo

Hirokatsu Kitai, Shuetsu Suzuki
and Rihachi Iizuka

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

Asynchronous division during mouse preimplantation development has been supposed to relate to differentiation of blastomeres to the inner cell mass and the trophectoderm of the blastocyst. This study is aimed to investigate the second and third cell cycles of the murine embryo and the quantitative measurement of asynchrony in each embryo in vivo by cytofluorometry.

Cytofluorometric measurement of the nuclear DNA content of blastomeres was performed after they were stained by propidium iodide and placed in the gap of 25 μ m between the cover glass and the slide. Because of small nucleocytoplasmic ratio of fluorescence, irradiated and photometric fields of the blastomeres were restricted to each nucleus as possible. Propidium concentration of 7.0 mg/dl and staining time of 30 minutes were selected for measurement. Nuclear DNA content appeared proportional to the nuclear fluorescence intensity subtracted by the cytoplasmic intensity around nuclei, as this frac-

tion of intensity was consistent with the intensity digested by DNase. DNA content of nuclei immediately before mitosis in 3- or 5-cell embryos was used as a reference for 4C DNA content observing their nuclear morphology by fluorescence microscope.

During the 2-cell stage the G_1 period was very short and possibly absent. The S period was about 6 hours before the considerably long G_2 period extending for 12 hours. In the 4-cell stage the G_1 period was also very short and the S period was about 6-7 hours. In contrast to the second cell cycle the G_2 period was about 3 hours.

DNA content of respective blastomeres in the embryo was compared after averaged in order of its content. Mean values of nuclear DNA content of 2-cell embryos were 2.55C and 2.33C 30 hours post injection of hCG (30 h p. i. h.), and 3.81C and 3.67C 36 h p. i. h. Those of 4-cell embryos were 3.47C, 3.23C, 3.10C and 2.99C 57 h p. i. h., and 4.08C, 3.97C, 3.75C and 3.64C 63 h p. i. h. These data suggested that although slight asynthronous synthesis of DNA might be found during the 2-cell stage, significant asynchrony appeared in the S period of the 4-cell stage.

(受付: 昭和55年12月22日)

月経周期における 20α -hydroxypregn-4-en-3-one の変動について

Changes in Plasma 20α -Hydroxypregn-4-en-3-one during the Menstrual Cycle

横浜市立大学医学部産婦人科学教室

白 須 和 裕 松 山 明 美 植 村 次 雄
Kazuhiro SHIRASU Akimi MATSUYAMA Tsuguo UEMURA

Department of Obstetrics and Gynecology
Yokohama City University, School of Medicine

正常月経周期を有する婦人10名を対象に、 20α -hydroxypregn-4-en-3one (20-OHP) を Radioimmunoassay を用いて経日的 (一部8時間おき) に測定した。同時に LH, FSH, estradiol (E_2), progesterone (P), 17α -hydroxyprogesterone (17-OHP) も測定し、20-OHP との関係について検討した。20-OHP の平均濃度は、月経期に 0.70 ± 0.55 ng/ml, 卵胞期 0.46 ± 0.20 ng/ml, 黄体期 3.10 ± 1.85 ng/ml であった。P, 17-OHP との相関が認められたが、P との相関の方が高く $r=0.6378$ ($p<0.001$) であった。日内変動について検討したが、17-OHP ほどには著明な変動はない。排卵期周辺において17-OHP, P は LH peak 前に、20-OHP は peak 後に有意の上昇を開始し、20-OHP はP にやや遅れて近似した変動を示す傾向がある。今回の成績からは正常月経周期における LH surge 発現に、20-OHP の積極的関与を示唆する結果は得られなかった。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 155-160, 1981)

排卵期周辺をめぐる各種ステロイドの動態について、現在まで多くの報告がなされてきた。Progesterone (P) の誘導体である 17α -hydroxyprogesterone (17-OHP) の動態については estradiol (E_2) の低下と17-OHP の上昇に密接な関係があり、LH surge への関与が示唆されてきた^{1,2)}。一方、P の20ketone 還元により生ずる 20α -hydroxypregn-4-en-3-one (20-OHP) については、未だその生理的意義に不明の点が多い。そこで今回、我々は月経周期における20-OHP の変動について研究をおこない、併せて LH, FSH, E_2 , P, 17-OHP との関係について若干の知見を得たのでここに報告する。

研究対象

研究対象は正常月経周期を有する健康な婦人10名で、可及的、経日的に採血し、一部症例では排卵期周辺において8時間毎に経時的採血をおこなった。また3例の排卵障害婦人についても、排卵誘発時に経日的採血により20-OHP の測定をおこなった。

測定法は図1に示す如く、20-OHP-3-oxime-BSA に

対する抗血清 (帝国臓器製) を用い、神戸川らの方法³⁾ に準じて radioimmunoassay を用いておこなった。hexane : benzene : methanol (80 : 10 : 10) の solvent system を使用してのP と17-OHP の分離は図2に示すごとく良好であり、4000倍希釈の抗血清を用いて得られた標準曲線は図3に示すごとく良好なものであった。

研究成績

(i) 正常月経周期における20-OHP の変動

対象婦人6名における末梢血中の20-OHP 濃度は表1に示すごとく月経期において 0.70 ± 0.55 ng/ml (mean \pm S.D., $N=17$), 卵胞期 0.46 ± 0.20 ng/ml ($N=46$), 黄体期 3.10 ± 1.85 ng/ml ($N=37$) であり、卵胞期に比して月経期にやや高値を示すが、これは20-OHP が月経開始日にまだ黄体期末期の高値を持続しているためで、ちなみに月経開始日における平均20-OHP 濃度は 1.32 ng/ml であるのに対してP 0.48 ng/ml, 17-OHP 0.19 ng/ml である。

経日的に測定した6症例の平均20-OHP 濃度の変動を

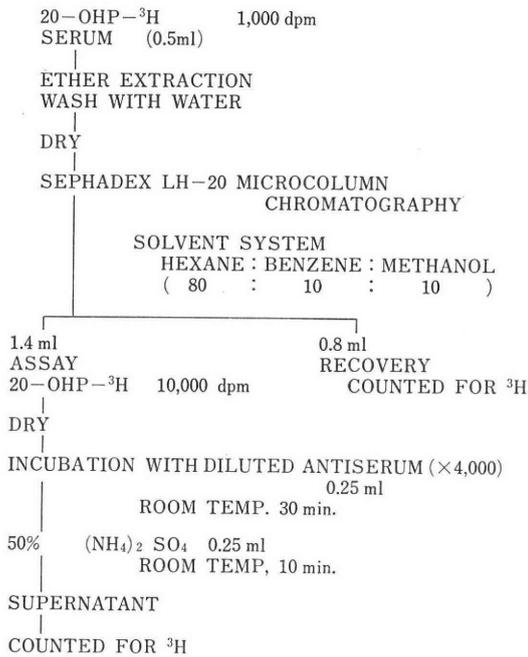


図1 20-OHP 測定法

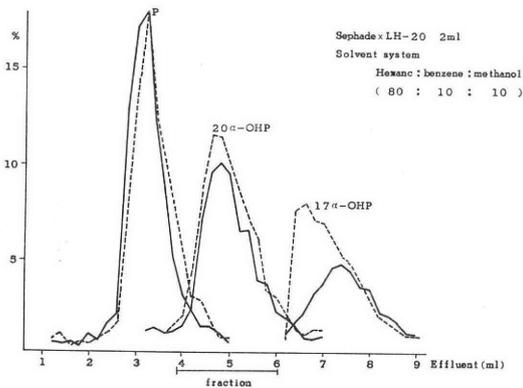


図2 カラムクロマトグラフィーによる progesterin の溶出部位

LH peak 時を 0 day としてあらわしたのが図4である。この図に斜線で図示したのはPの変動範囲 (mean+S.D.~mean-S.D.) である。月経周期において、E₂, P, 17-OHP のそれぞれと20-OHP との相関についてみると、一番相関が高いのはPとの間で $r=0.6378$ (N=103), 次いで17-OHP $r=0.5404$ (N=98) で、共に有意水準0.001で有意の相関があったが、E₂とは有意の相関が認められなかつた。また、0 day に一致して20-OHP は一過性の小さな peak を形成することが認められた。しかし、全体としては20-OHP はPと近似した変動を示しており、黄体期における20-OHP の最高値は+9 day で平均 $6.70 \pm 1.70 \text{ ng/ml}$ であつた。経日的に測定した症例

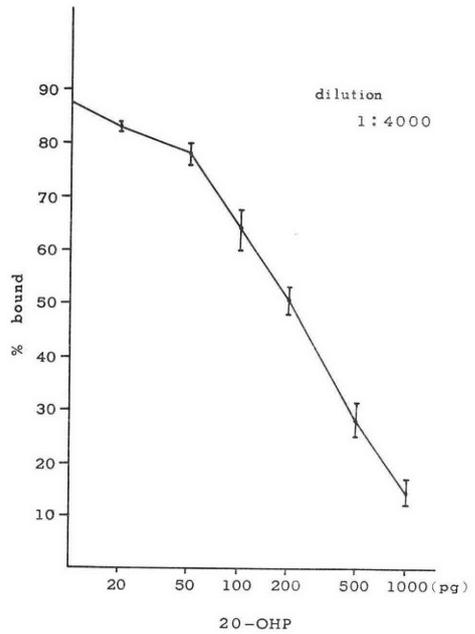


図3 標準曲線 (mean±S.D., N=6)

表1 月経周期における20-OHP の測定値

	N	mean±S.D.
bleeding	17	0.70±0.55ng/ml
follicular	46	0.47±0.20 //
luteal	37	3.10±1.85 //

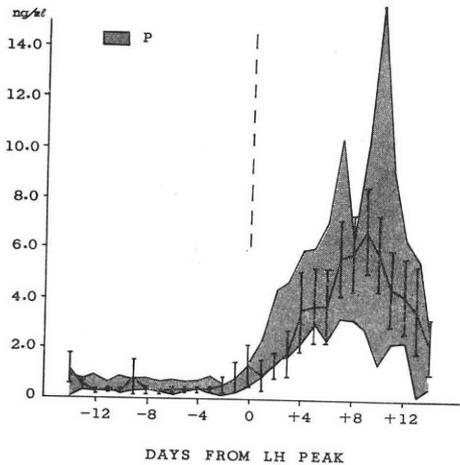


図4 月経周期における20-OHP の変動 (mean±S.D.)

の1例を図5に示した。0 day に20-OHP の小さな peak がみられる。P, 17-OHP, 20-OHP の上昇開始の順位に注目すると、17-OHP が-2 day から立ちあがり一番早く、次いで-1 day からPの急激な上昇が起り、

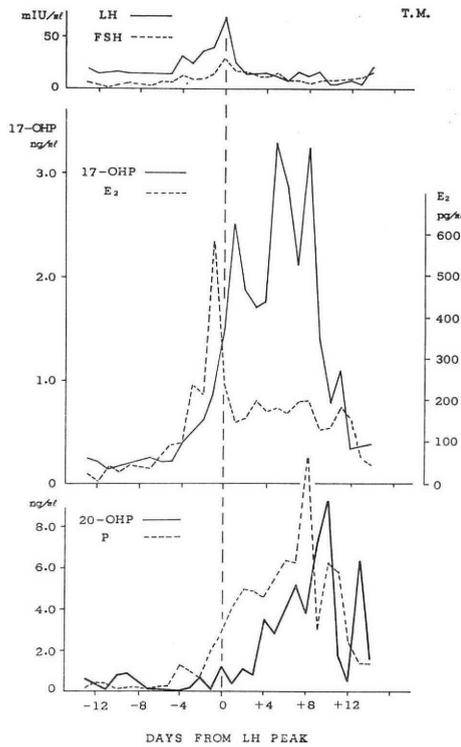


図 5 月経周期における経日測定 of 症例

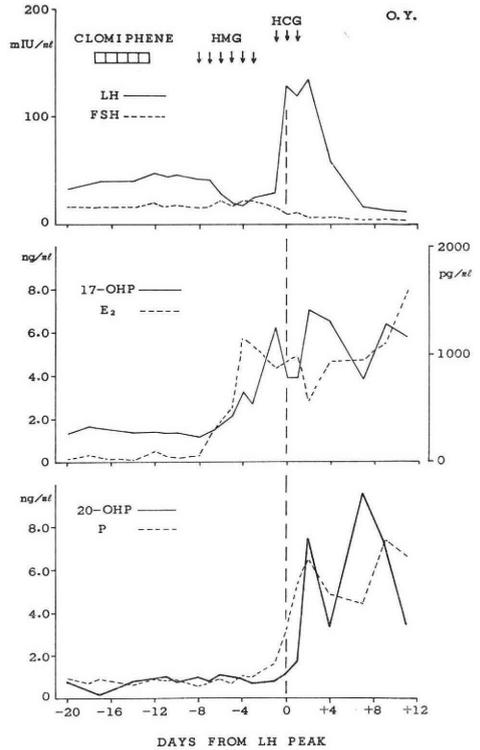


図 6 排卵誘発時測定の一症例

20-OHP が +4 day と一番遅く上昇気運を示した。また、P と 20-OHP の関係を見ると、20-OHP は P の上昇パターンに 1 ~ 2 日遅れる形で P に近似した上昇を示した。また、黄体期の一部に P と 20-OHP の reverse relationship が認められた。

(ii) 排卵誘発時における 20-OHP の変動

3 例の排卵障害婦人について、排卵誘発時における各種ホルモンの変動を測定した。図 6 に示した 1 例は clomiphene-HMG-HCG を用いた排卵誘発例で、17-OHP は比較的早期より上昇がみられるが、P の上昇は HCG 使用時から認められ、それにやや遅れて 20-OHP の急激な上昇がはじまっている。この 3 種類の progestin の上昇順位は正常周期の際に認められたのと同様の順位であり、この場合も P と 20-OHP はほぼ平行して変動を示した。

(iii) 排卵期周辺の 8 時間毎採血による 20-OHP の変動

排卵期周辺において、8 時間毎採血をおこなった 4 症例の 20-OHP の変動についてみた。採血は概ね午前 8 時、午後 4 時、午後 12 時におこなったが、各時間における 20-OHP の平均濃度はそれぞれ $0.59 \pm 0.20 \text{ ng/ml}$ (N=14), $0.45 \pm 0.20 \text{ ng/ml}$ (N=16), $0.55 \pm 0.17 \text{ ng/ml}$ (N=

16) であり、各平均値に差はなく、日内変動は認められなかった。P、17-OHP についても同様の検討をおこなった。P は 20-OHP 同様、日内変動は認められなかったが、17-OHP は午前 8 時に平均濃度 $0.59 \pm 0.16 \text{ ng/ml}$ であり、午後 4 時 $0.40 \pm 0.11 \text{ ng/ml}$ 、午後 12 時 $0.34 \pm 0.13 \text{ ng/ml}$ の両者に比し有意水準 0.01 で有意に高値を示した。3 種類の progestin の各々が -5 day における平均血中濃度から有意に上昇を開始する時期を検討したところ、P は有意水準 0.05 で -24 時から有意の上昇が起り、17-OHP では同様 -16 時から有意の上昇が起るが、20-OHP では +16 時からと LH peak の時より後で上昇を開始することが認められた(図 7)。図 8 は 8 時間毎に測定した 1 症例である。-24 時に一過性の 20-OHP の小さな上昇を認め、17-OHP と P は LH peak 時に小さな peak を示し、20-OHP は 8 時間遅れてもう一つの小さな peak を形成する。P の変動パターンにやや遅れて 20-OHP が変動してゆくことが経時的測定においても認められた。

(iv) P と 20-OHP の比率について

P と 20-OHP の比率の変化を図 9 に示した。月経周期を通しての一つの傾向は認められなかった。

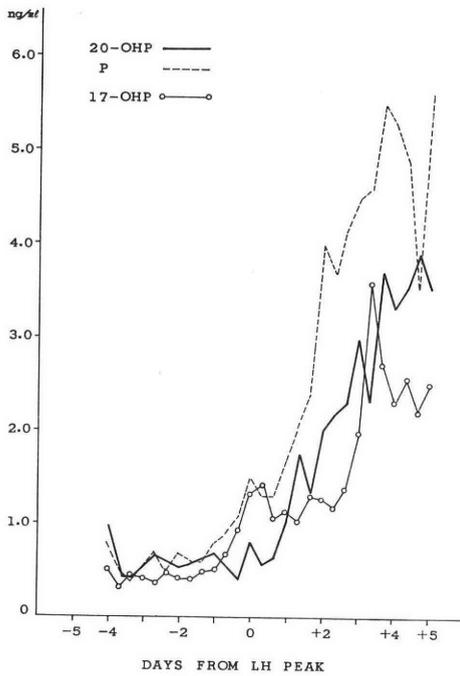


図7 排卵期の8時間毎測定による20-OHPの変動(平均値)

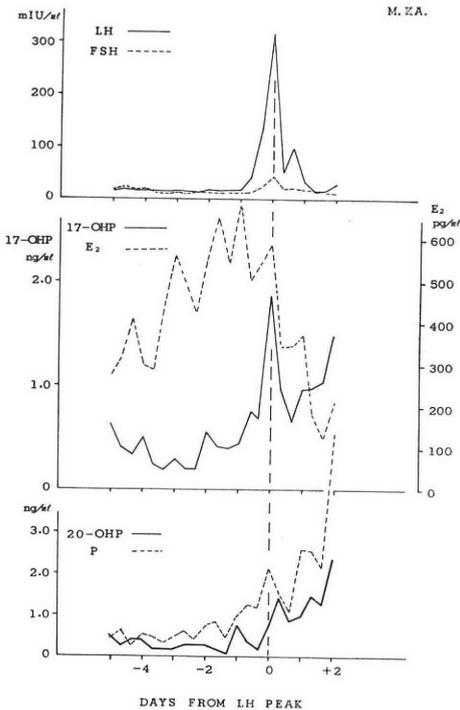


図8 排卵期に8時間毎測定の一症例

考案

今回、我々は20-OHP-3-oxime-BSA に対する抗血清

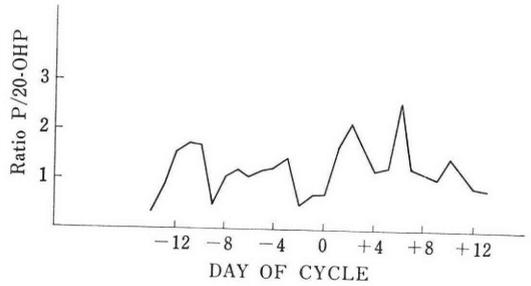


図9 月経周期におけるPと20-OHPの比率の変化

を用い radioimmunoassay で20-OHP を測定した。月経周期における血中20-OHP 濃度は卵胞期に低く、黄体期に高いが、その測定値は11 α , 20 α -dihydroxypregnen-4-en-3-one-11-succinyl-BSA に対する抗血清を用いた Wu ら⁴⁾の測定結果と極めて近似の値を示した。20-OHP は、1958年 Zander ら⁵⁾により、成熟卵胞や黄体から抽出されており、in vitro の実験でも20-OHP が acetate から卵巣内で合成され⁶⁾、また子宮筋や子宮内膜などで progesterone から20-OHP へ変換されることなどが明らかにされてきた。Florensa ら⁷⁾は、子宮内膜に存在する 20 α -hydroxysteroid-dehydrogenase でPから20-OHP に変換される割合は月経周期の時期で異なり、卵胞期から黄体期にかけて次第に増加すると述べている。しかし、Lin ら⁸⁾はPの20-OHP への変換は約10%であり、月経周期を通してほぼ一定であると報告している。Hirai ら⁹⁾はラット卵巣を用いた in vivo の実験にて、pregnenolone→20 α -OH pregnenolone→20-OHP の pathway の存在することを指摘し、20-OHP の産生はPからの変換よりむしろこの pathway によるものが優位であろうとしている。

今回の成績では20-OHP はほぼPと平行して変動しており、また、この両ホルモンの間に高い相関関係が認められること、両ホルモンの比率も月経周期を通して特に大きな差が認められないことから20-OHP はPの合成能をよく反映しているように思われる。

17-OHP は副腎皮質からも産生され、Cholesterol から cortisol となる過程での中間代謝物質でもある。cortisol の血中濃度は日内変動を示し、これに対応する血中 ACTH の変動も確められている¹⁰⁾。その血中濃度は午前3時頃から増加して、朝に最高値に達するが、今回の卵胞期における17-OHP の日内変動も午前8時に最高値を示した。これに対して20-OHP ではPに似て、このような cortisol と同期する日内変動は認められなかった。卵胞期の20-OHP 濃度は男性の血中レベルに近いこと⁴⁾、また、卵巣静脈血中の20-OHP 濃度が卵胞期に

低値であること^{11,12)}からこの時期の20-OHP は17-OHP と同様に主として副腎由来と考えられるが、17-OHP と異り、著明な日内変動を示さないことはPとより一層緊密な関係にあることを示唆している。

家兎では20-OHP が主要な progestin であり、交尾後の家兎では20-OHP が LH 分泌に positive feed back 作用を有すること^{13,14)}が知られている。ラットにおいてはPよりむしろ20-OHP が LH の ovulatory surge 前に増加しており¹⁵⁾、卵巣静脈中濃度でも LH surge の少なくとも2時間前に20-OHP はPと共に上昇している¹⁵⁾。また、未成熟ラットに PMS, HCG を投与すると HCG 投与後4時間にて、すなわち排卵前8時間には既に20-OHP はPと共に上昇を開始している¹⁶⁾という。さらに、20-OHP がラットで E₂ と synergistic な作用をして LH surge を誘起すること¹⁷⁾が認められている。ラットの視床下部では20-OHP は20 α -hydroxy-5 α -pregnan-3-one, 5 α -pregnane-3 α , 20 α -diol へ代謝され¹⁸⁾、これはPが視床下部や下垂体で5 α -pregnane-3, 20-diol, 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one へ転換される¹⁸⁾のに似ており、両者共 5 α -reductase, 3 α -hydroxysteroid-dehydrogenase が関与している。このように視床下部で20-OHP の代謝がおこるという事実と上記のことを考えあわせると、20-OHP が LH 分泌に関する中枢作用を有している可能性が強い。

サルにおいては、Resko ら¹⁹⁾は20-OHP が卵胞直径 5 ~ 6 mm の時点で卵巣脈中にPと共に認められ、両側卵巣の interstitial gland cell が有力な合成場所であるラット⁹⁾と同様の報告をしている。

ヒトについては、20-OHP が LH peak の前日にかなりの上昇を示す⁷⁾との報告もあるが、卵胞期を通して20-OHP は低値であり preovulatory surge のごとき変化は認められない⁴⁾とする報告もある。今回の成績でも20-OHP が LH peak に一致して、またはその前に一過性の上昇を示す症例が認められる。しかし、全体的にみると20-OHP が有意の上昇開始を示すのは LH peak 後であり、Pのそれより遅れていることなどから20-OHP の LH surge を誘起する役割についてはこれを積極的に支持する結果は得られなかったが今後更に検討してみる必要があろう。

20-OHP の測定に際し、御助言をいただいた帝国臓器、神戸川明氏に感謝いたします。本研究は第51回日本内分泌学会総会(東京都)で発表した。

文 献

1) Uemura, T., Suzuki, N. Tsuchihashi, S. and Shiojima, Y.: Changes in Serum 17 α -Hy-

droxyprogesterone Levels during Perioovulatory Phase in Women., *Endocrinol. Japon.*, 25 : 295, 1978.

- 2) Uemura, T., Tsuchihashi, S. Shiojima, Y. and Kawakami, M.: Effects of 17 α -Hydroxy progesterone on Luteinizing Hormone Release in the Rat., *Endocrinol. Japon.*, 26 : 167, 1979.
- 3) 胤森和幸, 堀内裕, 篠原継男, 尾崎晴彦, 吉田孝雄, 高木繁夫, 神戸川明, 国分知子: 20 α -hydroxypregn-4-en-3-one の Radioimmunoassay., *ホと臨*, 25 : 303, 1977.
- 4) Wu, C.H., Prazak, L. Flickinger, G. L. and Mikhail, G.: Plasma 20 α -Hydroxypregn-4-en-3-one in the Normal Menstrual Cycles., *J. Clin Endocrinol Metab.*, 39 : 536, 1974.
- 5) Zander, J., Forbes, T. R. von Münstermann, A. M. and Neher, R.: 20 α -hydroxy-20 α -ol and 20 α -3-ketopregnene-20 β -ol, Two Naturally occurring Metabolites of Progesterone. Isolation, Identification, Biologic Activity and Concentration in Human Tissues., *J. Clin Endocrinol. Metab.*, 18 : 337, 1958.
- 6) Huang, W. Y., Pearlman, W. H.: The Corpus Luteum and Steroid Hormone Formation., *J. Biol. Chem.*, 238 : 1308, 1963.
- 7) Florensa, E., Sommerville, I. F. Harrison, R. F. Johnson, M. W. and Youssefnejadian, E.: Plasma 20 α -Dihydroprogesterone Progesterone and 17-Hydroxyprogesterone: Daily and Four-Hourly Variations during the Menstrual Cycle., *J. Steroid Biochem.*, 7 : 769, 1976.
- 8) Lin, T. J., Billiar, R. B. and Little, B.: Metabolic Clearance Rate of Progesterone in the Menstrual Cycle., *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 35 : 879, 1972.
- 9) Hirai, M., and Masubuchi, Y.: An Endocrine Pharmacological study of Reproduction Concerning Luteal Function and the Role and Significance of a New Active Luteal Hormone in the Ovary., *Asian Med. J.*, 20 : 496, 1977.
- 10) Matsukura, S., West, C. D. Ichikawa, Y. Jubiz, W. Harada, G. and Tyler, F. H.: A new phenomenon of Usefulness in the Radioimmunoassay of Plasma Adrenocorticotrophic Hormone., *J. Lab. Clin. Med.*, 77 : 490, 1971.
- 11) 浅井義彦: 正常月経周期における卵巣静脈, 末梢血及び子宮動脈血中の性腺刺激ホルモン及び性ホルモン濃度の研究, *横浜医学*, 30 : 427, 1979.
- 12) Lloyd, C. W., Lobotsky, J. Baird, D. T. McCracken, J. A. and Weisz, J.: Concentration of Unconjugated Estrogens, Andro-

- gens and Gestagens in Ovarian and Peripheral Venous Plasma of Women: The Normal Menstrual Cycle., *J. Clin. Endocr.*, 32 : 155, 1971.
- 13) Hilliard, J., Penardi, R. and Sawyer, C. H. : A Functional Role for 20α -Hydroxypregn-4-en-3-one in the Rabbit., *Endocrinology*, 80 : 901, 1967.
- 14) Goodman, A. L., and Neill, J. D. : Ovarian Regulation of Postcoital Gonadotropin Release in the Rabbit: Reexamination of a Functional Role for 20α -Dihydroprogesterone., *Endocrinology*, 99 : 852, 1976.
- 15) Goldman, B. D., Kamberi, I. A. Siitteri, P. K. and Porter, J. C. : Temporal Relationship of Progesterin, LH Release and Ovulation in Rats., *Endocrinology*, 85 : 1137, 1969.
- 16) Bauminger, S., Eckstein, B. and Lindner, H. R. : Changes in Steroid Concentration in the Ovaries of Immature Rats Treated with Pregnant Mare Serum Gonadotrophin and Human Chorionic Gonadotrophin., *J. Endocr.*, 77 : 43, 1977.
- 17) Swerdloff, R. S., Jacobs, H. S. and Odell, W. D. : Synergistic Role of Progestogens in Estrogen Induction of LH and FSH Surge., *Endocrinology*, 90 : 1529, 1972.
- 18) Nowak, F. V., and Karrvolas, H. J. : Conversion of 20α -Hydroxypregn-4-en-3-one to 20α -Hydroxy- 5α -pregnan-3-one and 5α -Pregnane-3- α , 20α -diol by Rat Medial Basal Hypothalamus., *Endocrinology*, 94 : 994, 1974.
- 19) Resko, J. A., Koering, M. J. Goy, R. W. and Phoenix, C. H. : Preovulatory Progestins: Observations on Their Source in Rhesus Monkeys., *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 41 : 120, 1975.

Changes in plasma 20α -hydroxypregn-4-en-3-one during the menstrual cycle

Kazuhiro Shirasu, Akimi Matsuyama
and Tsuguo Uemura

Department of Obstetrics and Gynecology
Yokohama City University,
School of Medicine

Plasma concentrations of 20α -hydroxypregn-4-en-3-one (20-OHP) were measured by radioimmunoassay daily or eight-hourly in 10 women with regular menstrual cycles. Plasma levels of LH, FSH, estradiol (E_2), progesterone (P) and 17α -hydroxyprogesterone (17-OHP) were also determined by radioimmunoassay to investigate the relationship between 20-OHP and those hormones.

The mean (\pm S. D.) concentrations of 20-OHP were 0.70 ± 0.55 ng/ml during the bleeding phase, 0.46 ± 0.20 during the follicular phase, 3.10 ± 1.85 during the luteal phase. 20-OHP correlated with P and 17-OHP, especially with the former ($r = 0.6378$, $p < 0.001$). The nyctohemeral variation, which 17-OHP showed, in the concentrations of 20-OHP was not found clearly. Around the ovulatory phase, the significant initial rises of 17-OHP and P began before the LH peak, but that of 20-OHP started after the LH peak, and the pattern of plasma concentrations of 20-OHP followed and almost paralleled that of P.

In the present study, there is no evidence to suggest that 20-OHP may play a role to induce LH surge in ovulatory women.

(受付: 昭和55年10月8日)

CLOMIPHENE CITRATE DURING THE LUTEAL PHASE IN THE MANAGEMENT OF INFERTILITY WITH LUTEAL PHASE DEFECTS

Teruhiko TAMAYA, Hiroshi URABE*, Yousuke OHONO,
Hiroshi KUSANISHI, Toshio YAMADA
and Hiroji OKADA

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

* Present address: Department of Obstetrics and Gynecology,
Japan Baptist Hospital, Kyoto, Japan

Abstract: Clomiphene citrate was given during the luteal phase in the management of luteal phase defects, and might be effectively used for it.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 161-163, 1981)

Introduction

The association of luteal phase defects and infertility has been studied. In the management of such infertile patients clomiphene citrate has been used¹⁾ usually starting the medication from day 5 of the menstrual cycle. Follicle-stimulating hormone (FSH) was reported to be depressed significantly throughout the cycles of women having luteal phase defects²⁾. Clomiphene citrate appears to act as a drug by inducing a rise in gonadotropin levels, especially that of FSH³⁾. We have demonstrated that clomiphene citrate stimulated luteal function of the ovaries in the pseudopregnant rabbits⁴⁾. Therefore we tried to investigate the effects of clomiphene citrate during the luteal phase in the management of luteal phase defects.

Materials and Methods

Infertile patients who had repetitive luteal phase defects according to basal body temperature recording and histological diagnosis by endometrial dating were studied. All couples underwent infertility investigations including semen analysis, hysterosalpingo-

graphy, and postcoital testing, which were within the normal range. If no other cause than luteal phase defects for infertility was identified, patients were given Clomid, 50 mg/day, after the day of ovulation (the day of thermal drop) for 5 or 10 days. Basal body temperature charts were maintained during all cycles.

Results and Discussion

Three cases of clomiphene citrate treatment are shown in Fig. 1. Clomiphene citrate was given from the day of ovulation until the estimated day of implantation, while endogenous chorionic gonadotropin might help the luteal function after the implantation.

Evidently clomiphene citrate increased the height of basal body temperature during the luteal phase and the length of the period as shown in No. 1 of Fig. 1. We have had nine pregnant patients treated with clomiphene citrate. Two of them were demonstrated as shown in No. 2 and No. 3 of Fig. 1. Those pregnant patients have not delivered the babies yet. We withdrew clomiphene citrate before the possible time of implantation to avoid its influence to the fetal circulation and the teratogenic effect.

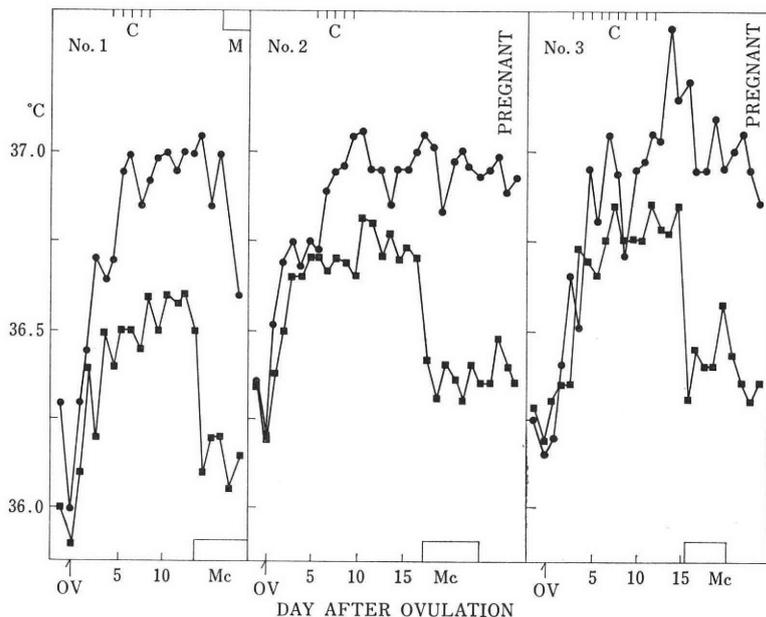


Fig. 1 The effects of clomiphene citrate on the basal body temperature in the patients having luteal phase defects. Clomiphene citrate (50 mg/day after ovulation) has been given for 5 days in cases No. 1 and 2 and for 10 days in a case of No. 3. In cases of No. 2 and 3, patients became pregnant after the the treatment.
 C=clomiphene citrate (Clomid 50 mg/day)
 M=menses for the clomiphene-treated cycle
 Mc=menses for the control cycle
 OV=ovulation (thermal drop)
 ●—●=cycle with the treatment of clomiphene citrate
 ■—■=control cycle

The response of the basal body temperature and the increased conception lead us to suspect that clomiphene citrate stimulated ovarian function during the luteal phases, possibly by the stimulation of hypothalamo-pituitary system. The effect of clomiphene citrate may be derived from an appropriate FSH discharge during the luteal phase. Besides the central effect clomiphene citrate may act as an anti-estrogenic agent via estrogen receptor, present in the endometrium and probably in the ovary. Clomiphene citrate might be effectively used for the management of luteal phase defects, beginning the treatment not only before but also after the ovulation.

References

1) Echt, C. R., Romberger, F. T. and Goodman,

J. A.: Clomiphene citrate in the treatment of luteal phase defects. *Fertil. Steril.*, 20 : 564, 1969.
 2) Strott, C. A., Cargillie, C. M., Ross, G. T. and Lipsett, M. B.: The short luteal phase. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 30 : 246, 1970.
 3) Jørgensen, 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.
 4) Tamaya, T., Ohono, Y., Furuta, N., Boku, S., Ide, N., Tsurusaki, T. and Okada, H.: Effect of clomiphene citrate on luteal function in rabbit. *J. Kyoto Pref. Univ. Med.*, 87 : 923, 1978.

**黄体機能不全症治療に黄体期
クロミフェン投与**

玉舎輝彦, 卜部 宏*, 大野洋介,
草西 洋, 山田俊夫, 岡田弘二
(京都府立医科大学産婦人科学教室)
(*京都日本バプテスト病院産婦人科)

黄体機能不全症による不妊症の治療に黄体期クロミフ

エン投与を試みた。排卵後5~10日間クロミフェンを投与することにより基礎体温は対照周期より上昇し、妊娠する症例が認められた。

(受付: 昭和55年10月17日)

LH-RH test によるクロミフェン の有効性に関する検討

Usefulness of LH-RH Test to Clomiphene Therapy

東京都立府中病院産婦人科

大塚 晴久 高田 邦明 北田 博大
Haruhisa OTSUKA Kuniaki TAKADA Hiroto KITADA

高岡 茂樹 園 信義
Shigeki TAKAOKA Nobuyoshi SONO

Department of Obst. & Gynecol., Tokyo Metropolitan
Hospital, Fuchu, Tokyo

本院での過去2年間の排卵障害を有する症例に対する LH-RH test 施行例78例の内、clomiphene test を合せ行つた64例につき、LH-RH test pattern より clomiphene の有効性を検討した。その結果有効例28例中27例94%は LH 前値60以下、頂値60以上であり、FSH については、前値は全例20以下、頂値は28例中27例が40以下であり、40以上の例は64であった。この結果から clomiphene 有効域は LH 前値60以下、頂値60以上、FSH 頂値40以下の症例と考えることが出来、これは間脳・下垂体・卵巢機能が比較的よく保たれている症例であることが裏付けられた。

(*Jap. J. Ferst. Ster.*, 26(2), 164-168, 1981)

緒 言

1971年、Shally らのグループ¹⁾によりプタ LH-RH (Luteinizing hormone releasing hormone) が Decapeptide であることが発表され、それによつて LH-RH が合成可能となつた。この合成 LH-RH を用いてヒトにおいても LH の放出作用と同時に、弱い FSH 放出作用を有することが判明し、以来基礎的研究ばかりでなく臨床応用がなされ、さらにそれは我々一般臨床家の間にも行い得る診断的手段となりつつある。

我々も不妊症治療における重要な診断的手段として用いているが、本院における過去2年間の LH-RH test 施行例78例を検討するため、その結果を分類上の一手段として黒川の基準²⁾に沿つて一応分類し、その内 clomiphene test を行つた症例64例につき、その有効性と LH-RH test の関連性を検討したので、その結果を報告する。

対象および方法

都立府中病院外来を受診した排卵障害を主症状とする患者78例に LH-RH test を施行し、その内 clomiphene test を合せ行つた症例数は64例であり、その内訳は無排卵性周期症16例、第I度無月経31例、第II度無月経17例である。

第I度無月経と第II度無月経の臨床分類は、我々は従来から chlormazinone acetate (Lutoral) を1日6mg、5日間投与によつて行つている。LH-RH test はこの Progesterone test 施行直前に行つた。

LH, FSH の測定は都立臨床研究所ホルモン研究室(主任、齊藤寿一博士)で二抗体法による R.I.A. によつて行つた。材料を研究所搬送までは血清は凍結保存した。

LH-RH test 実施方法は LH-RH (第一製薬, DB-2521) 100 μ g 静注法、投与条件は100 μ g/20% TZ20ml/

60sec, とし, 投与前, 投与後15', 30', 60', 120' の5回採血し, LH, FSH 測定に供した.

clomiphene 投与は月経又は消退性出血開始後第5日目より, 最初1日50mg, 5日間投与より開始し, 無効の場合は次周期より1日50mg づつ増量し, 最大150mg とし, 150mg 投与にても排卵を認めない場合を clomiphene test 陰性とした.

結 果

1. 臨床的内訳と clomiphene 有効率

LH-RH test 施行例78例の内 clomiphene test を行った64例の臨床的分類別内訳は表1に示す如く, 無排卵性周期症16例, 第I度無月経31例, 第II度無月経17例であり, その各々の clomiphene 有効率はそれぞれ50%, 54.8%, 17.6%であった.

2. LH-RH test 分類より見た clomiphene 有効率

表2に示す如き, 黒川²⁾の基準によつて, その結果を分類すると表1に示す様に, 中間型低 FSH 群に clomiphene 有効率は最も高く, 26例中21例, 80.8%であり, ついで normal range 群19例中6例, 31.6%, 中間型高 FSH 群6例中1例, 16.7%であったが, 当然の如く high good 型, low poor 型では全く無効であった.

3. LH-RH test における LH, FSH の前値, 頂

表1 clomiphene 排卵誘発施行例

	a.c	I*	II*	total	誘発成功率 (%)
n.r.	0/3	3/8	3/8	6/19	31.6
h.g'	0/1	0/2	0/4	0/7	0.0
m.h-FSH	1/3	0/2	0/1	1/6	16.7
m.l-FSH	7/8	14/18	0/0	21/26	80.8
l.p	0/1	0/1	0/4	0/6	0.0
誘発成功率 (%)	8/16	17/31	3/17	28/64	43.8

表2 黒川分類 (日産婦誌, 26, 271, 74)

黒川分類	LH		FSH	
	前値	頂値	前値	頂値
normal range (n.r)	20↓	30~250	20↑	40↓
high good (h.g)	60↑	100↑	high	good
中間型高FSH群 (mhF)	60↓	30↑		40↑
中間型低FSH群 (mIF)	60↓	30↑		40↓
low poor (l.p)	10↓	30↓	low	poor

値と clomiphene test の関係

clomiphene test 陽性例と陰性例について, LH-RH test における LH および FSH の前値, 頂値を比較してみると, 図1, 図2に示す様になる, すなわち, clomiphene test 陽性例28例では, LH 前値は全て60min/ml (以下, 単位省略) 以下であり, 頂値は1例を除いて全て60以上であった. FSH についてみると, 前値は全て20以下であり, 頂値は1例を除き, その他は40以下であった. 頂値が40を超えた例でのそれは64であった.

clomiphene test 陰性例についてみると, LH では前値が60以下の群と100以上の群に二分され, 100以上の群では, その頂値は全て400以上であった. FSH についてみると, やはり低値低反応を示す群と前値が明らかに40を超えて高反応を示す群の2群に分れた.

