

# 日本不妊学会雑誌

第30卷

第1号

昭和60年1月1日

- 抗エストロゲン剤の作用——単独あるいはエストロゲンとの併用によるラット性周期および子宮への影響——岡本 良平・他…1
- Etiological Study on Hyposecretion of progesterone in the Aspect of Echographically Measured Follicle Diameters and Serum Estradiol and Progesterone In Patients Categorized by BBT Patterns ……T. KANO・他…5
- Danazol による FSH および LH 放出の抑制 ……岡村 隆・他…10
- 正プロラクチン血症性黄体機能不全の病態にかかわる  
プロラクチンの意義 ……森 宏之・他…17
- 機能性不妊に対する Metharmon®-F の応用 ……中村 幸雄・他…22
- 当大病院開設後10年間における不妊症患者の統計的観察 ……米谷 国男・他…28
- マウス卵巣卵の受精能獲得過程とそれに及ぼす HCG,  
Estradiol, Progesterone の影響 ……香山 文美・他…33
- マウス体外受精における  $Ca^{2+}$  イオンの役割と影響 ……佐藤 孝道・他…40
- 成熟マウスの過排卵反応に及ぼす PMS または HCG  
反復処理マウス血清の影響 ……石島 芳郎・他…47
- 妊娠ラットにブスルファンを投与して卵母細胞を退行させた新生児卵巣における性索細胞の動態について ……小泉 攻・他…52
- 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子進入に及ぼす  
各種血清アルブミンの影響 ……上口勇次郎・他…57
- Studies on Artificial Insemination Into The Oviduct Through The Tubal Fimbria in Rabbits ……Kiichi KANAYAMA・他…65
- Kallikrein の不妊症への試み ……玉舎 輝彦・他…71
- Testosterone Uptake into the Isolated Seminiferous Tubules and Leydig Cell Function in Patients with Idiopathic Infertility ……Masahiko HOSAKA・他…80
- 無精子症におけるリブローソペプチド ……伊藤 元博・他…87
- ヒト精漿中のアンジオテンシン変換酵素について ……藤尾 幸司・他…92
- 特発性男子不妊症のホルモン療法 ……角谷 秀典・他…97
- 赤外線サーモグラフィーを用いた精索静脈瘤の臨床的研究 ……松下 全己・他…103
- Precocious Puberty due to a Hypothalamic Hamartoma. Studies of Sleep-Wake Pattern of Luteinizing Hormone Release and Testicular Steroidogenesis Activities ……Kazuhiko SATO・他…109
- 不妊を主訴とした46, XYq-の1例 ……笹川五十次・他…114
- AIH にて挙児に成功した逆行性射精の1例  
——高度乏精子症で HMG/HCG 療法により改善—— ……吉田 英機・他…119
- AIH にて妊娠・出産に成功した逆行性射精の一例 ……浜口 毅樹・他…124
- 先天性陰茎彎曲症の3例 ……成田 晴紀・他…130
- 地方部会講演抄録 ……136

# 会 告

## 第30回日本不妊学会総会および学術講演会 (第1回予告)

下記により第30回日本不妊学会総会ならびに学術講演会を開催いたしますので、多数の方々が奮って御参加下さいますようお願い申し上げます。

記

期 日：昭和60年11月26日（火）役員会

27日（水）～28日（木）学術講演会

会 場：東京農林年金会館虎の門パストラル

（東京都港区虎の門4の1の1 TEL 432-7261）

なお演題募集要項、特別講演、シンポジウム、その他詳細については次号（30巻2号、昭和60年4月発行予定）に掲載いたします。一般演題の締切りは7月中旬の予定です。

第30回日本不妊学会会長

蜂 屋 祥 一

連絡先：東京都港区西新橋3-25-8（〒105）

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室内

第30回日本不妊学会総会事務局

Tel. 03-433-1111 内線 3529

## 昭和59年度第2回通常総会

昭和59年度第2回通常総会は下記の如く東京都において開催され、松本理事長を議長として各議案につき慎重審議の上採択を行った。

日 時 昭和59年11月13日(火) 13時～13時15分

場 所 東京都 センチュリーハイアットホテル

開会当時の会員数 2660名

当日の出席会員数 1449名(含委任状887)

### 議 事

#### 第1号議案 名誉会員推薦の件

理事会および評議員会より推薦の別記7名につき審議の結果全員一致にて名誉会員とすることを承認した。

#### 第2号議案 役員改選の件

評議員会の決定した候補者につき審議の上全員一致にて別記の如く次期理事(20名)、監事(3名)を選出した。

#### 第3号議案 評議員改選の件

次期評議員は各支部よりの推薦をまち新理事会にて選任されるが、各支部別評議員数については理事会、評議員会の原案通り下記の如く定めることを全員一致で承認した。

北海道支部 5名、東北支部 4名、中部支部 5名、北陸支部 4名

中国・四国支部 5名、九州支部 8名、関西支部 8名、関東支部 16名

#### 第4号議案 次々期学術講演会および総会に関する件

61年度学術講演会および総会は理事会、評議員会の原案通り、下記の如く開催することを全員一致で承認した。

担当支部 東 北 支 部

会 長 折 笠 精 一

開催地 仙 台 市

## 新名誉会員および新役員について

11月13日開催された昭和59年度第2回通常総会において次の7名の方々が新たに名誉会員として推薦、承認されました。また役員(理事および監事)の改選が行われましたので、11月14日新理事会を開き、互選により下記の如く理事長、副理事長、常任幹事を選出するとともに各理事の職務分担を決定しました。

### 名誉会員

森 一 郎(九州支部)、高 井 修 道(関東支部)、滝 一 郎(関西支部)  
 塩 島 令 儀(関東支部)、志 田 圭 三(関東支部)、辻 一 郎(北海道支部)  
 中 條 誠 一(関東支部)

役員名	氏 名	職 種	支 部 名	備考
理 事 長	松 本 清 一		関 東 支 部	再任
副 理 事 長	佐 久 間 勇 次	編集・渉外	〃	〃
〃	木 下 佐	庶務・会計	〃	〃
〃	黒 田 一 秀	組織	北 海 道 支 部	〃
理事(常任)	飯 塚 理 八	編集・庶務	関 東 支 部	〃
〃 ( 〃 )	石 島 芳 郎	組織・編集	〃	〃
〃 ( 〃 )	水 野 正 彦	渉外・組織	〃	新任
〃 ( 〃 )	島 崎 淳	渉外・庶務	〃	再任
〃 ( 〃 )	高 木 繁 夫	庶務・会計	〃	〃
〃 ( 〃 )	蜂 屋 祥 一	会計・組織	〃	〃
〃 ( 〃 )	和 久 正 良	編集・組織	〃	〃
〃 ( 〃 )	森 崇 英	組織・会計	関 西 支 部	〃
〃	入 谷 明		〃	新任
〃	友 吉 唯 夫		〃	〃
〃	鈴 木 雅 洲		東 北 支 部	再任
〃	八 神 喜 昭		中 部 支 部	〃
〃	西 田 悦 郎		北 陸 支 部	〃
〃	酒 徳 治 三 郎		中 国 四 国 支 部	新任
〃	中 野 仁 雄		九 州 支 部	再任
〃	永 田 行 博		〃	新任
監 事	石 神 襄 次		関 西 支 部	新任
〃	蘭 守 龍 雄		〃	〃
〃	坂 元 正 一		関 東 支 部	〃

# Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 30, No. 1, 1985)

Japanese Society of Fertility and Sterility

## CONTENTS

- Antiestrogenic and Estrogenic Effects of Antiestrogen on  
Estrus and Uterus of Intact and Ovariectomized Rats ······*R. Okamoto S. Sassa*  
*S. Sakamoto Y. Imamura* ···· 1
- Etiological Study on Hyposecretion of Progesterone in the  
Aspect of Echographically Measured Follicle Diameters  
and Serum Estradiol and Progesterone In Patients  
Categorized by BBT Patterns ······*T. Kano and K. Nishikawa* ···· 5
- Danazol Suppresses Pituitary FSH and LH Release ······*T. Okamura T. Takeuchi*  
*O. Nishii T. Yaginuma T. Kobayashi T. Nagasaka* ····10
- Role of Prolactin on Pathophysiology of Luteal Insufficiency  
with Euprolactinemia ······*H. Mori R. Matsuoka*  
*K. Aisaka T. Kigawa* ····17
- Metharmon-F Treatment of Unexplained Infertility ······*Y. Nakamura T. Yoshio*  
*E. Katayama S. Iai Y. Tamaoka R. Iizuka* ····22
- A Clinical Review of the Infertile Women Attending our  
Fertility Clinic During the Past ten years ······*K. Kometani M. Ito*  
*M. Takahashi H. Chihara M. Ochi* ····28
- Studies on the Oocyte Maturation with Special Reference  
to the Role of HCG, Estradiol and Progesterone in *in vitro*  
Maturation of mouse Oocytes ······*F. Kayama K. Sato*  
*M. Mizuno S. Sakamoto* ····33
- Role and Effect of  $Ca^{2+}$  in Mouse *in vitro* Fertilization ······*K. Sato F. Kayama*  
*Y. Morita M. Mizuno* ····40
- Effect of Serums of Mice Repeatedly Injected with PMS  
or HCG on the Superovulatory Response in Mice ······*Y. Ishijima M. Ito*  
*R. Maru T. Shimizu* ····47
- Behavior of Sex Cord Cells in Young Rat Ovaries in  
Which Oocytes Were Disintegrated by Busulphan  
Administration to Pregnant Parent Rats ······*K. Koizumi K. Ishida* ····52
- Effects of Various Kinds of Serum Albumin on Human  
Sperm Penetration into Zona-free Hamster Ova ······*Y. Kamiguchi K. Mikamo* ····57
- Studies on Artificial Insemination Into The Oviduct