なお LH 頂値発現率は投与後15分28.6%, 30分60.7%, 60分7.1%, 120分3.6%であり, 投与後30分が最も高かった. FSH のそれは15分13.9%, 30分63.9%, 60分16.7%, 120分5.6%であり, 30分後で最も高かったが, LH のそれに比較して遅延の傾向を認めた.

4. LH-RH test の再分類と clomiphene の有効率以上の結果より, LH 前値, 頂値を表3の如く,

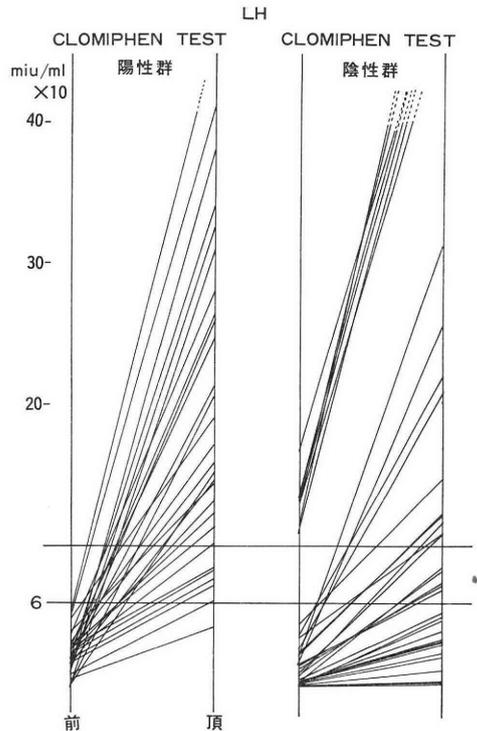


図1 LH, RH test における LH 前値および頂値と CLOMIPHENE 有効率の関係

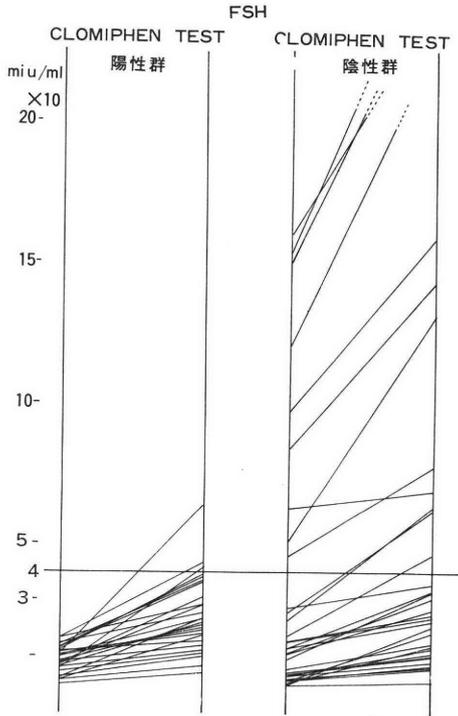


図2 LH-RH test における FSH 前値および頂値と clomiphene 有効率の関係

表3 LH-RH test の再分類後の clomiphene の有効率

	LH		h.g.	n.r.	m.h.F.	m.I.F.	L.p.	total	%
	前値	頂値							
a	10↓	60↓	0/0	1/9	0/0	0/0	0/6	1/15	6.7
b	10↓	60↑	0/0	2/3	1/1	1/1	0/0	4/5	80.0
c	10↑60↓	60↑	0/0	3/7	0/5	20/25	0/0	23/37	62.6
d	60↑	60↑	0/7	0/0	0/0	0/0	0/0	0/7	0.0
	total		0/7	6/19	1/6	21/26	0/6	28/64	
	%		0.0	31.6	16.7	80.8	0.0	43.8	

a) 前値10以下, 頂値60以下, b) 前値10以下, 頂値60以上, c) 前値10以上60以下, 頂値60以上, d) 前値60以上に再分類し, clomiphene の有効性を検討した。

黒川の分類による normal range 群に属す症例は a) b) c) に分散し, いわゆる high good 群と考えられる d 群には認められなかった。中間型低 FSH 群および高 FSH は当然ながら c 群に集中し, low poor 群は a 群に, high good 群は a 群にあつた。なお前値10以上60以下, 頂値60以下の症例は 1 例も認められなかった。

これら a, b, c, d 群の clomiphene 有効性を検討してみると, 有効例28例中27例 (94%) は b 群および c 群に分布しており, b 群および c 群の高 FSH 例 6 例を除

表4 LH-RH test 再分類後の臨床的分類よりみた clomiphene 有効率

	LH		a.c.	I*	II*	total	%
	前値	頂値					
a	10↓	60↓	0/4	1/4	0/7	1/15	6.7
b	10↓	60↑	0/0	2/2	2/3	4/5	80.0
c	10↑60↓	60↑	8/11	15/23	0/3	23/37	62.6
d	60↑	60↑	0/1	0/2	0/4	0/7	0.0
	total		8/16	18/31	2/7	28/64	
	%		50.0	54.8	17.6	43.8	

いたこれらの群の clomiphene 有効率は36例中2例67.2% であつた。

なお normal range 群で a 群に分布するもの, すなわち頂値60以下のものは極端に有効率が低下することが認められ, これらはむしろ low poor と考えるべき症例と思われる。

この様に clomiphene 有効例の94%は LH 前値60以下, 頂値60以上であつた。

5. 臨床的分類よりみた clomiphene 有効率

臨床的分類を以上の基準より検討すると, 表4に示す如く無排卵性周期症16例中11例68.8%が c 群に, 第I度無月経31例中23例74.2%が c 群に, 第II度無月経では低値低反応の群と高値高反応の群に主として分布し c 群には17例中3例17.6%が属するが, それぞれ各群に分散し, 臨床的分類より clomiphene 有効性を判定することの困難さを示している。

しかし以上の結果は clomiphene の有効な症例は殆んどは間脳不全型, 軽度下垂体性と云うことが出来る。

6. LH 頂値および LH 頂値における LH/FSH 比よりの clomiphene 有効性の検討

LH 頂値および LH 頂値における LH/FSH 比より clomiphene の有効性を検討してみたが, 図3に示す如く高口らの 100% 有効領域である LH 頂値100以上, LH/FSH 比 8 以上の群においても無効例を認め, その有効率は76.5%であつた。また, LH 頂値60以上, LH/FSH 比 4 以上の群における high good 症例を除く clomiphene 無効例 6 例中 4 例は P.C.O であつた。

考 按

我々市中病院不妊症外来で取扱う患者の内訳では, 機能性不妊症と考えられる症例が最も多いと考えられるが³⁾, 日常, 無排卵症はしばしば遭遇する疾患である。

不妊外来患者全てにホルモンを測定することは必要のないことであるし, また必要と思われる場合でも種々の要因から, そう簡単に測定することが出来ない。したがって我々は基本的には, 基礎体温表, progesterone

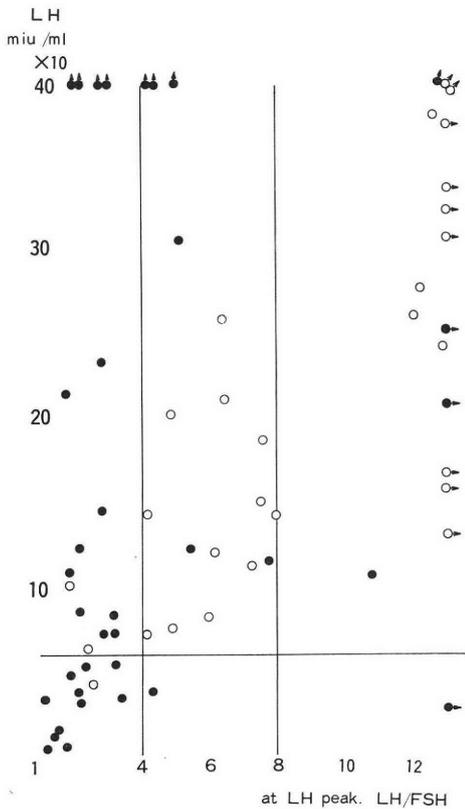


図3 LH 頂値および LH 頂値における LH/FSH 比よりみた clomiphene 有効値の検討

Test, 頸管粘液検査, 腔細胞診, 子宮内膜検査, 性交後テスト等を行うことによつて患者の状態を把握し, 診断, 治療方針を決定している。

しかし, 無排卵症患者に遭遇した場合, 少なくとも, LH-RH test を加えることによつて, その内分泌環境をより明確に知ることが出来ると考え, 我々は以上の場合に LH-RH test を検査の一つに加えることとした。

無排卵症の内分泌環境については, LH-RH test のパターンより, 可成り詳細に分類がなされているが^{6,7)}, 我々も黒川²⁾の基準にしたがつて分類してみた。

無排卵性周期症はその50% (16例中8例) が中間型低FSH 群に属するが各群にも分散する。第I度無月経では58% (31例中18例) がやはり中間型低FSH 群に属するが各群に分散する。第II度無月経では normal range 群に最も多く属し47% (17例中8例) であるが, 残りの大半は high good 群および low poor 群にあり, 1例のみ中間型高FSH 群であった。第II度無月経で normal range 群に属した症例で clomiphene に無効であった症例は, 結果(4)の如く, 我々の再分類ではむしろ

low poor 群と考えられた。したがつて, LH-RH test パターンより clomiphene の有効性を検討する際は, 黒川²⁾の基準による normal range 群では有効率は低く, その有効例6例中5例は, 前値60以下, 頂値60以上の中に入った。また19例中9例は前値10以下, 頂値60以下でその内, 8例は clomiphene 無効であり, これらの症例はむしろ low poor と考えるべき症例である。

熊坂ら⁴⁾は無排卵性周期症では LH が比較的高値を示すものと低値性反応を示す群に分かれると報告しているが, 我々の結果でも, 無排卵性周期症16例中4例は低値反応であり, その傾向を認めた。

以上, clomiphene 有効例28例中27例 (96.4%) は前値60以下, 頂値60以上の範中に入り, この群でのFSH 頂値40以上の症例6例を除くと, 36例中27例 (75.0%) が有効であったことになる。この値は, 間脳・下垂体・卵巣系機能が比較的良好に保たれている症例であると考えられる結果であり, CLOMIPHENE の作用機序としての間脳・下垂体説を裏付けるものと考えられる。

高口等⁵⁾は LH 頂値および LH-RH 投与後30分における LH/FSH 比より clomiphene の有効性を検討し, LH 頂値100以上, LH/FSH 8以上の領域は clomiphene に対し100%有効であったと報告しているが, 我々も LH 頂値における LH/FSH 比より検討してみたが, 高口等⁵⁾の云う100%有効領域においても4例の無効例を認めた。我々の症例では LH 頂値60以上, LH/FSH 比4以上での症例中無効例6例中4例は P.C.O であった。

血液での LH-RH test はそう簡単に行い得るものではなく, 簡便法として尿中 LH を測定することにより, LH-RH test を行う試みがなされているが^{6,7)}, しかしこの方法はFSH を全く無視した方法であり, これを考慮しなければならない。しかし, 尿中 LH は血中 LH をよく反映しており, また我々の基準の clomiphene 有効域での高FSH (頂値40以上) の症例は42例中6例 (14.3%) であり, 尿中 LH-RH, test より clomiphene 有効性を判定する際, その基準での無効例は再度血中 LH-RH, test を行うことにより検討する必要があると考えられる。

以上のことより, 排卵障害婦人に対して, LH-RH test および PRL 測定を行い, 高プロラクチン血症を除外し, LH-RH, test より clomiphene 適応を判断するだけでなく, その内分泌環境を知り, 以後の治療方針に役立てることに意義があると考えられる。

ま と め

排卵障害を有する症例64例に LH-RH test と clomi-

phene test を合せ行い, LH-RH test pattern より clomiphene の有効性を検討した.

1. clomiphene 有効率は64例28例43.8%であつた. その内訳は無排卵性周期症16例中 8 例50%, 第 I 度無月経31例中18例54%, 第 II 度無月経17例中 2 例17.6%であつた.

2. 有効例28例中27例94%は LH-RH test において, LH 前値60以下, 頂値60以上であつた. また, FSH については, 前値は全て20以下であり, 頂値は28例中27例が40以下であり, 40以上であつた例は64であつた.

3. 以上の結果から clomiphene の有効範囲は LH 前値60以下, 頂値60以上, FSH 頂値40以下の症例と考えることが出来る.

最後に LH-FSH 測定に御協力頂いた東京都立臨床研究所ホルモン研究室主任, 斉藤寿一博士に感謝致します.

文 献

- 1) Schally, A. V., Arimura, A., Baba, Y., Nair, R. M. G., Matuo, H., Redding, T. W. and Debeljuk, L.: Isolation and properties of the FSH and LH-releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res Commun* 43: 393, 1971.
- 2) 黒川博厚: 排卵障害症に対する LH-RH, test の臨床応用, *日産婦誌*, 26: 271, 1974.
- 3) 百瀬和夫, 平敷好雄, 大村剛, 田中リナ: 中規模病院における不妊外来-大学不妊クリニックとの比較, *日本不妊学会雑誌*, 19: 53, 1974.
- 4) 熊坂高弘, 斉藤幹, 西望, 加藤弘英, 矢追良正, 小山嵩夫, 大蔵健義, 有村章, Schally A. V.: LH-RH 投与による無排卵周期症の検討, *日産婦学会誌*, 24: 989, 1972.
- 5) 高口二郎, 植村次雄, 鈴木直行, 塩島令儀: LH-RH, test による Clomiphene 療法の排卵予測, *日不学誌*, 21: 1, 1976.
- 6) 中村幸雄, 松本茂, 黒川博厚, 斉藤薫, 飯塚理八: 尿中 LH 測定による LH RH test, *日不学誌*, 19: 53, 1974.
- 7) 塩出進, 恩田博, 田中文平, 浜田和考: 排卵障害症における簡易尿中 LH 測定の臨床応用について, *日不学誌*, 24: 35, 1979.
- 8) 水口弘司, 森宏之, 田村貴, 坂元正一: LH-RH による診断と排卵の誘発, *ホと臨*, 21: 365, 1973.
- 9) 倉智敬一, 青野敏博, 南川淳之祐, 河村憲一, 衣笠隆之, 三宅侃: 正常月経周期婦人および排卵障害婦人における LH-RH 負荷試験, *ホと臨*, 21: 913, 1973.

Usefulness of LH-RH test to clomiphene therapy

Haruhisa Otsuka, Kuniaki Takada, Hiroto Kitada, Shigeki Takaoka and Nobuyoshi Sono

Department of Obst. & Gynecol., Tokyo Metropolitan Hospital, Fuchu, Tokyo

We investigated the usefulness of the LH-RH test to anticipate the indication whether clomiphene citrate would be effective or not.

The LH-RH test was done by administration of 100 μ g of LH-RH intravenously for 64 anovulatory patients; 16 patients with anovulatory cycle, 31 patients of first grade amenorrhea and 17 patients of second grade amenorrhea.

Initial dose of clomiphene citrate was 50 mg daily for 5 days and the dosage was increased to 150 mg if the ovulation was not induced.

The results are as follows;

a) Patients were divided into 4 groups according to the pattern of LH-RH test and the effectiveness of clomiphene citrate.

Group-1; 15 patients with the level of LH under 10 mIU/ml before injection and peak value under 60 mIU/ml showed no response to clomiphene citrate.

Group-2; 4 of 5 patients with LH level under 10 mIU/ml and peak value over 60 mIU/ml responded to clomiphene citrate.

Group-3; 37 patients with LH level between 10 and 60 mIU/ml and peak value over 60 mIU/ml responded to clomiphene citrate in 62.6% cases.

Group-4; None of 7 patients with LH level over 60 mIU/ml and peak value over 60 mIU/ml showed response to clomiphene citrate.

b) The peak value of FSH were under 40 mIU/ml in 26 of 27 patients who responded to clomiphene citrate in group 2 and 3.

These results showed that the administration of clomiphene citrate is effective for the anovulatory patients with the LH level under 60 mIU/ml before injection and the peak value over 60 mIU/ml and also the peak value of FSH under 40 mIU/ml.

(受付: 昭和55年10月27日)

子宮内膜症に対する DANAZOL の効果と副作用

Clinical Effects and Side Effects of Danazol in the Treatment of Endometriosis

九州大学医学部産婦人科学教室 (主任: 滝一郎教授)

永田行博 中村元一 楠田雅彦
Yukihiko NAGATA Gen-ichi NAKAMURA Masahiko KUSUDA

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

Danazol を子宮内膜症に投与し、その臨床的効果と副作用について検討した。

1. Danazol は症状に対してほぼ完全な効果を発揮した。しかし、器質的な大きな病変には必ずしも効果的でなく、保存的手術療法との併用が必要である。
2. 副作用は肝機能障害、体重増加などが見られたが、1日投与量を400mg から300mg に減量することで著しく減少した。しかし、投与中の管理は充分に行う必要がある。
3. 妊娠率、再発率とも偽妊娠療法よりも優っていたが、有意の差はなかった。
4. Danazol 療法後の卵巣機能の回復は、偽妊娠療法に比べて早く確実である。
5. Danazol の投与方法は簡単で、偽妊娠療法に禁忌の症例にも使用できる。
6. Danazol の作用機序は、性中枢での抗ゴナドトロピン作用とともに、末梢での抗エストロゲン作用が主たる作用であり、理にかなった治療法である。

以上より、Danazol 療法は子宮内膜症の治療法として、今後期待される治療法である。

(Jap. J. Fert. Ster., 26(2), 169-175, 1981)

はじめに

子宮内膜症は生殖機能を保有する年齢の婦人に特有のものであり、異所性に増殖した子宮内膜が妊孕性を妨げることによく知られている。従って、不妊を訴えて来院した患者に子宮内膜症がないかどうかを検査することは、今や必須である。しかも、我が国ではその子宮内膜症が最近増加しつつあり、子宮内膜症に対し一段と効果的な治療法の開発が期待されている。

子宮内膜症のホルモン療法は、プロゲステンとエストロゲンを長期間連続して投与する偽妊娠療法が一般的であったが、Greenblatt らの報告¹⁾以来17 α -ethinyl testosterone の誘導体である Danazol が非常に効果的であるという報告が相次いでいる。

我が国でも Danazol の導入が検討されつつあるが、われわれは、子宮内膜症に対する Danazol の効果と副作用について検討したので、偽妊娠療法の結果と比較しながら、その結果について報告する。

研究対象および方法

1. 対象

昭和52年11月から昭和55年3月に九州大学医学部産婦人科、不妊・内分泌外来を受診した患者を対象とした。

不妊や月経困難症などを主訴とする20歳から36歳、平均29.8歳の子宮内膜症患者46名に Danazol を投与した。

2. 方法

1) Danazol の投与方法

1日投与量300mg、または400mg を連日服用する等量

持続投与法により、12週間から31週間、平均22週間投与した。服用は月経周期5日以内に開始した。

2) Danazol 投与中の検査

Danazol 服用中の異常所見をチェックするために、以下の項目について検査した。なお、①②③④⑤については Danazol 開始前、服用開始後2カ月間は2週間に1回、その後は4週間に1回、および服用終了後に検査した。

① 体重測定

② 血圧測定

③ 検尿：pH, 蛋白, 糖, ケトン, ビリルビン, ウロビリノーゲン, 潜血

④ 検血：赤血球, 白血球, 血小板, ヘモグロビン, ヘマトクリット

⑤ 生化学的検査 (SMAC)：総蛋白, アルブミン, BUN, クレアチニン, 尿酸, Na, K, Cl, Ca, 無機磷, SGOT, SGPT, LDH, アルカリフォスファターゼ, α -GTP, 総ビリルビン, 直接ビリルビン, コレステロール, トリグリセライド, グルコース

⑥ 内分泌学的検査：①基礎体温測定, ②腔脂膏検査 (成熟指数), ③血中 LH, FSH, PRL, E₂ 測定, ④LH-RH・TRH 負荷テスト, ⑤estradiol benzoate 負荷テスト (E・B テスト)

⑦ 超音波断層法 (UST)：主としてチョコレート嚢胞の変化を観察した。

3) 副作用のチェック

表 1 ダナゾールの副作用

男性化作用 同化作用	体重増加, 浮腫, にきび, あぶら症, 多毛, 変声, 陰核肥大
低エストロゲン症状	発赤, 発汗, 痒疹, 乾燥・焼灼感, 膣炎, 乳房の縮小
胃腸消化器症状	嘔気, 嘔吐, 便秘, 肝機能障害
その他	発疹, 皮膚あれ, めまい, 頭痛 易疲労性, 脱力感, 筋肉けいれん, 胸痛, 足痛

男性化作用, 低エストロゲン症状, 胃腸症状など表1のような副作用について来院時にチェックした。

4) 効果の判定

① 症状, 所見の改善

月経痛, 下腹痛, 腰痛, 性交痛, 排便痛などの症状について, 重症(卅), 中等症(卅), 軽症(+), ごく軽症(±), なし(-)の5段階に分け, Danazol 服用中少なくとも2段階以上の改善が見られた時に改善されたとした。

所見の改善は, 内診および直腸診による腫瘍, 硬結の軟化, 縮小, 子宮可動性制限の改善, 疼痛の消失を効果ありとした。

これらの結果から, 最終的に医師の総合判定として①著効, ②有効, ③やや有効, ④無効の分類を行った。

② 再発率, 妊娠率

Danazol 服用終了後定期的(1カ月1回)に追跡し, 症状, 所見の再発および妊娠の成立についてチェックした。

研究成績

1. 症状, 所見に対する Danazol の効果

Danazol の投与効果の判定が行い易い Danazol 単独療法例および保存的手術前投与例40例(400mg 投与群28例, 300mg 投与群12例)について月経痛, 下腹痛, 腰痛, 性交痛の症状とダグラス窩硬結の改善率を4週毎に示した(表2)。

月経痛は排卵が抑制され月経が発来しないために, 服用開始4週後には80%に改善を見ている。しかし, しばしば見られる破綻出血時の疼痛は完全には消失せず, 患者が月経痛として訴えなくなったのは12週以降である。下腹痛, 腰痛, 性交痛の症状も徐々に改善され, 20週後には92~95%の改善率であった。

ダグラス窩硬結の軟化, 縮小, 消失などの改善率は低く, 20週間服用後でも47%であった。

チョコレート嚢胞に対する Danazol の効果について UST による追跡では, 小さなチョコレート嚢胞で, 縮小が認められるものもあつたが, 大きいチョコレート嚢

表 2 ダナゾール療法の効果

	症例数	症状の改善率(%)				
		4週	8週	12週	16週	20週
月経困難症	25	80.0	96.0	100	100	100
下腹痛, 腰痛	19	57.9	73.7	78.9	84.2	94.7
性交痛	12	75.0	83.3	91.7	91.7	91.7
ダグラス窩圧痛	23	30.4	43.5	60.9	65.2	69.7
ダグラス窩硬結	19	26.3	26.3	31.6	36.8	47.4

表 3 ダナゾール療法後の再発率, 妊娠率

	症例数	再発(%)	妊娠(%)
ダナゾール療法	8	3(37.5)	2(25.0)
ダナゾール療法と 保存的手術の併用	24	6(25.0)	5(20.8)
	32	6(28.1)	7(21.9)*

* 訂正妊娠率 43.8%

表 4 偽妊娠療法後の再発率, 妊娠率

	症例数	再発(%)	妊娠(%)
偽妊娠療法	15	3(20.0)	5(33.3)
偽妊娠療法と保 存的手術の併用	26	10(38.5)	6(23.1)
	41	13(31.7)	11(26.8)*

* 訂正妊娠率 36.7%

胞の縮小傾向はほとんど認められなかった。

医師の最終評価では, 3 例を除いて全て, 著効(16例), 有効(15例), やや有効(6 例)と判定した。無効と判定した 3 例中 1 例は手術により腺筋症と診断され, 他の 2 例は Beecham 分類による III 期以上の重症例で, 内診, 直腸診所見の改善がほとんど認められなかったものである。また, 以上の結果について投与量による効果の差は見い出せなかった。

2. 再発率, 妊娠率

Danazol 投与終了後 1 年以上 follow up した 32 例(400 mg 投与群 28 例, 300mg 投与群 4 例)の再発率および妊娠率を表 3 に示した。

再発の症状, 所見は Danazol 単独療法例に 38%, 保存的手術療法との併用例に 25% 見られた。特に症状の再発は正常排卵周期獲得後比較的早く, ほとんどが 6 カ月以内に見られた。

妊娠は 7 例(400mg 投与群 6 例, 300mg 投与群 1 例) 22% に成立したが, 訂正妊娠率は 44% であった。

表 4 には偽妊娠療法 2 年以上 follow up した症例の再発率, 妊娠率を示した。

3. 副作用

1) 副作用発現率(表 5)

Danazol 服用中に発現した副作用を, 400mg 投与群, 300mg 投与群別に示した。

Danzol 服用前体重の 5% 以上体重増加を示したものは, 400mg 投与群 61%, 300mg 投与群 44% であった。GOT, GPT などの肝機能検査に異常が出現したのは 400mg 投与群 43%, 300mg 投与群 11% であった。ニキビ, あぶら症も 44% から 46% に見られた。浮腫 22~25

表 5 ダナゾール療法の副作用

副作用	400mg 投与群 (N=28)	300mg 投与群 (N=18)	計 (N=46) (%)
体重増加(5%以上)	17	8	25(54.3)
ニキビ・あぶら症	13	8	21(45.7)
肝機能異常	12	2	14(30.4)
浮腫	7	4	11(23.9)
肩こり	4	3	7(15.2)
乳房痛	4	3	7(15.2)
悪心・嘔吐	5	1	6(13.0)
頭痛	5	1	6(13.0)
発疹	4	1	5(10.9)
変声	3	1	4(8.7)
イライラ		4	4(8.7)
倦怠感	2	1	3(6.5)
腫炎	0	1	1(2.2)
その他	5	1	6(13.0)
副作用なし	4	4	8(17.4)

表 6 ダナゾール療法, 偽妊娠療法の副作用

副作用	ダナゾール療法		偽妊娠療法
	400mg/日	300mg/日	
体重増加(5%以上)	60.7	44.4	35.9
ニキビ・あぶら症	46.4	44.4	15.4
肝機能異常	42.9	11.1	12.8
悪心・嘔吐	17.9	16.7	46.8

%, 胃腸症状 17~18% などであった。

表 6 には Danazol 療法と偽妊娠療法の主な副作用発現率を比較して示した。胃腸症状を除いて, Danazol 400mg 投与群に高い副作用発現率であった。特に肝機能異常と体重増加の頻度が高かった。

GOT, GPT に異常値を示したものは, 明らかに 400 mg 投与群に多かった。しかし, 300mg 投与群では偽妊娠療法による頻度より低かった(表 7)。肝機能異常のため Danazol 投与を中止した症例は 3 例(400mg 投与群 2 例, 300mg 投与群 1 例)であったが, GOT, GPT の短期間内の急激な上昇(200U/L 以上)を中止の基準とした。

体重増加率を 400mg 投与群と 300mg 投与群で比較すると, 300mg 投与群が平均で明らかに低い増加率であった(図 1)。

2) 血圧, 尿, 血液, 腎機能などへの Danazol の影響

血圧, 尿所見, 血液検査には Danazol 服用中全く異常は見られなかった。SMAC による生化学的検査でも,

表 7 ダナゾール療法の副作用：肝機能異常

GOT, GPT 値 (U/L)	400mg /日投与群	300mg /日投与群	計
41~100	2	1	3
101~200	6		6
201~	4	1	5
計	12(42.9%)	2(11.1%)	14(30.4%)

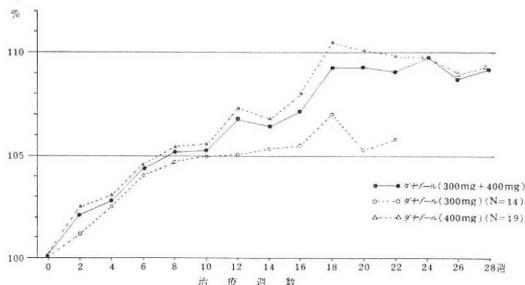


図 1 ダナゾール療法中の平均体重増加率

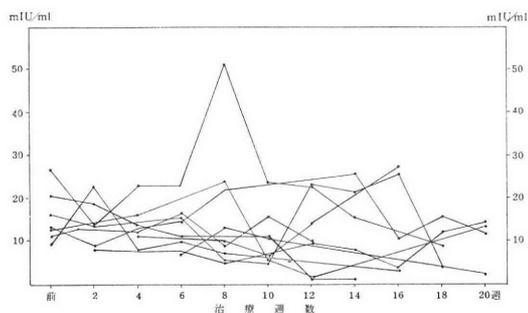


図 2 ダナゾール療法中の LH の動態

GOT, GPT, アルカリフォスファターゼに異常値が出現した以外には腎機能, 電解質, 脂質, 血糖値などに異常は認められなかった。

4. 卵巣機能への影響

1) Danazol 服用中の基礎体温

400mg 投与群, 300mg 投与群とも全例低温一相性を示し, 排卵は認められなかった。

2) Danazol 服用中の血中ホルモンの推移

LH は 5 mIU/ml に低下しているいる 症例もあつたが, ほとんどが正常 LH レベルを示した(図 2). FSH, PRL レベルにも, ほとんど変化は見られなかった。E₂ 値は, 多くの症例が 100pg/ml 前後の値を示し, Danazol 服用中明らかに減少し, 低値を示したものはなかった(図 3)。しかし, 腔脂膏検査では明らかに表層細胞は減少し, ほとんど見られなかった。

Danazol 投与 4 週間以降に行つた LH-RH テストで

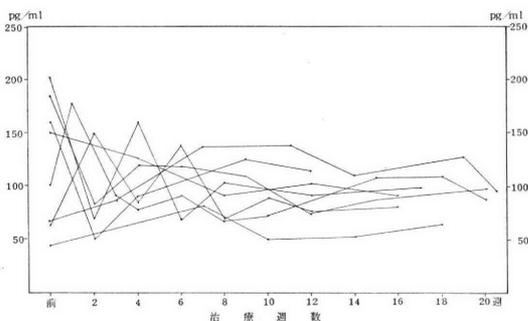


図 3 ダナゾール療法中の E₂ の動態

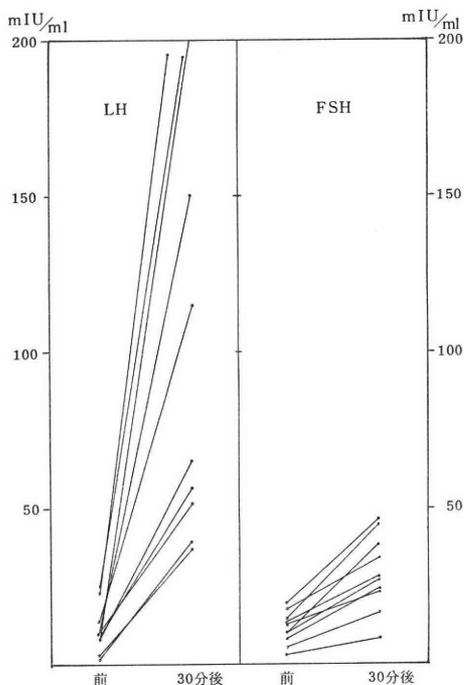


図 4 ダナゾール療法中の下垂体予備能 (LH-RH test)

は, LH, FSH とも LH-RH に反応し, 下垂体予備能は保持されていた(図 4)。TRH に対して PRL もよく反応した。

E・B テストは Danazol 12週間~24週間服用の 8 症例に行い, 3 例に LH surge を, 1 例は軽度の LH 上昇を認めたが, 他の 4 例は全く LH の上昇や surge を認めなかった。FSH は 8 例とも上昇を認めなかった。

3) Danazol 服用終了後の卵巣機能の回復

Danazol 療法後排卵周期は, 1 例を除いて 40 日以内に回復した。最も早い排卵は Danazol 服用終了後 11 日目に起り, 15 日以内に 31%, 20 日以内に 65.5%, 25 日以内に 79.3%, 30 日以内に 82.8% に排卵が見られた(表 8)。

表 8 子宮内膜症治療後の卵巣機能の回復

治療後日数	ダナゾール療法 (累積%)	偽妊娠療法 (累積%)
—10日	0	0
11—15	9(31.0)	0
16—20	10(65.5)	1(7.1)
21—25	4(79.3)	2(21.4)
26—30	1(82.8)	4(50.0)
31—40	5(100)	5(85.7)
41—50		1(92.9)
51—60		0
61—70		1(100)

偽妊娠療法の排卵周期回復率は3カ月以内に56%にすぎず、しかも、明らかにDanazol療法に比較して回復が遅延していた。

考 按

子宮内膜症のホルモン療法は、プロゲステロン・エストロゲンを長期間投与する偽妊娠療法が一般的であり、確固たる評価を受けている²⁾。しかし、このホルモン療法は子宮内膜症にむしろ好ましくないエストロゲンを微量とは言え長期間投与するものであることから、偽妊娠療法に代わりうる、さらに効果的なホルモン療法が期待されていた。

Danazol は弱い androgenic な作用はあるが、性中枢に働き排卵を抑制し、ひいては卵巣からのステロイド産生を低下させ、子宮内膜の萎縮、変性を促すと言う³⁾。われわれが検討した結果でも、排卵の抑制が認められた。一方、子宮内膜に作用するエストロゲンの血中レベルの減少はあまり認められなかったが、腔脂膏では表層細胞の減少や消失、子宮内膜の著しい萎縮など、末梢での確かな低エストロゲン効果が認められた。以上から、Danazol の作用は中枢での抗ゴナドトロピン作用と共に、末梢では抗エストロゲン作用があると言える。すなわち、子宮内膜症の治療という点では、理論的に抗エストロゲン作用を持つ Danazol 療法が偽妊娠療法に優つていると言えよう。

子宮内膜症に Danazol を最初に使用した Greenblatt らの成績では、40例中22例55%に症状の改善や骨盤内所見の変化を認め、硬結、圧痛などの減少を認めている⁴⁾。しかも、偽妊娠療法やアンドロゲン療法に反応しなかつ

た症例にも治療効果があり、Danazol の有用性を示唆している。その後 Friedlander⁴⁾は、症状の74~97%、Lauersen ら⁵⁾は87.5%、Dmowski と Cohen⁶⁾は100%の改善率を示している。Young と Blackmore⁷⁾は1日800mg 投与による症状や所見を毎月チェックし、5~7カ月後に月経痛は100%、骨盤痛は97%、性交痛は92%の改善率を示している。これらの結果は、われわれの投与20週後に得た症状の改善率と、ほぼ同一である。すなわち、Danazol の投与量に差はあるが、症状の改善、消失に関しては、Danazol はほぼ満足すべき効果を示していると言えよう。

ダグラス窩の硬結など器質的病変に関しては、Young と Blackmore⁷⁾は193例中87%に改善を認め、Greenblatt と Tzingounis⁸⁾は116例中36%が完全に、40%が部分的に改善されたと報告し、このような器質的病変に対しても有用であるとしている。しかし、われわれの症例では47%にしかこのようなはっきりした所見の改善は認められず、また卵巣の大きなチョコレート嚢胞の縮小傾向はほとんど認められなかつたから、一度形成された大きな器質的病変には、必ずしも Danazol のみでは効果を発揮し得ないと考えている。すなわち、このような症例では、保存的手術療法との併用が望ましい。

Danazol は弱い androgenic, anabolic な作用があり、さらに末梢での抗エストロゲン作用から男性化作用、体重増加、低エストロゲン症状などの副作用が発現する。偽妊娠療法では禁忌とされている血液凝固系への影響はなく、血栓症、高血圧、糖尿病などの疾患を伴う患者にも投与できる。しかし、水分貯留作用があるので、てんかん、偏頭痛、心不全、腎不全のある患者には投与に慎重を要しよう。

われわれの経験した Danazol による最も重大な副作用は、肝機能障害であった。この点に関しては、欧米の報告ではほとんど見られず、また薬物による toxic hepatitis は個人差、人種差が大きいと言われている。Danazol 投与を中止した症例は急速に改善され、6週間以内には肝機能の正常化が見られた。さらに1日投与量を300mg に減量することでその発生率は低下し、偽妊娠療法による発生率より低くなつたので、Danazol の投与量に注意し、頻回にチェックすることで肝機能障害は除外できる。

われわれの症例では問題となる男性化作用は出現しなかつたが、陰核肥大や変声は不可逆性であるから、声を職業とする婦人（アナウンサー、声楽家など）には投与は慎重にすべきであろう。

Danazol は性中枢に作用し、排卵を抑制する。われわれの1日300mg または400mg の投与量では全く排卵

は見られなかった。200mg ではほぼ排卵は抑制されるが、100mg ではときに排卵が見られるという⁹⁾。確かに Danazol 投与中でも血中 LH, FSH はそれ程低下しておらず、LH-RH テスト、E・B テストの結果からも、性中枢抑制の程度はそれ程強いとは考えられない¹⁰⁾。

これは Danazol 療法後の 卵巣機能の回復状況からでも推定できる。われわれの症例では、早いもので Danazol 服用終了後11日目に、他の報告では8日目には排卵が見られ⁷⁾、また、ほとんどが比較的短期間のうちにほぼ全例排卵周期を回復している。一方、偽妊娠療法では排卵周期の回復率が低く、時期も Danazol に比べて遅い。これは postpill amenorrhea としてもしばしば問題となるように、プロゲステン・エストロゲンの合剤を長期間服用すると、性中枢の抑制がかなり強く、長期間残っていることを示すものである。

Danazol 療法でも再発は見られる。われわれの再発率は、1年後に28.1%であった。平均37カ月の follow up で、Dmowski と Cohen⁹⁾は症状の再発率48.8%、臨床所見の再発率36.7%を見、多くが1年以内に再発したと言う。平均78カ月間観察した Greenblatt と Tzingounis⁹⁾は33%の再発率をあげ、平均して4.4カ月から9カ月後に再発したと言う。

偽妊娠療法の再発率を比較すると、われわれの Danazol の再発率が低い、有意の差とは言えない。Andrews と Larsen¹¹⁾は45%の偽妊娠療法の再発を示し、Dmowski と Cohen⁹⁾は、Danazol の再発率は保存的手術例や偽妊娠療法のそれとあまり変わらないため、再発率は治療法よりむしろ子宮内膜症の病態生理や進行度によるものではないかと述べている。

妊娠率について見ると、偽妊娠療法による妊娠率は43~55%が報告されている。われわれの症例では36.7%であり、Danazol による妊娠率は43.8%であった。Dmowski と Cohen⁹⁾は72.2%、Greenblatt と Tzingounis⁹⁾は50%の妊娠率を Danazol によつて得ている。しかしこれらの数字から両者の優劣は決められない。

子宮内膜症治療後の妊娠は比較的早期に、多くが1年以内に起るが、さらに Danazol 投与後の排卵周期の回復は早いから、偽妊娠療法よりも妊娠成立までの期間が短かくても当然かも知れない。このことは、治療終了後の早期妊娠による胎児への影響を考慮に入れる必要があろう。動物実験では teratogenic, embryotoxic な効果はなかったと報告されている。しかし、Dmowski と Cohen⁹⁾は Danazol 療法後の妊娠例39例中6例(15.4%)に流死産を認めており、しかも治療終了直後妊娠したものは3例中2例(67%)、3周期以内に妊娠したものは12例中3例(25%)が流死産し、それ以後の妊娠例24

例中1例よりも高率であつたと報告している。この点に関しては今後妊娠症例を増して観察する必要がある。

本論文の要旨は、第25回日本不妊学会総会(宇部市1980)において発表した。なお Danazol は東京田辺製薬より提供を受けた。

参考文献

- 1) Greenblatt, R. B., Dmowski, W. P., Mahesh, V. B. and Scholer, H. F. L.: Clinical studies with an antigonadotropin- Danazol, *Fertility and Sterility*, 22: 102, 1971.
- 2) 永田行博: 子宮内膜症のホルモン療法, 産婦人科治療, 41: 381, 1980.
- 3) Dmowski, W. P. and Scommegna, A.: The rationale for treatment of endometriosis with Danazol, in Recent advances in endometriosis (ed. R. B. Greenblatt), 100, *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1976.
- 4) Friedlander, R. L.: The treatment of endometriosis with Danazol, *J Reprod Med*, 10: 197, 1973.
- 5) Lauersen, N. H., Wilson, K. H. and Birnbaum, S.: Danazol: an antigonadotropic agent in treatment of pelvic endometriosis, *Am J Obstet Gynecol*, 123: 742, 1975.
- 6) Dmowski, W. P. and Cohen, M. R.: Antigonadotropin (danazol) in the treatment of endometriosis, *Am J Obstet Gynecol*, 130: 40, 1978.
- 7) Young, M. D. and Blackmore, M. P.: The use of Danazol in the management of endometriosis, *J Int Med Res*, 5 (suppl 3): 86, 1977.
- 8) Greenblatt, R. B. and Tzingounis, V.: Danazol treatment of endometriosis: long-term follow-up, *Fertility and Sterility*, 32: 518, 1979.
- 9) Lauersen, N. H. and Wilson, K. H.: Evaluation of danazol as an oral contraceptive, *Obstetrics and Gynecology*, 50: 91, 1977.
- 10) 永田行博, 中村元一, 楠田雅彦, 倉野彰比古: 子宮内膜症の臨床-新しいホルモン療法・ダナゾール療法について, 産婦人科, 30(3)掲載予定.
- 11) Andrews, W. C. and Larsen, G. D.: Endometriosis: Treatment with hormonal pseudopregnancy and/or operation, *Am J Obstet Gynecol*, 118: 643, 1974.