Through The Tubal Fimbria in Rabbits.....	<i>K. Kanayama T. Endo</i> <i>G. Kobayashi and Y. Sakuma</i> ....	65
Studies on Kallikrein for Infertility.....	<i>T. Tamaya Y. Ohno</i> <i>K. Wada H. Okada</i> ....	71
Testosterone Uptake into the Isolated Seminiferous Tubules and Leydig Cell Function in Patients with Idiopathic Infertility .....	<i>M. Hosaka Y. Kinoshita</i> <i>A. Iwasaki R. Nishimura and S. Takai</i> ....	80
Study on D-Ribulose-peptide in Azoospermia .....	<i>M. Ito K. Arisawa</i> <i>Y. Nakaoka M. Watanabe H. Amano</i> ....	87
Angiotensin Converting Enzyme in Human Semen.....	<i>K. Fujio T. Tanaka</i> <i>M. Matsuhashi M. Takanami A. Maki K. Miura</i> <i>K. Nakayama M. Shirai K. Ando</i> ....	92
Hormonal Therapy for Idiopathic Male Infertility.....	<i>H. Sumiya K. Kawamura</i> <i>H. Ito J. Shimazaki S. Murakami</i> ....	97
Clinical Study on Varicocele using with Infrared Thermography .....	<i>M. Matsushita N. Shimatani K. Hirooka</i> <i>S. Kamidono N. Oka T. Hamaguchi H. Okada</i> <i>M. Hazama O. Matsumoto J. Ishigami</i> ....	103
Precocious Puberty due to a Hypothalamic Hamartoma Studies of Sleep-Wake Pattern of Luteinizing Hormone Release and Testicular Steroidogenesis Activities.....	<i>K. Sato M. Hosaka</i> <i>Y. Kinoshita and R. Nishimura</i> ....	109
46, XYq- in a Patient with Male Infertility.....	<i>I. Sasagawa T. Terada</i> <i>T. Katayama</i> ....	114
A Case of Retrograde Ejaculation Whose Wife Conceived by Artificial Insemination with Husband's Semen —Treated by HMG/HCG Injection for Severe Oligozoospermia—.....	<i>H. Yoshida T. Yoshida M. Watanabe</i> <i>Y. Naitoh K. Imamura T. Yanaihara</i> ....	119
A Case of Retrograde Ejaculation; His Wife conceived and gave birth to a baby by AIH.....	<i>T. Hamaguchi Y. Okamoto N. Oka</i> <i>H. Okada M. Hazama O. Matsumoto S. Kamidono</i> <i>J. Ishigami Y. Ono H. Takashima</i> ....	124
3 Cases of Congenital Curvature of the Penis.....	<i>H. Narita K. Miyake H. Mitsuya</i> ....	130

## 抗エストロゲン剤の作用

—単独あるいはエストロゲンとの併用によるラット  
性周期および子宮への影響—

Antiestrogenic and Estrogenic Effects of Antiestrogen on  
Estrus and Uterus of Intact and Ovariectomized Rats

東京医科歯科大学難研内分泌異常部門

岡本良平 左雨秀治

Ryohei OKAMOTO Shuji SASSA

坂本忍 今村好久

Shinobu SAKAMOTO Yoshihisa IMAMURA

Department of Endocrinology, Medical Research Institute,  
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo

ナフォキシジン (NAF) あるいはタモキシフェン (TAM) などの抗E剤は、エストロゲンレセプター (ER) に結合してエストロゲン (E) に対し拮抗的に作用するが、またあるときはEと同じように作用する。今回は抗E剤のそのような作用を検討すべく、成熟 SD メスラットの無処置群と去勢群にエストラジオール ( $E_2$ ) と、NAF または TAM を、単独あるいは併用で1日1回14日間筋注し、性周期の estrus 日数および子宮の湿重量とチミジンキナーゼ (TK) 活性を測定した。その結果、抗E剤が無処置群ではEと拮抗的に、去勢群ではEと同じように作用することを認めたが、これは特に estrus 日数について著しかった。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 1-4, 1985)

Jensen ら<sup>1)</sup>によつてエストロゲンレセプター (ER) の概念が提唱されてから既に20年余りを経過した。此の間、臨床ではエストロゲン (E) に依存すると考えられる乳癌などについて、その癌組織中 ER の測定結果から内分泌療法<sup>2)</sup>の適用を決定するようになった。内分泌療法は主としてEの影響を除くことを目的とするが、その意味でEとER レベルで競合する抗E剤を、乳癌や子宮内膜癌の治療に用いて成績をあげている。抗E剤としては、乳癌や子宮内膜癌の治療によく用いられるものに、非ステロイドのナフォキシジン (NAF) およびタモキシフェン (TAM) がある。このような抗E剤には、Eの標的組織内にERとは異なる特異的な結合部位もあることが報告されているが<sup>3)</sup>、そのEに対する拮抗作用はERを介してであつて、抗E剤に特有な結合部位の生理的役割は未だ明らかにされていない。最近、Tate, Jensen らは「こうし」子宮細胞の細胞質 ER

(ERC) に対するポリクロナール抗体を山羊で作製し、これとヒト乳癌の MCF-7 細胞とをプレインキュベートすると、 $E_2$  の MCF-7 細胞 ERC に対する親和性と結合部位数が減少したが、TAM の誘導体である抗E剤 (monohydroxytamoxifen) の ER に対する性質には影響を及ぼさなかつたことから、Eと抗E剤の腫瘍 ERC に対する結合には大きな差があると述べている<sup>3)</sup>。このような抗E剤の作用をみると、あるときはEと拮抗的に、またある場合はEと同じように働くことがあつてまことに興味深い。

Eと抗E剤の作用について、持続性エストラジオールの投与、またエストラジオール ( $E_2$ ) あるいは NAF の1回投与によるラット子宮 ER の変動をみた結果は既に報告したが<sup>4)</sup>、今回は  $E_2$  と NAF または TAM をそれぞれ単独で、あるいは併用して成熟の無処置および去勢メスラットに連続14日間注射し、発情期 (estrus)

表 1 実験群

	n	群 注 射		n	
		1	2		
無	5	1	対 照 (生食)	5	去
	5	2	E <sub>2</sub>	5	
処	5	3	NAF	6	
	5	4	TAM	6	
	5	5	E <sub>2</sub> +NAF	5	
	5	6	E <sub>2</sub> +TAM	5	

生食 0.2ml, E<sub>2</sub> 1 $\mu$ g/0.2ml, NAF 50 $\mu$ g/0.2ml, TAM 50 $\mu$ g/0.2ml

日数, 子宮湿重量, さらに子宮細胞内チミジンキナーゼ (TK) 活性を測定することによってそれらの作用を検討してみた。

### 実験材料および方法

SD 系メスラットで, 去勢するラット以外は性周期を 2 周期観察し, 周期が 4 日前後のものを使用した。無処置群では 74 日齢から, 去勢群では生後 60 日に両側卵巢を摘除し, その後 14 日間経過してから試料の注射を開始した。両群をさらにそれぞれ 6 群に分け, 表 1 に示すように対照群には生理的食塩水 0.2ml を, その他の群には 1  $\mu$ g の E<sub>2</sub> あるいは 50  $\mu$ g の NAF または 50  $\mu$ g の TAM をそれぞれ 0.2ml の生理的食塩水に懸濁して, 毎日 1 回単独あるいは併用で 14 日間連続筋注した。注射の期間は毎朝 10 時に腔スデアを採取し, 最後の注射から 30 時間後に頸椎脱臼により屠殺して子宮湿重量を秤量後, 子宮は TK 活性を測定するまで -80°C で保存した。TK 活性測定は既に報告<sup>9)</sup>したごとく Taylor らの方法<sup>6)</sup> に準じて行ない, また蛋白量測定は Lowry 法<sup>7)</sup> に従った。結果については F 検定法による分散の比較, ならびに t 検定法による平均値の比較を行なって有意差を判定した。

### 結 果

Estrus 日数: 14 日間の注射期間中の平均 estrus 日数を表 2 に示す。無処置群では E<sub>2</sub> 注射の 2 群で最も多く, NAF の 3 群, TAM の 4 群では対照の 1 群と比べても有意 (p<0.05) に少なかった。抗 E 剤を E<sub>2</sub> と併用した 5・6 群は E<sub>2</sub> 単独の 2 群より少なく, 対照の 1 群と差がなかった。特に 6 群では 2 群と比べて有意の差 (p<0.05) を認めなかった。去勢群では対照の 1 群は全く estrus を欠如していたが, 併用の 5・6 群が E<sub>2</sub> 単独の 2 群とほぼ等しく, 抗 E 剤単独の 3・4 群でもかなり

表 2 注射期間中(14日)の各群 estrus 日数の平均

群	無 処 置	去 勢
1 対 照	4.0 $\pm$ 1.26	0.0 $\pm$ 0.00
2 E <sub>2</sub>	7.2 $\pm$ 1.60	12.5 $\pm$ 0.87
3 NAF	1.2 $\pm$ 0.40	9.8 $\pm$ 2.54
4 TAM	1.6 $\pm$ 0.80	8.5 $\pm$ 1.38
5 E <sub>2</sub> +NAF	4.0 $\pm$ 3.79	12.8 $\pm$ 0.40
6 E <sub>2</sub> +TAM	3.4 $\pm$ 1.50	13.0 $\pm$ 0.00

表 3 各群子宮湿重量の平均 (mg/100g B.W.)