Clinical effects and side effects of
Danazol in the treatment of
endometriosis

**Yukihiro Nagata, Gen-ichi Nakamura
and Masahiko Kusuda**

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

300 mg or 400 mg of Danazol was administered to patients with endometriosis having a complaint of infertility and clinical evaluation was done on the treatment of endometriosis with Danazol

1. Danazol manifested almost complete efficacy against symptoms. However, it is not necessarily effective on the advanced organic cha-

nges. In such cases combination treatment with conservative operation would be recommended.

2. Hepatic impairment and weight gain were observed in a high percentage of cases with 400 mg of Danazol as side-effects, but they were remarkably decreased by reduction of dosage to 300 mg.

3. Danazol therapy was, as an impression, superior to pseudopregnancy therapy in pregnancy rate and recurrence rate, but there was not significant differences statistically.

4. Recovery of the ovarian function was faster and more reliable in Danazol therapy than in pseudopregnancy therapy.

From these observations it can be said that Danazol treatment is a recommendable drug in the treatment of endometriosis.

(受付: 昭和55年12月22日)

子宮内膜症に対する DANAZOL 投与効果 とその内分泌学的背景について

Clinical Effects and Hormonal Aspects of Danazol Therapy in Patients with Endometriosis

新潟大学医学部産科婦人科学教室

佐藤 芳 昭 石 黒 隆 雄 星 野 明 生
Yoshiaki SATO Takao ISHIGURO Akio HOSHINO
須藤 寛 人 高 橋 威 竹 内 正 七
Narihito SUDO Takeshi TAKAHASHI Shoshichi TAKEUCHI

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

子宮内膜症20例に DANAZOL (DA) 療法を行い、18カ月 follow up した。対象患者は Beecham 分類で I 度 1 例、II 度 6 例、III 度 11 例及び IV 度 2 例である。DA 400mg/day 6 カ月間投与中、FSH, LH, E₂ は漸減し、又尿中 17-OHCS, 17-KS もやや低下傾向を示したが有意ではなかつた。排卵は DA 投与中 100% 抑制され、投与終了後 3 週間以内に回復した。月経困難症等の自覚症状は著明改善し、他覚所見も緩解した。組織学的検査では、子宮内膜及び外性子宮内膜症の組織は DA の用量依存的に萎縮像を呈した。症状の再発は 12.5% と軽度であつた。妊娠は 4 例に成立し 3 例が正常出産し健常児を得、1 例が自然流産し児希望者の妊娠率は 33.3% であつた。これらのことより DA が子宮内膜症の保存的治療法として優れた薬剤であることが認められた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 176-182, 1981)

I 緒 言

子宮内膜症 (endometriosis) は想像以上に頻度の多い疾患であり、さらに不妊症と結びついていることが多く、治療に対する再発率が高いために、治療法の選択に悩まされることが少なくない。

子宮内膜症の治療法としては、一般には保存的療法としてホルモン療法と手術療法、および根治的手術療法に分けられる。

ホルモン療法としては偽妊娠療法が代表的なものであり、種々の検討がなされている。

しかし再発率の高いことや、sex steroid の副作用などが問題とされている。最近、17 α -ethinyl testosterone の誘導体である DANAZOL (以下 DA と略) による子宮内膜症の治療法が注目をあびており、わが国におい

てもその治療成績を散見するようになってきた。

わたくしたちも子宮内膜症に対して DA を用いて、DA の与える内分泌学的背景と、治療効果について検討したので報告する。

II 方法と対象

臨床的に、または開腹により子宮内膜症と診断した 20 症例 (DA 単独投与 10 例、DA + 手術療法 10 例) について、DA を 400mg/day 6 カ月間連続投与を行った症例について、投与前、中、後におけるホルモン動態と臨床的效果について検討を行った。対象患者の重症度は Beecham 分類で I 度 1 例、II 度 6 例、III 度 11 例、IV 度 2 例であり、開腹で確認し得た 14 例については Acosta の分類で軽症 2 例、中等症 5 例、重症 7 例であつた。

手術療法を行った 10 例のうち 9 例は保存的手術後に

DA を使用, 1 例のみは DA 使用後に根治的手術を行った。

投与前に LH-RH 100 γ 負荷による血中 FSH, LH の推移, TRH 500 γ 負荷による Prolactin の動態および検血, 肝機能などの検査, 投与中には FSH, LH, E₂ の測定を 2 週間毎に行い, 同時に副作用のチェックを行った。対象患者には投与前より BBT の記載を指示し, 投与後も BBT で follow up のため初回月経, 排卵, 妊娠などについて追求した。患者は 25 歳より 40 歳 (平均 31.5 歳) であり, うち 12 例が不妊を主訴としていた。

不妊期間は 2 年~15 年 (平均 5 年 6 カ月) であり, DA 投与後の follow up 期間は 1 カ月~18 カ月 (平均 7.1 カ月) である。

ホルモン測定は FSH, LH, E₂, PRL は ¹²⁵I tracer による RIA 法 (第一アイソトープ社), 尿中 17-OHCS, 17-KS は屋形, 土田法による 24 時間尿について検討した。

III 結 果

1. DA 投与前後におけるホルモン動態

DA 投与により, いかなる負荷がホルモン動態にみられるかを FSH, LH, E₂ について図 1 に示した。DA 投与により, 初期には LH, FSH, E₂ ともにやや低下傾向を示すが, その後は横ばいであり, 下垂体での

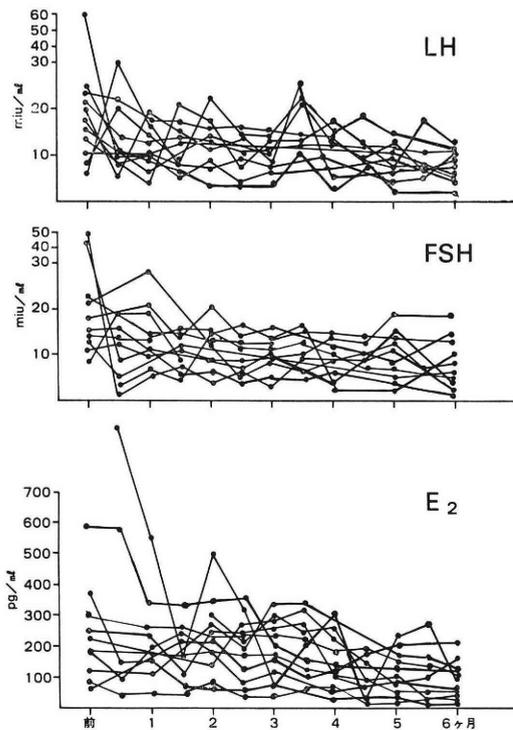


図 1 DANAZOL 服用中の血中ホルモンの変動

gonadotropin 産生が大きく抑えられていることはないようである。同様に E₂ 産生もそれほど強く抑制されていないようである。

2. DA 投与前後での下垂体機能

図 2 に示したごとく, 投与前における LH-RH 100 γ , TRH 500 γ 同時負荷での LH, FSH, PRL の反応形は正常タイプを示し, 投与終了直後では図 3 のごとく, 大部分の症例では下垂体の FSH, LH, PRL 産生と, その予備力は抑制されていない。

3. DA 投与前後での尿中 17-OHCS, 17-KS の動態

副腎系ホルモンの尿中主要代謝産物である尿中 17-OHCS は, 投与前 6.8 \pm 2.3mg/day, 投与後 5.0 \pm 2.3mg/day, 17-KS は投与前 5.2 \pm 2.3mg/day, 投与後 4.9 \pm 2.2mg/day と両者ともに投与後にやや低下の傾向を示すが, 統計学的な有意差はなかつた (図 4)。

4. DA 投与での組織学的変化

投与前からの子宮内膜診による組織学的変化を写真 1 (投与前), 写真 2 (投与 4 カ月), 写真 3 (投与終了時) に示した。

また, 投与終了後において手術的に摘出した例の adenomyosis, 卵巣 endometriosis とと思われる部分の

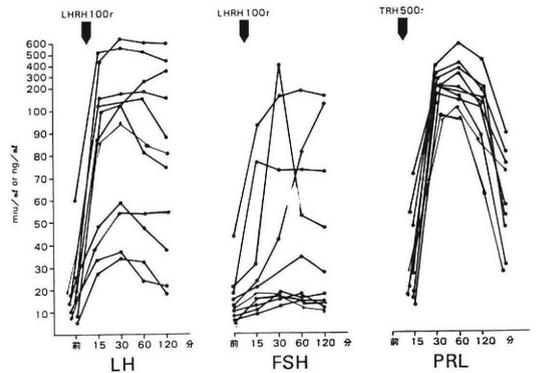


図 2 DANAZOL 服用前の下垂体機能

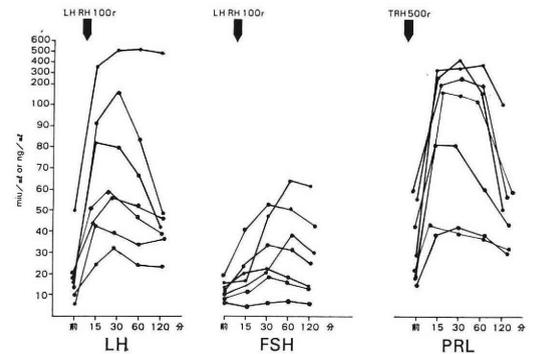


図 3 DANAZOL 服用終了直後の下垂体機能

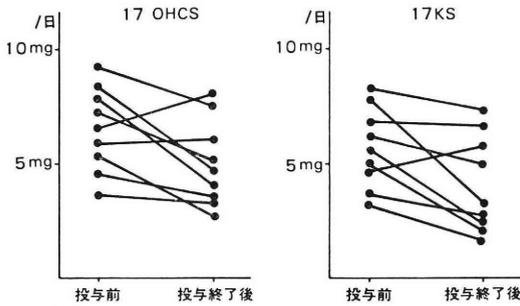


図 4 DANAZOL 投与前後の尿中17-OHCS/17-KS の変動

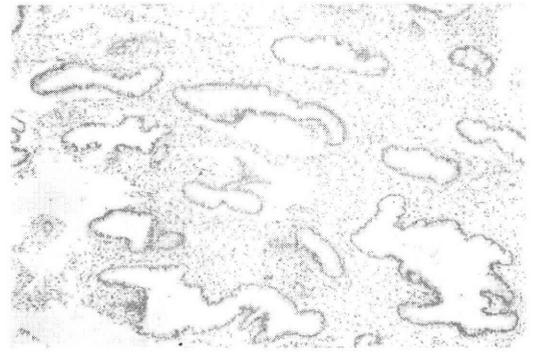


写真 1

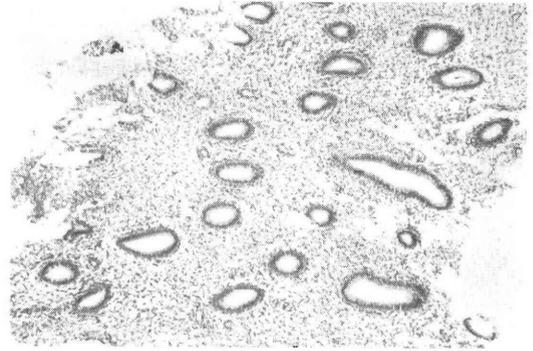


写真 2

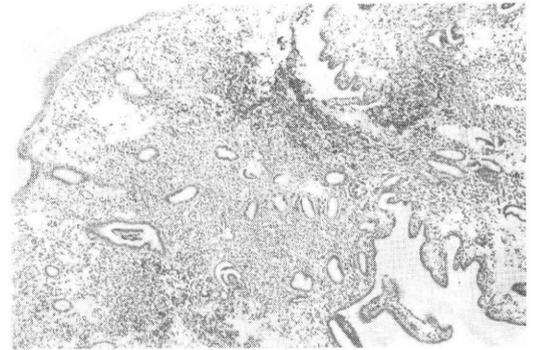


写真 3



写真 4

組織像を写真4に示した。

全体としては、子宮内膜では投与期間に応じて腺の萎縮、内腔へのおれ込みおよび間質細胞の数の減少が著明である。外性子宮内膜症の組織では、上述の子宮内膜と同様の所見をとる部分もあるが、その組織像は多彩であり、組織所見からのみで DA の効果のみをみることはきわめて困難と思われる。

5. DA の臨床的投与効果

DA の臨床的投与効果を表1に示した。月経困難症に対する効果判定は、投与終了後の第1回目の月経発来時に、その他のものは投与終了時での判定であり、最初から症状の存在しなかつたものは加えていない。自覚的な症状改善は月経困難症、性交痛において100%であり、これに次いで他覚的所見であるダグラス窩の硬結、子宮可動性の制限が改善されており、卵巣腫瘍の変化が最も悪く66.7%であった。これらを総合評価してみると、著効10例(50%)、有効6例(30%)、やや有効2例(10%)、無効2例(10%)であった。

6. 投与中の出血と排卵

投与中の出血よりみると、表2に示したごとく spotting を含む性器出血はかなり高頻度にみられ、特に投与中3回以上みられた症例が多く、投与の全周期にわたって続いた。

BBT よりみると排卵がみられたのが2症例2周期にあり、あとは全ての排卵が抑制されている。

7. 副作用

投与中に平均4.4kg の体重増加がみられ、図5に示すごとく最初の2~3カ月まで著明であるが、大部分はその後に増加は止まり、投与終了後1カ月でもともにもどる例が多くみられる。その他血液、凝固系の検索では特に問題はなく、DA で問題とされている肝機能検査でも表3に示したごとく、投与前後では有意差はなかつた。その他の副作用については表4にまとめて示した。

8. 投与終了後の予後について

DA 投与終了後の1~18カ月にわたる follow up 成

表 1 有 効 率

	やや有効以上/例数	
月経困難症	100%	16/16
下腹痛(月経時以外)	83.3	10/12
腰痛(")	70	7/10
性交痛(")	100	9/9
排便痛(")	83.3	5/6
内診時の疼痛	90	9/10
ダグラス窩の硬結	92.3	12/13
子宮可動性の制限	91.7	11/12
卵巣腫瘍の変化	66.7	8/12

表 2 性器出血よりみた DANAZOL の作用

1. 投与開始後全く出血をみなかった例	3
2. 排卵性周期を有した例	3
a. 1回のみ	3例
b. 2回以上	なし
3. 無排卵性出血を有した例 (spotting を含む)	13
a. 1~2回	3例
b. 3回以上	10例

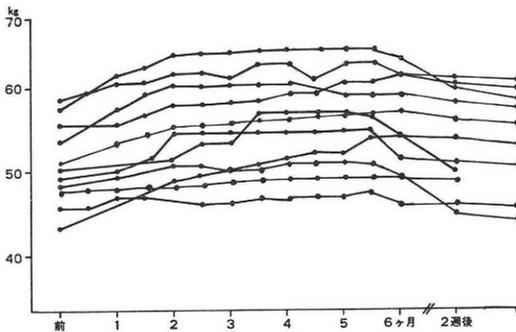


図 5 DANAZOL の体重に対する負荷作用

績について検討した。自覚症状および他覚所見とも、投与終了時(表1)とほぼ同様に高い有効率を示していた(表5)。

排卵は12例にみられ、4週以内が11例(91.7%)、8週以内が1例であり、平均投与終了後20.2日で排卵している。妊娠例は4例(その治療内容は DA 単独1例, DA+手術療法3例)であり、投与終了後4~6カ月で1例、7~12カ月で3例が妊娠している。4例中1例は妊娠8週で自然産産したが、残りの3例は全て満期で分娩し、児の異常はみられなかった。

挙児希望は12例あったので、妊娠率は33.3%となる。投与後における症状の再発をみると、終了時有用と判定した16例については2例が投与前の症状が再現し、再発

表 3 肝機能検査値

	投与前	投与終了時	有意差 (t-検定)
LDH (n=16)	294.7±26.84	299.6±25.22	なし
GOT (n=17)	15.7± 2.03	14.7± 1.87	なし
GPT (n=17)	12.7± 2.09	12.4± 2.03	なし

表 4 副 作 用

	投与中	投与終了1カ月後
カンジタ	1例 (5%)	0 (0)
胃痛	1 (5)	0 (0)
座瘡	10 (50)	3 (15)
浮腫	5 (25)	0 (0)
毛髪減少	1 (5)	0 (0)
毛髪増加	1 (5)	0 (0)
嘔声	3 (15)	0 (0)
筋肉がつる感じ	1 (5)	0 (0)
いびき	2 (10)	0 (0)
発疹	1 (5)	0 (0)
食欲亢進	2 (10)	0 (0)
食欲不振	1 (5)	0 (0)

表 5 Follow up 後の有効率

	やや有効以上/例数	
月経困難症	93.3%	14/15
下腹痛(月経時以外)	80	8/10
腰痛(")	75	6/8
性交痛(")	100	8/8
排便痛(")	83.3	5/6
内診時の疼痛	83.3	5/6
ダグラス窩の硬結	88.9	8/9
子宮可動性の制限	90	9/10
卵巣腫瘍の変化	66.7	6/9

と診断した(再発率12.5%)。その再発の時期は6カ月と18カ月目であった。

IV 考 察

子宮内膜症は生殖年代の婦人が罹患する複合因子による疾患単位であり、最近では疾患に対する意識の高まりと、診断的な進歩が相伴って、その数は多くなりかつ若年化しつつあることが知られている。しかも治療に対する抵抗性および再発の多いことから、われわれ臨床医を悩ませる疾患の1つである。

従来はそのホルモ的な治療法として、偽妊娠療法が知られているが、長期にわたること、再発率の高いこ

と、使用ホルモン量を増加させねばならぬこと、重症例での治療効果がほとんど期待できぬ点などから、批判的意見も少なくなかった。

しかし最近になり、外国で DA による治療法が報告されてから^{1,2)}、本邦でも再び子宮内膜症に対するホルモン療法が見なおされつつある。DA は 17α -Pregn-4 en-20-yno testosterone の誘導体であり、ラットにおいては LH, FSH などの下垂体よりの産生抑制作用を有することから、estrogen および progesterone 効果を有さず、弱い androgen 様作用をもつ anti-gonadotropin drug として開発されたものである^{3,4)}。またラットでは同様に、LH-RH に対する下垂体の反応性も抑制するという。ヒトに対しては、すでに数年前より内膜症の治療薬として用いられており、その効果についての報告^{1,2)} もみられるが、本邦での検討はまだ少数である。子宮内膜症については、その患者は年々増加しつづると言われ、その原因については診断技術の発達や、関心度の増加のほかに、疾病そのものの増加の可能性が指摘されている。

子宮内膜症のうちでも内性子宮内膜症（腺筋症）は一般に経産婦に多く、年齢とともに症状が強くなるのが特徴的であり、一方、外性子宮内膜症は不妊と結びつくことが多いために、常に妊孕性を念願において治療しなければならない場合が多い。妊娠を希望する子宮内膜症患者には、主として今までは偽妊娠療法がホルモン療法としては採用されてきた。しかし本法はその再発率が高く（35.6%）、また手術療法を行った場合でも 2.0~46.7% の再発がみられるという⁵⁾。

これらのことより新しいホルモン療法として、この DA が注目されているわけである。

DA の投与方法に関してはまだ画一的な方法は確立されていないと言つてよい。一般的には、200~800mg/day のかなり大量が使われている。この薬理作用からみると、ラットでは既に述べたように、強力な抗 gonadotropin 作用が注目されている^{1,2)}。しかし今回の検討で示したごとく（図 1 参照）、ある程度の gonadotropin の低下はみられたが、連続的な投与でも期待したほどの低下はみられず、又図 2 のごとく下垂体機能の低下もみられない。これは Greenblatt ら¹⁾、Guillebaud ら²⁾ の報告と同じ傾向であり、ヒトにおいては動物にみられるような強力な抗 gonadotropin 作用は存在しない可能性がある。

また DA は testosterone の誘導体であるために、多少の androgen 作用をもっている。

しかしこれはきわめて弱く、Potts^{3,4)}によれば 1/125 以下であるという。また、同時に多量を用いると抗 an-

drogen 作用のあることが判明しており、estrogen, progesterone, 抗 estrogen 作用はなく、抗 progesterone 作用をもつという。いずれにしても、Dmowski ら⁶⁾も述べているように、また、今回写真 1~3 で示したように、子宮内膜の萎縮や消失がみられ、内膜の活動性が消失してゆくことがこの薬剤の直接的な作用である。

よつてこの薬剤をヒトに対する臨床効果の面からみると、Young ら²⁾は 370 例の子宮内膜症の患者について、200~800mg/day の 3~9 カ月投与を行つて、その効果と副作用を検討している。800mg 投与では 2 カ月目で 98% が無月経となり、97% が無排卵を示し、3 カ月以内に 80% に自覚症状の緩解をみたと述べているが、子宮内膜の壊死→完全治癒には 9~12 カ月の投与が必要という。

Ward⁷⁾も 72 例を対象に 600mg/day より投与を開始し、400mg, 200mg と減量してゆき、ほとんどの患者で 200mg/day まで減量することができ、全ての患者が無月経となり、11 例に破綻性出血があつたが、その効果は下腹痛が 70%、性交痛 91% ときわめて良く、今回のわれわれと同じような良好な結果を報告している。しかし、DA を用いた場合、このような自覚症状の改善は著しいが、今回の卵巣腫瘍の縮小が 66% にしかみられなかつたように他覚的所見の改善はやや劣るようであり、これは偽妊娠療法などのホルモンの治療時にみられる特徴的な所見でもあるのかも知れない。

DA の使用量および使用期間については、Young ら²⁾は 800mg/day が最も効果があるが、子宮内膜の壊死は 4 カ月の投与ではおこらないので、9~12 カ月投与が必要という。今回の経験では 400mg 投与でも 3 カ月をすぎるとかなり強い atrophy がみられ（写真 2, 3 参照）、白人と日本人の感受性の差がある可能性もある。

DA 投与時における血中（または尿中）ホルモンの変動についてふれてみたい。

DA をある期間連続的に投与すると、FSH と E_2 のレベルは低下し、FSH, LH の mid cycle surge は抑えられるという。Wood ら⁸⁾は 5 例について 600mg/day を 6 カ月間投与して、そのホルモン動態をみているが、それによれば FSH は低下するが LH は平衡を保っており、 E_2 は低値を持続すると言うが、今回の検討では FSH, LH とともに期待したほどの低下はみられず、 E_2 に関しては緩徐な低下がみられたが、有意差はなかつた。

LH-RH, TRH の負荷による下垂体機能の抑制の有無を検討すると、その反応性は十分に保たれている。岡村¹⁰⁾も 600mg/day 3 週間投与で同様の検討を行つてい

るが、LH-RH 投与に対する gonadotropin の反応は正常であると述べ、DA の作用機序として estrogen の視床下部での positive feed back を抑制するのであろうと推定している。

これらのことより考察してみると、DA の作用機序としては、上位中枢の抑制のほかに子宮内膜に対する直接作用もある可能性もあり、また Tsang ら¹¹⁾が主張するように、卵巣での aromatase-enzyme 系を抑制して E₂ の低下をきたすような作用も考えられ、ホルモンレセプターレベルでの動きも加えて更に検討する必要がある。

DA の副作用についてみると、一般的には偽妊娠療法にみられるのと同様の症状である。体重の増加は今回の報告と同様に、最も多くみられるものである¹²⁾。これは 200mg~400mg という大量のステロイドの anabolic な作用による食欲亢進に伴うものであろう。

その他痤疮、浮腫、嗝声などが一般的にみられるものであるが、これらは DA の弱い testosterone 作用によると思われる。

武谷ら¹³⁾も 83% に体重増加 (平均 2.8kg) をみとめたが、これらの副作用は 2~3 カ月の短期間で、ほぼ一過性であったと言う。

特に重視される肝機能への影響は、投与中に 2 例 (10%) にみられたが、投与終了時には正常に復していた。植木ら¹⁴⁾は 21% の肝機能異常を指摘しているが、これも肝庇護剤の併用で 3.5% にとどめることができたという。その他の血液に対する副作用は、ほとんど無視し得ようである¹²⁾。また、plasminogen レベルの上昇と凝固時間の減少があり、これは子宮内膜での plasminogen 産生 activator が DA により低下することによると思われる。偽妊娠療法などの pill による心・循環器疾患を有する禁忌患者への投与にも有利な点であると思われる。

次に臨床的に最も問題となるのは、再発と挙児希望者に対する妊娠率の問題であらう。

佐野ら¹⁵⁾は、偽妊娠療法を含めた各種の療法のうち、DA+手術療法が最も再発率が少なく 11.4% であり、その妊娠率は 32% であるが、DA 単独では 24% の再発と 20% の妊娠率で、やや成績が下ると述べており、今回のわれわれの成績もほぼ同様の傾向がみられた。

Dmowski⁷⁾は、治療後の 7~12 カ月の follow up で 39% が再発したと述べ、特に進行の進んだ例での再発率の高さに問題があると指摘し、武谷¹³⁾は 22% の再発率で、平均 9.4 カ月目であったという。しかし、これらも従来の偽妊娠療法の再発率よりは少なく、DA が子宮内膜症の保存的治療法として優れたホルモン剤であることは確かなようである。さらに児の予後を含めて長期の

follow up 成績に期待したいと思う。

本論文の要旨は、第 24 回日本不妊学会総会 (札幌市) で発表した。DANAZOL の提供を受けた東京田辺製薬 K.K. に深謝します。

文 献

- 1) Greenblatt, R. B., Dmowski, W. P., Mahesh, V. B., and Scholer, H. F. L.: Clinical studies with an antigonadotropin.—DANAZOL. *Fertil. Steril.* 22: 102, 1971.
- 2) Young, M. D. and Blackmore, W. P.: The use of danazol in the management of endometriosis. *J. Int. Med. Res.* 5 suppl (3): 86, 1977.
- 3) Potts, G. O.: Experimental pharmacology of Danazol. *Int. Congr. Ser. No. 368*: 68, 1976.
- 4) Potts, G. O.: Pharmacology of Danazol. *J. Int. Med[Res.]* 5 suppl (3): 1, 1977.
- 5) 植木実, 大塚憲衛, 岡村信介, 田中泰吉, 奥田喜代司, 神吉秀一, 長谷川博之, 土居莊之助, 渡辺克一: 子宮内膜症に対するホルモン療法, 産婦進歩, 32: 179, 1980.
- 6) Guillebaud, J.: Endocrine effects of DANAZOL in menstruating woman. *J. Int. Med. Res.* 5 suppl (3): 57, 1977.
- 7) Dmowski, W. P. and Cohen, M. R.: Treatment of endometriosis with antigonadotropin DANAZOL. A laparoscopic and histologic evaluation. *Obst. Gynecol.* 46: 147, 1975.
- 8) Ward, G. D.: Dosage aspects of Danazol therapy in endometriosis. *J. Int. Med. Res.* 5 suppl (3): 75, 1977.
- 9) Wood, G. P., Flickinger, G. L. & Nikhail, G.: Hormonal change Associated with Danazol Therapy. *Obst. Gynecol.* 45: 302, 1975.
- 10) 岡村隆: Danazol の女性内分泌機能におよぼす影響, 日本不妊学会誌, 24: 282, 1979.
- 11) Tsang, B. K., Henderson, K. M., and Armstrong, D. T.: Effect of danazol on estradiol-17 β and progesterone secretion by porcine ovarian cells in vitro. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 133: 256, 1979.
- 12) Chimbira, T. H., Cope, E., Anderson, A. B. M., & Bolton, F. G.: The effects of danazol on menorrhagia, coagulation mechanisms, haematological indices and body weight. *British J. Obstet. Gynecol.* 86: 46, 1979.
- 13) 武谷雄二, 長坂恒樹, 水口弘司, 坂元正一: 子宮内膜症に対する DANAZOL の使用経験, 産と婦, 47: 1236, 1980.
- 14) 植木実, 佐野隆: Endometriosis に対する偽閉

- 経 (danazol) 療法, 産婦治療, 41 : 127, 1980.
15) 佐野隆, 植木実: 子宮内膜症治療法の選び方, 産婦治療, 41 : 649, 1980.

Clinical effects and hormonal aspects
of Danazol treatment in patients
with endometriosis

**Yoshiaki Sato, Takao Ishiguro,
Akio Hoshino, Norihito Sudo,
Takeshi Takahashi and Shoshichi Takeuchi**

Department of Obstetrics & Gynecology,
School of Medicine, Niigata University

Twenty women who received Danazol therapy for endometriosis were followed up clinically from 1 month to 18 months. The initial extent of endometriosis was diagnosed as grade I in 1, grade II in 6, grade III in 11 and grade IV in 2 following with Beecham's classification.

During administration of Danazol in a dose of

400 mg/day for 6 months, serum FSH, LH, E₂ gradually decreased, but these levels showed no significant variations statistically.

Urinary 17-OHCS, 17-KS seemed to decrease before and after Danazol treatment. During Danazol treatment, 100% developed anovulation, but ovulatory cycles returned with in 3 weeks. All 20 women who initially complained of dysmenorrhea or pelvic pain had marked improvement during therapy. Histogry revealed atrophic changes in the uterine and ectopic endometrium in relation to dosage of Danazol and the evidence of a healing process.

The recurrence of symptoms was revealed 2/16 (12.5%). Of infertile women who desired pregnancy after treatment, 4 women conceived, for a pregnancy rate of 33.3%.

Of these conceptions, one spontaneous abortion was observed and other 3 cases had healthy baby.

(受付: 昭和55年12月23日)

油性造影剤 Lipiodol UF による 子宮卵管造影法

Hysterosalpingography Using Oily Contrast Media Lipiodol UF

東邦大学医学部産婦人科学教室

百瀬 和夫

Kazuo MOMOSE

Dep. Obstet, Gynec. Toho Univ. School of Med. Tokyo

藤枝市立志太病院産婦人科

岡田 研吉 林田 和郎

Kenkichi OKADA Kazuo HAYASHIDA

Fujieda City Hosp. Shizuoka

不妊患者を主な対象とする1,050例の子宮卵管造影法に、油性造影剤 Lipiodol UF を使用した。本剤は局所の刺激性が少なく、24時間後の残像撮影を併用すれば、卵管疎通性の判定が容易である。

脈管内侵入は852例中75例8.8%にみられたが、臨床的に何らかの症状を呈したものはなく、アレルギー反応は1例も認められなかった。

(Jap. J. Fert Ster., 26(2), 183-186, 1981)

超音波や CT など ME の発達がめざましい今日でも、女性内性器の形態的变化を客観的に判定するために、子宮卵管造影法 HSG は婦人科における重要な検査手技としての位置を保っている。Image intensifier, TV-レントゲンによる透視、高感度フィルや増感紙などの導入により、患者に対する侵襲の軽減が計られる一方、より理想的な造影剤への努力も大きく寄与しているものと思われる。

油性造影剤 Lipiodol UF を用いた HSG の最近10年間の成績をまとめてみた。

対 象

昭和45年1月より54年12月までに東邦大学大森病院産婦人科において実施した1,050例の HSG で、その主な適応は表1の如くである。

原発、続発不妊あわせると、852例80%を超え、本法が依然として不妊診療上、重要なことを示している。とくに、これらの場合には後述するように、結核や骨盤内炎症性疾患 PID などの既往がなく、卵管に疎通性があ

表1 Lipiodol UF による HSG の主な適応

適 応	例 数	頻 度
原 発 不 妊	565	53.8%
続 発 不 妊	287	27.4
習 慣 流 産	75	7.2
下 腹 部 腫 瘍	92	8.8
月 経 異 常	22	2.1
子 宮 奇 形	8	7.6
卵 管 再 疎 通	1	0.1
計	1,050	

ると予想される例の HSG に対して、主に Lipiodol UF が選択されている。また習慣性流産や下腹部腫瘍の鑑別で、子宮の形態的变化を知る目的で HSG が行われることも比較的多い。しかし性器出血や月経異常で子宮内膜に病的変化が疑われる場合や卵管再疎通の術前診断として、油性剤による HSG は、前者では塞栓の可能性、後者では閉塞卵管内長期残留のおそれがあるため、

むしろ禁忌となる。

手 技

HSG 実施の時期は月経終了後4, 5日とし, 翌日または翌々日の残像撮影を含めても, X線照射が排卵期にかからないようにする。HSG を行った同一周期に妊娠が成立した例でも, とくに児の異常が高率ではないと報告されているが, 懸念を表明する患者に対しては, その周期だけリズム法かコンドームによる避妊をすすめる。

子宮腔部を滅菌後, 前唇に単鉤鉗子を横にかけ, 目盛りつきガラス管をつけた金属製頸管カニューレにより, 造影剤を子宮腔内に注入する。TV-レントゲンで Brown 管上の影像で子宮像を確認し, 1ml 注入ごとの圧力と左右卵管像が出現するまでの造影剤の量を記録する。卵管采から腹腔内に油性剤がピンポン球のように数滴流入するところまで確かめたら, 第1回の spot film を撮影する。1分前後の透視と2枚の film 撮影で, X線照射量は500milli rads 以下におさえることができる。

また注入器を頸管内に強くねじこむことや注入圧が200mmHg を大きく超えることを避ければ, HSG にさいして患者に苦痛を与えることはほとんどない。私は油性剤による HSG では, 術前, 術中に鎮痙剤, 鎮痛剤を用いていない。

造影剤の使用量は5~7ml 程度で十分であり, 10ml を超過する例は不妊患者の1%以下であった²⁾。しかし注入器と頸管とのかみ合わせがわるくて子宮口から造影剤が洩れたり, 子宮容量が予想外に大きいため卵管像が出現するにいたらない場合などが, HSG による卵管疎通性判定における誤診の最大の理由であるので, 造影剤の注入量と注入圧をコントロールする必要がある。

Lipiodol UF による HSG では, 術後とくに安静を

必要としないが, 膣部, 頸管内細菌の上昇による感染を防ぐため, 抗菌スペクトルの広い抗生物質を2~3日間, 内服させる。しかし卵管溜水腫などの異常が発見された場合には, PID の再燃防止のため, 安静を指示し, 抗生物質を増量する。

成 績

Lipiodol UF による HSG 1,050例のうち, 児希望を主訴とする852例の造影所見を表2, 3にまとめた。

子宮像では, ほぼ正常が半数を占め, これは水溶性造影剤を主に用いた場合の所見と全く差がなかった²⁾。発育不全以下の異常像の頻度にも著しい差はないが, 脈管像のみは原発不妊で5.3%, 続発不妊で15.7%とかなりの高率になっている。油性剤の方が脈管内に侵入しやすいというよりは, 体液と混ぜず, 吸収されにくいため発見されやすいためであろう。しかし透視下で壁内侵入像を認め次第, 直ちに注入を中止すれば, 油が血管内に入っても, この程度の量では全く無症状で, 障害を残すことはなかった。脈管像は油性剤による HSG の合併症というよりは, むしろ偶発所見と考えている。

卵管X線像では, 両側疎通性良好のものが $\frac{3}{4}$ を占め, これは対照²⁾の50%強より高率であった。油性剤を主として卵管所見の良さそうな患者に選択した所期の目的を反映している。このような例に水溶性剤を使用して, 比較的多量(恐らく2~3ml 以上)が腹腔内に流入すれば, 滲透圧の差から化学的炎症を起こし, 術後, 激しい腹膜刺激症状を呈するからである。

しかし一方, 両側卵管疎通障害例が10%程度に認められ, これらでは油性剤が長期間停滞して, 卵管内や腹膜面に異物肉芽腫を形成するおそれがあるので, 炎症がおさまる次第, 異物の除去—卵管形成手術にふみきるこ

表2 不妊患者における子宮X線像

子宮像	原発不妊		続発不妊		計	
正 常	289	51.2%	137	47.7%	426	50.0%
発育不全・萎縮	118	20.9	31	10.8	149	17.5
弛 緩 状	27	4.8	20	7.0	47	5.5
辺縁微細不正	1	0.2	1	0.4	2	0.2
辺縁粗大不正	27	4.8	17	5.9	44	5.2
ポリープ状増生	26	4.6	7	2.4	33	3.9
奇 形	32	5.6	21	7.3	53	6.2
欠 損	12	2.1	4	1.4	16	1.9
変 形	3	0.5	0	0	3	0.3
外傷性癒着	0	0	4	1.4	4	0.5
脈管内侵入	30	5.3	45	15.7	75	8.8
計	565		287		852	

表 3 不妊患者における卵管X線像

卵管像	原発不妊		続発不妊		計	
両側通	417	74.7%	203	73.0%	620	74.2%
一側通・他側癒着	15	2.7	9	3.2	24	2.9
" 閉塞	12	2.2	12	4.3	24	2.9
" 不明	34	6.1	21	7.6	55	6.6
両側癒着	27	4.8	5	1.8	32	3.8
一側癒着・他側閉塞	16	2.9	2	0.7	18	2.1
" 不明	1	0.2	0	0	1	0.1
一側閉塞・他側不明	0	0	1	0.4	1	0.1
両側閉塞	36	6.4	25	9.0	61	7.3
計	558		278		836	
不明	7		9		16	

表 4 油性剤と水溶性剤の比較

特徴	油性剤	水溶性剤
局所の刺激	少ない	強い、術後に腹痛・発熱
アレルギー反応	ほとんどない	まれに紅斑
吸収性	遅い。閉塞卵管内に長期間残留する	早い
残像撮影	24時間以後	数分以内
主な適応	卵管が通っていると思われる例 アレルギー体質	卵管閉塞部位の確認 性器出血など子宮内膜に異常が予想される例 遠方で再来院に不便な患者に

が望ましい。なお油性剤は、吸収が速やかにすぎて注入直後像と残像との比較が困難な水溶性剤に比べて、卵管疎通性の診断は容易のようである。

副作用

術中、術後に検査を中断、あるいは医治を必要とするような合併症は1例もなかった。抗菌スペクトルの広い抗生物質を使用し、透視とともに注入量が過大にならないように注意したためであろう。

1,050例中、主な副作用としては腹痛2例、胸痛1例、油性剤の残留5例が主なものであった。なかにはLipiodol UF では副作用なく、その後の水溶性剤によるHSGで、下半身に紅斑を生じた例があり、また、以前に血管透視でアレルギー反応を呈したにもかかわらず、Lipiodol UF によるHSGでは無反応であり、しかも術後まもなく妊娠した1例を経験した。造影剤は子宮、卵管粘膜からはほとんど吸収されず、とくに油性剤は腹腔

内に1~2ml程度の少量が流入しても、分解がゆるやかで、吸収がおそいため、アレルギー反応を呈しにくいのではなからうか。

考按とまとめ

HSGに用いる造影剤を大きく分けると、油性剤と水溶性剤となる。前者は刺激性はないが、吸収されにくく、後者は吸収されやすいものの、腹膜刺激作用が強い(表4)。いずれにしても、TVレントゲンによる透視下で、圧をコントロールしながら造影剤の注入量が過大にならないように注意すれば、術中、術後の疼痛は最少限におさえられ、副作用をなくすことが期待できよう。

文 献

- 1) 百瀬和夫, 江口貞雄: 子宮卵管造影法—注入圧曲線の作製とその実際, 中外医学社, 1965.
- 2) 百瀬和夫: 子宮卵管造影法—不妊診療における注意点, 日産婦東京会報, 25, 56, 1976.
- 3) 百瀬和夫, 林鴻程: 子宮卵管のX線像—不妊をめぐって, 産と婦, 46, 883, 1979.

Hysterosalpingography using oily contrast media Lipiodol UF

K. Momose

Dep. Obstet, Gynec, Toho Univ, School of Medicine, Tokyo

K. Okada and K. Hayashida

Fujieda City Hosp., Shizuoka

Hysterosalpingography with Lipiodol U F was effected to 1,050 cases, majority of which are infertile patients. Found less irritating, the agent makes it easy to determine tubal patency

when the after-image is taken. Intravasation was seen in 75 cases, or 8.8%, out of 852 cases, but none of the cases showed allergic reaction.

Contrast media for hysterosalpinography roughly divided, are either oily or water-soluble. The former is less irritating, while peritoneal irritation effect of the latter is strong, though well absorbable.