群	無 処 置	去 勢
1 対 照	159.8 $\pm$ 27.4	33.0 $\pm$ 6.28
2 E <sub>2</sub>	149.0 $\pm$ 24.1	94.9 $\pm$ 8.72
3 NAF	102.5 $\pm$ 16.3	69.9 $\pm$ 4.84
4 TAM	104.9 $\pm$ 12.2	66.8 $\pm$ 6.39
5 E <sub>2</sub> +NAF	111.2 $\pm$ 14.0	72.2 $\pm$ 3.58
6 E <sub>2</sub> +TAM	97.9 $\pm$ 10.6	85.4 $\pm$ 5.89

表 4 各群 TK 活性の平均 ( $\times 10^4$  dpm/mg protein/min)

群	無 処 置	去 勢
1 対 照	8.05 $\pm$ 3.28	2.31 $\pm$ 0.59
2 E <sub>2</sub>	5.02 $\pm$ 2.40	2.52 $\pm$ 0.35
3 NAF	5.40 $\pm$ 3.91	2.91 $\pm$ 0.69
4 TAM	3.71 $\pm$ 0.80	2.54 $\pm$ 0.32
5 E <sub>2</sub> +NAF	4.62 $\pm$ 1.91	2.40 $\pm$ 0.42
6 E <sub>2</sub> +TAM	3.27 $\pm$ 0.78	2.18 $\pm$ 0.24

の日数で出現した。

子宮湿重量: 表 3 に示すように無処置群では 3 群から 6 群まで, 単独にせよ併用にせよ, 抗 E 剤を注射した場合は対照の 1 群や E<sub>2</sub> 単独の 2 群と比べて有意 (p<0.05) の減少を認めた。一方去勢群では 2 群から 6 群まで, すべて対照の 1 群より有意 (p<0.01) に増加した。

TK 活性: 表 4 に示すように TK 活性は上昇せず, 無処置群では 2 群から 6 群まですべて対照群より有意 (p<0.05) に減少した。去勢群の場合は, すべて対照群と差がなかった。

### 考 察

無処置群の場合, NAF あるいは TAM を単独で注射すると, estrus は対照群および E<sub>2</sub> 単独注射群に比べて有意に減少した。またこれらの抗 E 剤を E<sub>2</sub> と併用した 5・6 群では, E<sub>2</sub> 単独の 2 群と比べて estrus がやはり減少していた。無処置ラットでは, 抗 E 剤が estrus に

関して E と拮抗的に作用したことになる。E<sub>2</sub> 単独注射の 2 群でも性周期は連続 estrus とはならず、2~3 日 estrus が続いた後に metestrus (発情後期) が 1~2 日発現し、その後は 15 日目に屠殺するまで estrus が続いた。Huggins はその著書<sup>9)</sup>の中で、卵巣を有するラットに強力な E である polyestradiol phosphate を注射した際の性周期について、まず estrus が現われ、それに metestrus が続くが、これは E が LH サージを起こし、この LH が卵巣に存在する黄体を刺激して黄体ホルモンを分泌させるためである、しかし、やがて黄体は消失してしまうから、その後は estrus が続くとして述べている。今回の E<sub>2</sub> 単独注射の結果からもこのことは推察される。しかし 3・4 群の抗 E 剤単独注射の場合はそれぞれ注射後 1~2 日 estrus が出現したが、その後は metestrus が連続した。一方去勢群では、E<sub>2</sub> 単独の 2 群はもちろん、抗 E 剤の単独あるいは E<sub>2</sub> との併用でもすべて estrus が出現した。すなわち E に対する抗 E 剤の拮抗作用はみられず、むしろ卵巣が欠如する場合、抗 E 剤は性周期に関して E と同じように作用していた。

子宮重量をみると、無処置群では対照の 1 群が最も重く、E<sub>2</sub> 単独注射の 2 群でも増量していない。これは E<sub>2</sub> を連続して注射した結果であると考えられる。われわれが持続性 E<sub>2</sub> を注射したラットの子宮内 ER を測定した結果<sup>4)</sup>では、血中 E<sub>2</sub> が高濃度の間は細胞質 ER (ERC) が減少して核内の ER (ERN) が高く、しかもこの ERN は E<sub>2</sub> の濃度が下降して ERC 値が回復してきてからも核内に長期間停留していた。すなわち細胞質でのセプターの新生成はみられても、核から細胞質へのレセプターの recycle が妨げられていた。高濃度の E<sub>2</sub> が持続して血中に存在するとき、E の作用はこのために抑止されるのであろう。乳癌の治療に E を使用する場合があるが、上の結果からも説明できよう。今回の子宮重量の減少も連続注射によつて高濃度の血中 E<sub>2</sub> が持続したためとも考えられる。抗 E 剤を注射した群では 3~6 群まで、すべて子宮重量の減少はさらに著しかった。E<sub>2</sub> および NAF のそれぞれ 1 回注射後の成熟去勢ラット子宮内 ER 測定の結果を前に報告<sup>4,9)</sup>したが、E<sub>2</sub> の場合は ERC, ERN とともに 24 時間後には注射前の値に回復していたのに対し、NAF の場合は 72 時間を経ても依然として ERC は低くて ERN が高く、ER が核内に停留し recycle が妨げられていることを示していた。このような抗 E 剤の連続投与では、E<sub>2</sub> の場合よりも子宮重量の減少が著しいものと思われる。去勢群の場合は両側卵巣を摘除してから注射開始までに 14 日を経過しているため、その間に子宮重量は著しく減少したはずである。対照の 1 群はそれからさらに 15 日を経過した時点で

の子宮重量を示す。E<sub>2</sub> あるいは抗 E 剤を連続注射した 2~6 群では、いずれも 1 群と比べて子宮重量が有意に増加していた。去勢ラットでは、子宮重量増加に関して抗 E 剤は E と同じように作用したといえよう。

TK のトータル活性については、無処置および去勢の両群ですべて増加は認められなかった。24 時間毎に E<sub>2</sub> 1 μg を 15 日間注射し、各注射の 24 時間後に子宮湿重量と子宮 TK 活性を測定した坂本の実験 (未発表) では、72 時間すなわち 3 回目以降の E<sub>2</sub> 注射では TK 活性が全く上昇せず、TK 活性の回復には E<sub>2</sub> 注射の間にある間隔が必要であると推測された。この点に関しては E<sub>2</sub> と抗 E 剤の間に差がないようである。無処置群で、抗 E 剤特に TAM の場合には、単独でも併用でも著しく TK 活性が減少したが、去勢群では差が認められなかった。

われわれは前に、成熟去勢ラット子宮における induced protein について E<sub>2</sub> と NAF の作用を比較するため、それぞれを 1 回注射して誘導されるプロゲステロンレセプター (Prg. R) を測定したところ、両者に差を認めなかった<sup>9)</sup>。また E<sub>2</sub> の 1 回注射で成熟去勢ラット子宮 TK のトータル活性は上昇するが、この上昇はカラムクロマトグラフィーで塩濃度 OM の溶出分画に起因することを認めた<sup>9)</sup>。成熟ラットではプロゲステロンが存在しないとき、E<sub>2</sub> は子宮内膜上皮のみ作用する。去勢ラットでは当然プロゲステロンが存在しないから、この TK アイソザイム活性は子宮内膜上皮に由来すると考えられる。NAF または E<sub>2</sub>+NAF では、この TK アイソザイム活性の上昇は認められなかった。この点から E<sub>2</sub> と NAF は成熟ラットの子宮内膜上皮に対する作用に差があるということも推測されよう。

しかし、今回の実験でみられた無処置あるいは去勢という状態による抗 E 剤の作用の違いが果して何に起因するのか、完全には明らかでない。無処置と去勢との差ということから、まずプロゲステロンの関与ということが考えられる。この点についてさらに検討したい。

## 文 献

- 1) Jensen, E. V. and Jacobson, H.: Basic guides to the mechanism of estrogen action. Recent progr. Hormone Res., 18: 387, 1962.
- 2) Miller, M. A. and Katzenellenbogen, B. S.: Characterization and quantitation of antiestrogen binding sites in estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines. Cancer Res., 43: 3094, 1983.
- 3) Tate, A. C., Greene, G., De Sombre, E. R., Jensen, E. V. and Jordan, V. C.: Differences between estrogen and antiestrogen-estro-

- gen receptor complexes from human breast tumors identified with an antibody raised against the estrogen receptor. *Cancer Res.*, 44 : 1012, 1984.
- 4) Okamoto, R. and Imamura, Y. : Interaction of estrogens or antiestrogen with estrogen receptor in the rat uterus. *Acta Histochem. Cytol.*, 15 : 554, 1982.
  - 5) Yamada, N., Sakamoto, S., Sawasaki, Y., Nakajima, H. and Okamoto, R. : Differences in the induction of thymidine kinase isozymes in estrogen-treated immature and adult rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 629 : 61, 1980.
  - 6) Taylor, A. T., Stafford, M. A. and Jones, O. W. : Properties of thymidine kinase partially purified from human fetal and adult tissue. *J. Biol. Chem.*, 247 : 1930, 1972.
  - 7) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 265, 1951.
  - 8) Huggins, C. B. : Acceleration and extinction of mammary cancer. *Experimental leukemia and mammary cancer*. University of Chicago Press, U. S. A. 1979, p. 105-106. (岡本良平監訳 : 実験白血病と乳癌, 篠原出版, 1981, p. 96)
  - 9) 今村好久 : 幼若および成熟去勢ラット子宮の Estrogen Receptor, Progesterone Receptor, Thymidine Kinase 活性に与える Estradiol と Nafoxidine の効果, 思春期学, 1 : 39, 1982.