Minimizing pain and eliminating side-effect during and after hysterosalpingography with Lipiodol U F can be expected if cautions are exercised not to exceed the infused volume, along with controlling the pressure, while seeing through the image by TV-Roentgen.

(受付: 昭和56年1月8日)

卵管形成術に対する microsurgery の応用

—その基礎と臨床—

Application of Microsurgery to Tuboplasty —Its Basic and Clinical Studies—

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室 (指導: 飯塚理八教授)

真 木 健

Ken MAKI

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

卵管形成術における肉眼手術と顕微鏡下手術の予後を判定すべく、家兎卵管を使用してその吻合部内面の治癒過程を走査電子顕微鏡 (scanning electron microscope, 以下 SEM と略) にて経目的に観察した。その結果を解析評価することにより卵管通過障害に対する顕微鏡下手術の術式を創案し、ヒト卵管形成術に応用した。

以上の研究から次の結論を得た。

1. 家兎卵管の端々吻合術において、肉眼手術と顕微鏡下手術後の疎通率は、各々、20.8%、90.0%であった。
2. 同時に、術後の SEM による縫合部内面の検討では内腔不整の出現率は、肉眼手術、87.5%、顕微鏡下手術、2.8%で明らかに顕微鏡下手術が優っている。
3. 家兎卵管の端々吻合術において術後の疎通率、SEM 所見より、糸の太さ、針数、縫合深度は、各々、9-0、4針、粘膜に0.1mm 突出させる縫合法が最適である。
4. ヒト卵管形成術において、肉眼手術と顕微鏡下手術の術後妊娠率は、各々、17.9%、28.6%であり、顕微鏡下手術の方が高い。
5. 卵管形成術、特に端々吻合術に顕微鏡下手術を応用することは大いに意義がある。

(Jap. J. Fert Ster., 26(2), 187-199, 1981)

I 緒 言

女性不妊因子の中で器質的な卵管通過障害の占める比率は高い。しかし、その治療対策については有効な方法論がなく模索の現状である。従来より卵管通過障害の症例には、非観血的療法である通気、通水療法と、観血的療法としての卵管形成術 (肉眼手術) が行われていたが、内外の文献的報告を見ても Sieglar²⁹⁾を初め予後は不良であつた。近年・外国諸家により卵管の観血的療法に顕微鏡下手術 (microsurgery, 以下マイクロと略) を導入し、妊娠率の飛躍的向上を見たとの報告がある。し

かし、その術式、予後等については術者によりかなりの差を認める。著者らは、従来、卵管形成術について行われていた肉眼手術 (gross operation, 以下マクロと略) とマイクロの比較検討およびマイクロの訓練を目的として、家兎卵管を用いこれにマクロとマイクロにて糸の太さ、針数、縫合深度につき種々の方法で端々吻合を行い、その吻合部内面の治癒過程を SEM にて経目的に観察した。その結果を解析評価することにより、卵管通過障害に対する著者らのマイクロ術式を創案し、ヒト卵管形成術に応用した。

さらに、従来、当大学で行っていた卵管肉眼手術後の

妊娠率とマイクロ形成術後の妊娠率の比較検討を著者らが手術適応とした卵管通過障害の病態別に行い、特に端々吻合術にマイクロの導入の必要性を認めたのでここに報告する。

II 対象と方法

1. 対象

(1) 動物実験

体重3 kg の日本白色種ウサギ、雌、32匹の両側卵管(64例)を使用した。

(2) 臨床研究

マイクロによる卵管形成術を行った症例は、1974年1月～1979年12月までの38例で、2年以上の不妊期間を持ち、他の不妊症検査(子宮内膜検査、月経血培養、精液検査、フーナーテスト)で何ら異常を認めず、通気、子宮卵管造影(Hysterosalpingography, 以下 HSG と略)にて卵管通過障害を認めた者である。HSG による手術適応は、①両卵管に卵管采癒着による通過障害を認め、反復通気通水にても改善しないもの。②卵管溜水腫(Hydrosalpinx, 以下 HYD と略)。③卵管角および卵管内腔の完全閉鎖。である。

2. 方法

(1) 動物実験

① 麻酔法

塩酸ケタミン(初回に50mg/kg 筋注、その後、体動あれば50～100mg ずつ追加筋注する)、または塩酸ケタミン+ペントバルビタールナトリウム(初回、塩酸ケタミン30mg/kg 筋注、その後耳静脈よりペントバルビタールナトリウムを0.3ml/kg ずつ追加静注する)にて行った。

② 手術法

家兎を手術板に仰臥位に固定し、腹部をバリカン、カミソリにて剃毛した。腹壁を消毒後(以下無菌的操作)下腹部に約7 cm の正中切開を加えた。双角の子宮端から約3 cm 離れた箇所の卵管を玉井式血管縫合用ダブルクランプにて挟鉗した。

(i) 肉眼手術

卵管の漿膜、筋層、粘膜を一括してカミソリにて切断し、実際の端々吻合を想定して片側のみ2～3 mm 切除した。肉眼にては7-0の糸が限界であるので、3-0、7-0 ナイロン糸にて各6匹ずつ、両側卵管(12例)に端々吻合を行った。針数は2～4針、縫合深度は粘膜にかけ、かつ内腔への糸の突出を可能な限り避けるようにした。

(ii) 顕微鏡下手術

家兎卵管を血管縫合用ダブルクランプにて挟鉗後、6～10倍拡大下にて2本の鑷子にて鈍的に卵管漿膜を剥

離した。カミソリにて卵管切断後、片側のみ一部切除した(写真1)。卵管内腔に直径0.2～0.3mmのナイロン糸を挿入し、クランプをかけ直し、10～16倍拡大下にて9-0、11-0 ナイロン糸を用い各10匹(20例)ずつ端々吻合を行った。(計40例)各糸につき3針(6例)、4針(6例)(写真2)、6針(4例)、(写真3)、8針(4例)(写真4)にて縫合した。

また、縫合深度は図1のごとく、(I)筋層のみ(8例)、(II)粘膜途中まで(12例)、(III)粘膜断端より0.1mm 内腔へ突出させる(12例)、(IV)粘膜断端より0.2mm 以上

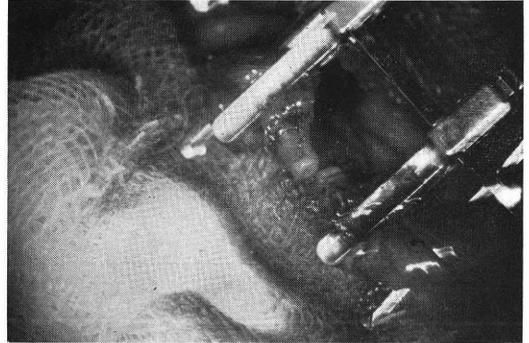


写真1 玉井式血管縫合用ダブルクランプと漿膜を剝離後、一部切除された卵管

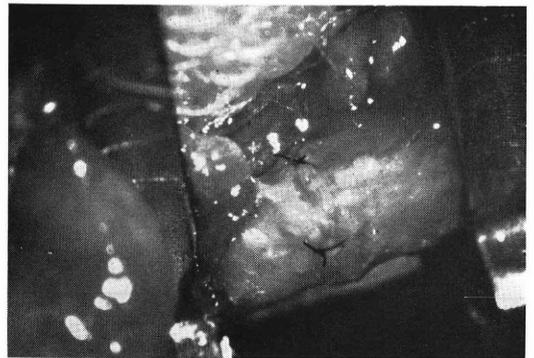


写真2 4針縫合完了したところ

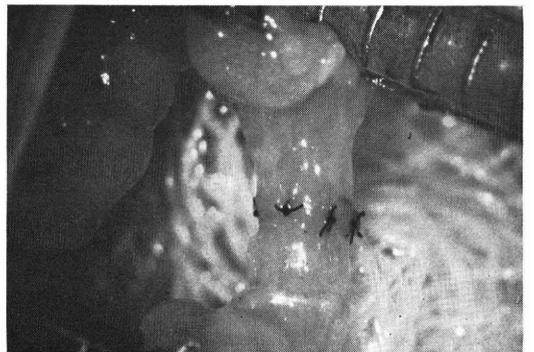


写真3 6針縫合

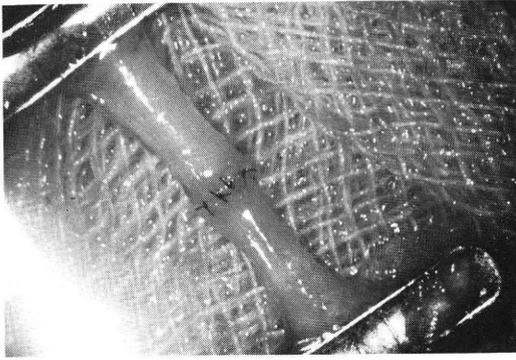


写真 4 8 針縫合

縫合深度

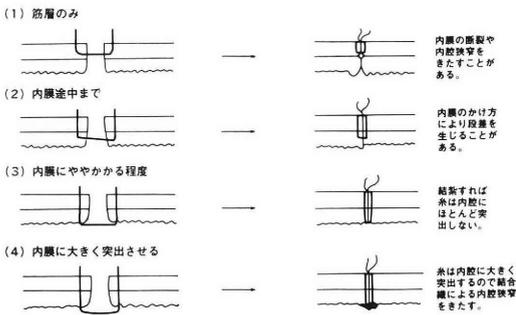


図 1

突出させる（8例）の4方法にて縫合し、針数の違いと縫合深度の組み合わせで計40例行つた。

漿膜縫合は行わず、内腔に挿入したナイロン糸は縫合完了後ただちに抜去した。

術後の管理はマクロ、マイクロとも同様とし、セファロリジン1g/日筋注を3日間行つた。

③ 疎通性の確認と縫合面の SEM 的観察

術後1日～8週までに再開腹し、卵管を摘出し縫合部外観を肉眼的に観察後、0.1mm ナイロン糸を挿入して疎通性を確認した。その後摘出卵管をグルタルアルデヒドにて固定し、縫切開を加えてから SEM 用の処理を行い、縫合部内面の糸の露出状態、内腔不整、狭窄の有無、縫合面治癒過程を SEM（倍率30～1000倍）にて観察した。

(2) ヒトへの応用（臨床）

動物実験にて体得したマイクロの技術をヒト卵管形成術に応用した。術式の検討を要する項目（糸の太さ、針数、縫合深度）については、動物実験の結果を参考とし、糸の太さ7-0～11-0、針数4～6針、深度は粘膜断端より内腔に0.1mm 突出する方式とした。

一方、器械については、持針器、鉗子、鉗、子宮固定器、卵管把持器等を準備、開発した¹⁾(写真5、6)。

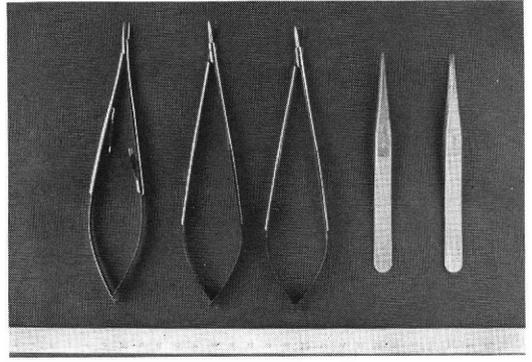


写真 5 左よりマイクロ持針器、直剪、曲剪、鉗子

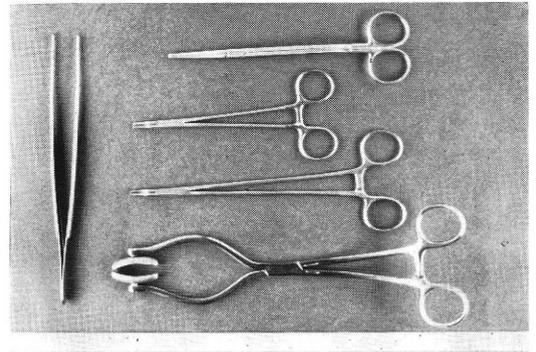


写真 6 左、鉗子、右上よりクーパー、マイクロマクロ兼用持針器（短）、同持針器（長）、子宮固定器

III 研究成績

1. 動物実験の成績

(1) マクロとマイクロの比較

3-0、7-0 ナイロン糸を用い肉眼縫合した家兎卵管と、9-0、11-0 ナイロン糸を用い顕微鏡下で縫合した家兎卵管における縫合部の疎通性と縫合部内面の SEM による観察では、マクロ後は糸の内腔への大きな突出、卵管粘膜の破壊、断裂などの不整所見、縫合した左右卵管の歪曲を24例中21例（87.5%）に認めた（写真7）。また、対側粘膜に糸がかかった例が5例（20.8%）も認められた。内腔へ突出した糸は術後日数が経るにつれて、結合織、粘膜組織に被覆されたが（写真8）、糸の突出が大きいため内腔の狭窄、閉塞をきたす例が多く、ナイロン糸挿入による疎通性の確認では、24例中わずか5例（20.8%）の疎通率であつた。

一方、マイクロ縫合後の卵管内腔は前述した縫合法の違いにより SEM 所見に差を有したが、疎通性は40例中36例（90.0%）が有し、SEM 上でもマクロ症例に見られた様な強度の内腔不整は、閉塞例を除いた36例中1



写真 7 マクロ、3-0ナイロン糸使用、術後2週 (×100)

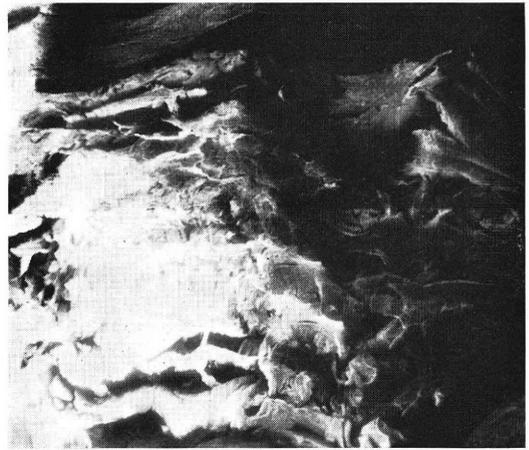


写真 9 マイクロ、3針縫合、術後8週 (×30) 上方に粘膜の離開が見られる

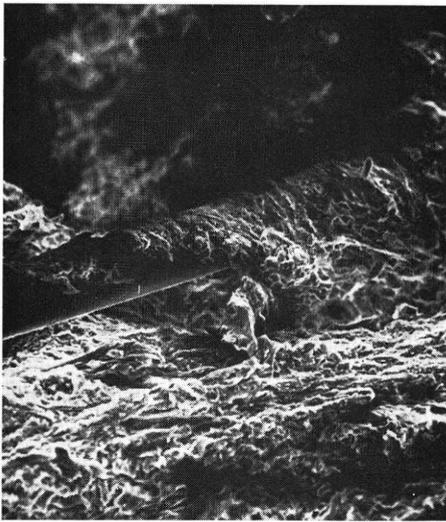


写真 8 マイクロ、7-0ナイロン糸使用、術後7日 (×600)

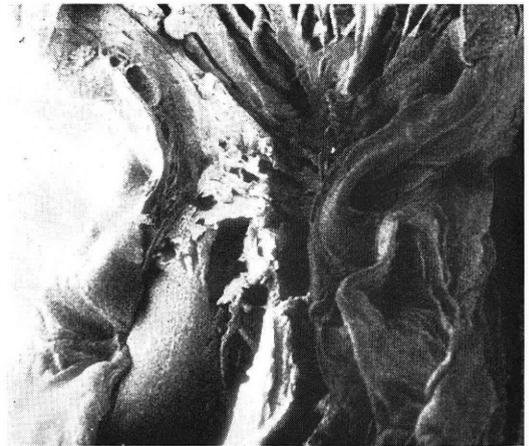


写真 10 マイクロ、6針縫合、縫合法 (I)、術後6週 (×30) 縫合部粘膜の内腔突出による輪状狭窄が見られる

例 (2.8%) しか認められなかった。

(2) 糸の太さ

マクロにおける3-0、7-0間には、7-0の方がやや内腔不整が軽度な傾向が認められたが、疎通性その他についてはほとんど差がなかった。

マイクロにおいては9-0、11-0使用例間に全く差を認めなかった。

(3) 針数

マクロについては、当初予定した4針縫合は全く不可能であることが判明したので、2針、3針にて各12例ずつ縫合したが、両者間に疎通性、SEM 所見に明らかな差は認められなかった。

一方、マイクロでは、3針縫合例で肉眼および SEM

観察上、縫合不全(写真9)、卵管のズレを認めた例が12例中2例(16.7%)あった。4針以上にて対称的に縫合した場合は、同様の異常所見は28例中1例(3.6%)しか認めなかった。なお、4、6、8針縫合例間には明らかな差を認めなかった。

(4) 縫合深度

著者らは前述のごとく4種類の縫合法にて実験してみたが、SEM による縫合面の観察で、次のような所見を認めた。

縫合法 (I) では、3針縫合例で縫合部粘膜の軽度離開を2例中1例(50.0%)に認め、針数4~8針例では、結紮糸による筋層短縮分だけ粘膜が内腔へ突出し軽度の輪状狭窄をきたした例を8例中2例(25.0%) (写真10)に認めた。疎通率は8例中7例、87.5%であった。

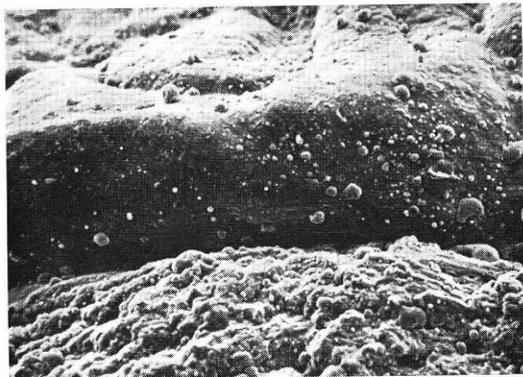


写真 11 マイクロ, 4 針縫合, 縫合法 (II), 術後10日 (×400)
粘膜に明らかな断差を認める

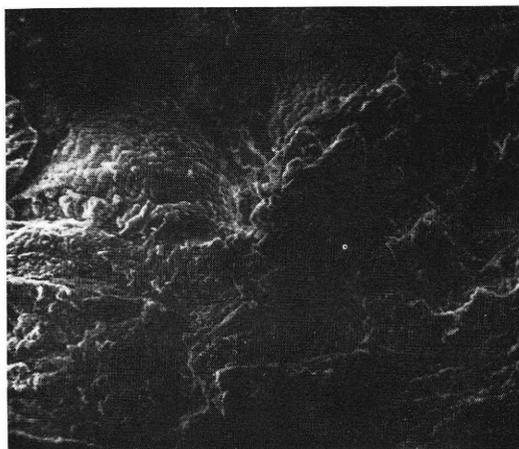


写真 12 マイクロ, 4 針縫合, 縫合法 (III), 術後6週 (×300)
縫合面は中へまくれ込む形となっている

縫合法 (II) では, 左右卵管断端の粘膜途中まで針をかける深度の違いがそのまま段差となつて現われた例を12例中2例 (16.7%) に認めた(写真11). 疎通率は12例中11例, 91.7%であつた。

縫合法 (III) では, 粘膜にかかった糸が粘膜断端を外側に向つて引き上げるように作用するため, 縫合部は互いにまくれ込む形となり(写真12), 狭窄, 閉塞を認めた例は1例もなかつた。疎通率は12例中12例, 100%であつた。結果後の糸は内腔へほとんど突出せず(写真13), 必要以上に粘膜にかかった糸を認めた例は12例中1例 (8.3%) であつた。

縫合法 (IV) では, 内腔へ大きく突出した糸が被覆されるのに長期間を要し(写真14), 被覆後は内腔狭窄, [8例中2例 (25%)], 閉塞[8例中2例 (25.0%)]を多く認めた。疎通率は8例中6例, 75.0%であつた。

2. ヒト (臨床) の研究成績

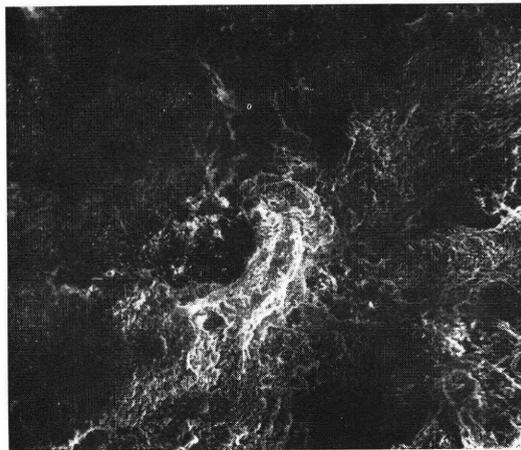


写真 13 マイクロ, 11-0 ナイロン糸使用, 縫合法 (III), 術後3週 (×300)
小さく突出した糸は, すでに結合織に被覆され, 縫合部粘膜の断差凹凸はほとんどない。

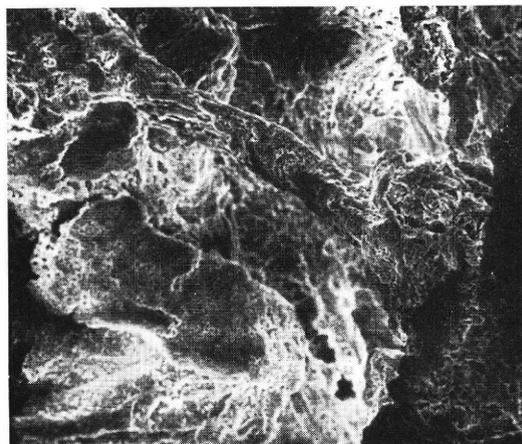


写真 14 マイクロ, 9-0 ナイロン糸使用, 縫合法 (IV), 術後8週 (×200)
中央に結合織に被覆された糸を認めるが, 粘膜面との間にはまだ間隙が残っている。

(1) 卵管把持器の開発

婦人科卵管形成術へのマイクロ導入にあたり最大の問題点は術野の固定の困難さである。著者らはヒト卵管把持器を試作し, 実際にヒト卵管形成術に使用した経験から, 改良を重ね, 現在の把持器とした(写真15)。

特徴は以下のごとくである。

① 卵管を挫滅しないようにブレードの圧力を50g以下とし, ブレードの形には向つて凸である¹⁾。

② 助手の持つ支持棒をつけ, クランプ本体との間を関節式ジョイントでつなぎ, 吻合する左右卵管断端の位置をブラすことなく常に術者の最も縫合しやすい位置に回転できる。

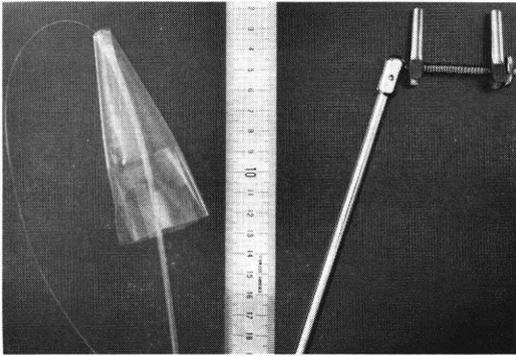


写真 15 右：卵管把持器，左：IK式シリコンフード

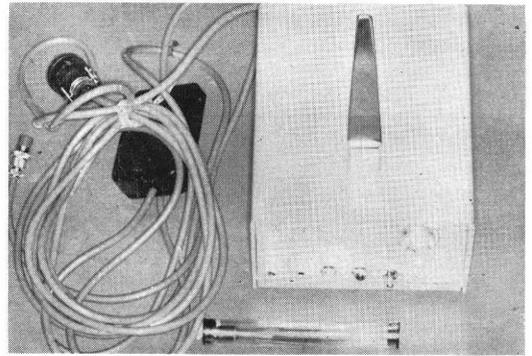


写真 16 双極性凝固器

③ ブレードの基部を約5mm開けてあるので卵管が滑脱しにくい。

④ 2本のブレードの間隔はネジで調節可能であり、卵管一部切除後も両側断端を容易に接近させることができる。

⑤ 把持器の向きを変えることにより卵管開口術にも使用できる。

本器械の使用により、従来の一側卵管マイクロ端々吻合における平均所要時間、約50分を20分短縮した。また骨盤底に向けた最も縫合困難な部分の卵管も容易に縫合できるようになった。

(2) 術式の創案

① 開口術

術前に子宮腔内へ小児用バルンカテーテル（8号）を挿入し、インジゴカルミン1Aを生理食塩水に溶いて20ccとしたものを注射器に入れてバルンに連結し、患者の左大腿部外側に固定しておく。

開腹後、卵管周囲に癒着があればこれを鋭的、鈍的に剝離し、卵管を遊離する。漿膜欠損部よりの出血は丸針2号糸か、針付4-0ナイロン糸にて被覆止血する。生理食塩水で湿した大ガーゼをダグラス窩に packing するか子宮固定器（写真6）にて子宮を挙上する。術前HSGにてHYDの診断のついた症例でも卵管周囲の癒着剝離だけで通過性を回復するものがあるので、この時点で色素通水を試みる。もちろん、子宮固定器を使用している場合は一時ゆるめる必要がある。色素の通過性を認めない場合でも卵管は青色色づくので、その走向を確認することにより卵管采部の決定が容易になる。盲端になっている卵管采部を見つけたならば、卵管把持器をかけ6倍拡大下にてモスキート鉗子にて鈍的に開口するか、尖刃にて十字の小切開を加える。一方向の単純切開でも卵管采部がきれいに反転出現することがある。

HYDが大きく、卵管角へ向って発育している場合に

縫合順序

(1) 4針の場合

(2) 6針の場合

(3) 8針の場合

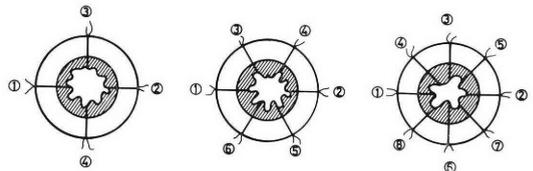


図 2

は、河上⁸⁾が提唱しているようにHYD内のciliaが消失していることが予想されるので、HYDの先端部分を切除する術式をとっている。

開口と同時に色素が流出するはずである。切開時の出血は、bipolar coagulator（写真16）にて粘膜を損傷しないように卵管采の辺縁部のみ凝固していく。マイクロでは、微小血管からの出血も発見でき血管のみの凝固も可能である。

卵管内腔確認のため、開口部に太いナイロン糸か眼科用ゾンデを挿入する。反転された開口部を図2のごとく7-0ナイロン糸を用い対称的に輪状縫合するのが原則であるが、反転が自然に行われた場合には不必要な縫合は行わない方がよい。開口部の大きさにより4～6針で縫合する（写真17）。術中は、ガーゼの代りに生理食塩水を注射器にて噴射し、術野をきれいに保つ。

縫合完了後、もう一度、色素通水を行い通過性を確認する。卵管開口術では癒着剝離を同時に行うことが多いので、著者らは術後再癒着防止用IK（Iizuka, Kawakami）式フードを装着し（写真15, 18）、術後4日目に抜去している。以上^{2)～8)}

② 端々吻合術

色素通水の用意、癒着剝離と出血部の止血、ダグラス窩のpackingなどによる子宮の挙上は開口術と同様である。

術前HSGと術中色素通水にて子宮側閉塞部の見当

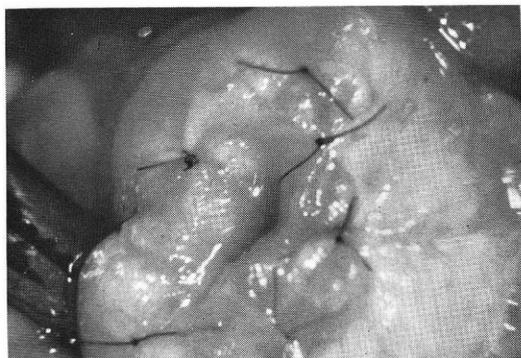


写真 17 6 針で開口術完了したところ、実際の手術では結紮糸をもつと短かく切る。

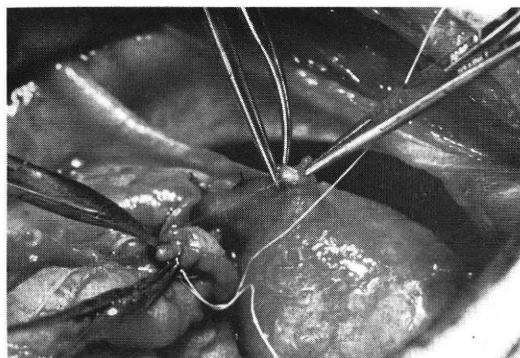


写真 20 子宮側卵管断端より色素の噴出を認める

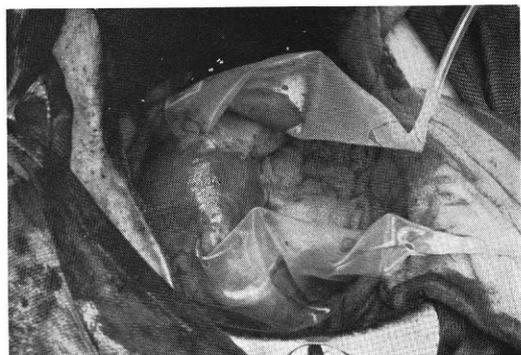


写真 18 フードを子宮に固定したところ

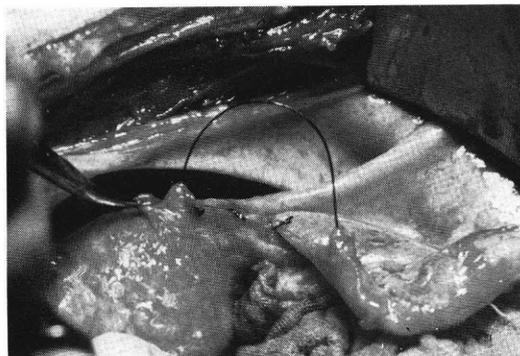


写真 21



写真 19 剝離された漿膜

をつける。次に卵管采部より細いナイロン糸を挿入し、采部側の閉塞部を確認する。閉塞部、すなわち切除する部分があり長く、術後健常卵管がほとんど残らないと予想される時は手術を中止すべきである。切除部位を決定したならば(以下マイクロ)、microscope 6 倍拡大下にて卵管漿膜を小剪刀で切除すべき部分より両側 5 mm ずつ広めに剝離する写(写真19)。止血は bipolar coagulator または 7-0 ナイロン糸にて行う。卵管の子宮側閉塞部をカミソリまたはメスにて切断するが、最初から健常卵管を切断することはせずに、色素が勢良く流出する

箇所まで切断を繰り返すつもりで閉塞部からカミソリを進める(写真20)。子宮側の切断が終わった後で卵管采側の切断に移る。ナイロン糸が通過するまで切断を繰り返す。切断部からの出血は粘膜を損傷しないように凝固止血する。

卵管采より挿入したナイロン糸を断端より引き出し子宮側卵管に挿入する(写真21)。卵管把持器をかけ卵管断端の接近を図る。(写真22)

縫合順序は理想的には図2のごとく対称的にてであるが、把持器をかけてあれば術者の縫合しやすい箇所から卵管を回転しつつ順番に縫合していつても卵管のズレは生じない。著者らは 9-0 ナイロン糸にて 4~6 針縫合を行っている(写真23)。縫合深度は、卵管筋層、粘膜を一括し、針が粘膜断端より 0.1mm 内腔へ突出する縫合法を心掛けている。

次に卵管漿膜、卵管間膜を 7-0 ナイロン糸、8 針程度で縫合する(写真24)。

(以下マクロ) 卵管把持器を除去し(写真25)、卵管内のナイロン糸を采部より抜き手術完了となる。術後色素通水は、縫合部よりの漏れが多いので無効である。縫合部は漿膜によって被覆できるが、卵管周囲に癒着剝離後の漿膜欠損部を伴うことが多いので、前述の IK 式フ

表 1

(1) マクロとマイクロの術後妊娠率 (妊娠例数/症例数) 1974.1.1~1978.12.31

術式	マクロ	マイクロ
端々吻合術	0/7 (0%) (うち外妊例.0)	3/8 (37.5%) (うち外妊例.1)
開口術	2/25 (8.0%) (うち外妊例.1)	5/20 (25.0%) (うち外妊例.1)

(2) マイクロを含めた術式別術後妊娠率 1974.1.1~1978.12.31

卵管采着 (卵管采着剝離術, マクロ)	10/43 (23.3%)	小計 マクロ 29/162 (17.9%) マイクロ 8/28 (28.6%)
卵管延長 (腫瘍摘出術, 卵管周囲癒着剝離術, マクロ)	17/87 (19.5%)	
卵管渾水腫 (開口術)	マクロ 2/25 (8.0%) マイクロ 5/20 (25.0%)	
卵管内腔閉鎖 (端々吻合術)	マクロ 0/7 (0%) マイクロ 3/8 (37.5%)	
平均妊娠率	37/190 (19.5%)	

表 2 通気による術後疎通率 (通過症例数/症例数) 1974. 1. 1~1979. 12. 31

術式	マクロ	マイクロ
端々吻合術	2/7 (28.6%)	7/11 (63.6%)
開口術	17/30 (56.7%)	20/27 (74.1%)

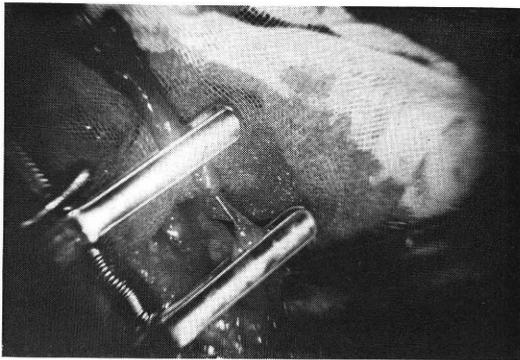


写真 22

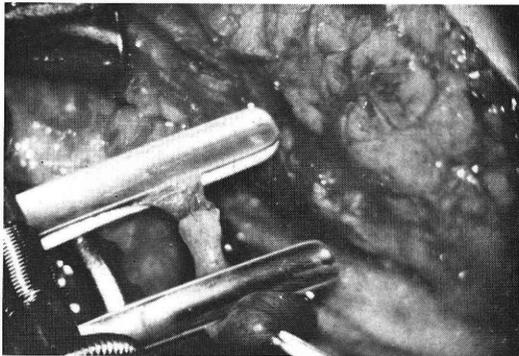


写真 23 2針で縫合したところ



写真 24 漿膜縫合完了

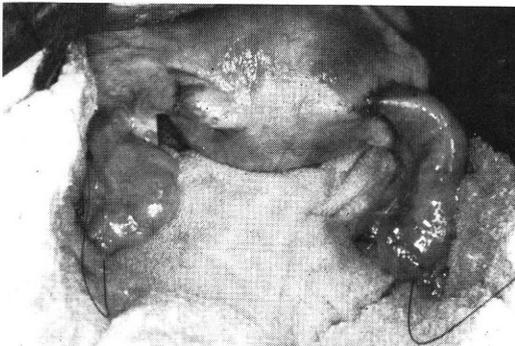
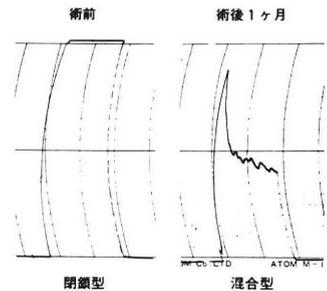
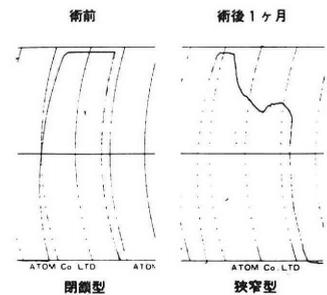


写真 25 両側端々吻合+両側開口術を行った症例における手術完了の写真. まだナイロン糸を抜去していない.

1978.3. の端々吻合例 (通過改善例)



1979.1. の端々吻合例 (通過不良例)



ードを装着する. 以上^{2~8)}

(3) 術後妊娠率の比較

著者らが従来行っていたマクロ卵管形成術とマイクロ卵管形成術後の妊娠率を比較してみると表1のごとくである. 比較する術式は端々吻合術と開口術のみに限り, また術後2年間の follow up 期間を考え, 1978年12月までの手術患者を対象とした. 端々吻合術については妊娠率37.5%, 開口術では妊娠率25.0%であり, マクロの両術式あわせての32例中2例妊娠 (妊娠率6.3%) を大き

く上まわっている。また、卵管采癒着剝離術など妊娠率の比較的良い卵管手術を含めた5年間のマクロ卵管形成術後の妊娠率17.9%をも上まわっている。一方、妊娠成立以前の問題として、術後の疎通率(通気により判定)を見ると、やはりマイクロの方がマクロより高い(表2)。

IV 考 案

1960年に Jacobson が microscope を使用して、微小血管吻合に成功して以来、microsurgery は形成外科、眼科、耳鼻科、脳外科と広く利用されてきたが、我が産婦人科領域では比較的導入が遅く、Swolin²⁰⁾が1967年ヒト卵管形成術に応用したのが初めてとされている。

動物実験では1969年家兎卵管を用いた Amnon David の報告¹⁰⁾が最初であり、その後種々の動物実験が繰り返され、その応用からヒト卵管 microsurgery 後の妊娠率も飛躍的に向上してきた。

以下、動物実験、ヒト卵管 microsurgery について検討を加えてみた。

1. 拡大器具の選択

マイクロに使用する拡大器具にはルーペと microscope がある¹⁾。ルーペは倍率が2~4倍と低く固定されていること、焦点距離が常に一定であるので術者は頭の位置を動かすことができず疲労しやすいという欠点を持つ反面、比較的倍率で行う手術に用いれば、特別な操作がいらぬこと、廉価であること、消毒などの準備がいらぬことなどの長所も有する。著者らは、最初、倍率2倍のルーペを使用して端々吻合術を行っていたが、前述の欠点から現在は microscope のみ使用している。

2. 術式の選択と倍率

卵管形成術の中でマイクロを応用できる手術の種類を決定するために、著者らは種々の症例に実際にマイクロを応用してみた。当初より最も有効であろうと考えていた如く、マクロでは不可能に近かつた卵管角部、峡部のような細い部分の端々吻合術には非常に有効であった。端々吻合では、10~40倍とかなり高い倍率を主張する者もいるが¹⁸⁾、著者らの経験では、最も細い部分の手術でも25倍の倍率を必要とするのは一時だけであり、概ね10~16倍で充分である。25倍以上の拡大下では、卵管の固定が困難なため焦点が合わせにくいという婦人科マイクロの欠点が出やすい。高い妊娠率を報告している Gomel も2~10倍を通常の倍率としている。

また著者らは、従来マクロにても広く行われていた開口術にマイクロを応用してみた。開口術には4~6倍拡大の報告が多く、著者らも通常6倍下にて手術を行っていた。

さらに低倍率での手術を想定していた卵管周囲の癒着剝離、特に卵管采部の剝離には、microscope は実際の所全く無効であった。その理由として、卵管は子宮後面に癒着していることが多く、その位置の関係から手術野に microscope の焦点を合わせにくく、かつ、拡大することにより各臓器の識別がつきにくくなるという点あげられる。故に著者らは microscope 下での剝離を行つておらず、強いて使うならばこの術式にはルーペの方が有効であると考えた。Winston も剝離にはルーペが有効であると述べている¹⁵⁾。

卵管移植術は術式の困難さ、妊娠の可能性の低さから、著者らはマイクロの適応外とした。従つて、著者らが現在行っている卵管マイクロは端々吻合術と開口術のみである。

3. 糸の材質と太さ

(1) 糸の材質

糸には大きく分類して絹糸、カットグート(以下カットと略)、ナイロン糸、Polyglycolic acid suture (®デキソン、以下 p.a. suture と略)の4種類があるが、この中で最も組織反応が少ないとされているのがナイロン糸、次いで p.a. suture である。絹糸、カットは異物反応による炎症作用が強く卵管手術には不適当であるとされ、Winston の家兎卵管の実験報告¹⁴⁾でも、カット使用群とナイロン糸使用群の比較で妊娠率に明らかな差を認めたとする。p.a. suture に関しては、John. J. Stangel¹⁹⁾、Smith らがこの糸を使用した家兎の実験で良好な成績をおさめている¹⁴⁾ので、ナイロン糸との間に明らかな差はないようである。

ヒトに関する報告でも Swolin は5-0、6-0の太いカットを使用し、やはり他家に比べてかなり低い妊娠率を報告しており²⁰⁾、Gomel²⁴⁻²⁶⁾、Ansari²³⁾は7-0、p.a. suture を用いてナイロン糸使用報告を上まわる妊娠率を報告している。

以上の検討より、糸の材質はナイロン糸と p.a. suture が適当であり、カット、絹糸は不適当である。

(2) 糸の太さ

著者らは家兎におけるマクロ縫合で、3-0、7-0ナイロン糸を使用して見たが、マクロでは操作上7-0が限界であった。マクロの報告では S.K. Khoo らの4-0カット使用の報告¹¹⁾があるが、妊娠率は40%と低率であった。その後の家兎マイクロの報告では、8-0^{10,13)}~11-0¹⁴⁾ナイロン糸が用いられ、中でも10-0が最も良く用いられている^{12,13,17,18)}。

ヒト卵管端々吻合では、著者らは9-0~11-0のナイロン糸を使用して見たが、11-0は張力の点で劣り、縫合後卵管自体の重量に耐えるために多くの針数を要した。ま

た、操作の点からも9-0が有利であった。著者らは動物実験の9-0、11-0糸使用例間に差がないという結果から、現在、端々吻合には9-0を使用している。

外国ではヒト卵管端々吻合に、Diamond²⁷⁾、Wood³¹⁾のように10-0の細い糸を使用する者と Winston¹⁵⁾8-0、Gomel 7-0のように比較的太い糸を使用する者がいるが、妊娠率に対する報告では後者の方が上回っており、糸が細い程妊娠率が向上する傾向はない。

以上の検討により、マイクロ下であれば7-0程度の比較的太い糸の使用でもマクロに比べて妊娠率の向上が望め、11-0のような必要以上に細い糸を使用する必要は全くないという事になる。

4. 針数と縫合深度

(1) 針数

S.K. Khoo らが行ったマクロ家兎実験¹¹⁾では2針縫合であった。著者らは2~4針の縫合を試みたが、4針縫合はマクロでは事実上不可能であり、かえって卵管の損傷をきたした。

マイクロの報告では、最も少ないもので3針¹⁹⁾、最も多いもので6~10針¹⁴⁾としているが、4~6針が一般的である^{10,12,17,18)}。著者らの実験にても4針以上ならばSEM上差を認めないという結果であった。Stangel¹⁹⁾によれば3針縫合にても、5例中5例、妊娠率100%という結果を得ているが、彼の症例数が少ないことから3針が最適な針数とは結論できない。著者らの実験結果では、3針縫合の場合縫合点間の距離が不均等になりやすく、そのため縫合部のズレが起りやすかつたという点、縫合部内面のSEM像にても同様の所見が得られたという事から、著者らは家兎卵管に関しては4針縫合が適当と考える。

著者らは以上の動物実験報告の検討から、ヒト卵管については、より大きな直径を考慮し4~6針が適当と考え、実際に手術に応用してみた。切除部分が長く吻合すべき卵管の直径に差がある場合は、針数を適宜増やして縫合したが、その場合でも8針で充分であった。諸家の報告では、ヒト卵管端々吻合においても4針が多いが^{16,25,27)}、針数について特に記載のない文献も多かつた。著者ら同様、手術時に適宜に針数の増減をするためと思われる。

開口術については、著者らは通常4~6針縫合を行っているが、Gomel²⁶⁾は2~3縫合を主張し、著者らも針数にこだわらず粘膜を反転固定できる必要最少限の針数で良いと考える。

(2) 縫合深度

著者らは深度により縫合法を4つに分類し、各々の縫合法で縫合した家兎卵管を検討した結果、粘膜に0.1mm

突出させる(Ⅲ)の縫合法を提唱している。(Ⅲ)の縫合法は、(Ⅰ)、(Ⅱ)の縫合法に比べ、直径の違う卵管を吻合することの多い実際の卵管手術においても、外壁および内腔に段差を生じにくく、かつ、糸が粘膜断端を外側へ引き上げるように作用するため縫合部の狭窄を来しにくいと考える。

動物実験における諸家の報告では、粘膜にかけずに筋層縫合を行つている者が多く^{10,14,18,19)}、漿膜縫合のみを行つている者もいる¹¹⁾。一方、P. Paterson ら¹²⁾は粘膜までの縫合を行い、術後妊娠率についても前者と変らぬ60%の報告をしている。また Seki ら¹⁷⁾は筋層縫合と粘膜までの縫合を行つた2群の家兎卵管の疎通性とSEMによる検討を行い、両者間に差を認めなかつたとしている。

ヒトに関しては、Diamond²⁷⁾、Garcia-Aller²³⁾は著者ら同様、粘膜までの縫合を行い、特にDiamondは粘膜のみの縫合と、さらに漿膜、筋層の一括縫合による2層縫合を行つている。現在のところ、Winston、Gomel らのように粘膜まで針をかけない縫合法を行つている者の方が多いが、妊娠率だけの比較では両者間に全く差はないと言つてよい(後述)。

5. Splint の使用と留置

S.K. Khoo ら¹¹⁾は、30匹の家兎卵管に直径0.61mmのpolyethylene splintを挿入してマクロ端々吻合を行い、術後 splint 留置期間別に疎通性、卵管周囲の癒着、縫合部肥厚、妊娠率について検討した。疎通性については留置期間に無関係であつたが、2週間留置群では全く見られなかつた癒着が6週間留置群では70%強に見られ、16週間以上の留置群ではfibrosisによる肥厚も見られたという。また妊娠については2週間留置群のみに見られたとしている。WinstonはNylon splint 1週間留置群と全く留置しない群を比較し、前者の妊娠率が後者の約50%であつたと報告している¹⁴⁾。本邦においても篠塚ら⁹⁾は、家兎による実験で、3種類の太さのNylon splintを用い、splintが太い程卵管粘膜に影響を与えたとしている。

ヒト卵管端々吻合時の splint 使用とその抜去時期については諸説がある。著者らは細い部分の卵管縫合には、卵管内腔の確認の意味で splint を挿入した方が良いと考えるが、Gomelも同様の意見を述べている。著者らの提唱する粘膜までの縫合を行う場合にはさらに splint は有益と考える。Diamond²⁷⁾、Gomel^{24,25)}、Winston²⁵⁾、Williams²²⁾らが縫合時に splint を使用しているが、Winstonは彼の動物実験の結果¹⁴⁾から術後すぐ抜去することを主張している。術後留置を行つている者も、Gomelの3~7日、Williamsの12日程度で

あり、以前、Mulligan, Shirodkar らが3~6カ月間も留置していた頃に比べると最近は短縮傾向にある³⁰⁾。著者らは前述の如く、縫合完了後ただちに抜去する方針である。

6. 卵管把持器の使用

卵管手術部位を腹壁近くに挙上するために、従来よりダグラス窩にガーゼやスポンジを packing したり、子宮把持鉗子を用いる方法がとられてきた。しかし著者らが実際に従来の方法のみで卵管の挙上固定を行い、卵管手術、特に端々吻合を行つてみた経験では、満足すべき結果が得られなかった。著者らは縫合すべき卵管を腹壁近くに平面的に固定する事こそ予後を左右すると言つても過言ではないと考える。

卵管把持器を使用すべきではないとする人々の理由は、卵管を atraumatic に扱うべきであるという点であるが、そのために卵管をペアンや鉗子等々マクロの器械で把持することが多く、固定の不備はもちろん、かえつて traumatic な操作になつていた。

欧米でも卵管固定用に単鉤の鉗子を2本使用したり¹⁴⁾、双鉤の鉗子を使用している者もいるが^{27, 32)}、いずれも鉗子本体を腹壁近くに固定したり、裏側縫合のための回転という点で不利であり、また助手の両手をふさぐため術者の負担が大きくなつていた。

著者らの支持棒付卵管把持器は、こうした欠点を克服すべく設計した器械である。

7. 妊娠率

マイクロによる家兎卵管切断再縫合、または卵管一部切除後の再縫合後妊娠率は、41¹⁰⁾~100%^{17, 18)}であるが、100%の報告はいずれも2~3例と症例数が少ないので、Winston の92% (25例中23例)¹⁴⁾が最も高い妊娠率の報告といえるだろう。

マクロでは、S. K. Khoo らの splint 2週間留置群妊娠率43% (7例中3例)¹¹⁾がある。splint を留置しなければ妊娠率の若干の向上が望めたかもしれないが、マイクロとマクロの差は明らかである。

以下、ヒトの妊娠率について検討を加えてみる。マクロにおける妊娠率の報告は無数にあるといつても過言ではないが、術者による手術適応、術式の分類、妊娠率の算出法などが異なるため (例えば、軽度の癒着剝離術を開口術に含めたり、1人が2回妊娠すると妊娠2例として計算している例がある)。バラつきが大きく、マクロとしての妊娠率を把握しにくい。そこで今回資料として選んだものは、Siegler が4910人の医師にアンケートを求め、734人の回答を得たものの集計²⁸⁾である。アンケートに答えた医師達は卵管手術の specialist ではない人々で、この集計はマクロの妊娠率の実態をよく反映し

ていると考えられる。それによると、開口術後の妊娠率は20.3%、端々吻合では7.8%であり、著者らの大学で過去5年間行つてきた手術後妊娠率、17.9%とも類似した信頼すべき数値であると思われる。

マイクロの統計については、いまだ報告例数も少なく個々の報告によらなければならないが、妊娠率の低いものは、Swolin (1967, 全術式の妊娠率28%)²⁰⁾、高いものは Gomel (1977, 端々吻合の妊娠率64%)²⁴⁾である。術式別に見ると端々吻合において特に高く、Williams 55%²²⁾、Garcia 53.4%¹³⁾、卵管結紮後の復元のみでは、Winston 69%¹⁵⁾、Gomel 72.7%²⁴⁾、Diamond 75%²⁷⁾と驚異的な妊娠率を報告している。しかし開口術についてはマイクロにてもさほどの妊娠率の向上が見られないのが特徴で、Winston 30%¹⁶⁾、Gomel 32%²⁶⁾の報告があるにすぎない。

子宮外妊娠率については、Gomel がマクロ時代は、O'Brien らの1.8%、Cognat らの4.1%、Horne らの3.8%程度であつたのに対し、マイクロ導入後は、Swolin の18%²¹⁾を最高に Gomel 12%、Williams 15%と明らかに上昇していると述べている²⁶⁾。特に開口術後の子宮外妊娠率が高率であることが諸家の報告に共通である。マイクロがマクロより子宮外妊娠率の高い原因について Winston は、マイクロは手術時間が長くかかるので漿膜が傷害され、また coagulator によつて粘膜炎が傷害されるからではないかと推論している¹⁶⁾。

しかし、著者らが資料として用いた Siegler のアンケートによれば、マクロ下の開口術後の子宮外妊娠率は12%、端々吻合術後のそれは6.6%であつた。これをマイクロの子宮外妊娠率と比較すると、Gomel が述べている程差はなく、開口術と端々吻合術後の子宮外妊娠率の差がさらに印象づけられる。開口術の方が端々吻合術より子宮外妊娠率が高い原因について論じている者はいないが、著者らは HYD の開口術においては、SEM 上 cilia が萎縮消失している例が高率であるので受精卵の輸送機能に問題があるのではないかと考えている³⁾。

V 結 論

1. 家兎卵管の端々吻合術において、肉眼手術と顕微鏡下手術後の疎通率は、各々、20.8%、90.0%であつた。
2. 同時に、術後の SEM による縫合部内面の検討では、内腔不整の出現率は、肉眼手術87.5%、顕微鏡下手術2.8%で明らかに顕微鏡下手術が優つている。
3. 家兎卵管の端々吻合術において、術後の疎通率、SEM 所見より、糸の太さ、針数、縫合深度は各々、9-0、4針、粘膜炎に0.1mm 突出させる縫合法が最適であ

る。

4. 顕微鏡下手術の臨床応用においては、卵管把持器の開発、使用により、手術時間の短縮と骨盤底側の卵管縫合を容易に行うことが可能になった。

5. ヒト卵管形成術において、肉眼手術と顕微鏡下手術の術後妊娠率は各々、17.9%、28.6%であり、顕微鏡下手術の方が高い。

6. 卵管形成術、特に端々吻合術に顕微鏡下手術を応用することは大いに意義がある。

稿を終るにあたり御懇篤な御指導、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。また御指導頂いた河上征治講師、森定優医長に感謝の意を表わします。また、microsurgery を実地に御指導頂いた形成外科の藤野豊美助教授と走査電顕室の藤原達司先生に心より感謝いたします。さらに動物実験、臨床に御協力頂いた研究室の諸兄に深謝いたします。本研究の一部は、昭和54年度、日本母性保護医協会おぎや一献金研究費によったことを付記します。

(なお、本論文の要旨は、第23回日本不妊学会総会シンポジウム、第24回日本不妊学会総会、及び第2回産婦人科マイクロサージェリー研究会にて発表した。)

参考文献

- 1) 藤野豊美, 生田義和, 原科孝雄: マイクロサージェリー, 医学書院, 1977.
- 2) 飯塚理八, 河上征治, 真木健: 卵管のマイクロサージェリー, 現代産婦人科学大系, 年刊追補, '78-A: 263, 中山書店, 1978.
- 3) 飯塚理八, 河上征治, 岡井良至: 卵管不妊に対する手術のコツ, 産婦人科治療, 37: 548, 1978.
- 4) 河上征治, 真木健: 卵管機能保存と形成手術手技, 産婦人科治療, 37: 255, 1978.
- 5) 河上征治: 卵管形成術, 産婦人科の世界, 31: 567, 1979.
- 6) 河上征治, 森定優, 真木健, 岡井良至, 鈴木俊夫: マイクロサージェリーによる卵管形成術の基礎, 産婦人科の世界, 31: 1071, 1979.
- 7) 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, 東海大学出版会, 1979.
- 8) 河上征治, 真木健, 福井谷達郎: 卵管形成術, 産婦人科治療, 41: 139, 1980.
- 9) 篠塚孝男: Microsurgery の手技, 産婦人科におけるマイクロサージェリー, 82, 東海大学出版会, 1979.
- 10) David, A., Brackett, B. G., and Garcia, C. R.: Effects of Microsurgical Removal of the Rabbit Uterotubal Junction, Fertility and Sterility, 20: 250, 1969.
- 11) Khoo, S. K., and Mackay, E. V.: Reactions in Rabbit Fallopian Tube after Plastic Reconstruction. I. Gross Pathology, Tubal Patency, and Pregnancy, Fertility and Sterility, 23: 201, 1972.
- 12) Paterson, P., and Wood, C.: The Use of Microsurgery in the Reanastomosis of the Rabbit Fallopian Tube, Fertility and Sterility, 25: 757, 1974.
- 13) Paterson, P.: Tubal Microsurgery—A Review, Aust. N. Z. J. Obst. Gynaec., 18: 182, 1978.
- 14) Winston, R. M. L.: Microsurgical Reanastomosis of the Rabbit Oviduct and its Functional and Pathological Sequelae, British Journal of Obst. and Gynaec., 82: 513, 1975.
- 15) Winston, R. M. L.: Microsurgical Tubo-cornual Anastomosis for Reversal of Sterilization, Lancet, 1: 284, 1977a.
- 16) Winston, R. M. L.: The Future of Microsurgery in Infertility, Clinics in Obstetrics and Gynaecology, 5: 607, 1978.
- 17) Seki, K., Eddy, C. A., Smith, N. K., and Pauerstein, C. J.: Comparison of Two Techniques of Suturing in Microsurgical Anastomosis of the Rabbit Oviduct, Fertility and Sterility, 28: 1215, 1977.
- 18) Eddy, C. A., Antonini, R. Jr., and Pauerstein, C. J.: Fertility following Microsurgical Removal of the Ampullary-Isthmic Junction in Rabbits, Fertility and Sterility, 28: 1090, 1977.
- 19) Stangel, J. J., Settles, H. E., Reyniak, J. V., Freedman, W. L., and Stone, M. L.: Microsurgical Anastomosis of the Rabbit Oviduct using 9-0 Monofilament Polyglycolic Acid Suture, Fertility and Sterility, 30: 210, 1978.
- 20) Swolin, K.: Fifty Fertility Operations. I. Literature and Methods, Acta Obst. and Gynec. Scandinav., 46: 234, 1967.
- 21) Swolin, K.: Electromicrosurgery and Salpingostomy: long-term results, Ame. J. Obstet. and Gynecol., 121: 418, 1974.
- 22) Williams, G. F. J.: Fallopian Tube Surgery for Reversal of Sterilization, British Medical Journal, 1: 599, 1973.
- 23) Garcia, C. R., and Aller, J.: Surgical Approach to Tubal Disease, Clinical Obstet. and Gynecol. 17: 102, 1974.
- 24) Gomel, V.: Tubal Reanastomosis by Microsurgery, Fertility and Sterility, 28: 59, 1977a.
- 25) Gomel, V.: Reconstructive Surgery of the Oviduct, Journal of Reproductive Medicine, 18: 181, 1977b.
- 26) Gomel, V.: Salpingostomy by Microsurgery, Fertility and Sterility, 29: 380, 1978a.

- 27) Diamond, E. : Microsurgical Reconstruction of the Uterine Tube in Sterilized Patients, *Fertility and Sterility*, 28 : 1203, 1977.
- 28) Siegler, A. M., and Hellman, L. M. : Tubal Plastic Surgery, *Fertility and Sterility*, 7 : 170, 1956.
- 29) Siegler, A. M., and Perez, R. : Reconstruction of Fallopian Tubes in Previously Sterilized Patients, *Fertility and Sterility*, 26 : 383, 1975.
- 30) Siegler, A. M. : Surgical Treatments for Tuboperitoneal Causes of Infertility since 1967, *Fertility and Sterility*, 28 : 1019, 1977.
- 31) Wood, C. : New Aspects of the Treatment of Tubal Infertility, *Aust. N. Z. J. Obst. Gynaec.*, 18 : 67, 1978.
- 32) Hoffman, J. J. : A Simple Solution to Five of the Major Problems of the Microsurgical Reversal of Sterilization, *Fertility and Sterility*, 30 : 480, 1978.
- 33) Ansari, A. H. : End-to-end Tubal Anastomosis using an Absorbable Stent, *Fertility and Sterility*, 32 : 197, 1979.

Application of microsurgery to tuboplasty

— Its basic and clinical studies —

Ken Maki

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

In order to determine the prognosis of tuboplasty by microsurgery and gross operation, healing progress on the interior surface of the

anastomosed region was observed in time course by scanning electron microscope using rabbit oviducts. As a result of analytical evaluation on the findings of the above investigation, a method of microsurgery for the disturbance of tubal patency has been designed and applied to human tuboplasty.

The following conclusions were derived from the above :

(1) The patency rates after end to end anastomosis by microsurgery and gross operation carried out on rabbit oviducts were 90.0% and 20.8% respectively.

(2) At the same time, the rates of irregularity of the endsalpinx after microsurgery and gross operation revealed by the scanning electron microscopic investigation of the interior surface of the anastomosed region were 2.8% and 87.5% respectively, which clearly indicated the superiority of the former.

(3) The rates of patency and findings by scanning electron microscope suggested the following method to be most suitable for end to end anastomosis of rabbit oviducts : the size of the thread : 9-0 ; No. of stiches : 4 ; the depth of the suture : the anastomosis to be processed into the mucosa by 0.1mm.

(4) The pregnancy rates after end to end anastomosis by microsurgery and gross operation on human Fallopian tubes were 28.6% and 17.3% respectively, showing the higher percentage occupied by microsurgery.

(5) It was satisfactory, to apply microsurgery to tuboplasty, especially in the case of end to end anastomosis.

(受付 : 昭和55年12月22日)

IUD 挿入婦人の着床期子宮内膜の形態学的研究

The Morphological Study of the Endometrium of Women with IUD in Nidative Phase

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室 (主任: 蜂屋祥一教授)

安江育代

Ikuyo YASUE

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

著者は、IUD の避妊機序、特に着床障害の機序を明らかにする為に、妊卵の着床の場である子宮内膜の変化を、形態的に観察し、従来、あまり注目されていなかった内膜間質結合織の変化を中心に検討した。

IUD 装着婦人80名より、着床期に子宮内膜を採取し、HE 染色、PAS 染色、および、渡辺鍍銀染色の各染色を施行し、形態学的に検討し、以下の結果を得た。

1) 病理組織学的検討において、何らかの器質的異常を伴うものは、80例中56例、70%であり、器質的に全く異常を認めない内膜は24例、30%に認められた。

2) 子宮内膜日付診では、一致例が80例中54例、67.5%で、不一致例は26例、32.5%であつた。不一致例26例中、遅延例は22例で、促進例は4例であつた。

3) PAS 染色では、正常が80例中、32例、40%で、軽度不全、不全を合わせて PAS 陽性物質の産生異常例が60%に認められた。

4) 渡辺鍍銀染色において、子宮内膜間質結合織である細網線維の変化を検討した結果85%の高率に、明らかな増生が認められた。以上、IUD 装着子宮内膜の変化を検討した結果、得られた所見の中で、特に、間質細網線維の増生が明らかにされたが、この事実が、妊卵の間質内着床を障害する点で IUD の避妊機序と深く関連するものと推定された。

(*Jap. J. Fert., Ster.*, 26(2), 200-207, 1981)

I 緒 言

1928年、Gräfenberg がヒトに対する絹製の IUD の使用を発表¹⁾してより、今日まで種々の IUD が開発されている。そして、最近では、一時的避妊法としては、経口薬とともに、世界的に普及し、その避妊効果の高いことは、異論のない所である。しかし、IUD の避妊機序に関しては、数多くの実験、研究が報告されているが、いまだに、決定的な結論はなく、推測の域を出ない。

Mastroianni らのモンキーを使った実験即ち排卵誘発剤にて過排卵をおこさせた IUD 挿入モンキーの卵管から、卵を回収し、IUD 非挿入モンキーと比較した際、

有意の差をもつて、回収率が悪く、結論として、IUD は卵管の運動性を亢進させ、卵の卵管から、子宮への輸送を異常に早くしてしまうという説を代表とする卵管運動亢進説はあまりに有名である。しかし、卵管の輸送速度を避妊機序とすることに関しては、Marston^{3,4)}、Ishihama⁵⁾、宮井⁶⁾らは、否定的な報告をしており、Mastroianni⁷⁾も、人工排卵による実験ということで、自説を訂正した。さらに Tredway⁸⁾らは IUD 挿入により精子の輸送の遅延を主張しているが、Malkani⁹⁾らは精子の運動を阻害しないとしている。また、IUD による着床障害の可能性として、Nicolaisen¹⁰⁾、Lee¹¹⁾、牧野¹²⁾、Tamada¹³⁾らは、子宮内膜の日付診で遅延を主とする組

織学的ズレを挙げている。しかし、Hall¹⁴⁾らは日付診に
 関しては、IUD の影響はないとしている。また Moyer¹⁵⁾
 は多数の多核白血球の存在が胚芽の發育を阻止するとし
 ており、Jessen¹⁶⁾らは IUD 挿入による子宮内膜の炎症
 性変化による着床阻害を主張している。これらの諸説を
 大別すると、卵または、精子の輸送異常、日付診のズレ、
 内膜炎を含めた着床障害、妊卵の發育阻止などであり、
 今日では、着床障害が有力であるように思われる^{17,18,19)}。
 しかし、着床障害の詳細なメカニズムについては不明な
 点が少なくない。そこで今回、著者は以上のような点を
 明らかにすべく、妊卵着床の場である子宮内膜の変化を
 主に形態学的に観察し、従来あまり注目されていなか
 った間質結合織の変化を中心に IUD 挿入による子宮内膜
 への影響を検討し、知見を得たので報告する。

II 検索対象ならびに方法

正常月経周期を有する、年齢24歳から50歳までの IUD
 装着婦人80例を検索対象とした。検索方法は、月経周
 期、基礎体温等より黄体期中期、即ち着床期と推定され
 る時期に IUD を抜去し、同時に子宮内膜掻爬診を施行
 した。内膜は、76例が掻爬にて、4例は摘出子宮より採
 取した。IUD の種類は、太田リングが33例、Wing が
 26例と多く、以下表1に示した通りであつた。挿入期間
 は、最少期間6カ月から、最高20年までであり、2年以
 内の挿入例が58例で全体の約73%を占めた(表1)。以上

表 1

検索対象

IUD の種類		挿入期間	
太田リング	33	~6M	2
Wing	26	7M~12M	31
FD-1	7	13M~24M	25
優生リング	7	25M~36M	9
loop	3	37M~	13
Coil	2		
Cu-7	2		
80例			

の IUD 挿入子宮より採取した内膜に HE 染色、PAS
 染色、および、渡辺鍍銀法の各染色を施こした。HE 染
 色にて、器質的異常の有無を判定するとともに、内膜日
 付診を行なつた。また PAS 染色では IUD 挿入時内
 膜の Glycogen 及び mucopolysaccharide の産生能を観
 察した。さらに、渡辺鍍銀法により、内膜間質の結合織
 の変化を以下述べる方法により判定した。いずれの場合
 も内膜に病変の認められない子宮の手術摘出標本の着床
 期内膜を IUD 非装着子宮として、コントロールとし
 た。

III 結 果

1) HE 染色所見

表 2 IUD 挿入内膜の病理組織学的所見

I. 異常内膜 56例 (70%)		
1. 被覆上皮	2. 間質	3. 腺
潰瘍形成 3	浮腫 19	不整形腺 5
ポリープ 20	細胞浸潤 14	
不整突出像 21	血管の拡張 13	
	血管の増生 8	
II. 正常内膜 24例 (30%)		

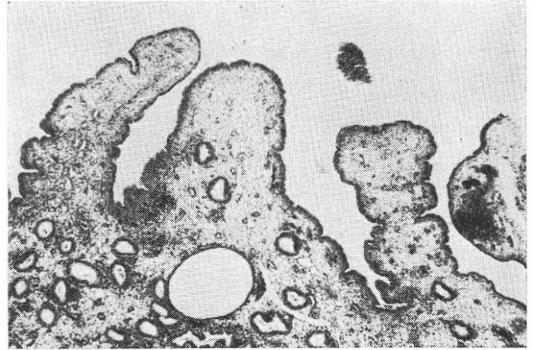


図 1 Loop を一年六カ月間挿入していた症例
 月経周期の22日目に採取した内膜で、内膜表層
 は乳頭状に突出しており、拡大したのう胞状の
 腺が認められる。(×40)

i) 器質的異常所見(表2)

器質的变化の結果を表2に示した。その内分けは、異
 常所見を組織構成からみると、先ず、被覆上皮におい
 ては、4例の子宮摘出標本の内3例に IUD が接していた
 部分の潰瘍形成を認めた。また、ポリープ形成は80例中
 20例、25%にみられた。乳頭状の特異な不整突出像は、
 21例、26%の高頻度でみられた(図1)。ついで、間質で
 は、著明な浮腫像が19例、24%、また、リンパ球を主と
 した細胞浸潤が14例、18%に認められた(図2)。さらに
 血管の異常所見としては、静脈の拡張、うづ滞は13例、
 16%に、血管の増生は8例、10%にみられた。腺に関し
 ては、のう胞状に不整拡大した像が5例、6%と少数例
 であるが認められた。以上まとめると、何らかの器質的
 異常を伴うものは、56例、70%であつた。しかし、器
 質的異常所見を全く認めない内膜も24例、30%にみら
 れた事は、注目される。なお、異常所見の重複例は延べ
 症例数として示した。

ii) 内膜日付診(表3)

機能を背景とした形態を観察する意味で、内膜の日付
 診を行なつた。前記 i) の器質的变化の有無に関係なく、
 全症例について検討した。採取日と日付診断が±2日以
 内の範囲のものを日付診一致例とした。その結果、一致
 例は54例、67.5%であり不一致例は26例、32.5%であ
 った。不一致例26例中遅延例は、22例、85%で、促進例は

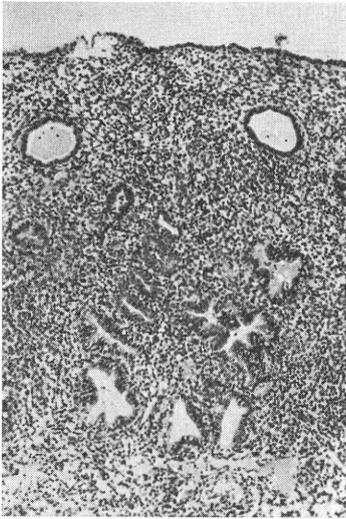


図 2 Loop を二年八カ月挿入，月経周期22日目に採集した内膜で，間質にリンパ球を初めとした細胞浸潤を認め，内膜腺は機能低下を思わせる形態異常を示し，内膜炎に特有な腺管構造を示す。(×40)



図 3 分泌機能低下例
日付診上，一致しているかに見えるが，腺腔内の分泌物が極めて乏しい症例。(×100)

表 3 内膜の日付診断

一致例	54例 (67.5%) (分泌機能低下例 17例を含む)	
不一致例	遅延 22	26例 (32.5%)
	促進 4	
80例(100.0%)		

4例，15%と，そのほとんどが遅延像を示した。一致例のうち，腺，間質の形態とも一見正常で，日付診上，一致しているかに見えるものの，腺細胞の分泌能の低下をうかがわせ，かつ腺腔内の分泌物が極めて乏しい組織像を示す一群を特に，分泌機能低下例とし17例認めた(図3)。

2) PAS 染色所見

内膜の形態的機能をとらえる目的で，PAS 染色を行なった。

i) コントロール

IUD 非装着婦人の排卵後7日目採取の内膜に PAS 染色を行なった。PAS 陽性物質が腺上皮，細胞質内，および，腺腔内に微細顆粒状に存在し，さらに，被覆上皮下にも認められた(図4)。

ii) IUD 装着群

PAS 陽性物質の腺上皮，腺腔内，ならびに，被覆上皮下への出現状況により正常，軽度不全例，不全例の3つに分類した。正常とは，PAS 陽性物質がコントロールと同様の出現状態を示すものとし，軽度不全とは，

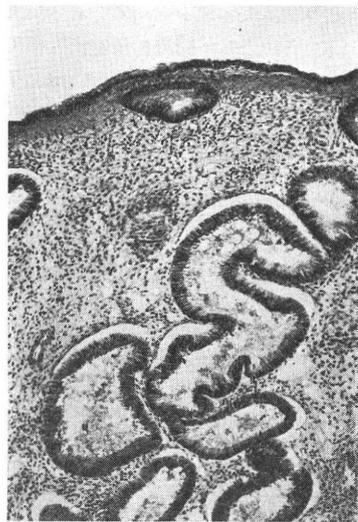


図 4 IUD 非装着婦人の排卵後7日目の内膜の PAS 染色 (×100)

PAS 陽性物質が腺上皮，腺腔内に多少認められ，間質にもまばらに存在するものとした。不全例とは，PAS 陽性物質が，いずれにも，ほとんど出現しないものとした(図5)。その結果，正常は32例，40%，軽度不全例は19例，24%，不全例は29例，36%であった。以上の結果，PAS 陽性物質の産生異常例が，合わせて，60%の高率にみられた(表4)。

3) 渡辺鍍銀染色

子宮内膜結合織の線維について，渡辺鍍銀法を用い検討した。子宮内膜の結合織線維は好銀性を有する細網線維または，格子線維とされ，鍍銀法により，つやのある

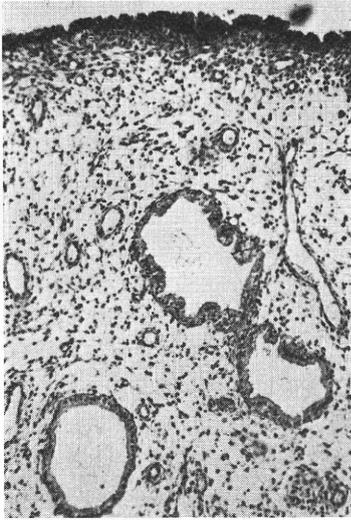


図 5 PAS 染色. 不全例
PAS 陽性物質が腺上皮, 腺腔内にほとんど出現しない. (×100)

表 4 PAS 染色による組織化学的検討

正 常 例	32例	40%	
軽度不全例	19例	24%	} 60%
不 全 例	29例	36%	
計	80例	100%	

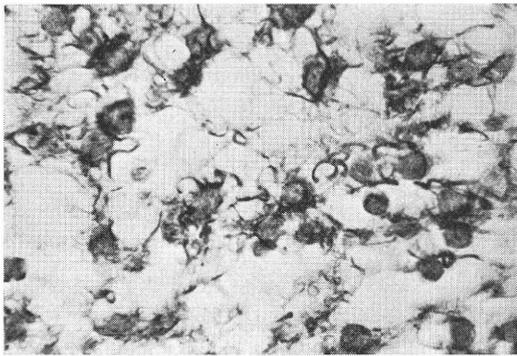


図 6 渡辺鍍銀染色
IUD 非装着子宮内膜の分泌期中期. 間質結合
組織線維は細く, 密度も極めて粗である. (×1000)

黒色に染色される.

i) コントロール

着床期の正常子宮内膜では, 間質結合組織線維は, 細く, 密度も極めて粗である(図6).

ii) IUD 装着群

結合組織線維の密度, 太さ, 集束性の3項目について検討した. 集束性とは, 複数の細い線維が集まって一つの

表 5 渡辺鍍銀法による子宮内膜間質結合組織の検討

	密 度	太 さ	集 束 性
+	66 (82.5%)	65 (81.3%)	49 (61.3%)
±	14 (17.5%)	15 (18.7%)	31 (38.7%)
-	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
計	80 (100%)	80 (100%)	80 (100%)

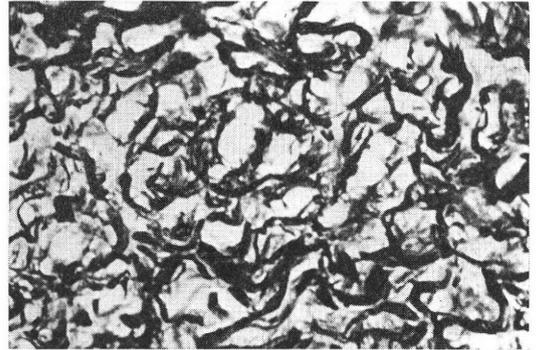


図 7 太田リングを2年間挿入していた症例の
渡辺鍍銀染色
間質, 細網線維の密度, 太さ, 集束性いずれも
(+)とした症例. (×1000)

束を形成している状態を示すものとする. コントロールに比し, 3つの項目のそれぞれ増生したものを(+), コントロールと変わらないものを(±), コントロールより減少しているものを(-)であらわした. その結果, 密度がコントロールより増しているものは, 66例, 82.5%, 太さでは65例, 81.3%, そして集束性では49例, 61.3%であった. 密度がコントロールと変わらないものは14例, 17.5%であり, 太さでは15例, 18.7%, 集束性では31例, 38.5%であった. 密度, 太さ, 集束性いずれについても, コントロールより減少している症例は認められなかった(表5). そして, 結合組織の増生を, 密度, 太さ, 集束性のうちいずれかの項目を満たすものとした場合, 増生例は68例, 85%となつた(図7).

IV 考 按

IUD の避妊効果や副作用についての研究や観察は, すでに報告され尽くした感がある. しかし, 最も重要な避妊機序, 即ち, IUD がいかなるメカニズムで避妊作用を有するのかについては, 不明な点が少なくない. 以下 IUD の避妊機序について, 著者の成績を交じえて, 文献的に考察した.