## Antiestrogenic and estrogenic effects of antiestrogen on estrus and uterus of intact and ovariectomized rats

**Ryohei Okamoto, Shuji Sassa,  
Shinobu Sakamoto and Yoshihisa Imamura**

Department of Endocrinology, Medical  
Research Institute, Tokyo Medical and  
Dental University, Tokyo

Such antiestrogens as nafoxidine (NAF) and tamoxifen (TAM) are useful in the treatment of endocrine-responsive cancers of breast or uterine endometrium. These agents exert their antiestrogenic effects through the estrogen receptor system of target cells, but they display estrogenic action in some circumstances.

Intact and ovariectomized SD female rats received daily injection with estradiol or antiestrogen (NAF or TAM) separately or in combination for 14 days. Estrous cycle during the injection, and weight and thymidine kinase activity of the uterus at 30 hr after the last injection were studied.

NAF and TAM appeared to act antiestrogenic in intact rat, but estrogenic in ovariectomized rat. This feature was particularly distinct in estrous cycle.

(受付 : 昭和59年 5 月 2 日)

# Etiological Study on Hyposecretion of Progesterone in the Aspect of Echographically Measured Follicle Diameters and Serum Estradiol and Progesterone In Patients Categorized by BBT Patterns

Takashi KANO and Kiyoshi NISHIKAWA

Department of Gynecology, Nishikawa Clinic  
5-1, Bingo-machi, Higashi-ku, Osaka, 541, Japan

**Abstract:** Luteal insufficiency was etiologically studied by investigating echographically measured maximum follicle diameters and serum levels of estradiol and progesterone in 35 patients with normal menstrual cycles and 63 patients with abnormal BBT patterns which seemed to be caused by hyposecretion of progesterone. The patients with abnormal BBT patterns were categorized into 4 groups: the hyperthermic base lines were high, short-lasting and steady in Type A, high, long-lasting and fluctuating in Type B, low, short-lasting and steady in Type Ca, and low, long-lasting in Type Cb. The main causes of hyposecretion of progesterone were considered to be: early luteolysis in Type A, early luteolysis and follicular immaturity in Type B and Ca and follicular immaturity in Type Cb.

**Key words:** Luteal insufficiency, Echography, Follicle, Estradiol, Progesterone  
(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 5-9, 1985)

## Introduction

Hyposecretion of progesterone of the corpus luteum is not the only cause of endometrial abnormality in the secretory phase because abnormality in endometrial progesterone receptor<sup>1)</sup> can also be responsible for this pathological condition. For correct understanding of etiology of luteal insufficiency, ovarian hyposecretion of progesterone and abnormality in secretory phase of endometrium should separately be considered.

We<sup>2)</sup> reported that hyposecretion of progesterone, hypoovarianism in ovulatory cycle, was attributable to follicular immaturity or to early luteolysis or both, and suggested that the main cause of hyposecretion of progesterone in a given patient could be suspected was to substantiate our previous suggestion<sup>2)</sup> about causes of progesterone hyposecretion by comparing endocrinological behaviors and echographically measured maximum follicle diameters. It was also defined only by

measuring maximum follicle diameters and analyzing BBT patterns.

## Materials and Methods

### 1) Patients

Thirty-five patients with normal menstrual cycles and 63 patients, with abnormal BBT patterns which seemed to be caused by hyposecretion of progesterone<sup>2)</sup>, who had attended the fertility clinic of Nishikawa Clinic were reviewed. The patients with abnormal BBT patterns were categorized into the following four types<sup>2)</sup>: Type A-The hyperthermic base lines lay not less than 0.3°C above the hypothermic base lines, and the hyperthermic phase lasted steadily for less than 10 days (20 patients); Type B-the hyperthermic phase lasted for 10 days or more with transient thermal depressions of not less than 0.1°C (16 patients); Type Ca-the hyperthermic base lines lay less than 0.3°C above the hypothermic base lines, and the hyperthermic

phase lasted for less than 10 days (13 patients); Type Cb-the hyperthermic phase for lasted for 10 days or more (14 patients).

## 2) Echography

A real time linear scanner (Yokogawa, Model MEV-1517) with a 3.5Hz rotating head transducer was used for echographic studies. The urinary bladder of the patients were filled with spontaneous urine or 2% boric acid dissolved in water before scanning. Follicle diameters were daily measured until follicle rupture or appearance of the early corpus luteum was confirmed on the basis of established echographic criteria<sup>3-5)</sup>.

## 3) Hormone assay

Serum estradiol was determined by radioimmunoassay using CIS Kit on the day when the maximum follicle diameters were obtained. Serum progesterone was also determined by radioimmunoassay using CIS Kit on BBT +7 and +8 days, and expressed as the means of the two days<sup>2,6)</sup>. The results were expressed as the Mean  $\pm$  S. D. for each group.

## Results

In the patients with normal menstrual cycles, significant correlations between maximum follicle diameters and the levels of estradiol ( $p < 0.01$ , Fig. 1) and progesterone ( $p < 0.001$ , Fig. 2) were demonstrated. Estradiol and progesterone levels were significantly correlated ( $r = 0.483$ ,  $p < 0.01$ ) each other.

Maximum follicle diameters were significantly smaller in the patients of Type A, B, Ca and Cb than in those with normal menstrual cycles ( $p < 0.01$  for the former two, and  $p < 0.001$  for the latter two, Fig. 3 and 4). When compared among the patients with abnormal BBT patterns, Maximum follicle diameters in Types Ca and Cb were significantly smaller than those in Types A and B (Ca vs. A:  $p < 0.01$ , Ca vs. B:  $p < 0.01$ , Cb vs. A:  $p < 0.05$ , Cb vs. B:  $p < 0.05$ , Fig. 3 and 4).

Estradiol levels were significantly lower in the patients of Types B, Ca and Cb than in those with normal menstrual cycles ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.001$ , and  $p < 0.01$ , respectively, Fig. 3). Estradiol in Types Ca and Cb were significantly lower than those

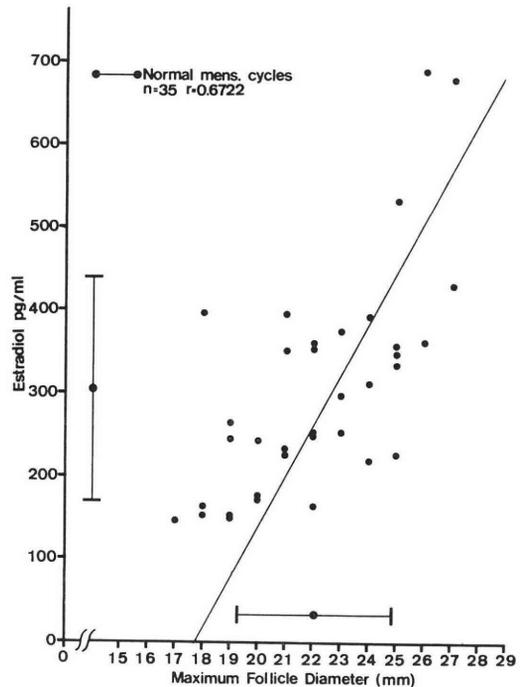


Fig. 1 Relation between serum estradiol ( $M \pm S.D.$ ) and echographically measured maximum follicle diameters ( $M \pm S.D.$ ) in the patients with normal menstrual cycles

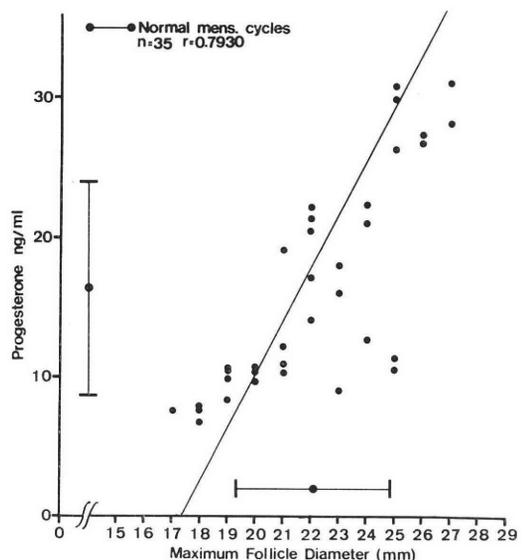


Fig. 2 Relation between serum progesterone during BBT Days +7 and +8 (average of the two days,  $M \pm S.D.$ ) and echographically measured follicle diameters ( $M \pm S.D.$ ) in the patients with normal menstrual cycles