IUD が排卵を妨げるという説は, 否定的である. その根拠としては, IUD 装着婦人の B.B.T.²⁰⁾, ホルモン測定²¹⁾において, 変化を示さないと報告されており, 今

回の著者の検索においても、基礎体温上で、無排卵を示す症例は認められなかつた。さらに卵管内からの卵の証明や、開腹所見より、出血卵胞、黄体形成を認めた報告^{22, 23}もあり、排卵に関しては、影響を及ぼさないと考えられている。

殺精子説に関しても同様で、IUD 装置婦人の子宮、卵管から運動精子が証明されており^{9) 22) 23)}、同説も否定的である。

卵管の卵または精子の輸送異常に関しては多くの実験、観察が報告されている。先に述べた Mastroianni²⁾の報告の他に、卵管運動亢進説を子宮外妊娠に着目した Tietze²⁴⁾や Margulies²⁵⁾の報告もある。即ち、IUD 装着婦人における子宮外妊娠は、IUD 非装着婦人の場合より低い頻度で発生するとし、それは、卵管の運動性が亢進している為と主張している。さらに、精子に関しては、Tredway⁸⁾の観察がある。これは、避妊の為の卵管結紮を受ける婦人に前もって IUD を装着し、手術の15分から30分前に授精させ、頸管粘液、子宮卵管内の精子を調べた結果、卵管では、全く精子の存在を認めなかつたという結果から、IUD が精子の輸送を妨げるという報告である。しかし、類似した観察から Malkani と Sujan⁹⁾は対象例 4 例全例に、子宮及び卵管から運動精子を認めており、IUD が精子の輸送に何ら影響を及ぼさないとしている。先に述べた多くの報告^{9) 4) 5) 6) 7)}から考慮しても、卵管の卵または、精子の輸送異常に関しては、避妊機序と直接結びつけるには無理があると思われる。

子宮収縮に関しては、馬越ら²⁶⁾の報告がある。即ち、Open-end-Tube 法を用い、IUD 装着時の子宮収縮を観察すると、分泌期後半に収縮の増大傾向があり、Bentsson²⁷⁾の報告とほぼ同様であるとしている。伊藤²⁸⁾らはラットを用い、IUD 挿入子宮角と非挿入子宮角からプロスタグランディンを抽出した結果、IUD 挿入子宮角の方に高値を示したと報告しており、川端²⁹⁾、国本³⁰⁾らは IUD 装着婦人の頸管粘液中のプロスタグランジン値を測定し、IUD 非装着婦人のそれと比較し、高値の傾向があるとしながらも、症例数が少なく、結論は出していない。いずれにしても、これらのデータは、子宮内圧の亢進、子宮収縮などにより、受精卵の排出、受精卵の剝離が促されるのではないかという推定であるが、その機序は不明であるとしている。

IUD が内膜に影響し、着床を障害するという見地から、Nicolaisen¹⁰⁾、Lee¹¹⁾、牧野¹²⁾、Tamada¹³⁾らは、子宮内膜の日付診における、理論的日付と組織学的日付診との間に遅延を主とするズレを認め、避妊機序と関連づけている。しかし、Hall¹⁴⁾らは、日付診に関しては、

IUD の影響を否定している。著者の成績においても日付診一致例は80例中54例、67.5%であり、遅延を中心とした日付診不一致例は、80例中26例、32.5%であり日付診のみで避妊機序を説明するのは困難な数値であつた。一方、Moyer¹⁵⁾や Greenwald³¹⁾は多数の多核白血球の存在が着床を阻害するとしており、Jessen¹⁶⁾も IUD 挿入による子宮内膜の炎症性変化が着床に影響を与えていると述べている。炎症性変化についての報告は多数あり、浮腫、充血、出血、圧迫萎縮、壊死、腺組織の形成不全、線維化、多核白血球、リンパ球の間質内浸潤などが主な組織学的所見^{13) 14) 15) 16) 31) 32) 33)}である。著者の観察においても、類似した変化を認めた。即ち、被覆上皮における潰瘍形成、ポリープ形成、不整突出像、間質における浮腫、細胞浸潤、血管の拡張、血管の増生、腺の不整形変化などである。Moyer³⁴⁾も同様の報告をしている。即ち、IUD が接していた内膜にV型の表層欠損を認め、被覆上皮直下に多核白血球、間質にリンパ球の浸潤を報告している。血管の変化に関しては、Willson³²⁾や Shaw³⁵⁾らの報告があり、血管の拡張、血管の増生を認めており、特に Shaw³⁵⁾は血管の分布を数値で示し、コントロールと比較し、IUD 挿入子宮内膜の血管増生を示している。いずれにしても、これらの変化は、IUD を異物としてとらえた場合、内膜の組織反応として、極く当然の所見であり、これらが、避妊機序に、直接的に関与しているとは考えにくい。また出現頻度の点からも、著者の結果では、器質的異常所見を示す例は70%であり、それも延べ症例数であり、すべての異常を示しているわけではなく、さらに、器質的異常所見を全く認めない症例が30%存在し、避妊機序との相関に関しては否定的である。

さらに、着床障害を示唆する報告として、宮井³⁶⁾の blueing reaction、脱落膜反応および、脱落膜腫形成についてのラットを用いた実験がある。この実験では、交尾前から IUD を装着しておく、blueing reaction は完全に阻止され、一方 IUD 非装着側にては、交尾後5日目頃より著明な blueing reaction が認められることから、IUD は blueing reaction を局所的に阻止する作用があることを証明している。IUD と着床の関係についても、交尾の二週間以上前に、IUD を装着した時、IUD 装着子宮角には全く着床は見られないが、IUD 非装着子宮角には、正常な着床が認められたと報告し、さらに、IUD の装着時期との関係についても観察しており、結論として、IUC は blueing reaction、脱落膜腫形成、ならびに、脱落膜反応を阻止し、妊卵の着床を阻止するとし、この脱落膜阻止作用は、IUD の装着期間と関係があり、一定期間以内では、その阻止作

用を示さないとしている。

子宮内環境の変化による着床障害を示唆する報告として、子宮内膜を組織化学的に観察したのも多い。高桑³⁷⁾は、IUD 装着婦人子宮内膜多糖体を測定し、着床、発育に対する子宮の準備態勢の不全を推定し、Abe³⁸⁾³⁹⁾らは、プロゲステロンのもつ、子宮内膜ムコ多糖体生成の抑制効果を減少させ、特に glycoprotein の異常合成をひき起こすことを避妊機序と関連づけている。また大野⁴⁰⁾⁴¹⁾らも IUD 挿入子宮内膜における PAS 陽性物質が、特に分泌期において出現の弱いことを報告している。しかし、石浜ら⁴²⁾はグリコーゲン、アルカリフォスファターゼが IUD 挿入によって変化しないと、Hall⁴³⁾らも、IUD 挿入前後で、PAS 染色における差はなかったと述べている。著者の観察では、PAS 染色において、PAS 陽性物質の産生異常例が60%にみられたが、やはり、この結果のみで IUD の避妊機序を述べるには無理がある様に思われる。

以上述べた如く、IUD の避妊機序は諸説あるが、IUD の作用は、排卵の抑制や、卵精子の輸送障害や受精障害のレベルに起こるのではなく、子宮因子、即ち受精卵の着床にかかわっているのであろうということが、ほぼ確信されるに至っている。

着床とは、一般に胎盤形成の初期過程を指して用いられる語であり、胚の外壁をなす栄養芽細胞と子宮内膜の上皮細胞との細胞間接着の開始を第一段階とする。ヒトを含む霊長類の胎盤は、血純毛性胎盤 (haemochorial placenta) に属し、胚の栄養芽細胞による侵襲度が最も高い⁴⁴⁾。ヒトの着床過程は、桑実胚、さらに、胚盤胞まで分割した卵が、内膜上皮に接触 (attachment) し、接合 (adhesion) し、ついに侵入 (penetration) し、基底膜を通過し、内膜間質を侵襲し毛細血管の内皮細胞へ侵入する。この時期、即ち、分泌期中期には、子宮内膜の間質は強い浮腫を示し、細網線維は細く、数も少なく、このことは、卵の間質への侵襲にとつて、極めて合目的な子宮内環境であるといえる。細網線維は組織内における緊張を保つ意味で、支持組織として働き、組織の構築性を保持する役目を持つ。この子宮内膜間質の細網線維に着目した報告は比較的少ない。牧野⁴⁵⁾は、IUD 装着内膜では、子宮内膜間質に紡錘形細胞が著明に認められたと述べ、線維芽細胞の増生を想像させた。小林ら⁴⁶⁾は、金属太田 Ring 挿入婦人95名について、子宮内膜の形態学的所見について検索を加えた結果、結合織の増殖している例が40%の多数にみられ、着床障害と結びつけ、Ring の避妊機序の一つに挙げている。著者は子宮内膜に鍍銀染色を施し、細網線維を観察したが、その結果、80例中、68例、即ち85%の高率に増生の所見を認めた。子宮摘出標本に

おいて、IUD が接していた部分、即ち、上皮損欠部において、その所見は特に著しく出現し、他の部分でも、IUD 非装着例のコントロールに比べると、増生所見は認められた。子宮内膜間質結合織である細網線維が増生した場合、妊卵の着床過程の最終段階である間質への侵襲を阻止することが想像される。即ち、細網線維の増生は、着床という妊娠成立にとつて不可欠な過程にとつて、極めて、不都合な子宮内環境であると言える。以上、IUD による避妊機序は、内膜因子、特に、間質結合織である。細網線維の増生より、妊卵は、子宮内膜上皮に接触、接合し、さらに間質に侵入せんとする段階において、これを阻止されるという、着床障害であると推定された。

稿を終るに臨み、御指導、御校閲を賜りました恩師、蜂屋祥一教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始、御助言、御指導を賜りました楠原浩二講師に深く感謝致します。

なお、本論文の要旨は、第24回、第25回日本不妊学会総会ならびに第10回世界不妊学会にて発表した。

文 献

- 1) Gräfenberg, E.: 'Silk als antikonzipiens', *Geburtenregelung: Vorträge und Verhandlungen des Ärztekursus vom 28-30 Dezember 1928* (K. Bendix, ed.), 50-64 Berlin: Selbstverlag (1929).
- 2) Mastroianni, L. Jr., and Hongsanand, C.: Mechanism of action of the intra-uterine contraceptive device in the primate, I: Tubal transport of ova and distribution of spermatozoa, *Intra Uterine Contraception*, Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, International Congress Series No. 86 : 194, 1965.
- 3) Marston, J. H., Kelly, W. A., and Eckstein, P.: Effect of an intra-uterine device on gamete transport and fertilization in the rhesus monkey, *J. Reprod. Fert.*, 19 : 149, 1969.
- 4) Marston, J. H., Kelly W. A., and Eckstein, P.: Effect of an intra-uterine device on uterine motility in the rhesus monkey, *J. Reprod. Fert.*, 19 : 321, 1969.
- 5) Ishihama, A., Nakamura, Y., and Miyai, T.: Pertubal, Cinesalpingographical and radiotubal observations using IUD, *Yokohama Med. Bull.*, 17 : 45, 1966.
- 6) 宮井哲郎: IUD 装着家兎ならびにラットにおける卵の卵管内通過性について, *日本不妊学会雑誌*, 13(4) : 1, 1968.
- 7) Mastroianni, L., Jr., Suzuki, S., Manabe,

- Y., and Watson, F.: Further observations on the influence of the intrauterine device on ovum and sperm distribution in the monkey, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 99: 649, 1967.
- 8) Tredway, D. R., Umezaki, C. U., Mishell, D. Jr., and Settlage, D. S.: Effect of intrauterine devices on sperm transport in the human being: Preliminary report, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 123: 734, 1975.
 - 9) Malkani, P. K., and Suján, S.: Sperm migration in the female reproductive tract in the presence of intrauterine devices, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 88: 963, 1964.
 - 10) Nicolaisen, H. H., Pedersen, H., Guttorm, E., and Rebbe, H.: Postovulatory endometrial development in women with I.U.D., *Acta, Obstet. Gynec. Scand.*, 52: 253, 1973.
 - 11) Lee, C. H., Chow, L. P., Cheng, T. Y., and Wei, P. Y.: Histologic study of the endometrium of intrauterine contraceptive device users, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 98: 1967.
 - 12) 牧野俊重: IUD による子宮内膜反応に関する研究, *日本不妊学会雑誌*, 15(1): 49, 1970.
 - 13) Tamada, T., Okagaki, T., Maruyama, M., and Matsumoto, S.: Endometrial histology associated with an intrauterine contraceptive device, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 98: 811, 1967.
 - 14) Hall, H. H., Sedlis, A., Chabon, I., and Stone, M. L.: Effect of intrauterine stainless steel ring on endometrial structure and function, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 93: 1031, 1965.
 - 15) Moyer, D. L.: IUD の作用機序, *日本不妊学会雑誌*, 16(4): 76, 1971.
 - 16) Jessen, D. A., Lane, R. E., and Greene, R. R.: Intrauterine foreign body, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 85: 1023, 1963.
 - 17) 鈴木雅洲, 安部徹良: IUD の作用機序について (その1), *産婦人科の実際*, 21(5): 408, 1972.
 - 18) 鈴木雅洲, 安部徹良: IUD の作用機序について (その2), *産婦人科の実際*, 21(6): 495, 1972.
 - 19) 石浜淳美: IUD の効果と作用機序, *Sexual Medicine* 2(1): 20, 1975.
 - 20) Hall, H. H., and Stone, M. L.: Observations on the use of the intrauterine pessary, with special reference to the Gräfenberg ring, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 83: 683, 1962.
 - 21) Vorys, N., Deneef, J. C., Boutselis, J. G., Dettmann, F. G., Scott, W. P., Stevens, V. C., and Besch, P. K.: Effect of intra-uterine device on the normal menstrual cycle, *Intra Uterine Contraception*, Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, International Congress Series No. 86: 147, 1965.
 - 22) Morgenstern, L. L., Orgebin-Crist, M. C., Clewe, T. H., Bonney, W. A., and Noyes, R. W.: Observation on spermatozoa in the chronic presence of intrauterine devices, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 96: 114, 1966.
 - 23) Bonney, W. A., Glasser, S. R., Clewe, T. H., Noyes, R. W., and Cooper, C. L.: Endometrial response to the intrauterine device, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 96: 101, 1966.
 - 24) Tietze, C.: Intra-uterine contraceptive rings: History and statistical appraisal, *Intra-uterine contraceptive devices*, Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, International Congress Series No. 54: 9, 1963.
 - 25) Margulies, L. C.: Permanent reversible contraception with an intra-uterine plastic spiral (permaspiral), *Intra-uterine contraceptive devices*, Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, International Congress Series No. 54: 61, 1963.
 - 26) 馬越誠通, 桑田昱, 三井武, 鈴木正勝: IUD と子宮収縮, *産婦人科の世界*, 22(9): 17, 1970.
 - 27) Bengtsson, L. P., and Moawad, A. H.: The effect of the lippes loop on human myometrial activity, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 98: 957, 1967.
 - 28) 伊藤耕造, 尾崎博臣, 森憲正, 前山昌男: IUD と子宮組織中 Prostaglandins, *日不妊誌*, 18(2): 118, 1973.
 - 29) 川端徳衛, 河合義雄, 小見克夫: IUD の避妊機序と頸管粘液中の Prostaglandin 活性について, *日不妊誌*, 18(1): 27, 1973.
 - 30) 国本恵吉, 河合義雄, 宮内茂寿, 川端徳衛: IUD 装着婦人の頸管粘液中 Prostaglandin 含有量について, *日産婦誌*, 24(12): 1198, 1972.
 - 31) Greenwald, G. S.: Interruption of pregnancy in the rat by a uterine suture, *J. Reprod. Fertil.*, 9: 9, 1965.
 - 32) Willson, J. R., Ledger, W. J., and Andros, G. J.: The effect of an intrauterine contraceptive device on the histologic pattern of the endometrium, *Am. J. Obst. & Gynec.*, 93: 802, 1965.
 - 33) Ober, W. B., Sobrero, A. J., Kurman, R., and Gold, S.: Endometrial morphology and polyethylene intrauterine device, *Obst. & Gynec.*, 32: 782, 1968.
 - 34) Moyer, D. L., and Mishell, D. R. Jr.: Studies of the endometrium in patients using intra-uterine contraceptive devices. I.: Histologic changes in the uterus, *Intra uterine contraception*, Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, International Congress Series No. 86: 159, 1965.
 - 35) Shaw, S. T., Macaulay, L. K., and Hohman, W. R.: Vessel density in endometrium of

women with and without intrauterine contraceptive device: A morphometric evaluation, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 135: 202, 1979.

- 36) 宮井哲郎: IUD の作用機序に関する一考察, 日本不妊誌, 15(1): 35, 1970.
- 37) 高桑明夫: 子宮内装具の家兎子宮多嚢体に及ぼす影響, 日産婦誌, 20(4): 365, 1968.
- 38) Abe, T., Higashiiwai, H., Endo, M., and Yoshizawa, Z.: Biochemical study of the antifertility action of the intrauterine device (IUD), *Fertility and Sterility, Excerpta Medica Amsterdam, International Congress Series No. 278*: 932, 1973.
- 39) Abe, T., Endo, M., and Yoshizawa, Z.: Study on the uterine mucosubstances accompanying the infertility effect of an intrauterine device, *Clin. Chim. Acta.*, 42: 29, 1972.
- 40) 大野虎之進, 松井一郎, 高島弘, 佐賀正彦: IUD 挿入婦人の子宮内膜所見, 日不妊誌, 14(4): 401, 1969.
- 41) 大野虎之進, 高島弘, 曾敏明: IUD 挿入婦人子宮内膜の組織化学的検討 (I), 齒科学報, 70: 488, 1970.
- 42) 石浜淳美, 中村義孝, 浜津吉男, 利部輝雄, 宮井哲郎, 今井規: 子宮内避妊装置の使用経験, 産と婦, 33(3): 293, 1966.
- 43) Hall, H. H., Stone, M. L., Sedlis, A., and Chabon, I.: The intrauterine ring for conception control, *Fertility & Sterility*, 15: 618, 1964.
- 44) 館澄江, 館鄰: 着床と胎盤形成, 代謝, 16, 臨時増刊号「性 II」: 1313, 1979.
- 45) 牧野俊重: IUD (子宮内避妊装置) による子宮内膜組織像, 秋田県農村医学会雑誌, 21(1): 66, 1974.
- 46) 小林隆, 河合信秀, 渡辺明, 石橋仁子, 小出保爾, 平塚肇, 丸山正義: 子宮内避妊器具による避妊機序に関する一考察, 日産婦誌, 19(9): 1097, 1967.

The morphological study of the endometrium of women with IUD in nidative phase

Ikuyo Yasue

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

An attempt was made to clarify the mechanism

of how the intrauterine device (IUD) disturbs the nidus implantation from the view point of morphological changes of endometrium caused by attachment of the IUD. Mainly, the resulted changes of endometrial stroma, which has rarely investigated, were examined in this investigation.

Endometrial biopsies were performed at the suspected implantational period from 80 women who had worn the IUD. The endometrium was fixed and stained by Hematoxylin-Eosin staining, Periodic-Acid-Shiff staining and Watanabe's silver staining.

1) 56 cases of 80 cases (70%) showed abnormal findings of endometrium histopathologically. On the other hand, 24 cases (30%) showed almost normal endometrium.

2) By the examination of the dating of the endometrium, 54 cases of 80 cases (67.5%) were diagnosed as normal and 26 cases (32.5%) were diagnosed as discrepant endometrium. 22 cases of discrepant group showed retarded endometrium and 4 cases showed advanced endometrium.

3) Comparing with normal endometrium stained by Periodic-Acid-Shiff staining, 32 cases of 80 cases (40%) were estimated as normal and 60% of all cases showed slightly or markedly scant production of Periodic-Acid-Shiff positive substance.

4) An increase in either density or thickness of the reticulum fibers of endometrial stroma, being examined by Watanabe's silver staining, was recognized in high incidence (85%)

Among the histopathological and histochemical examination of the endometrium which was removed from the women who had worn the IUD, an increase in density or thickness of reticulum fibers in stromal region was the most remarkable change which might be caused by insertion of the IUD. It was concluded that the change of the reticulum fibers may disturb the nidus implantation whereby contraception is attained.

(受付: 昭和55年12月22日)

LYMPHOCYTES SUBPOPULATION IN PREGNANT WOMEN

Yukihiko SHIOTSUKA¹⁾, Kazuo KOBAYASHI¹⁾
and Susumu YAMAUCHI²⁾

Department of Obstetrics and Gynecology,¹⁾
Division of Microbiology Inter Departmental Laboratory,²⁾
Tokai University School of Medicine, Kanagawa

Abstract: In order to examine the change of the immune function of pregnant women, the lymphocyte subpopulation in the peripheral blood was studied continuously from early pregnancy to parturition and further to puerperium of the same individuals. The change of the blastoid reaction by PHA and PWM, too, was examined.

Further for examining the masking phenomenon, separated lymphocytes were washed with PBS five times (T_5) or cultured for 72 hours (T_{72}) as pretreatment, and the T cell population was counted, to make comparative discussion.

1. The T cell population was $50.3 \pm 19.0\%$ in the 1st trimester, $64.2 \pm 20.9\%$ in the 2nd trimester, $57.4 \pm 16.6\%$ in the 3rd trimester and $61.9 \pm 14.7\%$ in the puerperium. The B cell population was $18.2 \pm 6.0\%$ in the 1st trimester, $15.6 \pm 4.4\%$ in the 2nd trimester, $19.3 \pm 5.2\%$ in the 3rd trimester and $16.9 \pm 5.3\%$ in the puerperium.

With regard to the blastoid reaction by PHA and PWM, there was no clear difference in the respective studies.

2. The T cell population counted in the respective weeks of pregnancy showed a clear decrease in 6 to 7 weeks of pregnancy, and gave the lowest value of $40.2 \pm 13.4\%$ in 10 to 11 weeks of pregnancy. It rose again from 14-15 weeks of pregnancy, and did not change so much after 18-19 weeks of pregnancy.

3. In the examination of the masking phenomenon, after such pretreatment as washing separated lymphocytes five times, T cell population increased, showing no change in relation with the weeks of pregnancy. It was demonstrated that the masking phenomenon decreased the T cell population in the 1st trimester.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 26(2), 208-212, 1981)

Human pregnancy has been regarded as successful allogeneic transplantation, although fetus as transplanted tissue possesses histocompatibility antigens different from mother, and the mechanism by which foetus resists to successful allograft rejection is not yet well understood.

To examine the immune function of pregnancy, there were many reports made on the studies of lymphocyte subpopulation¹⁻⁷⁾, but no general agreement about that. There were some reasons surmised to be ascribable to difference in the weeks of pregnancy of subjects and no report made on sequential

study of the same individuals.

The present investigation was designed to carry out the immunological function of pregnant women, and we studied the lymphocyte subpopulation continuously from the early weeks of pregnancy to puerperium.

Material and Method

1. Materials

Heparinized peripheral venous blood of 12 pregnant women who have no recent infection, no toxima of pregnancy and no medication were obtained, and their ages ranged

from 24 years old to 34 years old, healthy nonpregnant women of childbearing age served as control. Sampling was done sequentially from early pregnancy to puerperium.

2. Isolation of Lymphocytes

The lymphocytes isolated by LYMPHO-PREP (NYEGAARD & Co. A/S Oslo) and washed 3 times with phosphate buffer saline (PBS) (0.01M, PH 7.3) were applied in all experiments. The viability of lymphocytes was checked with tripanblue and exclusion test of neutrophil, monocytes contamination were under 10 percent. Each test was performed in triplicate.

3. T cell population

The lymphocytes were resuspended in RPMI 1640 with 20% FCS and the number of lymphocytes was adjusted to 5×10^6 /ml respectively. Fresh SRBC in Alsever's solution stored at 4°C were washed three times with PBS and treated with Neuraminidase (HOECHST JAPAN, TOKYO). SRBC were then washed three times with PBS and were adjusted to 1×10^8 /ml in RPMI 1640 with 20% FCS. A volume of 0.1 ml of lymphocytes suspension was mixed with 0.1 ml. of SRBC suspension respectively.

The mixture was incubated for 20 minutes at 37°C and centrifuged at 800 r. p. m., for 5 minutes afterward, and the tube was kept at 4°C for 2 hours. The sediment in the tube was gently resuspended with micropipett and counted on SRBC to the lymphocytes. Lymphocytes binding three or more SRBC were considered as RFC positive. 200 lymphocytes were scanned for each sample.

4. B cell population

B cells were determined on immunofluorescent technique by use of fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti human immunoglobulin (anti IgG, anti IgM, anti IgA : S-Ig) (HOECHST JAPAN, TOKYO).

5. Responses of lymphocytes to mitogens

On the measurement of PHA and PWM responses, 1×10^6 /ml of isolated lymphocytes were cultured in RPMI 1640 with 20% FCS supplemented with 50ug/ml of Kanamycin (MEIJI SEIKA, LTD. Tokyo). 5ug/ml of PHA-P (Difco Labo, Detroit, Mich. 48201), 10ug/ml of PWM (GIBCO, grand Island, N. Y. 14072) respectively. Cultures were incubated at 37°C in 95% air and 5% CO₂ for 72 hours. Lymphocytes were harvested and counted on each slide.

6. To examine the masking phenomenon reported by Rugarli^{8,9)}

T cells were detected again by E-RFC method, after such pretreatment as washing separated lymphocytes five times with PBS (T₅), or culturing in RPMI 1640 with 20% Feted Calf Serum for 72 hours at 37°C afterward (T₇₂).

Results

1. Lymphocyte subpopulation in each pregnant stadium

The T cell population was $50.3 \pm 19.0\%$ in the 1st trimester, $64.2 \pm 20.9\%$ in the 2nd trimester, $57.4 \pm 16.6\%$ in the 3rd trimester, and $61.9 \pm 14.7\%$ in the puerperium. The value in the 1st trimester was rather low.

The B cell population was $18.2 \pm 6.0\%$ in the 1st trimester, $15.6 \pm 4.4\%$ in the 2nd trimester, $19.3 \pm 5.2\%$ in the 3rd trimester and $16.9 \pm 5.3\%$ in the puerperium. The values in the 2nd trimester and the puerperium were rather low, but there was no significant difference.

With regard to the blastoid reaction by PHA and PWM, there was no significant difference observed in the respective stadia (Table 1).

2. Change of T cell population in relation with the weeks of pregnancy

The T cell population which showed an obviously low value in the 1st trimester was

Table 1 T cell and B cell population in each stadium of pregnancy and puerperium

Stadium of pregnancy		I st trimester	II nd trimester	III rd trimester	Puerperium
Lymphocytes subpopulation (%)	T cell	50.3±19.0	64.2±20.9	57.4±16.6	61.6±14.7
	B cell	18.2± 8.0	15.6± 4.4	19.3±11.2	16.9± 5.3

investigated in detail in relation with the weeks of pregnancy.

In 5 weeks of pregnancy, it was $75.6 \pm 7.0\%$, showing no difference from the control. But in 6 to 7 weeks of pregnancy, it sharply dropped to $51.7 \pm 16.4\%$, and in 10 to 11 weeks of pregnancy, it showed the lowest value of $40.2 \pm 13.8\%$. From 14-15 weeks of pregnancy, the T cell population rose again, and after 18-19 weeks of preg-

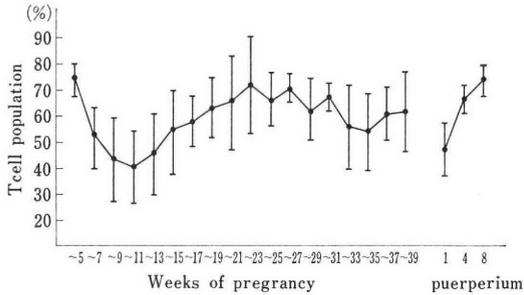


Fig. 1 Levels to T cell populations on differential weeks of pregnancy and puerperium.

Table 2 T cell population on differential weeks of pregnancy and puerperium

	weeks	T cell population
weeks of pregnancy	~ 5	75.8 ± 7.0
	~ 7	51.7 ± 16.4
	~ 9	43.4 ± 15.2
	~ 11	40.2 ± 13.8
	~ 13	46.3 ± 16.1
	~ 15	54.0 ± 17.2
	~ 17	57.4 ± 10.9
	~ 19	62.3 ± 11.4
	~ 21	65.7 ± 18.0
	~ 23	71.0 ± 19.0
	~ 25	66.2 ± 9.6
	~ 27	69.5 ± 4.5
	~ 29	60.8 ± 11.9
	~ 31	68.3 ± 4.7
	~ 33	55.0 ± 16.2
	~ 35	52.7 ± 15.0
~ 37	60.0 ± 10.1	
~ 39	60.6 ± 14.8	
puerperium	1	47.14 ± 10.5
	4	66.2 ± 4.3
	8	73.3 ± 4.1

nancy, it varied only slightly.

In 1 week of puerperium, it showed again a low value of $47.1 \pm 10.5\%$, but in 4 weeks, it rose to $66.2 \pm 4.3\%$. In 8 weeks, it became $73.3 \pm 4.1\%$, thowing no difference from the control (Fig. 1) (Table 2).

3. Examination of masking phenomenon

We thought the decrease of T cell population observed in the 1st trimester was an apparent decrease caused by the masking phenon. The separated lymphocytes were pretreated by way of washing with PBS five times (T_5) or culturing for 72 hours (T_{72}), and then the T cell population was counted again by E-RFC method, for comparison with the standard T (T_s).

After the pretreatment, in both the cases of T_5 and T_{72} , the T cell population rose, showing little difference from the T_s . It did not change either in relation with the differential weeks of pregnancy (Fig. 2).

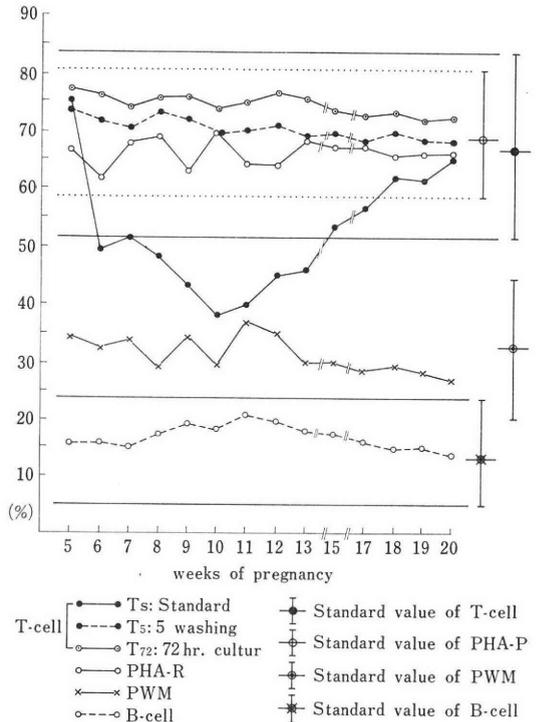


Fig. 2 Levels of T cell, B cell, lymphocytes response to mitogen and result of examination about masking phenon in early weeks of pregnancy.

Discussion

Hitherto, pregnancy has been regarded as semiallogeneic transplantation, and it is surmised that the immune function of pregnant women many change to establish and maintain pregnancy. For this reason, there were many reports made to examine the change of the immune function of pregnant women by examining lymphocyte subpopulation¹⁻⁷⁾. But there is no general agreement reached.

Strelkaushas, et al.⁷⁾ reported that decrease of T cells and increase of B cells were observed in the 1st trimester, but no other reporters since then admitted any clear increase of B cells.

Gergely, et al.⁵⁾ observed a slight increase of B cells in the 3rd trimester, and Cornfield, et al.³⁾ too, observed a slight increase of B cells similarly in the 3rd trimester, especially a slight increase of IgG bearing B cells. Many reported that the T cell population did not change. However, most of these reports used pregnant women in the 3rd trimester as materials. And there was no report concerning the examination made on the same individuals from early pregnancy to late pregnancy, and further to puerperium.

We have been studying placenta and deciduae morphologically, and from this experience^{10,11)}, since the fetomaternal relationship is not always stable, but changes in the respective stadia of pregnancy and becomes stable only after the placentation in and after the 2nd trimester of pregnancy, we are of the opinion that in the 1st trimester when the relationship is still unstable, the change of the immune function of the mother's body in the 1st trimester gives an important effect in establishing and maintaining pregnancy.

Based on this conception, the lymphocyte subpopulation and the blastoid reaction by PHA and PWM were examined sequentially, using the same individuals from early pregnancy to puerperium, and in the 1st trimester, a clear decrease in T cell population was observed. The B cell population did not show any distinct change.

If the T cell population decreases and the

B cell population remains unchanged, then what category do the remaining lymphocytes belong to? In pregnancy as a physiological phenomenon, can such decrease of T cells occur? Being confronted by these two questions, we supposed the decrease in T cell population would be concerned with the masking phenomenon reported by Holland, et al.¹²⁾ Rugarli, et al.^{8,9)} and washed separated lymphocytes with PBS five times or cultured them for 72 hours, to count the T cell population again by E-RFC method. After the treatment, the T cell population increased, showing no difference in relation with the weeks of pregnancy. The decrease in T cell population in the 1st trimester was found to be an apparent decrease caused by the masking phenomenon due to any factor.

The bond between the masking factor and lymphocytes is very low in affinity, and the effect can be eliminated by such treatment as several times of washing. We consider that the masking factor must be the HCG proven to exist locally on the surface of lymphocytes, and this study is now being continued.

The masking factor existing on the surfaces of lymphocytes not only lowers the appearance of T cells by E-RFC method, but also is surmised to affect T cell function, and we will keep studying this subject.

Reference

- 1) Brain, P., Marston, R. H. and Gordon, J.: Immunologic response in pregnancy. *Brit. Med. J.* 4: 488, 1972.
- 2) Campion, P. D. and Currey, H. L. F.: Cell-mediated immunity in pregnancy. *Lancet*, 11: 830, 1972.
- 3) Cornfield, 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 Oleary, J. A.: T and B cells in pregnancy. *Obstet. Gynecol.*, 53: 203, 1979.
- 5) Gergely, P., Dsvonyar, J. and Szegedi, G.: T and B lymphocytes in pregnancy. *Clin. Wochenschr.*, 52: 601, 1974.
- 6) Loke, Y. W., Brook, S. S. and Allen, G. E.: Increased 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 cells in early pregnancy. *Nature.*, 258 : 331, 1975.
- 8) Rugarli, C., Scorga, R. and Sabbadini, M. G.: Unblocking of T lymphocytes. *Lancet*, 2 : 1297, 1975.
- 9) Rugarli, C., Smeraldi, R-S., Sabbadini, M. G., Fabio, G. and Bonara, P.: Serum factors influencing spontaneous rosette-formation by lymphocytes of pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 129 : 662, 1977.
- 10) Shiotsuka, Y., Hayashi, S., Hayashi, M., Sahashi, T., Fujii, N. and Kobayashi, K.: An electron microscopic study on the structure of fetomaternal junctional zone. *J. Clin. Electron. Microscopy*, 9 : 596, 1976.
- 11) Shiotsuka, Y., Hayashi, S. et al.: Study on the function of fibrinoid layer in early pregnancy. *Jap. J. Fertil. Steril.* (22th annual meeting) 22 : 135, 1977.
- 12) Holland, P. D., Browne, O. and Thornes, R. D.: The enhancing influence of proteolysis on E-rosette forming lymphocytes (T-cells) *in vivo* and *in vitro*. *Brit. J. Cancer.*, 31 : 164, 1975.

妊婦末梢血における Lymphocytes subpopulation

塩塚幸彦, 小林一夫

東海大学医学部産婦人科学教室

山内 進

共利研微生物

妊婦の免疫機能の変化を検索する為に、妊娠初期から分娩、産褥に至るまで同一個体で連続的に末梢血のリンパ球 subpopulation の検査を行った。また PHA, PWM による blastoid reaction の変化の検査を行った。

さらに masking 現象の検索のため、分離したリンパ球を PBS でさらに5回洗滌 (T₅), 72時間培養 (T₇₂) 等の前処置を行った後再び T cell population の検査を行ない比較検討を行った。

結果

(1) T cell population は I st trimester 50.3±19.0%, II nd trimester 64.2±20.9%, III rd trimester 57.4±16.6% 産褥期 61.9±14.7% であった。B cell population は I st trimester 18.2±6.0%, II nd trimester 15.6±4.4%, III rd trimester 19.3±5.2%, 産褥期 16.9±5.3% であった。PHA, PWM による blastoid reaction は各時期で顕著な変化は認められなかった。

(2) 各妊娠週別の T cell population 検査では、妊娠 6~7 週より発現率が減少し、妊娠 10~11 週で 40.2±13.8% と最も低値となった。妊娠 14~15 週より再び増加し妊娠 18~19 週以後は顕著な変化は認められない。

(3) masking 現象の検査では T₅, T₇₂ ともに T cell population は増加し T_s との差が無くなり、また妊娠週数による差も認められなくなった。I st trimester での T cell population の変化が masking 現象による見せかけの減少であることを示した。

(受付: 昭和 56 年 1 月 6 日)

地方部会講演抄録

第82回日本不妊学会関東地方部会

昭和55年6月28日
埼玉医科大学臨床講堂

1. パーオデル (CB-154) による妊娠例の検討

沢田富夫・福永友明・小田高久
中村幸雄・飯塚理八 (慶大産婦)

高プロラクチン (PPL) 血症を伴う排卵障害患者 54名に Bromocriptine を投与し以下の成績を得た。対象は、無排卵周期症 5, 第 1 度無月経 11, 第 2 度無月経 38 名であり、高 PRL 血症の病態別では、Argonz-del Castillo 症候群 27, Chiari-Frommel 症候群 24, 下垂体腫瘍術後 3 名に分類される。

① Bromocriptine 療法により 44 名 (81.5%) に排卵が誘発され、そのうち 29 名が妊娠に至った。全排卵者に対しての妊娠率は、65.9% であった。

② 妊娠した 29 名の転帰は、正産 14, 自然流産 3, 妊娠継続中 12 名であり、自然流産率は 10.3% であった。

③ 正産となった 14 名の妊娠経過は 1 名に切迫流産の徴候がみられた以外は順調であった。

④ 出生児 14 名は、男子 10, 女子 4 名であり、生下時身長、体重の平均値は 49.3cm, 3188gr で SFD 児及び奇形は認められなかった。

⑤ 出生児の健康面、運動能力、知能の発達についての追跡調査によれば現在のところ全例において異常は認められていない。

2. マイコプラズマ陽性不妊患者の治療と妊娠例について

吉田茂子 (女子医大産婦)

マイコプラズマのうち、ウレアプラズマ (*Ureaplasma urealyticum*) は、不妊夫婦の子宮頸管及び精液から高率に分離され、又ウレアプラズマ陽性精子の電顕像は、ウレアプラズマ菌の附着像及び環状や渦巻状の変形が認められた。この変形は、実験的ウレアプラズマ感染精子の病態像と一致し、他種のマイコプラズマ菌の実験的感染精子と異なる病態像が認められた事を報告してきた。今回ウレアプラズマ陽性の不妊夫婦に Doxycycline の治

療を行い、ウレアプラズマ撲滅により妊娠となった症例につき報告する。

治療薬剤及び治療方法：ウレアプラズマ菌は Doxycycline 及び Minocycline に最も感受性を示したので Doxycycline (ビブラマイシン) を用いた。月経開始の第 1 日に 200mg を朝夕分服、翌日より 1 日 100mg 宛 9 日間投与し、1100mg 10 日間を 1 クールとして、排卵日前に内服終了する様にした。治療は、夫婦共に同時期に内服せしめ、1 クール終了毎に分離培養を行った。

治療対象及び結果：不妊期間 2 年以上の原因不明の不妊例で、ウレアプラズマ陽性の夫婦 45 組 (原発不妊 30 組, 続発不妊 15 組) である。このうち 16 組 (原発 11 組, 続発 5 組) が妊娠となり、8 組 (原発 7 組, 続発 1 組) は満期分娩し健康児を得た。4 組 (原発 3 組, 続発 1 組) は現在妊娠継続中であり、残りの 4 組 (原発 1 組, 続発 3 組) は流産となった。妊娠となった 16 例の薬剤治療回数は 3 クールが最も多く、75% は 3 クール治療後に妊娠となった。又この中には、人工授精を 20 回行ったが妊娠しなかつたものや、排卵誘発に成功したが妊娠に至らないもの等が含まれ、ウレアプラズマ治療によつて妊娠となった事から、この微生物が、これらの症例においては、生殖障害の原因となつていた事が推定された。

3. ヒト子宮内膜における PAS 陽性物質の意義

木下英夫・木村英三・篠塚正一
楠原浩二・蜂屋祥一

(慈医大産婦)

着床現象、すなわち卵の子宮内膜接着機構解明の目的にて、Wister-Imamichi 系妊娠ラット子宮内膜組織と卵細胞、それぞれの細胞表層に存在する糖残基の性格を、糖鎖と特異的に結合する植物性凝集素 fluorescein isocyanate (FITC) を標識された三種の FITC-lectin、すなわち、FITC-WGA FITC-RCA、および FITC-Con-A を用いて、卵と内膜を incubation し、蛍光顕微鏡による観察を行った。さらに、子宮内膜組織中における glycosidase activity を検討した。

この結果、denudation を終了した Blastocyst は RCA と Con-A に対する強い結合性を示し、一方、子宮内膜においては着床期に相当する D_{5.5} に EGA はその表層細胞に対する強い結合性を示した。この事実は、

卵細胞表層の糖残基として、 $\beta(\alpha)$ -D-Galactose 又は α -D-Mannose と、内膜表層での β -D-(GlcNAc (1 \rightarrow 4)- β -D-GlcNAc が着床成立に際して、相互の細胞接着に関与していることが推察された。

4. IUD 挿入子宮における PAS 陽性物質の推移とその表層糖鎖の性質

安江育代・木下英夫・庄司 誠
楠原浩二・蜂屋祥一
(慈医大産婦)

私共は既に、IUD 装着子宮内膜の着床期における PAS 陽性物質の発現低下が約60%の症例に認められたことを発表した。しかしそれが着床にどの様にかかわっているのは不明である。そこで今回我々は、PAS 陽性物質が一部を構成する糖残基が、内膜と卵の接着において、立体的構造の上で何らかの相互認識に関与するであろうと推定し、正常内膜と IUD 装着内膜を比較し、その相異を検討した。検査対象は正常月経周期を有する IUD 装着婦人20例で、着床期と推定される時期に IUD を抜去し、同時に子宮内膜搔爬診を施行し、内膜の一部に PAS 染色を施し、一部に FITC-Lectin である ConcanavalinA (ConA), Wheat germ agglutinin (WGA), Ricinus Communis agglutinin (RCA) を標識し、蛍光顕微鏡観察を行った。対象例は PAS 陽性例10例、中等度陽性例4例、陰性例6例で、それらが、どの様な糖残基を細胞表層に有しているかを検討した。正常内膜においては、WGA が強く、他は中等度に発現し、一定の規則性をもっていた。一方、IUD 装着子宮内膜においては、各群とも正常内膜とは異なり、特に PAS 陰性群では Lectin の標識の程度が極めてまちまちであった。即ち、正常内膜において、その表層から出る糖残基が一定の規則性をもつのに反し、IUD 装着子宮内膜では糖残基の発現が不規則であり、このことが細胞表層における糖残基との結合を阻害するのではないかと推定した。

5. 睾丸組織 LDHx と Spermotogenesis

内島 豊・岡田耕市 (埼玉医大)

思春期後の睾丸組織や精子を含む射精液中にのみ特異的に認められる LDH アイソザイムの一つである LDHx が、どの精子形成過程の段階で出現してくるかを検討した。

[研究対象と研究方法]

ウィスター系のおスラットを使用した。生後5日目から、10日、14日、20日、25日からは34日まで連日、60

日、90日目に各々4~5匹の睾丸を摘出し、十分ホモゲナイズ直後、105,000g で遠心沈殿後、その上清を酵素活性およびアイソザイム測定に使用した。一方、病理組織学的に精子形成発達段階を確認した。

[研究結果]

(1) LDH 活性は10日令から14日令の間に2倍の増加を認め、以後著しい増加を示さなかった。

(2) 各アイソザイムについて検討すると、10日令、14日令までは $LDH_1+LDH_2 < LDH_4+LDH_5$ の比率を示したが、20日令以後では $LDH_1+LDH_2 > LDH_4+LDH_5$ の比率を示した。

(3) ラットでは LDH_4 の陰性側および陽性側に各々1本計2本の LDHx バンドが認められるが陽極側を LDH_{x1} 、陰極側を LDH_{x2} とすると、 X_1, X_2 の両方とも34日令以後になつて初めて出現した。

(4) LDHx の出現は精子細胞の出現時期とほぼ一致した。

6. 腎同種移植後妊娠の成立がみられた2名の男性患者

小田島邦男・中村 宏・松下一男
早川 正道・藤岡俊夫
(防医大泌尿)

慢性腎不全末期の患者では、腎同種移植は血液透析療法と同等の生存率を挙げることができるのみならず、社会的活動や生殖機能の点では血液透析よりも優れており、われわれが腎移植を行なつた男性患者15名のうち2名がそれぞれ2名の健康な子供を誕生せしめたのでここに報告する。

患者1、移植時26歳の男性で、尿毒症にて血液透析を16回受けた後に腎同種移植術を施行した。免疫抑制療法には、azathioprine と prednisolone を使用し、ステロイドは移植後6年6カ月目まで使用しそれ以降は azathioprine のみを内服している。精液検査は移植後4年目以降、定期的に施行した。いずれも乏精子症の状態であつたが、精子数および運動率はともに漸時増加の傾向にあるようである。血清テストステロンは正常範囲にある場合と低値を示している場合とが相半ばしていたが、血清 FSH と LH は漸減する傾向にあり、1回を除き正常範囲内であつた。クロミフェン・テストでも陽性を示した。この患者は移植後2年10カ月目に結婚し、3年7カ月目と6年11カ月目に健康な男児の誕生をみた。

患者2、移植時25歳の男性で尿毒症にて約6カ月間血液透析を受けた後、腎同種移植術を施行した。免疫抑制

療法には azathioprine と betamethasone を使用し移植後 2 年 11 月以降はステロイドの投与を中止した。精液検査では、いずれも乏精子症の状態、betamethasone 投与中は大きな変動を示していたが、中止後は安定してきている。運動率も 1 回を除き 60% 以下と低値を示していた。血清テストステロンは移植後 3 カ月目以後は 2 回やや低値を示した以外は正常範囲内であった。血清 FSH は 3 年 3 カ月目以降正常範囲内に下降し、血清 LH はほとんどが正常範囲内で、クロミフェン・テストは陽性であった。この患者は移植後 2 年 1 カ月目と 4 年 3 カ月目にいずれもまったく健康な女兒の誕生をみている。

7. 日本で開発された penile tumescence monitor の使用経験

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・福田秀樹・鳥居鎮夫
(東邦大第一生理)

我々は器質的インポテンスと機能的インポテンスの客観的な鑑別診断法として終夜睡眠ポリグラフィによる Nocturnal penile Tumescence (NPT) の有無を利用して、この NPT を測定する機器としてこれまでアメリカの Event System 社製 PTM-1 を使用してきた。PTM-1 は高価であるうえ記録紙の送り速度が日本人になじみの薄いインチ単位であることや電源が充電式で充電に約 10 時間を要するなどの不便さがある。

そこで本邦での機器の開発の必要性を痛感してきた。最近我々はダイヤメディカルシステム K.K. に機器の開発を依頼し、試作第 1 号機が完成したのでここに報告する。

本機器は potency meter と名付けられており、PTM-1 と異なる点は out put level を自由に調節できること、交流電源を使用することである。プローブは細いリング状の mercury strain gange で装着により患者に不快感を与えないよう特に配慮してある。

potency meter を実際に患者に使用してみたが感度は極めて良好であり外国製品と比較しても決して劣らない。

8. 精索静脈瘤患者の睾丸機能

吉田謙一郎・大島博幸 (医歯大泌尿)

昭和55年度日本不妊学会東北支部総会

昭和55年10月18日

長陵会館

一般演題

1. ホルモンの作用機序における Ornithine Decarboxylase の役割

星合 昊 (東北大産婦)

C. A. Vilee (ハーバート大生化学)

Ornithine Decarboxylase (以下 ODC) は、Urea cycle の最終産物である L-Ornithine を基質として Polyamin 類の一つである putrescine を産生する酵素である。ラット精巣に FSH, LH, cAMP を投与すると投与後 1 時間で ODC 活性は上昇し 4 時間にピークを作る。偽妊娠ラットにオリブオイルで脱落膜を誘発しエストラジオールを投与すると、脱落膜の ODC 活性は 4 時間後にピークを示した。同時にポリアミン類 (putrescine, spermidine, spermine) を測定すると矢張り同時期にピークを示した。ポリアミン類の RNA 合成系への影響を見ると、putrescine は影響しないが他の 2 者は RNA 合成を促進し、その関与は新 RNA 鎖の産生よりもむしろ既 RNA 鎖の延長させられると思われる。(結論) ペプチドステロイドの両方ルモンは Receptor の存在からして作用機序を異にするが、ODC は両者の RNA 合成に関与し、その生物作用の発現に重要な役割を担っていると思われる。

2. Nonoxynol-9 の Spermicidal Activity とその臨床応用

小田隆晴・長谷川剛志・川越慎之助
広井正彦 (山形大産婦)

非イオン界面活性剤である Nonoxynol-9 (以下 N-O-9) の spermicidal activity を in vitro で検討し、それを含む vaginal sponge 及び ring につき基礎的臨床的 acceptability につき検討し次の結果を得た。

1) in vitro における種々の濃度の N-O-9 solution と semen の incubation study では N-O-9 濃度 10~20 µg/ml で sperm は non-progressive (Quality=0) となり、40 µg/ml で運動性は完全に消失した (Motility=0)。

2) vaginal sponge (N-O-9 1150mg 含有) よりの 24 時間の放出率は in vitro study では 34.7%, sponge 装着婦人では 36.2% (非性交群), 51.8% (性交群) でい

ずれも spermicidal activity の面から臨床応用可能と思われたが、24時間以降の放出率は僅かであった。

3) vaginal ring (N-O-9 放出率: 6 mg/day) 装着婦人での排卵直前の Huhner test は control 81.4 ± 9.8 % に比し 38.3 ± 18.4 % と sperm の Motility 低下がみられたが、完全な spermicidal effect が認められず、臨床応用に関しては問題点が残った。

3. 雄ヤギの性フェロモン様物質について

佐々田比呂志・正木淳二 (東北大農)

目的: 性フェロモンの役割をはたす臭気性物質が反芻家畜に存在するかどうかを確かめるために、雄ヤギの特異臭を対象とし発現機構、性行動における役割、および化学的性状の検索を行った。

方法: ザーネン種および日本在来種の成熟雄ヤギを用い、特異臭発現について品種、年齢および季節による影響を観察し、発情ヤギに対する特異臭の役割、ホルモン投与による特異臭の発現、特異臭の分泌腺の形態、特異臭成分の機器分析について調べた。

結果: 1. 特異臭発現は季節により変動し繁殖季節に強く、未成熟個体では認められなかった。2. 発情ヤギは特異臭の消失した雄ヤギに興味を示さなかった。3. 特異臭は HCG により強く発現しテストステロンではほとんど現れなかった。4. 特異臭は皮脂腺により分泌され、頸部での皮脂腺がよく発達していた。5. 特異臭成分は脂質として抽出され最終的にケン化される画分に集まりカルボン酸の一種であることが判った。

4. マウスにおける融合割球の発生能について

菅原七郎・○和田康平・大原 彰
正木淳二 (東北大農)

目的: 近年哺乳動物卵子を用いて発生の過程を探ろうとする実験発生学的研究が行なわれている。我々は、マウス胚で割球同士を融合し、in vitro で培養して、これが正常に発生するか否かについて調べた。

方法: C57BL 及び 4 系雑種 (RR・SS・SDS・AD) の雌マウスを用い、4~6 細胞期卵子を採取した。それらは 0.2% プロネースで 10 分間処理することにより透明帯を除去したのち、滅菌針で物理的に接触、融合させ培養した。培養液は BWW 液に BSA (4 mg/ml) を添加したものを用いた。培養は Brinster の方法に従い行なった。培養 48 時間後に胚盤胞への発生の有無とその容量を調べ、一部の胚盤胞は走査型電顕で観察した。

結果: 4~6 細胞期の割球は 1 個だけでは胞状化してしまうが、2 個以上では、形態的に正常と思われる胚盤

胞に発生した。融合割球から発生した胚盤胞の容量は、融合させた数に比例した。

5. 妊娠初期流産患者の内分泌、組織、超音波との関連

高橋秀幸・川越慎之助・広井正彦
(山形大産婦)

切迫流産の診断で入院した症例において自然流産に変わるものと予後良好のものを早期に鑑別することは臨床に非常に重要であり、そのため従来補助診断法として HCG, HPL などの生化学検査が行なわれている。また超音波断層法とともに切迫流産の管理に多大な威力を示している。当科においても切迫流産例に HCG, HPL, 超音波断層法を施行し管理している。今回それらについて検討したので報告する。

尿中 HCG は従来いわれているように、流産例では低値を示す。血中 HPL も同様である。realtime B-Mole による胎児心拍の有無により 9 週以後では予後不良例と良好例を全例鑑別できた。G.S. の最大長径及びその増加率は予後判定に有用である。また、速時性という点で他の方法よりすぐれている。絨毛の変性にともない尿中 HCG は低下傾向がみられるようである。HPL との関係はあきらかではない。

6. 乳汁漏を中心とした不妊症の内分泌動態とその治療成績

斉藤 晃・桃野耕太郎・平野睦男
鈴木雅洲 (東北大産婦)

galactorrhea amenorrhea 54 名につき、臨床的検討と内分泌学的検討を加え、さらに 24 名について CB-154 投与を行い、以下の結果を得た。

① 第 I 度無月経では galactorrhea の高度のものは少なく、第 II 度無月経では逆に galactorrhea の高度のものが多かった。

② 成因別に血中 prolactin の値をみると、Forbes-Albright syndrome と性ホルモン剤以外の薬剤によるものの値が他の原因によるものより異常に高値であった。

③ LH-RH test により下垂体の予備能はよく保たれていることがわかった。

④ CB-154 は血中 prolactin の低下、galactorrhea の軽減、ovulation の開始という順に治療効果があらわれるものと考えられた。

⑤ 血中 prolactin の低下、galactorrhea の消失のみで CB-154 の投与を中止すると、症状は再燃しやすく、

長期の投与が必要であることが示唆された。

7. Hyperprolactinemia を示さない乳汁分泌症候群について

齊藤英和・川越慎之助・広井正彦
(山形大産婦)

今回、私たちは当科に入院した症例で、妊娠、産褥の時期とは無関係の乳汁分泌症状を呈する症例について、ホルモン検査を施行しました。乳汁分泌を示した症例、38例中正常プロラクチン値を示した症例は、18例と47%を示したが、これは Tolis らが、乳汁分泌婦人について調べた値と、ほぼ同値であり、乳汁分泌症と高プロラクチン血症が必ずしも一致しないことを示しています。また正常プロラクチン値を示した症例の各ホルモン値や、各種負荷による反応も、ほぼ正常域にあることが認められた。またこの群においては、Endometriosis を合併した症例が3例あり、第2群(Hyperprolactinemiaのみ)にも Endometriosis を合併した例が2例あり Hirschowitz が唱えているところの galactorrhoea Endometriosis 症候群の存在が認められた。

乳汁分泌症状が、正常プロラクチン血症でも、発症しており、今後、乳汁分泌の原因について、さらに検討が必要と思われる。

(第2群: Hyperprolactinemia(+), Pituitary adenoma(-))

8. 排卵障害に対する HMG-HCG 療法の検討

太田博孝・福島峰子(秋田大産婦)

我々は1972年1月より、1980年9月まで当科不妊外来を受診し、他の薬物療法で妊娠に致らない39例に HMG-HCG 療法を施行し、その治療成績をまとめた。

対象39例の内訳は、無排卵周期症8例、第1度無月経13例、第2度無月経18例である。排卵率は周期数でみると平均70.6%で、第2度無月経では61.9%と低かった。妊娠率は平均19.4%で、第2度無月経では逆に26.9%と良い成績であった。多胎例は12例中3例で、双胎が2例、要胎が1例であった。流産例はなく、早産が1例のみで、他は満期分娩を行った。卵巣過剰刺激症候群は平均5.9%で、第2度無月経では2.4%と発生し難い傾向にあった。腹水と卵巣腫大を伴う例は2例で、うち1例が入院を要した。ヒューナーテストの不良や夫の精子減少症のため、18%に AIH を施行した。

以上諸家の報告とほぼ一致する良好な成績を得た。

9. 不妊の外科的療法

永井 宏・古賀詔子(向仁会永井病院)

近年不妊症の手術適応の拡大がいわれている。従来、手術不可能とされた病変で技術の進歩によって外科的療法が可能となった例の増加と、従来、手術適応外とされていたが、診断法の進歩により手術の必要性が明らかとなった例の増加が、2大原因としてあげられる。そして前者はこの領域におけるマイクロサージェリーの導入に、後者は内視鏡を初めとする診断学の進歩に関連をもとめることができよう。

第一線婦人科の立場においても適応、術式、器具器械などのおおのにおに变化が見られる。

当院における不妊症の現状、特に適応決定へのアプローチについて述べたい。

シンポジウム「不妊診療の最近の進歩」

1. 免疫と不妊症(精子免疫を中心に)

桃野耕太郎(東北大産婦)

最近6カ月間の当科不妊患者中12名(11%)に原因不明不妊患者が存在した。現在これら原因不明とする不妊婦人に生殖免疫異常によると考えられる不妊症が注目されている。特に精子免疫に関しては1889年来研究報告があり、臨床的には1964年に Franklin & Dukes が精子凝集抗体、1968年に磯島が精子不動化抗体について原因不明不妊婦人に特異的な事を報告している。我々も精子不動化抗体を4名に検出し精子凝集抗体よりも特異性があり、Hühner test との相関がある事を知った。又精子凝集試験、メタノール精子固定間接蛍光抗体法より精子抗体の局在性が示唆された。両方法が同じ抗原に対する抗体を検出しているとは云えなかつたが現在精子抗体産生に対する精子抗原の証明が問題とされている。大きく精漿に由来する精子付着抗原と精子細胞抗原の2つが考えられており各々報告がある。

2. 排卵期前後のホルモン動態

古橋信晃(東北大産婦)

排卵期前後を中心とした月経周期の内分泌動態の検討を RIA 法の発達とともに著しく進歩し、かなりの部分が解明されてきたと思われる。今回は、現在までに解明された排卵期を中心とした月経周期の種々の末梢血中ホルモン動態についてまとめた。特に gonadotropin および sex steroids の動態のみでなく prolactin の動態についても報告し、prolactin が steroidogenesis に関与

している可能性を示唆した。さらに最近の知見として、われわれも現在その測定法を鋭意検討中である catechol estrogen と β -endorphin について、それらの月経周期におよぼす影響について紹介した。すなわち、catechol estrogen は estrogen の視床下部への negative feedback 機序に対し、anti-estrogen として作用し、LRF と gonadotropin 放出に関与していること、また β -endorphin が LH 分泌調節に関与している可能性について文献的考察を行い、それらを紹介した。

3. 射精障害の基礎と臨床

木村行雄 (十和田泌尿器科)

射精には seminal emission, ejaculation および精液の膀胱内への逆流を防ぐ mechanism である射精時の内尿道口の閉鎖の3現象より成り立っている。まず射精の生理を犬を使用して生理学的、薬理的に検討した。その結果、射精のうち seminal emission は下腹神経と骨盤神経の支配を受け、ejaculation は陰部神経と下腹神経の支配を受けることが判明した。また射精時の内尿道口の閉鎖は下部腰髄より発し、下腹神経内に含まれる下部の下内臓神経由来の神経線維の支配を受けることが判明した。以上の末梢神経の起源より考えてこれまでいわれて来たように射精の脊髄中枢は上部腰髄にあるとの説は誤りで、下部胸髄より仙髄までわたって存在すると考えるべきであると思われる。

また射精の3現象, seminal emission, ejaculation および内尿道口の閉鎖はすべて α -adrenergic receptor mechanism に支配されていることが判明した。

また射精の上部中枢は視床下部前部にあり、この部の dopamine 系が射精の発現を促進し、serotonin 系が抑制していることが判明した。

これらの成績をもとにして射精障害患者を治療した。まず上位中枢に異常のある射精障害は COMT 阻害剤, L-dopa, 抗セロトニン剤が有効であり、逆行性射精患者には上記の薬剤に抗ヒスタミン剤を加えると有効であることが判明した。また orgasm のない症例には COMT 阻害剤, L-dopa の投与が有効であることが判明した。

4. 家畜の繁殖性と不妊

正木淳二 (東北大農)

家畜は人に比べて早熟で、繁殖に供用し得る期間は一般に短い。年間の分娩回数は牛、馬、羊で1回、豚で2~3回を目標に繁殖計画がたてられている。疾病等によつてこの計画から除外されたものは、治療だけでなく淘汰の対象になる。しかし、人為的要因による不妊また

は繁殖効率の低下も少なくない。例えば授精適期を判定する場合、発情徴候だけでは必ずしも正確でないことが、最近の乳汁中のプロゲステロン値に関する報告でも示されている。また、自然交配と人工授精では適期が異なるとの成績が得られている。これらの問題を含め、家畜の繁殖性と不妊の特徴を紹介する。

特別講演

避妊法の研究動向

広井正彦 (山形大産婦)

第2次大戦後にみる人口の爆発的増加は、生殖のメカニズムと抑制に強い関心をよび、さらに食量需給のアンバランスにより人類の将来に暗い影響をなげかけている。

近年、人口の抑制のための避妊法について WHO (世界保健機構) はじめ多くの団体が真けんにとりこんでいるが、ここでは以下のことについて解説的にのべ、今後の研究の方向性について検討したい。

Oral contraception

Injectable preparations for women

Intra-uterine device

Vaginal and intracervical devices

Periodic abstinence (simple do-it-yourself technique)

Immunological methods (vaccine for fertility regulation)

Female sterilization

Termination of pregnancy

Male methods of fertility regulation

第87回日本不妊学会関西支部集談会

昭和55年11月23日

済交社

1. Zona free ハムスター卵を用いた in vitro 受精実験よりみた乏精子症患者精子の受精能について

高田喜嗣・長谷川昭子・伊熊健一郎

窪田耕三・香山 浩二・磯島 晋三

(兵庫医大産婦)

挙児希望患者のうちでも oligospermia の患者の妊娠成功率は、きわめて低い。従来の AIH では、新鮮精液の子宮腔内注入が行なわれていたが、精漿は、decapacitation factor を含むために、我々は精子濃度 $20 \times 10^6/\text{ml}$

以下の症例に対して BWW medium を使って洗浄濃縮を行ない、処理後の活動精子の腔内注入を試みた。洗浄濃縮の操作により、精子濃度は、もとの2倍から5倍、運動率も悪かつたものでも約2倍の改善をみた。しかし、現在までまったく妊娠には、いたっていない。そのため我々は、oligopermia を有する男性不妊患者においては、精子濃度とか精子運動率に関係なく、精子の受精能そのものに障害があるのではないかと想定し、in vitro における zone free hamster 卵との受精実験を行なった。その結果 oligospermia の患者は、単に精子数、精子運動率が低いばかりでなく、受精能そのものにも何らかの障害があるのではないかという事を示唆した。

2. ウサギ精巣上体精子による卵子の体外受精

細井美彦・丹羽皓二・入谷 明
(京大農畜産)

最近 Brackett らは、家兔射出精子および精巣上体精子を高張液で処理することにより、Capacitation を誘起し、卵子の体外受精に成功した。本実験では彼等の方法を改良し、精巣上体精子による体外受精を試みた。高張液処理ならびに等張液処理(それぞれ15分間)をした精子を約10時間前培養後に受精に用いた結果、精子の侵入は1時間後に始まり、精子頭部の前核への変形は2時間後から観察された。このように受精の遅延は全く見られなかつたので、本実験条件下では、精子は前培養中完全に Capacitate されたものと推察される。また、高張液処理精子と等張液処理精子との間には、受精率に差は見られなかつた。雄の個体によつては、運動精子率が、前培養後に極端に低下(5%以下)したが、このような精子による侵入率は非常に低かつた。

3. 改良法によるラット卵子の体外受精

西村 浩・丹羽皓二・三宅正史
入谷 明(京大農畜産)

修正 KRB 液を用いてラット精巣上体精子の前培養(5時間)と受精時の精子濃度を次の方法で調整した。(I) 原精子液を1回希釈して、最適と考えられる $17\sim 65\times 10^4$ 精子/mlの濃度で前培養後、卵子に受精した。(II) 上記の濃度で前培養後、再び1回希釈して、受精時濃度を $0.8\sim 4.0\times 10^4$ /mlとした、(III) (II)の受精時濃度を前培養開始前に合計2回の希釈により調整後、前培養と受精を行った。その結果、(I)では受精率(90%)は高かつたが、polyspermy の割合(38%)も高かつた。(II)では受精率(67%)は低下したが、poly-

spermy の割合(5%)は著しく減少した。一方(III)では精子侵入率は極端に低下した。ラット精巣上体精子の受精能得誘起には、前培養濃度が大きな要因になっていると考えられる。

4. ラット卵細胞成熟分裂におよぼす抗プロゲステロン抗血清の抑制効果

森本紀彦・森 崇英・甲田平吾
鈴木 瞭・西村敏雄(京大産婦)

家兔抗 progesterone 抗血清(anti-P)を用いて、内因性Pの生物活性を中和することにより、Pの卵細胞成熟分裂再開調節機構への関与を検討した。生後22日齢のWistar 系幼若雌ラットに、PMS と hCG の順次投与による誘発排卵処置を施し、anti-P 投与による中和実験および外因性P補充による回復実験を行った。卵胞をその最大直径から大(250μ 以上)、中($125\sim 250\mu$)、小(125μ 以下)の3群に分類、germinal vesicle breakdown を形態的指標として、成熟分裂を再開した卵細胞数を算定し、全卵細胞に対する百分率(再開率)を検討した。抗血清投与により大卵胞群で著しい再開率の減少が認められ、回復試験ではその部分的な回復が認められた。外因性Pのestrogen作用を消去する目的で、抗estrogen 抗血清を同時に投与したところ、再開率はさらに回復した。以上の結果から、Pは大卵胞内卵細胞の成熟分裂再開に、排卵刺激のmediatorとして促進因子の1つとして関与していることが示された。

5. Androgen Producing Tumor (arrhenoblastoma) の一例

—特にその内分泌機能について—

藤原卓夫・柴田和男・赤堀泰一郎
片山和明・武居勝信・森川 肇
東条伸平(神大産婦)

症例は16歳の女性で、13歳時で初潮があつたものの15歳頃より男性化徴候が出現してきた。術前の内分泌検査ではテストステロンや17-KSの中でも11-deoxy-17-KSが異常高値を示していた。開腹により鶏卵大の一部cysticな腫瘍を確認した。組織学的にはLegdy cellとSertoli cellの両者より成るArrhenoblastomaと診断された。この腫瘍摘出により上記のAndrogenは速やかに減少した。術前の視床下部一下垂体—卵巣系の機能検査では、LH-RHに対するLH、FSHの反応性は正常で、Premarin testにおいてもLHの著明なSurgeが認められ、少なくとも視床下部一下垂体の機能障害は認められなかつた。又、Gonadotropin 負荷により一過

性の estrogen の上昇が認められ、この腫瘍の estrogen 産生能の可能性が示唆された。

6. 卵管妊娠に対する保存的手術後の通過性の検討

香山永樹・藤本 昭・杉本 修
(大阪医大産婦)

子宮外妊娠の大部分を占める卵管妊娠に対して従来卵管摘除術が主な手術法として行なわれてきました。しかし一般に外妊患者の多くは、不妊症と関係が深く、児の保有数が少ない傾向にあります。特に反対側卵管に閉塞など通過障害がある場合、卵管摘除術では、以後永久不妊になり、挙児希望の患者に与える影響は、計りしれぬものがあります。我々は、昭和51年以降行なつた16例の保存手術につきその成績をまとめた結果、術後 HSG 施行し得た12例中10例 (83.3%) に術側卵管通過性を認めた。妊娠例は追跡調査可能であつた13例中5例に子宮内妊娠を認めた。これら5例は、いずれも術側卵管による妊娠と断定できるものではないが、今後手術側のみ通過性を認める症例の経過を追跡する予定である。術後妊娠について保存手術に特にすぐれた結果は文献的にも認められないが、外妊の早期発見、早期治療に努めれば、さらにより成績が得られるものと考えます。

第83回日本不妊学会関東地方部会

昭和55年11月28日
三田会館

1. 副腎性器症候群の1例

○川原昌巳・牧 昭夫・柳下次雄
松島正治・白井将文・安藤 弘
(東邦大泌尿)

最近経験した副腎性器症候群の1例を報告した。患者：20歳♀、主訴：外性器異常、既往歴、家族歴に特記すべきことはない。現病歴：小学2年生の頃より、外性器異常と多毛に気付くも放置す。その後、月経の発来もなく、本人も半陰陽を疑い、昭和55年5月1日当科外来受診す。入院時現症：身長145.1cm 乳房の発達不良、腋毛(+)、陰毛男性型、外陰部陰核著しい肥大あり、外尿道口は腔内に開口、精神状態安定。入院後諸検査成績：血液所見に異常なし、血液電解質正常、尿糖(-)、染色体構成46XX、血中テストステロン2.64ng/ml、DHA 23.8ng/ml、DHA-sulfate 2,061ng/ml 尿中17KS 49.4mg/ml、尿中17-OHCS 5.0mg/day、尿中プレグナントリオール25.67mg/day 以上により21-Hydroxylase 欠損に

よる副腎性器症候群と診断す。治療は、陰核・腔形成術を施行し、更にステロイド療法を行なつており、治療開始2カ月後より、月経の発来をみている。

2. 月経黄体及び妊娠初期黄体における C_{21} ステロイドの生成

北村幸太郎・増田隆昭・村井一郎
田 根 培・高木繁夫 (日大産婦)

ヒト黄体期一妊娠初期における 卵巣及び子宮静脈血 (Ov-V 及び Ut-V) の pregnenolone (Δ^5p), progesterone (Δ^4p), $17\alpha\text{OH-}\Delta^4p$ と hCG, hCG- α 、 β を同時測定すると共に、核出黄体を用いる in vitro 実験を合せ行つた上、各々の Δ^4p 生成態様を比較検討した。即ち、Ov-V における Δ^5p 及び Δ^4p 濃度は妊娠第10週で急増し16週では Ut-V のそれが凌駕し、 $17\alpha\text{OH-}\Delta^4p$ 濃度は8週で急増し以後は急減した。一方、hCG, hCG- β 濃度は8週でピークとなりその後急減し、hCG- α は10週から増加した。また妊娠初期黄体の $3\beta\text{-HSD}$ の基質親和性及び $\Delta^5p \rightarrow \Delta^4p$ 転換能は月経黄体、同期絨毛に比べて高く、然も内因性 steroid による阻害効果は少く、更に CSCC 活性も比較的高い。従つて妊娠初期黄体における Δ^4p 生成能は妊娠第10週でもつとも活発であり、それに特異的に増量する hCG が関与しているものと考えられる。

3. 卵管収縮に関する基礎的研究

落合和彦・徳留省悟・楠原浩二
安田 允・蜂屋祥一

(慈医大産婦)

複雑多岐にわたる卵管機能は、諸家の努力により解明されつつあるが、未だ生殖生理学上残された問題は多い。今回、我々は高感度 strainauge を用い、卵管の自動運動を、部位別、性周期別に検討した。

手術的に摘出したヒト卵管を、Lock 液中にて卵管間膜を除去し、長軸方向に沿い縦走筋束 (8mm×1mm) を、采部、膨大部、峡部の3カ所にわたり採取した。標本を Lock 液槽 (容量1ml) 中で、片側を固定、片側を高感度 strainauge に接続し、等尺性の反応を観察した。

卵管自動運動の周期は、采部と膨大部では増殖後期に最も延長し、分泌期に入り次第に短縮するが、峡部では増殖期の変化は少く、分泌期に入り延長した。

以上の様に、卵管は摘出された後でも、自律的に運動をくり返しているが、これは卵の摂取、卵の輸送といった卵管機能に基いた運動である事が示唆された。

4. ネコの過排卵誘起に関する研究

山田 均・高橋 敬一・田中宗福
宮下泰人・矢部 勝弘・金山喜一
杉村栄治*・佐久間勇次
(日大家畜生理・*家畜内科)

目的：ネコはペットあるいは実験動物として多くの研究領域に用いられている。ネコの生殖生理学的基礎研究として、ネコの過排卵誘起と交尾排卵について検討した。方法：供試ネコは東京都西部動物管理所から入手した2~5歳、2.0~3.5kgの临床上健康と認められた雌60頭で入手前の繁殖経歴は不明。過排卵誘起は陰垢像の発情休止期を選びGTHを投与した。I区：PMSG 5日皮下注、翌日交配とHCG静注。II区：PMSG 5日皮下注、最終投与日にE₂筋注、翌日交配とHCG静注。HCG投与後48時間に開腹し卵巣を観察し、排卵点、卵胞(1.0~1.5, 1.5~2.0, 2.0~3.0, 3.0mm以上)血様濾胞を記録し、卵子の回収は摘出した卵管を子宮に近い部位から卵管采に向かつて灌流し実体顕微鏡下で卵子数と分割程度を観察した。結果：I区は13例で5~37個の排卵が認められた。II区は17例で5~52個の排卵が認められた。交尾を拒否したものが多く未受精卵子が多かった。仔ネコの過排卵誘起：PMSG 500IU HCG 500IUを投与した6例中、1.0kg以上の2例が反応し、その1例が排卵した。交尾排卵：8例の交尾を確認した自然発情のネコを開腹し2例に排卵が認められたが、6例は成熟卵胞があつても排卵しなかつた。HCG排卵：発情期のネコにHCG 300~500IUを投与し、400IU以上の8例中、5例が排卵した。交尾とHCG併用：6例の交尾を確認した自然発情のネコにHCG 500IUを投与し5例に排卵が認められた。

5. マウス卵子の卵割と胞胚形成に及ぼす isoxazole の影響

新村末雄・石田一夫(新大畜産)

卵子におけるステロイド合成の生理的役割を調べるために、2細胞期と8細胞期のマウス卵子を isoxazole に浸漬して 4^β-3β-HSD 活性を阻止した後体外培養を行い、卵割や胞胚形成が起こるか否かを観察した。

1) 卵子の 4^β-3β-HSD 活性は2細胞卵子、8細胞卵子共に isoxazole 6%を含む培養液に5分間か、4%を含む液で4時間の浸漬で阻止された。2) isoxazole によつて卵子の 4^β-3β-HSD, 17β-HSD, 20α-HSD 及び20β-HSD の活性は阻止されたが、NADH₂-DH 及び NADPH₂-DH の活性は阻止されないことが組織化学的に

証明された。3) 無処理の2細胞卵子を52時間、8細胞卵子を33時間培養すると、それぞれ79.5%、86.5%が胞胚にまで発生したが、isoxazole に浸漬した卵子は全く発生しなかつた。このことから、卵子においてステロイド合成を阻止すると卵割や胞胚形成が起こらないことが明らかとなつた。

6. 家兎卵胞卵子の体外受精及び培養

佐藤嘉兵(日大農)

家畜の生産、人妊症の治療手段として体外受精及びその受精卵子の移植が応用され始めた。卵胞卵子の利用価値が注目されているが現時点では、その受精及び培養等に関する検討が少ない。本実験では家兎卵胞卵子の体外受精及び培養について予備的に検討した。PMS 100IU を皮下注射し72時間後に動物(NZW種雌)を供試した。無菌条件下で直径1mm以上の卵胞から卵子を採取した。採卵時に第1極体が見られた卵子は112個中67個であつた。卵子を培養液(20%仔牛血清加TC-199)で2時間培養した後、これと同じ培養液で1時間培養した精巢上体尾部精子(2×10⁶)を加え受精させ、以後卵子の培養を継続した。その結果、62個中44個に受精が見られた。そのうち10個が2細胞、8個が4細胞、4個が8細胞、5個が桑実胚一初期胞胚期まで発達した。採取時に第1極体が見られなかつた卵子20個のうち12個が受精し、そのうち8個が4~8細胞期まで発達した。

7. ヒト精子培養の2~3の知見

松橋 求・藤尾幸司・三浦一陽
中山孝一・白井将文・安藤 弘
*岡田詔子・*加藤守男
(東邦大泌尿、*同第二解剖)

実験目的：男子不妊症患者の精液を検査する時、どのような精子が妊孕能と関連性を有するかを予知することは大切である。その一つの方法として精子を短時間培養して、その性状を各方面から検討しようとして試みた。

方法：妊孕能を有する正常男子群と男子不妊症患者群から得られた精液より洗浄精子を作り、これをTMPA medium+3.5% HSA, 4cc 内に浮遊させ37°C room air conditioning 下に培養した。培養精子の変化を見るために洗浄前、洗浄後、培養後1, 2, 3, 4, 5時間と経時的に一定の深さより精子混入液を採取し Sperm motile efficiency index (SMEI) を計測し、その差を比較した。

結果：正常男子群で SMEI は培養後4時間目で有意差をもつて培養前より上昇していた。しかし男子不妊症

患者群では培養しても SMEI の上昇する症例と、上昇を見ない症例があり、その値は様々で一定の傾向はみられなかった。

以上より精子培養前後の SMEI を計測することにより、男子不妊症患者が、妊孕可能であるかどうかの、ある程度の指標となりうるものと考えた。

8. 乏・無精子症における間脳・下垂体・性腺機能に関する研究—殊に血中プロラクチン動態について

柳沢洋二・津端捷夫・坂田壽衛
小笠原仁・深沢雅典・吉田孝雄
高木繁夫(日大産婦)

女性において高プロラクチン血症をきたしている、排卵抑制がおこり、これに CB-154 を投与すると排卵がおこる、ということから、男性においても性腺に関与することがあるかどうかを検討した。

すなわち

- ・乏精子症では一点採血では一般に血中 prolactin (PRL) は正常値限界 (2~30ng/ml) の上界を示すものが多く、このようなものでは血中 Testosterone (T) が正常限界 (4~8 ng/ml) の下限またはそれ以下の低値を示すものが多かった。
 - ・無精子症のうちでも睾丸の高度組織障害を示すものでは TRH 負荷テスト (500 μ g) による血中 PRL の反応が大きく正常妊孕夫および乏精子症症例との間に有意の差をみた。また、このような症例に L-DOPA を投与することにより、その反応が抑制された。またこのような症例では、LHRH テスト (100 μ g) による血中 LH または FSH の反応が小さく且つ遅延傾向がある。
 - ・また、乏精子症例中に一点採血で T が低く且つ Estradiol (E₂) が高いものがあるが、このようなものでは TRH 負荷テストによる血中 PRL の反応が大きくなかった。
- 以上のことから、高度の睾丸組織障害例では性腺のみならず上位中枢においても何らかの機能障害があることを推察した。

9. 男子不妊症に対するプロスタグランディン生合成阻害剤の効果

皆川秀夫・布施秀樹・宮内大成
伊藤晴夫・島崎 淳
(千葉大泌尿)

男子不妊症患者25例に対し、プロスタグランディン生合成阻害剤を3カ月又はそれ以上の期間投与を試みた。

精液所見の判定は齊藤らの方法によつた。その結果、精子数では、25例中、6例で有効と認め、悪化は2例であつた。精子運動率では25例中、8例で有効、1例で悪化をみた。プロスタグランディンと造精機能につき若干の考察を加えた。

10. 男子不妊症に対するツムラ八味地黄丸 (TJ-7) の効果

吉田英機・田代博紹・渡辺政信
内藤善文・今村一男
(昭和大泌尿)

26例の男子不妊症患者に対しツムラ八味地黄丸 (TJ-7) 1日5g の内服療法を12週間施行しその精液所見に対する効果について検討した。無精子症の5例では全例無効であつたが、精子無力症の4例中3例では精子運動率の著明な改善が得られ、うち1例は妊娠に成功した。精子濃度30 \times 10⁶/ml 以下の乏精子症17例中13例で精子濃度の著明な改善が認められ、うち1例が妊娠に成功した。この結果、無精子症を除いた21例中16例 (76.2%) が臨床的有效と判定され副作用は全く認められなかったことから、男子不妊症に対する非ホルモン剤として本剤は有用と思われる。

11. クロミフェンによる男子不妊症の治療成績

小寺重行・町田豊平・池本 庸
稲葉善雄・谷野 誠
(慈医大泌尿)

1979年から現在まで2年間に慈恵医大泌尿器科を訪れた男子不妊主訴患者は169例であつた。平均年齢は32.6歳、結婚より来院までの期間は1年未満が16例 (9.5%) 3年目に来院したものは34例 (20.1%) であつた。精液検査の結果は無精子症23例 (13.6%)、乏精子症60例 (35.5%)。精子数60 \times 10⁶/ml 以上を正常精子数とすることは86例 (50.9%) であつた。精子運動率では0の症例は7例、運動率30%以下の症例は34例でこれらの男子不妊と診断した63症例に対してクロミフェン5mg 投与を行つた。クロミフェン50mg を粉碎し、乳糖を加え0.5g 中にクロミフェン5mg が含まれるように調剤した。内服時間は起床直後とし、連日継続投与で14週間内服とした。治療成績は無精子症に対しては無効、乏精子症35例中17例が有効で、4例が妊娠可能となつた。また運動率の改善がみられた8症例を加え有効率は63例中25例 (39.7%) であつた。クロミフェンの少量、長期投与の治療成績の有効性について述べた。

特別講演：頸管粘液性状、とくに Crystallization 及び Sperm migration と受胎

高嶺 浩 (農工大獣医)

子宮頸管粘液における結晶形成現象は、長坂 (ウシ 1941), Papanicolaou (ヒト 1946) の報告を初めとし、1950年頃から臨床面で広く応用されている。いつぼう、精子受容性に関しては、Sims (1874), Huhnes (1924) による post coital test, Miller & Kurzrok (1932) の in vitro test 以来多くの検査法が考案されており、両現象の発現度合と受胎との関連についても古くから注目されている。

演者は、1950年以來、家畜とくにウシにおける両現象の発現状況、粘液組成と両現象の発現関係、受胎との関連などについて報告を重ねてきた。

今回は、ヒトにおける研究との比較を含めて、研究の概要について報告する。

第25回日本不妊学会九州支部総会

昭和55年11月30日

宮崎看護専門学校

1. 45, XO/46, XX/47, XXX の原発無月経例

山口昌俊・小池弘幸・宮川勇生
森 憲正 (宮崎医大産婦)

原発無月経はひとつの症候群であり、種々の原因が知られているが、染色体異常および、それに基づく gonadal dysgenesis もそのひとつである。

一方、染色体異常の中でも triple X female (47, XXX) は臨床症状を何ら示さないことが多く、妊娠の報告も見られる。

1961年 Jacobs らが原発無月経を呈した45, XO/47, XXX の1例を、同年に Hayward らがターナー症候群様症状を呈した45, XO/46, XX/47, XXX の1例を報告したが、これらはみな45, XO dominant であった。一般に臨床症状は45, XO/46, XX/47, XXX の割合により修飾されると言われている。

今回我々は、原発無月経を主訴として来院し、染色体分析の結果47, XX dominant の45, XO/46, XX/47, XXX のモザイク型を呈した22歳の未婚女性の症例を経験し、この症例について種々の内分泌学的検査をおこなったので報告した。

2. 同胞に発症した Testicular Feminization Syndrome (TFM) の2例に関する内分泌学的検討

吉田耕治・宇津宮隆史・山口省之
森山英俊 (九大産婦)

症例は24歳と22歳の同胞でいずれも外見上乳房の発育も良好な女性であるが原発性無月経で陰毛腋毛を欠き、陰核肥大なく小さな腔を有しているが核型は46, XY の男性型であった。内分泌学的には末梢 Testosterone (T) 値は11.48, 6.3ng/ml と正常の男性値を示し Estrone (E₁), Estradiol (E₂) はそれぞれ E₁: 85.6, 104.0, E₂: 43.2, 71.3pg/ml と正常男性のそれを上まわった。開腹した年長例の精巣静脈血中の T, 5 α -dihydrotestosterone (DHT) とともに末梢より高く、精巣よりの T 産生と 5 α -reductase 活性は高いことが明らかであった。末梢血中の Pregnenolone, 17 α -OH-Pregnenolone, DHEA が比較的高値で P, 17 α -OH-Progesterone, Androstendione が比較的には低いことから TFM の精巣中でも正常精巣と同じく 4 β よりも 4 β -pathway の方が優勢であることが示唆された。精巣の Sertoli-Leydig cells の混合培養で in vitro に、T, DHT 産生は多くしかも hCG 刺激で T 産生は増加しなかつた。大唇陰の skin fibroblast の DHT binding affinity は低く、本例は androgen receptor 異常による TFM と判定された。Sertoli-Leydig cells とともに電顕的に正常精巣と形態学的な差はなかつた。

3. 性早熟症の一例

角沖久夫・堂地 勉・中村正彦
楠田雅彦 (九大産婦)

今回、我々は高身長、クモ手、水晶体偏位等一見 Marfan 症候群を思わせる特発性性早熟症を経験したが、正確な身体計測・尿中代謝産物の測定により Marfan 症候群は否定され、また性早熟を来たす視床下部・松果体領域・副腎・卵巣等の形態的検索で腫瘍は否定された。機能的に見ても、Baseline Hormone 値で Gonadotropin 値は高く、LH-RH test にて LH の過剰分泌反応、E. B. test で良好な LH 放出反応を認め、中枢性本態性性早熟の診断を確認した。又、今日我々は Danazol を本症例に使用し、FSH, LH, E₂ の低下を見、臨床的にも身長伸びの鈍化・月経停止等の改善を見ており、1971年 Gleenblatl らの使用以來、1975年 Lee らも FSH, LH, E₂ の抑制を示しており、同様の結果が得られた。又、Danazol 使用量に関しては、彼らの報告では150~300mg/m²/day と多く、本症例では100mg/day で充分

効果が得られております。本邦での性早熟における Danazol 使用例の報告は少ないがこれからの検討が望まれる。

4. 妊娠中尿崩症を再発した下垂体腺腫術後妊娠の1例

山口省之・宇津宮隆史・門田 徹
(九大温研産婦)

患者は32歳の1回経産婦。分娩後の乳汁漏出持続、排卵障害、不妊を訴え当科を受診。無月経1度、高プロラクチン血症 (PRL=117ng/ml) を証明した。トルコ鞍の精査にて下垂体腫瘍を疑い、九大脳外科にて microadenoma の摘出を transsphenoidal approach にて受けた。手術直後一時的に1日尿量5~6l となつたが、手術後2カ月目には正常化していた。術後 PRL は8.7ng/ml と下降し、自然排卵の後、術後3カ月に妊娠した。妊娠8カ月頃より口渴が出現し、多尿となり、妊娠39週で精査のため入院した時は、1日尿量11l であつた。水制限試験、高張食塩水試験、バズブレッション試験等より尿崩症と診断した。自然陣痛が発来し、予定日に正常男児を経産分娩した。尿量は分娩を境に著減し産褥6日には3l 余となり、同時に口渴も消失した。また妊娠中産褥期の授乳前後の PRL は一貫して20ng/ml 以下の低値であつたが、産褥4日に泌乳開始、6日には220ml の乳汁分泌を認めた。

5. 下垂体腫瘍合併不妊婦人の妊娠・分娩例の2例 —非観血的薬物療法による排卵誘発妊娠—

松浦講平・水元淳一・前山昌男
(熊本大産婦)