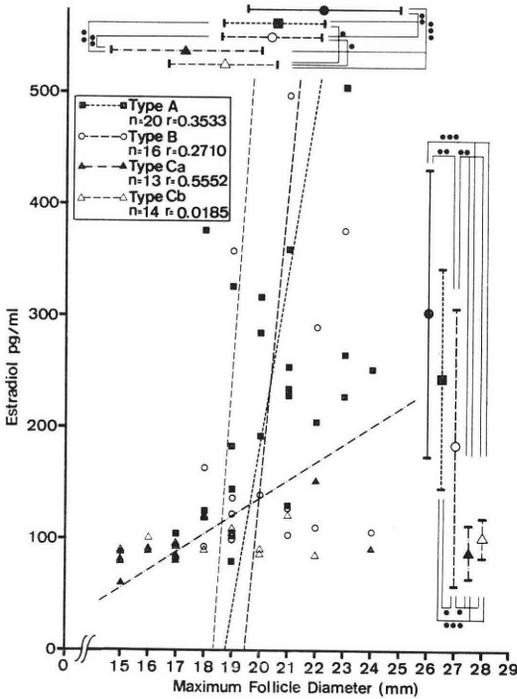


Fig. 3 Relations between serum estradiol ( $M \pm S. D.$ ) and echographically measured maximum follicle diameters ( $M \pm S. D.$ ) in the patients with various types of BBT patterns. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ : significantly different

in Types A and B (C a vs. A:  $p < 0.001$ , C a vs. B:  $p < 0.05$ , C b vs. A:  $P < 0.001$ , C b vs. B:  $p < 0.05$ , Fig. 3).

Progesterone levels were significantly lower in the patients of Types A, B, Ca and Cb than in those with normal menstrual cycles ( $p < 0.001$  for all comparisons, Fig. 4). Progesterone in Types Ca and Cb were significantly lower than the patients in Type B ( $p < 0.001$  and  $p < 0.05$ , respectively, Fig. 4).

Among the patients with abnormal BBT patterns, significant correlation between maximum follicle diameters and estradiol levels was detected only in Type Ca ( $p < 0.05$ , Fig. 3). Progesterone levels was significantly correlated with maximum follicle diameters only in Type Cb ( $p < 0.05$ , Fig. 4).

### Discussion

Follicular insufficiency can be a cause of luteal insufficiency (hyposecretion of proge-

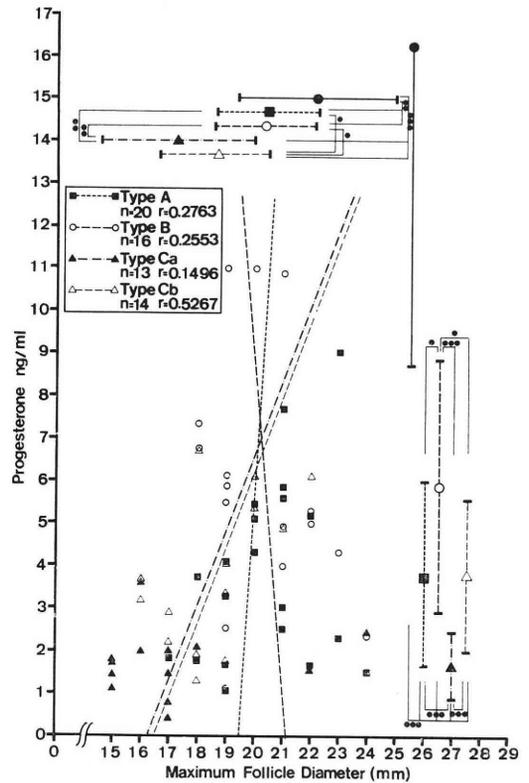


Fig. 4 Relations between serum progesterone during BBT Days +7 and +8 (average of the two days,  $M \pm S. D.$ ) and echographically measured maximum follicle diameters ( $M \pm S. D.$ ) in the patients with various types of BBT patterns. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ : significantly different

sterone) because follicular development, ovulation and formation of the corpus luteum construct a series of ovarian function.

Previous investigations demonstrated that echographically measured follicle diameters were significantly correlated with serum estradiol in the women with normal menstrual cycles<sup>7)</sup> and in the patients receiving clomiphene or human menopausal gonadotropine<sup>8)</sup>. In the present study, significant correlation between maximum follicle diameters and serum levels of estradiol and progesterone were demonstrated in the patients with normal menstrual cycles. These findings suggest that luteal progesterone secretion was highly related to echographically measured diameters of follicles. We<sup>2)</sup> previously suggested that the BBT patterns of Type A reflect hyposec-

retion of progesterone mainly produced by early luteolysis, Type C being produced by follicular immaturity, and Type B by both of the two. This hypothesis roughly supported by the results of the present study adding echographic information about follicle diameters to endocrinological information. In the patients of Type A, the significant decreases in progesterone were considered to be due to early luteolysis although follicular immaturity was also partially involved in their abnormal BBT patterns as in all the patients of the other types. This consideration is based on the finding that follicle diameters in Type A were larger than those in Type Ca and Cb and that estradiol levels in Type A was not significantly different than patients with normal menstrual cycles. In the patients of Type Ca and Cb, on the other hand, follicular immaturity may have been predominantly responsible for their significant decreases in progesterone levels because their follicle diameters were significantly smaller than those in patients of Types A and B as well as than those in the patients with normal menstrual cycles. In Type Ca, the low levels of progesterone are suggestive of an important role of early luteolysis. Type B seemed to lie between Type A and C. The hyposecretion of progesterone in Types A, B and Cb may have been caused by functional abnormalities in follicles, for example, by a decreased number of granulosa cells because estradiol levels and maximum follicle diameters were not significantly correlated with each other.

BBT patterns in the patients with hyposecretion of progesterone under hyperprolactinemia are mostly categorized into Type C (a and b). Decreased progesterone secretion in these cases is considered to be attributed to inhibitory effect of prolactin on follicular growth<sup>2,9)</sup>. In patients with hyperprolactinemia, BBT patterns of whom are categorized into Type A or B, their insufficient secretion of progesterone might be ascribable to luteolytic effect of prolactin<sup>10,11)</sup>.

In conclusion, two main causes of hyposecretion of progesterone might be morphological or functional follicular immaturity and early luteolysis. For the etiological differentiation of the two, echographic measurement of maximum follicle diameters and BBT

analysis are necessary at least. These procedures will supply information useful for the treatment of hyposecretion of progesterone<sup>2)</sup>.

### References

- 1) Tamaya, T.: Gynecological tumor and steroid receptor, Acta. Obstet. Gynaec. Jpn, 35 : 1146, 1983.
- 2) Kano, T., Nishikawa, K., Kurobe, Y. and Ishii, K.: Etiology of luteal insufficiency (hyposecretion of progesterone) in relation with BBT patterns, Jap. J. Fertil. Steril, 29 : 364, 1984.
- 3) Queenan, J. T., O'Brien, G. D., Bains, L. M., Simpson, J., Collins, W. P. and Campbell, S.: Ultrasound scanning of ovaries to detect ovulation in women, Fertil. Steril, 34 : 99, 1980.
- 4) Hall, D. A., Hann, L. E., Ferrucci, J. T., Black, E. B., Braitman, B. S., Crowley, W. F., Nikrui, N. and Killey, J. A.: Sonographic morphology of the normal menstrual cycle. Radiology, 133 : 185, 1979.
- 5) Renaud, R. L., Macler, J., Dervain, I., Ehrot, M., Aron, C., Plas-Roser, S., Spira, A. and Pollack, H.: Echographic study of follicular maturation and ovulation during the normal menstrual cycle, Fertil. Steril, 33 : 272, 1980.
- 6) Kano, T. and Nishikawa, K.: Bromocriptine therapy of luteal insufficiency accompanied with hyperprolactinemia in the follicular phase, Acta. Obstet. Gynaecol. Jpn, 35 : 975, 1983.
- 7) Hackloer, B., Fleming, R., Robinson, H., Adam, A. and Coutt, S.: Correlation of ultrasonic and endocrinologic assessment of human follicular development, Am. J. Obstet. Gynecol, 135 : 122, 1979.
- 8) Vargyas, J. M., Marrs, R. P., Kletzky, O. S. and Mishell, D. R.: Correlation of ultrasonic measurement of ovarian follicle size and serum estradiol levels in ovulatory patients following clomiphene citrate for *in vitro* fertilization, Am. J. Obstet. Gynecol, 144 : 569, 1982.
- 9) Aso, T.: The influence of hyperprolactinemia on human and baboon ovarian function, Acta. Obstet. Gynaecol. Jpn, 32 : 1239, 1980.
- 10) McNatty, K. P., Swaers, R. S. and MacNeilly, A. S.: A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle, Nature, 250 : 653, 1974.
- 11) Kano, T., Nishikawa, K., Kanda, T., Miyazaki, K. and Sugimoto, O.: Plasma prolactin in luteal insufficiency and treatment with

bromocriptine, J. Fertil. Steril, 28 : 26, 1983.

**超音波断層法による卵胞最大径と血中 estradiol と progesterone 値の検討による BBT 型で分類した黄体機能不全症 (progesterone 分泌不全症) の etiology の研究**

西川婦人科内科クリニック, 婦人科  
假野隆司, 西川 潔

概 要

黄体の progesterone 分泌不全に起因すると考えられる BBT 異常 4 型および正常月経周期 35 例について, 超

音波断層法により測定した最大卵胞径, 血中 estradiol および BBT + 7, + 8 day の progesterone 値を検討することで黄体機能不全症 (progesterone 分泌不全症) の etiology を考察した. この結果 A 型 (低温基線より 0.3°C 以上の高温相は安定しているが持続日数が 10 日未満の 20 症例) は early luteolysis が, B 型 (低温基線より 0.3°C 以上の高温相は 10 日以上持続するが 0.1°C 以上の陥凹を認める 16 症例) は卵胞機能不全と early luteolysis が, Ca 型 (低温基線より 0.3°C 未満の高温相は安定しているが持続日数が 10 日未満の 13 症例) は卵胞成熟不全と early luteolysis が, Cb 型 (低温基線より 0.3°C 未満の高温相は 10 日以上持続するが 0.1°C 以上の陥凹を認める 14 症例) は卵胞成熟不全が progesterone 分泌不全症の主因と考えられた.

(受付: 昭和 59 年 6 月 8 日)

# Danazol による FSH および LH 放出の抑制

## Danazol Suppresses Pituitary FSH and LH Release

東京大学医学部附属病院分院産婦人科

岡村 隆 竹内 亨 西井 修

Takashi OKAMURA Tooru TAKEUCHI Osamu NISHII

柳 沼 忒 小林 拓郎

Tsutomu YAGINUMA Takuro KOBAYASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,  
University of Tokyo at Mejirodai, Tokyo, Japan

富山医科薬科大学医学部産婦人科学教室

長 阪 恒 樹

Tsuneki NAGASAKA

Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine,  
Medical and Pharmaceutical University of Toyama, Toyama, Japan

Danazol のゴナドトロピン放出に及ぼす影響を検討するため、9例の閉経あるいは卵巣摘出婦人のうち4例（3例の両側卵巣摘出婦人を含む）に Danazol 1日400mg を、5例（2例の両側卵巣摘出婦人を含む）に Danazol 1日600mg をそれぞれ2週間連続投与した。Danazol 投与前と投与終了後に20分間隔2時間計7回、採血をした。これら7回の血中 FSH および LH を RIA で同時に測定し、7回の平均値を Danazol 投与前後において比較した。Danazol 400mg 投与群では FSH は投与前に比較して投与後は全例有意 ( $p < 0.01$ ) に低下した。LH は1例のみ有意な減少したにすぎなかった。Danazol 600mg 投与群では、全例において FSH が、4例中3例において LH が有意に低下した ( $p < 0.005$ )。これらの結果は、Danazol は下垂体 FSH および LH の放出を明らかに抑制することができることを示す。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 10-16, 1985)

### 緒 言

子宮内膜症に対して Danazol は秀れた効果を発揮する。しかしその作用機序は十分に解明されていない。元来 Danazol は「抗ゴナドトロピン作用」すなわちゴナドトロピン放出抑制作用により、かかる効果を発揮すると考えられた。しかしこれに関する最近の結果は、Danazol のこの「抗ゴナドトロピン作用」と必ずしも一致しない。この原因の一部は、卵巣ステロイドホルモンによる下垂体機能の修飾とゴナドトロピン、特に LH の血中濃度における pulse の存在によると考えられる。

そこで、この研究では、Danazol のゴナドトロピン放

出に対する作用を決定するために、閉経婦人あるいは卵巣摘出婦人に Danazol を投与し、それぞれの婦人において投与前後に20分間隔で2時間採血し、これらの投与前後の平均値を比較した。

### 対象と方法

閉経婦人あるいは両側卵巣摘出婦人（摘出後1カ月上、59歳~75歳）に Danazol 1日400mg あるいは600mg を2週間連日投与した。Danazol 投与前日と投与終了の翌日に、前腕静脈に留置した19G-heparinized butterfly needle から20分間隔で7回採血した。血液の血清をホルモン・アッセイまで凍結保存した。

FSH および LH は RIA (FSH および LH「第一」RIA キット使用) により一括して測定した。

Student's t テストにより、Danazol 投与前後における FSH および LH 濃度の平均の差を検定した。

結 果

1. Danazol 400mg 投与群 (表 1)

1) FSH

4 例の全症例において血中 FSH 濃度は有意に低下した。

表 1 Danazol 400mg/日 投与群

症例	ホルモン	投与前*	投与後*	有意性
1	FSH	53.22±2.98	10.61±0.20	減少 P<0.005
	LH	52.13±7.01	34.93±6.11	NS
2	FSH	133.97±4.26	82.75±1.64	減少 P<0.005
	LH	114.11±17.81	101.21±5.90	NS
3	FSH	58.28±0.94	42.02±0.96	減少 P<0.005
	LH	45.92±3.41	41.26±3.30	NS
4	FSH	113.85±2.38	102.28±2.13	減少 P<0.01
	LH	161.84±13.48	111.45±4.03	減少 P<0.01

\* means±SDmIU/ml

表 2 Danazol 600mg/日 投与群

症例	ホルモン	投与前*	投与後*	有意性
5	FSH	32.88±0.50	3.65±0.08	減少 P<0.005
	LH	193.55±8.72	52.32±3.81	減少 P<0.005
6	FSH	34.17±0.76	18.21±0.65	減少 P<0.005
	LH	34.70±3.42	18.11±1.55	減少 P<0.005
7	FSH	91.57±3.02	14.71±0.81	減少 P<0.005
	LH	56.18±4.30	7.74±0.40	減少 P<0.005
8	FSH	188.55±3.17	141.25±5.46	減少 P<0.005
	LH	142.43±3.82	104.41±4.62	減少 P<0.005
9	FSH	40.70±0.84	35.37±0.41	減少 P<0.005
	LH	46.38±4.90	49.71±4.36	NS

\* mean±SD mIU/ml

2) LH

4 症例中 1 例のみにおいて血中 LH 濃度は有意に減少し、残り 3 例は有意差を示さなかった。

2. Danazol 600mg 投与群 (表 2)

1) FSH

血中 FSH 濃度は 5 症例の全例において有意に減少した。

2) LH

血中 LH 濃度は 5 症例中 4 例において有意に減少した。

考 察

Danazol の子宮内膜症に対する作用機序としては、当初、適切な用語とは思わないが、とかく「抗ゴナドトロピン作用」によるとされてきた。確かに Danazol はおそらく視床下部に作用して LH の mid cycle surge を抑制し、排卵を抑制する。しかし tonic gonadotropin release に対しての結果は一致していない。表3, 4およ

び 5 はこれらの結果を示したものである。閉経前の婦人に投与した場合に、投与前後において血中 FSH および LH ともに不変とする報告が 21, LH は不変で FSH が低下するとした報告が 3, LH は不変で FSH が上昇するという報告が 1 であった (表 3)。同様な場合に、血中 FSH および LH ともに低下するとした報告が 6 例であった。これらの投与期間は 6 日から 6 カ月、投与量は 1 日 50mg から 1600mg までであった。一方、閉経後の婦人に投与した場合は 2 報告あり、いずれも、血中 FSH および LH ともに低下するとした (1 日 600mg の 15 日間 (5 例) と 1 日 400mg の 7 日間 (4 例) 投与であった (表 4)。逆に閉経前の婦人に投与した時に、これらの血中ホルモン濃度が増加するとした報告が 2 あった (表 5)。

最近 LH の放出の pulsatile pattern が注目されている。それによると LH は約 1.5~3 時間に 1 回の頻度で放出される。したがって pulse peak と pulse nadir の LH 値の差は大きいことがある。それ故、血中 LH レベルを決定するには 15~20 分間隔で長時間採血し、それらの LH の平均を求めることが望ましい。前述の表 3 および 4 の諸報告例においては、多くの場合、1 日 1 回の採血となつている。これらの報告において、Danazol のゴナドトロピンに対する影響が一定しない一つの理由は、かかる採血法によるものである。このために、われわれの今回の研究においては 20 分間隔に 7 回採血した。さらに下垂体におけるゴナドトロピン分泌は卵巣ステロイドホルモンの影響を大いに受けている<sup>46)</sup>。したがって今回の研究においては、Danazol の卵巣に対する作用からの下垂体機能の間接的影響を避けるために、われわれは閉経婦人あるいは両側卵巣摘出婦人を対象にした。