下垂体 PRL 産生腫瘍による無排卵婦人に CB-154 を投与し妊娠、分娩せしめた2例を報告。症例1は25歳の無排卵周期症、症例2は12年間の続発無月経の36歳、共に未経妊婦人で乳汁漏を示した。血中 PRL 値は各々230ng/ml と185ng/ml で TRH に対する反応は症例1が抑制反応、症例2は鈍化していた。トルコ鞍断面所見は症例1が、鞍底前下壁の非薄化、症例2は鞍底部から右後床突起の破壊がみられたが、共に視野障害 (Goldmann) はみられなかつた。CB-154、10mg/日と7.5mg/日の投与で4周期目と2周期目に妊娠が成立した。症例2は10週で自然流産したが、再び同量の CB-154 で妊娠した。妊娠初期、共に軽い頭痛を訴えたが増強せず中期まで視野は正常であつたが、症例1は32週突然両耳側半盲を来したが、一過性であつた。症例2は28週頃より I₁ イソプターの狭窄がみられたが進行は緩徐であつた。共

に満期で帝切を行い3490g と3050g の共に健康女児を得た。産褥症例2のみ I₁ イソプターの狭窄が持続した。

6. 下垂体腫瘍摘除による続発性無月経患者の妊娠分娩例

橋本晏理・佐久本薫・水元淳一
中山道男・前山昌男
(熊本大産婦)

妊娠可能婦人における Pituitary adenoma の重要な問題は、腫瘍に対する治療が低ゴナドトロピン性第2度無月経、ひいては不妊症を招くことである。

今回我々は Pituitary chromophobe adenoma の亜全摘後、続発性無月経となり挙児希望により HMG-HCG 療法を行い、妊娠分娩し得た症例を経験したので報告する。

症例は33歳、主訴は挙児希望で、昭和44年頃より月経不順となり、昭和48年8月頃より無月経となつた。昭和49年11月頃より頭痛、嘔吐、視野障害出現し、12月、腫瘍摘除術を受け、術後リニアック5000rad 照射した。また術後性腺機能障害として続発性無月経が持続した。昭和50年より Kaufmann 療法を行い、昭和52年8月より HMG-HCG 療法による排卵誘発を行った。第4回目のコースで妊娠が成立し、順調に経過、昭和55年1月妊娠40週2日にて2710g の女児を生産した。本症例は chromophobe adenoma で cystic、かつ血中 Prolactin が高値を、また Galactorrhea をみたことから、Forbes albright syndrome であつた可能性が強い。

7. ³H-Estradiol を用いた Testosterone-Estradiol binding globulin (TeBG) 結合能について

宇津宮隆史 (九大温研産婦)
片桐 英彦 (福岡赤十字病院産婦)

TeBG 結合能の測定法については、硫酸塩析法、Concanavalin-A 法、Dextran-Charcoal 法の3つの方法を比較して報告した。今回は主として卵巣機能障害例について血中 Estradiol (E₂) 値、血中 Testosterone 値と TeBG 結合能の関係を Dextran-Charcoal 法を用いて検討した。その結果、結合率は男子51.33±3.55% (mean±S.D.)、女子65.98±6.93%、E₂ 値30pg/ml 以下は60.55±6.53%、30pg/ml 以上は60.38±6.90%、PCO は60.92±8.05%、妊婦は90.15±3.73%で、また E₂ 値が11pg/ml から87pg/ml の間では結合率と E₂ 値の間に相関は認められなかつた。T値と結合率の間ではT値が高い例ほど結合率は低い傾向があつた。また HMG 療法中の結合率は、前値に比較し、E₂ 値が200

pg/ml くらいに増加すると結合率は下降し、その後横ばい状態が続く、 E_2 値が1000pg/ml 以上に増加すると結合率は再び上昇した。

8. Gonadotropin 療法による卵巣腫大例の分析

渡辺比奈子・熊本有宏・穴井恵子
白川 光一 (福岡大産婦)

排卵誘発療法に際し手挙大以上に卵巣腫大をきたした10例について、その臨床像を分析した。治療前の病態は8例が続発性第1度無月経で他の2例は無排卵周期症および高 PRL 血症を伴う第2度無月経であった。LH-RH test は全て反応良好で LH の前値も正常またはやや高値であり、clomiphene test は全て無効で、ほとんどが PCO と診断できるものであった (内3例は開腹し確認)。排卵誘発の方法はほとんどが HMG-HCG 療法に clomiphene や prednisolone を併用したものであり HMG の総使用量は最高で1500IU であった。卵巣腫大が10例中8例で HCG 使用後に生じ、また8例は排卵に成功し4例が妊娠に移行した。卵巣腫大は両側性であったが左右差が大きく多房性で壁の薄い囊腫様であった。発症時の検査所見で著変は認めなかったが estrogen 値は極めて高く、血中 estrogen の分画では estrone, estradiol が高く estriol は正常であった。外科的治療を要したものはなく全て安静のみで回復した。

9. 乳漏症、高プロラクチン血症の診断と治療

堂地 勉・片桐純子・角沖久夫
永田行博・楠田雅彦 (九大産婦)

最近乳漏症や高プロラクチン (PRL) 血症の診断、治療法が飛躍的に進歩した。従来乳漏症は直接生命に関係のないものとして、我々産婦人科医も軽視した感がある。

我々の不妊内分泌外来においても排卵障害患者のうち15%に乳漏症、高 PRL 血症患者を認めているが、最近の症例に治療前後の状態について分析した。下垂体腫瘍群は非腫瘍群に比較して PRL レベルが明らかに高く大部分が150ng/ml 以上であった。macroadenoma は一般に micro より PRL 値が高値だったが区別できないものもあつた。非腫瘍群は負荷テストによく反応したが、腫瘍群では TRH, E.B ステットに反応しなかつた。microadenoma は現在のところ CB-154によく反応するし、特に症状のないものが多い為妊娠中嚴重に経過し観察することを条件に、手術よりも薬物療法で治療を行つてもよいと思われる。

10. 高 PRL 血症をともなう無排卵症の1例—特に PRL の size heterogeneity の変化について

森 広康・今道節夫・今村定臣
河野前宣・石丸忠之・山辺 徹
(長崎大産婦)

プロラクチン (PRL) 産生下垂体腫瘍 (プロラクチノーマ) の報告は数多く見られ、その際の内分泌学的な病態生理についても、かなり詳細な検索がなされている。最近、血中 PRL 値が9,200ng/ml と異常高値を示した prolactinoma (chromophobe adenoma) の1例を経験した。無月経、乳汁漏出、視力低下、視野狭窄を主訴として来院した19歳の女子学生で、CT スキャン、polytomography より下垂体腫瘍の診断にて、脳外科にて腫瘍摘出術を行つた。術前の PRL 値は9,200ng/ml、LH RH テスト及び TRH テストには無反応であった。術後、Liniac total 4000rad の放射線治療を行なうも以後 PRL の減少なき為、CB-154の投与を開始した。開始後約2カ月にて50ng/ml まで減少したが、月経の発来はまだ見ていない。PRL の size heterogeneity については、術前の big-PRL が38.3%と高値を示した。手術により60%の減少を示した。CB-154投与によつて little-PRL の減少が著名であつた。この点に関しては、更に検討してゆく予定である。

11. 婚前無月経に対する長期療法と婚後の経過

池田友信・今村昭一・森田明夫
(鹿児大産婦)

昭和47~53年の7年間に当科思春期・内分泌クリニックで3年以上治療を行い、なお治療中に結婚した女性のうち、婚後2年間の経過が明らかなもの14例について、婚前の治療および婚後の経過を報告する。初診時年齢は18~20歳が11例、21~24歳が3例で、原発無月経は前群5、後群1例、続発無月経は前群7および後群1例であつた。婚前の治療は2次性微発現と子宮発育の程度によつて、偽妊娠療法をはじめ、Kaufmann や Holmstrom 方式によるホルモン療法を長期に亘つて行い、また排卵誘発は clomiphene や cyclofenil 投与のみにとどめた。結婚時には全例に排卵の自発は認められなかつたので結婚後は gonadotropin 療法なども加え、排卵誘発を行う例が多かつた。結婚後~3カ月で6例、4~6カ月で3例、7~12カ月で1例、計10例 (71.4%) が妊娠した。これは、無月経を伴つた不妊患者の治療成績に比べはるかに良好であることからみて、婚前の無月経の治療はきわめて重要だと思ふ。

12. 連続周期における黄体機能の検討

河野前宜・石丸忠之・今村定臣
岡本純英・森 広康・今道節夫
森崎正幸・山辺 徹
(長崎大産婦)

〔目的〕現在の黄体機能不全症の診断は、主として retrospective になされ、治療が行われているが、連続した各周期における黄体機能の変動を検討してみた。〔方法〕BBT が 2 相性を示す婦人 29 例を対象とし、3 周期以上無治療で BBT を記録させ、各周期における高温相日数、BBT パターン、High Phase Score (HPS)、Planimetric Luteal Index (PLI) を検討し、うち 15 例では連続 2 周期における高温相 7～8 日目に子宮内膜日付診と血中 gonadotropin および steroids の測定を行った。〔成績〕高温相日数 9 日以内、BBT パターン I 型以外および A 型以外、HPS 7 点以下、PLI 50 以下を異常としますと、一周期でも異常値を示したもの各々、4 例、15 例、24 例、19 例、3 例でした。次に hormone 値と日付診で、Prolactin 30ng/ml より大、estradiol (E₂) 値 100pg/ml 未満、progesterone (P) 値 7 ng/ml 未満、日付診のズレ ± 2 日より大を異常としますと、いづれかの周期で異常値を示したもの各々、6 例、4 例、5 例、9 例でした。

13. 黄体機能不全 (不妊) に対する高単位 HCG 療法
の再検討

森田明夫・今村昭一・池田友信
(鹿児島大産婦)

われわれは、昭和 47 年に本症の診断 (Jayle 変法) と高単位 HCG 療法の成績を報告したが、本剤の投与方法は今日なお報告者によつてまちまちである。そこで、過去 10 年間に行つた教室の成績を再検討してみた。器質的原因をはじめ、他に明らかな不妊因子が認められない 3 年以上の不妊期間を経験した本症患者 (118 例) に、排卵徴候 (+) 日に、〔I〕HCG 10,000 単位、以後月経の初日あるいは高温相 26 日まで 3,000 単位を (a) 連日、あるいは (b) 隔日に投与、〔II〕HCG 5,000 単位投与後同様に、3,000 単位を (a) 連日、あるいは (b) 隔日に投与した。これらを〔III〕gestagen 療法など他の方法を行つた症例 (212 例) を対照として比較した。その結果、〔I〕—(a) および〔I〕—(b) 法では、成績に差が殆んどなく、64%前後のものが、また〔II〕—(a) では 40%、〔II〕—(b) では 27.3%のものが妊娠した。〔III〕の妊娠率は 11.8%であつた。また、妊娠しなかつ

た周期では、全例で本剤投与第 26 日以前に月経が発来している。

14. DANAZOL の子宮内膜症への効果

永田行博・中村元一・堂地 勉
津田知輝・尾上敏一・楠田雅彦
(九大産婦)

ダナゾールは子宮内膜症の効果的なホルモン療法剤として欧米ではすでに使用されている。

我々も 2 年以上にわたつてダナゾールを使用しているが、その効果について報告する。ダナゾールは 300mg 又は 400mg/日を連続して約 6 カ月間使用した。その結果、ダナゾール単独療法では妊娠率 25%、再発率 37.5%、手術との併用療法では妊娠率 20.8%、再発率 25%であり、総合では妊娠率 21.9% (訂正妊娠率 43.8%) 再発率 28.1%であつた。この結果は偽妊娠療法の妊娠率 26.8% (訂正妊娠率 36.7%) 再発率 31.7%と比較して遜色のないものであり、副作用や使い易さの点ではダナゾールがすぐれていると言える。しかしダナゾールは子宮内膜症に対する特効薬的なものではなく、あくまでも症例を選んで使用すべきである。

15. 不妊患者の無治療周期妊娠例の検討

大久保信之・堂地 勉・津田知輝
中村 正彦・永田行博・楠田雅彦
(九大産婦)

我々は、当科外来約 10 年間のいわゆる無治療周期妊娠 142 例について種々の検討を加えた。

初診時年齢は 26～30 歳が全体の 60% を占め、原発不妊と続発不妊の別では前者 2/3 であつた。当科来院までの不妊期間は 2 年未満が 53% を占めた。来院後妊娠成立までの期間は、6 カ月以内が多く、特に続発不妊では半数を占めた。BBT 上排卵異常が疑われたものは 25% で、排卵遅延症、無排卵出血、散発無排卵、黄体機能不全などが主であつた。HSG あるいは通水と、妊娠成立の時期が判明したもので、それらの間隔を検討したが、10 カ月頃までがそれ以後と比べやや多かつた。フーナーテストの結果を retrospective に検討してみると、20 例 22% が陰性であり、精液検査では精液 1 cc あたり 1000 万以下、運動率 25% 以下の例が 2 例ずつあつたことは、これらの検査の施行時期、回数、夫の健康状態等が問題となると思われる。転帰の判明している症例 98 例の流産率は 10% であつた。

16. 当科における最近 5 年間の不妊症の臨床統計

黄 宏駿・田川博之・吉田京子
森 広康・福居兼実・梶村秀雄
(長崎市立市民病院)

1975年9月より1980年8月までの最近5年間に不妊を主訴として当科を受診した114例について、統計的観察を行い、下記の結果を得た。1) 初診時平均年齢と不妊期間は原発性不妊は27.5歳および2年9カ月であり、続発性不妊は27.9歳および3年4カ月であつた。2) 妊娠成功率は原発性不妊46.8%、続発性不妊62.2%であり、

妊娠成功率は1例を除いて、全例初診より2年以内に妊娠の成立をみた。また妊娠継続と予後不明の症例を除いて、妊娠成功率の生児獲得率は原発性不妊と続発性不妊はそれぞれ84.6%と85.7%でした。3) 原発性不妊における治療内容別にみた妊娠成功率は HSG および通水は47.2%、排卵誘発は33.5%、無治療は13.9%、その他5.4%であつた。続発性不妊ではそれぞれ56.5%、21.6%、17.4%および4.5%であつた。4) 未妊娠例の不妊因子では原発性不妊と続発性不妊とともに卵巣因子が第1位であり、とくに原発性不妊では卵巣因子が半分以上を占めた。

会員各位殿

日本不妊学会

理事長 高井 修道

通信総会

法人規定により前年度決算ならびに当年度予算は、5月末日までに文部省に提出しなければならないため、例年と同様に昭和55年度決算および昭和56年度予算について本通信総会での御審議をお願いしたいと存じます。

下記決算ならびに予算案につきよろしく御検討の上、同封の葉書にて5月25日までに賛否をお知らせ下さい。期日までに御回答のない場合は御承認を得ましたものとさせていただきます。なお御不審の点につきましては事務局までお問い合わせ下さい。

議案ならびに説明書

I. 昭和55年度収支決算の件

昭和55年度収支計算書(案)は122~124頁に示すごとくである。ただしこれは昭和55年4月1日より56年2月末までの収支による決算見込であるため、年度末における多少の変更は了承されたい。

収支合計では8,200,743円が余剰金として次年度に繰越されるが、さらに将来の運営基金として1,000,000円を積立金にまわしており、実質的には9,200,743円の繰越金が出たものと考えてよい。54年度からの繰越金7,088,957円を除いて本年度内だけの収支を見ても、1,111,786円の黒字であり、これは55年度予算における3,273,600円の赤字予想に対してかなり良好な結果である。

a. 収入：収支総額は41,158,654円(前年度からの繰越金を除く年度内収入は34,069,697円)で、予算に対し4,568,697円の増である。

- (1) 基本財産収入は予金利率の上昇により48,500円の増
- (2) 購読料収入は約43万円の増となっているが、これは主として前年度未収分の納入があつたためである。広告料も約30万円の増収となっているが、これは会員名簿の広告料収入を予算では見込んでいなかったためである。
- (3) 正会員会費は、55年度会費については会員数、徴集率ともに増加したため約155万円の増収、過年度会費も極力徴集につとめた結果約104万円の増収となつた。
- (4) 賛助会員会費は、3社退会のため30万円の減
- (5) 特別掲載料は約100万円の増収となっているが、それに見合つて支出面で会誌印刷費が増加している。
- (6) 利息収入は全体の収入増と利率の上昇に伴ない約32万円の増収となつた。

b. 支出：支出総額(次年度繰越金を除く)は32,957,911円で、予算(予備費を除く)に対し183,311円の支出超である。

- (1) 会誌印刷費は、約65万円の支出増となっているが、前記特別掲載料の増収に見合うもので、実質的には支出超というわけではない。
- (2) 会誌発送費は、本年度ある程度の郵送料値上げを見込んであつたが、値上げ時期が予想より遅れたため約21万円の支出減。
- (3) 委員会経費は極力節減につとめた結果約22万円の支出減。
- (4) 渉外費は、本年度は国際不妊学会理事会が2回行われたため、1回分50万円の支出超となつた。
- (5) 給与手当は、名簿作製のための超過勤務増などのため約8万円の支出超となつた。
- (6) 事務所費は、予算算定にやや過りがあつたため約18万円の支出減で済んだ。

- (7) 旅費交通費、通信費はいずれも値上げの影響が予想より少なかったため支出減となった。
- (8) その他の項目については、多少の増減は見られるがほぼ予算範囲の支出であった。

II. 昭和56年度収支予算の件

昭和56年度収支予算案は125～127頁に示すごとくである。ただし55年度よりの繰越金、56年度当初会員数などがなお確定的でないため、多少の変更があり得ることは了承されたい。

- a. 収入：収入総額は35,756,743円であるが、前年度よりの繰越金を除く年度内収入は27,556,000円で、55年度予算に比し2,001,000円の減である。ただし55年度予算は名簿作製のための積立金取崩しによる収入200万円を含んでいるので、実際には55年度とほぼ同額の収入予算と見てよい。
 - (1) 正会員56年度会費は年度当初会員2,533人、年度内徴収率80%として算出し、過年度会費は55年度会費136人分（未納者456人、徴収率30%）+54年度以前の会費100人分とした。
 - (2) 賛助会員会費は、55年度予算に比し2社分の減とした。
 - (3) 購読料は会員90名分、広告料はほぼ前年度予算に準じて計上した。55年決算額よりはかなり減となっているが、これは前記の如く55年度には特殊な事情により収入増となっていることによる。
 - (4) 特別掲載料は前年度予算通り300万円を計上したが、決算時におけるこの項の増減は会誌印刷費の増減と見合うもので、全体の収支バランスとはほぼ無関係と考えてよい。
 - (5) 受取利息はほぼ前年度予算に準じて計上した。
- b. 支出：支出総額（予備費および運営基金積立金を除く）は31,357,600円で、55年度予算（予備費、運営基金積立金および名簿作製費を除く）29,774,600円に比し1,583,000円の増加である。また本年度収入総額（前年度よりの繰越金を除く）に対しては3,801,600円の支出超過となる。
 - (1) 会誌印刷費は、4号分で一般原著48編288頁、会告その他70頁、広告50頁、計408頁（1頁当たり平均5.5円）、各号2,900部発行予定で約650万円、それに特別掲載、超過頁、総会抄録等の自己負担分220頁、約350万円を加え1,000万円とした。
 - (2) 渉外費は前年度決算を考慮して50万円の増額とした。
 - (3) 給与手当は、職員2名分、本給月額（198,000円+139,000円）×17.5カ月（賞与を含む）+残業手当約30万円に、物価上昇に対する特別手当として1人月額12,000円（前年度より6,000円増）を加え、6,500,000円とした。
 - (4) 器具備品費は本年度特に購入予定がないため5万円とした。
 - (5) 消耗品費は例年やや不足を来すので本年度10万円の増額をしたが、これについては極力節減をはかりたい。
 - (6) その他の諸経費はほぼ前年度並みか、物価上昇に備えて多少の増額をした。
 - (7) 運営基金積立金は実質的には翌年度以降への繰越金と考えれば、本年度予算がこの予算書通りに執行された場合、予備費と合わせて約440万円が明年度へ繰越されることになり、これに今までの運営基金積立金700万円を加えた1,140万円が57年度以降の年度内収支赤字に対する準備金となる。

収 支 計 算 書 (案)
(一 般 会 計)

(昭和55年4月1日から昭和56年3月31日まで)

1) 収入の部

単位：円

勘 定 科 目			決 算 額	予 算 額	増 減△
大 科 目	中 科 目	小 科 目			
I	基本財産運用収入		398,500	350,000	48,500
	基本財産利息収入	利 息	398,500	350,000	48,500
II	事業収入		2,466,950	1,737,000	729,950
	機関誌購読料収入	購 読 料	1,195,750	765,000	430,750
	機関誌広告料収入	広 告 料	1,271,200	972,000	299,200
III	会費収入		23,626,710	21,334,000	2,292,710
	正会員会費収入	正 会 員 会 費	20,576,710	17,984,000	2,592,710
	賛助会員会費収入	賛 助 会 員 会 費	3,050,000	3,350,000	△ 300,000
IV	助成金収入		100,000	100,000	0
	日本医学会助成金収入	医 学 会 助 成 金	100,000	100,000	0
V	負担金収入		4,018,785	3,000,000	1,018,785
	負担金収入	特 別 掲 載 料	4,018,785	3,000,000	1,018,785
VI	雑収入		1,458,752	980,000	478,752
	受取利息	利 息	1,269,577	950,000	319,577
	雑収入	雑 収 入	189,175	30,000	159,175
VII	積立預金取崩収入		2,000,000	2,000,000	0
	名簿作製積立預金取崩収入	名 簿 積 立 取 崩	2,000,000	2,000,000	0
VIII	前期繰越収支差額		7,088,957	7,088,957	0
	前期繰越収支差額	前 期 繰 越 金	7,088,957	7,088,957	0
収 入 合 計			41,158,654	36,589,957	4,568,697

注：年度内収入（I～VII）

55年度決算額 34,069,697円

55年度予算額 29,557,000円

会費収入の内訳

(1) 正会員会費 計 20,576,710円

55年度会費 16,991,000円 (2,123人分, 徴収率82.3%)

(会員数2,579人)

過年度会費

54年度会費 2,205,710円 (275人分, 徴収率54%)

(54年度未納者508人)

53年度以前会費 1,380,000円 (172人分)

(2) 賛助員会費 計 3,050,000円

18口 1社 (日本シエリング) 1,800,000円

1口 12社 (太田製薬, 大日本製薬, 山之内, サンド薬品, ミドリ十字, 小野薬品, 三共, 第一製薬, 持田製薬, 帝国臓器, 藤沢薬品, 塩野義) 1,200,000円

1/2口 1社 (エーザイ) 50,000円

2) 支出の部

勘 定 科 目			決 算 額	予 算 額	増 減△
大 科 目	中 科 目	小 科 目			
I 事 業 費			17,543,833	16,856,600	687,233
	総 会 委 託 費		1,551,580	1,550,000	1,580
		総 会 補 助 金	1,000,000	1,000,000	0
		総 会 諸 経 費	551,580	550,000	1,580
	機 関 誌 発 行 費		11,256,481	10,820,000	436,481
		印 刷 費	9,849,745	9,200,000	649,745
		発 送 費	1,286,736	1,500,000	△ 213,264
		編 集 費	120,000	120,000	0
		負 担 金	80,000	100,000	△ 20,000
		I.F.F.S 会 費	80,000	100,000	△ 20,000
	助 成 金 支 出		397,600	386,600	11,000
		支 部 運 営 費	397,600	386,600	11,000
	会 議 費		674,102	900,000	△ 225,898
		委 員 会 経 費	674,102	900,000	△ 225,898
	渉 外 費		1,000,000	500,000	500,000
		渉 外 費	1,000,000	500,000	500,000
	名 簿 作 製 費		2,066,580	2,000,000	66,580
		名 簿 作 製 費	2,066,580	2,000,000	66,580
	雑 費		517,490	600,000	△ 82,510
		雑 費	517,490	600,000	△ 82,510
II 管 理 費			11,714,078	12,218,000	△ 503,922
	給 与 手 当		6,276,627	6,200,000	76,627
		給 与 手 当	6,276,627	6,200,000	76,627
	臨 時 雇 賃 金		506,300	500,000	6,300
		臨 時 雇 賃 金	506,300	500,000	6,300
	福 利 厚 生 費		546,836	580,000	△ 33,164
		法 定 福 利 厚 生 費	466,916	500,000	△ 33,084
		福 利 厚 生 費	79,920	80,000	△ 80
	器 具 備 品 費		398,000	450,000	△ 52,000
		器 具 備 品 費	398,000	450,000	△ 52,000
	賃 借 科		1,830,504	2,008,000	△ 177,496
		事 務 所 費	1,602,504	1,780,000	△ 177,496
		器 具 賃 借 料	228,000	228,000	0
	旅 費 交 通 費		578,450	750,000	△ 171,550
		旅 費 交 通 費	578,450	750,000	△ 171,550
	通 信 運 般 費		609,660	800,000	△ 190,340
		通 信 費	609,660	800,000	△ 190,340
	印 刷 費		49,250	50,000	△ 750
		印 刷 費	49,250	50,000	△ 750
	消 耗 品 費		574,847	550,000	24,847
	消 耗 品 費	574,847	550,000	24,847	
修 繕 費		57,850	50,000	7,850	
	修 繕 費	57,850	50,000	7,850	
会 議 費		33,120	30,000	3,120	
	会 議 費	33,120	30,000	3,120	

勘 定 科 目			決 算 額	予 算 額	増 減△		
大 科 目	中 科 目	小 科 目					
Ⅲ 積立預金支出	諸 謝 金		175,000	175,000		0	
			會計指導費	175,000	175,000		0
	租 税 公 課		2,500	5,000	△	2,500	
			公 租 公 課	2,500	5,000	△	2,500
	慶 弔 費		30,000	30,000		0	
			慶 弔 費	30,000	30,000		0
	雜 費		45,134	40,000		5,134	
			雜 費	45,134	40,000		5,134
				3,700,000	3,700,000		0
		退職給与積立預金支出	退 職 積 立 金	700,000	700,000		0
		諸事業積立預金支出	諸 事 業 積 立 金	1,000,000	1,000,000		0
	名簿作製積立預金支出	名 簿 作 製 積 立 金	1,000,000	1,000,000		0	
	運営基金積立預金支出	運 營 基 金 積 立 金	1,000,000	1,000,000		0	
Ⅳ 次期繰越収支差額			8,200,743	3,815,357		4,385,386	
		次期繰越収支差額	8,200,743	3,815,357		4,385,386	
		当期余剰金	8,200,743	3,815,357		4,385,386	
支 出 合 計			41,158,654	36,589,957		4,568,697	

注：年度内支出（Ⅰ＋Ⅱ＋Ⅲ） 55年度決算額 32,957,911円
55年度予算額 32,774,600円

予 算 書 (案)

(一 般 会 計)

(昭和56年4月1日から昭和57年3月31日まで)

1) 収入の部

単位: 円

勘 定 科 目			予 算 額	前 年 度 予 算 額	増 減△
大 科 目	中 科 目	小 科 目			
I	基本財産運用収入		370,000	350,000	20,000
	基本財産利息収入	利 息	370,000	350,000	20,000
II	事業収入		1,810,000	1,737,000	73,000
	機関誌購読料収入	購 読 料	810,000	765,000	45,000
	機関誌広告料収入	広 告 料	1,000,000	972,000	28,000
III	会費収入		21,246,000	21,334,000	△ 88,000
	正会員会費収入	正会員会費	18,096,000	17,984,000	112,000
	賛助会員会費収入	賛助会員会費	3,150,000	3,350,000	△ 200,000
IV	助成金収入		100,000	100,000	0
	日本医学会助成金収入	医学会助成金	100,000	100,000	0
V	負担金収入		3,000,000	3,000,000	0
	負担金収入	特別掲載料	3,000,000	3,000,000	0
VI	雑収入		1,030,000	980,000	50,000
	受取利息	利 息	1,000,000	950,000	50,000
	雑収入	雑 収 入	30,000	30,000	0
VII	積立預金取崩収入		0	2,000,000	△ 2,000,000
	名簿作製積立預金取崩収入	名簿積立取崩	0	2,000,000	△ 2,000,000
VII	前期繰越収支差額		8,200,743	7,088,957	1,111,786
	前期繰越収支差額	前期繰越金	8,200,743	7,088,957	1,111,786
収 入 合 計			35,756,743	36,589,957	△ 833,214

注: 年度内収入 (I ~ VII)

56年度予算額 27,556,000円

55年度予算額 29,557,000円

55年度決算額 34,069,697円

会費収入の内訳

(1) 正会員会費 計 18,096,000円

56年度会費 8,000円×2,026人=16,208,000円

(会員数2,533人, 徴収率80%)

過年度会費

55年度会費 8,000円×136人=1,088,000円

(未納者456人, 徴収率30%)

54年度以前会費 8,000円×100人=800,000円

(2) 賛助会員費 計 3,150,000円

18口 1社(日本シエリング) 1,800,000円

1口 13社(太田製薬, 小野薬品, 大日本製薬, 山之内, サンド薬品, ミドリ十字, 三共, 武田薬品, 第一製薬, 持田製薬, 帝国臓器, 藤沢薬品, 塩野義) 1,300,000円

½口 1社(エーザイ) 50,000円

2) 支出の部

勘 定 科 目			予 算 額	前 年 度 予 算 額	増 減△	
大 科 目	中 科 目	小 科 目				
I 事 業 費			16,314,600	16,856,600	△ 542,000	
		総 会 委 託 費	1,600,000	1,550,000	50,000	
			総 会 補 助 金	1,000,000	1,000,000	0
			総 会 諸 経 費	600,000	550,000	50,000
		機 関 誌 発 行 費	11,720,000	10,820,000	900,000	
			印 刷 費	10,000,000	9,200,000	800,000
			発 送 費	1,600,000	1,500,000	100,000
			編 集 費	120,000	120,000	0
		負 担 金	70,000	100,000	△ 30,000	
			I.F.F.S 会 費	70,000	100,000	△ 30,000
		助 成 金 支 出	424,600	386,600	38,000	
			支 部 運 営 費	424,600	380,600	38,000
		会 議 費	900,000	900,000	0	
			委 員 会 経 費	900,000	900,000	0
		渉 外 費	1,000,000	500,000	500,000	
			渉 外 費	1,000,000	500,000	500,000
		名 簿 作 製 費	0	2,000,000	△ 2,000,000	
			名 簿 作 製 費	0	2,000,000	△ 2,000,000
		雑 費	600,000	600,000	0	
		雑 費	600,000	600,000	0	
II 管 理 費			12,343,000	12,218,000	125,000	
		給 与 手 当	6,500,000	6,200,000	300,000	
			給 与 手 当	6,500,000	6,200,000	300,000
		臨 時 雇 賃 金	600,000	500,000	100,000	
			臨 時 雇 賃 金	600,000	500,000	100,000
		福 利 厚 生 費	580,000	580,000	0	
			法 定 福 利 厚 生 費	500,000	500,000	0
			福 利 厚 生 費	80,000	80,000	0
		器 具 備 品 費	50,000	450,000	△ 400,000	
			器 具 備 品 費	50,000	450,000	△ 400,000
		賃 借 料	2,008,000	2,008,000	0	
			事 務 所 費	1,780,000	1,780,000	0
			器 具 賃 借 料	228,000	228,000	0
		旅 費 交 通 費	750,000	750,000	0	
			旅 費 交 通 費	750,000	750,000	0
		通 信 運 搬 費	800,000	800,000	0	
			通 信 費	800,000	800,000	0
		印 刷 費	50,000	50,000	0	
			印 刷 費	50,000	50,000	0
	消 耗 品 費	650,000	550,000	100,000		
		消 耗 品 費	650,000	550,000	100,000	
	修 繕 費	65,000	50,000	15,000		
		修 繕 費	65,000	50,000	15,000	
	会 議 費	30,000	30,000	0		
		会 議 費	30,000	30,000	0	

勘 定 科 目			予 算 額	前 年 度 予 算 額	増 減△
大 科 目	中 科 目	小 科 目			
Ⅲ 積立預金支出	諸 謝 金		175,000	175,000	0
		会 計 指 導 費	175,000	175,000	0
	租 稅 公 課		5,000	5,000	0
		公 租 公 課	5,000	5,000	0
	慶 弔 費		30,000	30,000	0
		慶 弔 費	30,000	30,000	0
	雜 費		50,000	40,000	10,000
		雜 費	50,000	40,000	10,000
			3,700,000	3,700,000	0
		退職給与積立預金支出	退 職 積 立 金	700,000	700,000
	諸事業積立預金支出	諸 事 業 積 立 金	1,000,000	1,000,000	0
	名簿作成積立預金支出	名 簿 作 製 積 立 金	1,000,000	1,000,000	0
	運営基金積立預金支出	運 營 基 金 積 立 金	1,000,000	1,000,000	0
Ⅳ 予 備 費			3,399,143	3,815,357	△ 416,214
	予 備 費		3,399,143	3,815,357	△ 416,214
		予 備 費	3,399,143	3,815,357	△ 416,214
支 出 合 計			35,756,743	36,589,957	△ 833,214

注：年度内支出（Ⅰ＋Ⅱ＋Ⅲ） 56年度予算額 32,357,600円
 55年度予算額 32,774,600円
 55年度決算額 32,957,911円

日本学術会議第80回総会報告

日本学術会議第80回総会は、10月22日9時40分から同講堂において開催された。今総会には、20件を超える提案事項があり、できるだけ審議に時間をあてるため、諸報告は文書だけによることとし、口頭報告は、特に追認・承認を必要とする事項に限って行われた。続いて第6部、食糧需給問題特別委員会、栄養・食糧科学研究連絡会から提案された「食糧自給力の向上について」の勧告案が審議された。しかし多数の会員から、このままでは賛成できないという発言があり、提案者により大幅に修正されたが、なおも多くの会員からの反対があつたため、さらに修正を行い、翌日審議することとされた。続いて発展途上国学術協力問題特別委員会提案の「発展途上国からの留学生を対象とする情報センターの設置について」(勧告)が採択された。午後は、最初に国公立研究機関問題特別委員会から、第9期以来の本会議における検討をとりまとめて提案された「国・公立試験研究機関の運営の改善について」(勧告)が採択された。続いて、第7部・癌研究連絡委員会老化分科会提案の「国立老化・老年病センター(仮称)の設立について」(勧告)および第7部と学術情報生産・流通問題特別委員会提案の「医学情報センター(仮称)の設立について」(勧告)が採択され、16時45分1日目の議事を終了した。

2日目の23日は10時開会、第5部提案の「日本工学技術機構(仮称)の設立について」の勧告案について審議が行われた。この提案は、総会前日の21日、特に連合部会が開かれ前もって説明がなされていたものである。しかし多くの疑問や懸念が述べられたので提案者により修正され、24日に改めて審議することとされた。次に、第7部提案の「医学教育会議(仮称)の設置について」の勧告案について審議が行われたが、この会議の法律上の性格が問題にされ、この点を修正のうえさらに翌日審議することとされた。続いて、第4部、地質学研究連絡委員会、地球化学・宇宙化学研究連絡会、南極研究連絡委員会提案の「隕石科学及び隕石による宇宙科学研究の振興について」(勧告)、学術体制委員会提案の「研究者養成の振興策について」(要望)、科学史、科学基礎論研究連絡委員会提案の「生産に関連する科学・技術資料の保存・管理・利用について」(要望)、研究費委員会提案の「大学における経常的研究費の増額について」(要望)、

国際学術交流委員会提案の「日本学術会議の国際学術交流に必要な予算の増額について」(要望)がそれぞれ審議の上採択された。続いて、前日に提案された「食糧自給力の向上について」勧告の修正案が審議されたが、なお反対意見が多く、投票による採決の結果賛成少数で可決されるに至らなかった。続いて海洋学研究連絡委員会、水産学研究連絡会提案の「海洋科学調査について」の要望案はなお検討の必要ありとして、提案者により取り下げられた。2日目は18時に終了した。

3日目の24日は、最初に会長から前日の「食糧自給力の向上について」の提案は、総会で可決されなかったが、本会議はこの問題の重要性を否定するものでないの食糧需給問題特別委員会の名でこれまでにまとめた見解や資料を外部に発表することを了承されたい旨が述べられ、承認された。続いて第7部、実験動物研究連絡委員会提案の「動物実験ガイドラインの策定について」(勧告)が採択された。前日の「日本工学技術機構(仮称)の設立について」の勧告案は、提案者により「工学技術振興の方途を早急に講ずることについて」の要望案にかえることを提案され、活発な討論の後、投票により可決された。次に前日提案の「医学教育会議(仮称)の設置について」(勧告)の修正案が採択された。この後、科学者の地位委員会提案の「外国人の国公立大学専任教員任用について」(見解)、第7部、第3部、第5部提案の「労働衛生の効果的推進について」(要望)、国際協力事業特別委員会、環境・健康問題特別委員会、自然保護研究連絡委員会提案の「環境科学研究の推進について」(申入れ)、環境・健康問題特別委員会提案の「騒音問題の重要性を訴える」(声明)、原子力平和問題特別委員会提案の「放射性物質を使用する際の心構えについて科学者・技術者に訴える」(声明)、会長提案の「国際紛争の平和的解決の必要性について」(声明)が採択され、16時30分全議事を終了した。

本総会は、提案件数が多かつたが、多くの会員から活発な意見が述べられ、第11期最後の総会にふさわしいものになった。

なお、本総会の出席率は、1日目85.6%、2日目86.1%、3日目82.3%であつた

(日本学術会議広報委員会)

第10回国際産科婦人科連合 (FIGO) 世界大会
開催のお知らせ



THE INTERNATIONAL FEDERATION OF GYNECOLOGY
AND OBSTETRICS (FIGO)

Presents

THE XTH WORLD CONGRESS OF GYNECOLOGY
AND OBSTETRICS

San Francisco, October 17-22, 1982

Hosted by The American College of Obstetricians and Gynecologists

For further information write the Xth World Congress of Gynecology and
Obstetrics, c/o The American College of Obstetricians and Gynecologists,
One East Wacker Drive, Suite 2700, Chicago, Illinois 60601, U.S.A.

The American Association of Gynecologic
Laparoscopists より学会開催の御案内

- ① AAGL 第1回 Advanced Workshop on Microsurgery in Gynecology

開催日：1981年6月1日～6月5日

開催地：Animal Resources Laboratory, University of California, Irvine,
Irvine, California

- ② 第6回 International Workshop on Laparoscopy and Microsurgery in
Gynecology

(卵管吻合術を含む)

開催日：1981年6月4日～6月7日

開催地：University of California, Irvine, Irvine, California

登録に関する連絡先

Jordan M. Phillips, M.D.
Chairman of the Board
11239 South Lakewood Blvd.
Downey, California 90241
(213) 862-8181

卒後研修のお知らせ

“Reproductive Endocrinology, Infertility and Contraception”

主催：University of Southern California School of Medicine Postgraduate
Division

(会長 Phil R. Manning M.D.)

開催地：Royal Lahaina Hotel, Maui, Hawaii

期 日：1981年8月8日～15日

研修内容問合せおよび参加希望者連絡先

① 日本不妊学会事務局

〒162 東京都新宿区市ケ谷砂土原町1-1

保健会館別館内3F

電話 03 (267) 4635

② 椎葉卓光

〒160 東京都新宿区西新宿1-18-8

新宿スカイビル4F

日本交通公社 団体旅行新宿支店 土屋グループ

電話 03 (346) 0131

投稿規定

1. 本誌掲載の論文は、特別の場合を除き、会員のものに限る。
2. 原稿は、本会の目的に関連のある綜説、原著、論説、臨床報告、内外文献紹介、学会記事、その他で、原則として未発表のものに限る。
3. 1論文は、原則として印刷6頁(図表を含む)以内とし、超過頁並びに特に費用を要する図表および写真に対しては実費を著者負担とする。
4. 綜説、原著、論説、臨床報告等には必ず400字以内の和文抄録並びに、ダブルスペース2枚以内の欧文抄録(題名、著者名、所属を含む)を添付すること。
5. 図表並びに写真は稿末に一括して纏め、符号を記入しかつ本文中に挿入すべき位置を明示すること。
6. 記述は、和文又は欧文とし、和文は横書き、口語体、平かなを用い、現代かなづかいによる。
7. 外国の人名、地名等は原語、数字は算用数字とする。学術用語および諸単位は、それぞれの学会所定のものに従い、度量衡はメートル法により、所定の記号を用いる。
8. 文献は次の形式により、末尾に一括記載する。
 - a. 雑誌の場合
著者名：題名、誌名、巻数：頁数、年次
原則として、特に原著の場合は著者名を全員あげる。
誌名は規定または慣用の略字に従うこと。特に号数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、東京都新宿区市ヶ谷砂土原町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 26巻2号

昭和56年3月25日 印刷
昭和56年4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 市ヶ谷砂土原町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