Danazol 1 日 400mg 投与群では血中 FSH は 4 例全例有意に減少し (p<0.01~p<0.05), 血中 LH は 4 例中 1 例のみが有意に減少し (p<0.01), 残り 3 例は変化を認めなかった。Danazol の 1 日 600mg 投与群では血中 FSH は 5 例全例有意に減少し (p<0.005), 血中 LH は 5 例中 4 例が有意に減少し (p<0.005), 残り 1 例は変化を認めなかった。すなわち FSH 分泌は比較的少量の Danazol 投与によつても確実に抑制され得るが、LH 分泌は比較的大量の Danazol によつてのみ確実に抑制された。

以上の結果は、ヒトに対する Danazol の治療によつて FSH および LH の放出が確実に抑制されたことを示した初めての決定的証拠である。これらの Danazol 投与中 LH-RH に対する下垂体反応性は抑制されなかった (未発表)。Danazol の FSH と LH の放出抑制はおそらく、Danazol の視床下部レベル以上に対す

表3 Danazol 投与により Gonadotropin に変化を認めなかった報告例

	case	dose (mg/day)	duration	Before		After		
				FSH	LH	FSH	LH	
Premenopausal Women								
Guillebaud, J. <sup>1)</sup>	14	400	18D	—	—	—	—	NS
Chimbira, T.H. <sup>2)</sup>	14	400	12W	—	—	—	—	NS
Greenblatt, R.B. <sup>3)</sup>	90	100~800	20D~50D	—	—	—	—	NS
Lieberman, B.A. <sup>4)</sup>	6	800	7 D	18.0±10.55	0.91±0.17	19.83±6.01	0.73±0.24	NS
Wentz, A.C. <sup>5)</sup>	4	800	28 D	220n	200n	200n	180n	F: ↓, L: NS
Andrew, M.C. <sup>6)</sup>	10	800	12W	—	—	—	—	F: ↓, L: NS
Wood, G.P. <sup>7)</sup>	5	800	6 M	8	10	4	10	F: ↓, L: NS
Rannevik, G. <sup>8)</sup>	20	600	6 M	—	—	—	—	F: ↑, L: NS
Rönnerberg, L. <sup>9)</sup>	20	600	6 M	—	—	—	—	NS
Mettler, L. <sup>10)</sup>	32	400	6 M	—	—	—	—	NS
Chimbira, T.H. <sup>11)</sup>	10	400	10W	—	—	—	—	NS
Nagata, Y. <sup>12)</sup>	46	300~400	20W	—	—	—	—	NS
Sato, Y. <sup>13)</sup>	20	600	6 M	—	—	—	—	NS
Hirschowitz, J.S. <sup>14)</sup>	9	400	3 M	—	21.8	—	15.8	F: NS, L: P<0.1
Dmowsky, W.P. <sup>15)</sup>	8	800	3 M	69.3±11.1n	150.0±27.5n	52.1±6.7n	95.7±11.6n	NS
Colle, M.L. <sup>16)</sup>	4	50~200	20D~40D	8	10	7	13	NS
Floyd, W.S. <sup>17)</sup>	20	200~800	60D~180D	9.5	13	11.3	18	NS
Goebel, R. <sup>18)</sup>	47	400~800	14D~42D	—	—	—	—	NS
Lauersen, N.H. <sup>19)</sup>	11	400	180D	6.3	8	7.3	9	NS
Stillman, R.J. <sup>20)</sup>	5	600	6 D	5.2	6.12	5.4	7.12	NS
VanDijk, J.G. <sup>21)</sup>	21	200	100D	8	25	12	32	NS
Lind, T. <sup>22)</sup>	3	800	3 M	10.9	9.3	9.0	33	NS
Leppäuto, J. <sup>23)</sup>	7	600	6 M	—	—	—	—	NS
Frasser, I.S. <sup>24)</sup>	16	600~800	2 M~3 M	6.8±1.1	10.0±1.1	5.3±0.8	14.5±2.5	NS
Reyniak, J.V. <sup>25)</sup>	4	400~1600	2 W~6 W	—	—	—	—	NS
Men								
Sherins, R.J. <sup>26)</sup>	3	200	100D	—	7	—	5	NS
	5	600	100D	—	8.8	—	4.2	NS
Monkey								
Ash, R.H. <sup>27)</sup>	5	400	黄体期のみ	—	—	—	—	NS
Luciano, A.A. <sup>28)</sup>	7	800	2 M	5±7	22±4	5±1	17±3	NS
Rat								
Menson, M. <sup>29)</sup>	下垂体	5×10 <sup>-6</sup> M		—	—	—	—	NS

D: day, W: week, M: month, n: ng/ml (その他はmIU/ml), ↓: 減少傾向あるもNS

—: 記載なし, F: FSH, L: H,

↑: 増加傾向あるもNS

表 4 Danazol 投与により Gonadotropin が減少した報告例

	case	dose (mg/day)	duration	Before		After		
				FSH	LH	FSH	LH	
Premenopausal Women								
Okamura, T. <sup>33)</sup>	4	600	3 W	20.8±7.0	18.8±7.3	14.6±5.6	12.5±3.3	F: ↓P<0.05, L: ↓
Braun, P. <sup>34)</sup>	5	800	9 D	8.5±1.4	9.0±1.0	7.3±1.7	8.4±1.1	F: ↓, L: ↓P<0.05
Laversen, N. <sup>35)</sup>	30	50~200	6 M	—	—	—	—	F: ↓, L: ↓
Greenblatt, R.B. <sup>36)</sup>	1	800	6 Y	—	—	—	—	F: ↓, L: ↓
Hirakawa, S. <sup>37)</sup>	21	400	3 M	—	—	—	—	F: ↓, L: ↓
Tamaki, Y. <sup>38)</sup>	5	400~600	16W~24W	19.9±8.53	22.0±5.06	14.7±6.96	15.0±8.23	F: ↓, L: ↓
Yamada, Y. <sup>39)</sup>	3	400	3.5M~6M	—	—	—	—	F: ↓, L: ↑
Postmenopausal Women								
Franchimont, P. <sup>40)</sup>	5	600	15 D	49.6±8.21	15.5±2.8	24.2±7.7	9.98±2.8	F: ↓P<0.05 L: ↓P<0.05
Fraser, I.S. <sup>41)</sup>	4	400	7 D	60.97	38.55	52.66	36.80	F: ↓P<0.01 L: ↓P<0.05 *1
(ca)								
Men								
Buckle, R. <sup>42)</sup>	14	300~800	6 M	5.1±0.6	9.3±0.8 54~75%減 (尿中)	2.1±6.4 5.1~12.7%減 (尿中)	3.7±0.5	
Franchimont, P. <sup>40)</sup>	5	600	15 D	4.62±0.73	7.38±0.6	2.42±0.53	3.54±0.52	F: ↓P<0.05 L: ↓P<0.01
Sherins, R.J. <sup>27)</sup>	4	600	17W	12.57±5.83	—	5.65±5.83	—	F: ↓P<0.05 L: ↓P<0.1
(ca)								
			11W		8.8±3.0 100±38		4.2±1.3 7±3	F: ↓P<0.05 L: ↓P<0.01
Rat								
Eldridge, J.C. <sup>43)</sup>	(ca)	10mg/kg/d	6 D	1600n	1200n	300n	25n	F: ↓P<0.01 L: ↓P<0.01
Raj, S.G. <sup>44)</sup>		20mg/kg/d	6 W		150±93.9n		5±8.6n	L: ↓P<0.01
Krey, L.C. <sup>45)</sup>	(ca)	10~50mg/kg	8 D					L: ↓signif.
Monkey								
Ash, R.H.	(ca)	400	19 D	—	—	—	—	F: ↓signif. L: ↓signif.

ca : castration, D : day, W : week, M : month, Y : year, n : ng/ml (その他はmIU/ml), F : FSH, L : LH, — : 記載なし

↓ : 減少するもNS, ↑ : 増加するもNS, signif. : significant, \*1 : 1例のみ有意差あり

表5 Danazol 投与により Gonadotropin が増加した報告例

	case	dose (mg/day)	duration	Before		After		
				FSH	LH	FSH	LH	
Premenopausal Women								
Dhont, M <sup>30)</sup>	16	400	2 M	8.4±1.4	9.4±1.7	13.6±1.4	16.7±2.8	F: ↑P<0.05 L: ↑P<0.05
Bohnet, H.G. <sup>31)</sup>	10	800	6 M	344±47.6n	48.9±10.9n	653.1±91.5n	53.5±9.1n	F: ↑P<0.01 L: NS
Rat								
Barbieri, R.L. <sup>32)</sup>	-	1.25~5.0 mg/kg		-	-	-	-	F: ↑ L: ↑

M: month, n: ng/ml (その他はmIU/ml), F: FSH, L: LH, -: 記載なし

る作用と考えられる<sup>46)</sup>。

本研究中、採血に協力された医師および看護婦、そしてホルモン測定に協力された松本敏子嬢に深謝致します。

文 献

- 1) Guillebaud, J., Fraser, I. S., Thoburn, G. D. and Jenkin, G.: Endocrine effects of Danazol in menstruating women. *J. Int. Med. Res.*, 5: 57, 1977.
- 2) Chimbira, T. H., Cope, E., Anderson, A. B. M. and Bolton, F. G.: Preliminary results in the treatment of menorrhagia with Danazol. *J. Int. Med. Res.*, 5: 98, 1977.
- 3) Greenblatt, R. B. and Gutierrez, M.: Summation of the role of Danazol in therapy of endometriosis. Recent advances in endometriosis, edited by Greenblatt, R. B. (*Excerpta Medica*), 116, 1975.
- 4) Lieberman, B. A., Murrax, M. A.F. and Jacobs, H. S.: Selective inhibition by Danazol of follicle stimulating hormone during the luteal phase. *Brit. J. Obstet. Gynecol.*, 84: 55, 1977.
- 5) Wentz, A. C., Jones, G. S. Sapp, K. C. and King, T. M.: Progestational activity of danazol in the human female subjects. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 126: 378, 1976.
- 6) Andrew, M. C. and Wentz, A. C.: The effects of Danazol on gonadotropins and steroid blood levels in normal and anovulatory women. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 121: 817, 1975.
- 7) Wood, G. P., Wu, C. H., Flickinger, G. L. and Mikhail, G.: Hormonal changes associated with Danazol therapy. *Obstet. Gynecol.*, 45: 302, 1975.

- 8) Rannevik, G.: Hormonal metabolic and clinical effects of Danazol in the treatment of endometriosis. *Postgraduate Med. J.*, 55: 14, 1979.
- 9) Roennberg, L., Yloestalo, P. and Jaervinen, P. A.: Effects of Danazol in the treatment of severe endometriosis. *Postgraduate Med. J.*, 55: 21, 1979.
- 10) Mettler, L. and Semm, K.: Clinical and biochemical experiences with Danazol in the treatment of endometriosis in case with female infertility. *Postgraduate Med. J.*, 55: 27, 1979.
- 11) Chimbira, T. H., Anderson, A. B. M., Cope, E. and Turnbull, A. C.: Preliminary results of clinical and endocrine studies in the treatment of menorrhagia with Danazol. *Postgraduate Med. J.*, 55: 27, 1979.
- 12) 永田行博, 中村元一, 楠田雅彦: 子宮内膜症に対する Danazol の効果と副作用, *日本不妊会誌*, 26: 61, 1981.
- 13) 佐藤芳昭, 石黒隆雄, 星野明生, 須藤寛人, 高橋 威, 竹内正七: 子宮内膜症に対する効果とその内分泌学的背景について, *日不妊会誌*, 26: 68, 1981.
- 14) Hirschowitz, J. S., Soler, N. G. and Wortzman, J.: Sex steroid levels during treatment of endometriosis. *Obstet. Gynecol.*, 54: 448, 1979.
- 15) Dmowski, W. P., Headley, S. and Radwanska, E.: Effects of Danazol on pulsatile gonadotropin patterns and on serum estradiol in normally cyclic women. *Fertil. Steril.*, 39: 49, 1983.
- 16) Colle, M. L. and Greenblatt, R. B.: Contraceptive properties of Danazol. *J. Reprod. Med.*, 17: 98, 1976.
- 17) Flويد W.S.: Danazol: Endocrine and

- endometrial effects. *Int. J. Fertil.*, 25 : 75, 1980.
- 18) Goebel, P. and Rjosk, H. K. : Laboratory and clinical studies with the new anti-gonadotropin, Danazol. *Acta Endocrinol.*, 85 : 34, 1977.
- 19) Lauersen, N. H. and Wilson, K. H. : The effects of Danazol in the treatment of chronic cystic mastitis. *Obstet. Gynecol.*, 48 : 93, 1976.
- 20) Stillman, R. J., Fench, M., Schiff, I., Barbieri, R. L. and Tulchinsky, D. : Inhibition of adrenal steroidogenesis by Danazol *in vivo*. *Fertil. Steril.*, 33 : 401, 1980.
- 21) van Dijk, J. G., Frohlich, M., Braud, E. G. and van Hall, E. V. : The treatment of unexplained infertility by Danazol. *Fertil. Steril.*, 31 : 481, 1979.
- 22) Lind, T. and Cook, D. B. : How does Danazol work? *Lancet.*, 26 : 1401, 1976.
- 23) Leppaeluoto, J., Roennberg, L. and Yloestalo, P. : LRF and TRF test during long-term Danazol treatment increase of the LH and FSH responses but decrease of prolactin and TSH responses. *Acta Endocrinol.*, 104 : 1, 1983.
- 24) Fraser, I. S., Merckham, R., McIlveen, J. and Robinson, M. : Dynamics tests of hypothalamic and pituitary function in women treated with Danazol. *Fertil. Steril.*, 37 : 484, 1982.
- 25) Rejniak, J. V. and Gursipide, E. : Effects of Danazol on gonadal steroidogenesis in patients with a complete testicular feminization. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 142 : 479, 1982.
- 26) Sherins, R. J., Gandy, H. M., Thorslund, T. W. and Paulsen, C. A. : Experience with a new gonadal inhibition, 17- $\alpha$ -pregn-4-en-20-yno- (2, 3-d) isoxazol-17-ol (Danazol). *J. Clin. Endocrinol.*, 32 : 522, 1971.
- 27) Asch, R. H., Fernandes, E. O., Smith, C. G., Khodr, T. M. and Pauerstein, C. J. : Effects of Danazol on gonadotropin levels in castrated rhesus monkeys. *Obstet. Gynecol.*, 53 : 415, 1979.
- 28) Luciano, A. A., Hauser, K. S., Chapler, F. K. and Sherman, B. M. : Danazol : endocrine consequences in healthy women. *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 141 : 723, 1981.
- 29) Menson, M., Peegel, H. and Menson, K. M. J. : In vitro effects of Danazol on luteinizing hormone-releasing hormone-stimulated luteinizing hormone release in rat anterior pituitary cell culture in vitro. *Endocrinol.* 109 : 191, 1981.
- 30) Dhont, M., Delbeke, L., van Eyck, J. and Voorhoof, L. : Danazol treatment of chronic cystic mastopathy : a clinical and hormonal evaluation. *Postgraduate Med. J.*, 55 : 66, 1979.
- 31) Bohnet, H. G., Hanker, J. P., Schweppe, K. W. and Schneider, H. P. G. : Changes of prolactin secretion following longterm Danazol application. *Fertil. Steril.*, 36 : 725, 1981.
- 32) Barbieri, R. L., Canick, J. A. Macris, A., Told, R. B., Duvies, I. J. and Ryan, K. J. : Danazol inhibits steroidogenesis. *Fertil. Steril.*, 28 : 809, 1977.
- 33) 岡村 隆 : Danazol (17-Pregn-4-en-20-yno [2, 3-d] isoxazol-17-ol) の女性内分泌機能に及ぼす影響, 日不妊会誌, 24 : 282, 1979.
- 34) Brawn, P., Wildt, L. and Leyendecker, G. : The effect of Danazol on gonadotropin secretion during the follicular phase of the menstrual cycle. *Fertil. Steril.*, 40 : 37, 1983.
- 35) Lauersen, N. and Wilson, K. H. : Evaluation of Danazol as an oral contraceptive. *Obstet. Gynecol.*, 50 : 91, 1977.
- 36) Greenblatt, R. B. and Tzingovnis, V. : Danazol treatment of endometriosis : long-term follow-up. *Fertil. Steril.*, 32 : 518, 1979.
- 37) 平川 舜, 小島栄吉, 西田修二, 大村 剛 : Danazol 療法による子宮内膜症の内視鏡的管理, 産婦の世界, 33 : 70, 1981.
- 38) 田巻勇次, 小堀恒雄 : Danazol 療法における子宮内膜の形態学的変化に関する研究, 日不妊会誌, 27 : 125, 1982.
- 39) 山田光興, 荒木克己, 富岡嘉昌, 寺田 督 : 子宮内膜症に対する Danazol 療法について, ホルモンと臨床, 28 : 69, 1980.
- 40) Frauchimont, P. and Cramilion, C. : The effect of Danazol on anterior pituitary function. *Fertil. Steril.*, 28 : 814, 1977.
- 41) Fraser, I. S. and Thorburn, G. D. : Effects of Danazol on pituitary gonadotropins in postmenopausal women. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynecol.*, 18 : 247, 1978.
- 42) Buckl, R. : Danazol therapy in gynecomastia : recent experience and indication for therapy. *Postgraduate Med. J.*, 55 : 71, 1979.
- 43) Eldrige, J. C., Dmowski, W. P. and Mas-kesh, V. B. : Effects of castration of immature rats on serum FSH and LH and various steroid treatments after castration. *Biol. Reprod.*, 10 : 438, 1974.
- 44) Raj, S. G., Raj, M. H. G., Talbert, L. M. and Cohen, R. : Structural and functional regression of polycystic ovaries by Danazol. *Fertil. Steril.*, 36 : 392, 1981.
- 45) Krey, L. C., Robbins, R. and McEwen, B. : Danazol suppression of luteinizing hormone Secretion : a role for Danazol androgen receptor interaction within the brain-pituitary complex. *Fertil. Steril.*, 35 : 467, 1981.

- 46) 柳沼 恣:  $17\alpha$ -Pregn-4-en-20-yno (2, 3-d) isoxazol-17-ol (Danazol) の基礎, 産と婦, 45: 309, 1978.

### Danazol suppresses pituitary FSH and LH release

**Takashi Okamura, Toru Takeuchi  
Osamu Nishii, Tsutomu Yaginuma  
Takuro Kobayashi**

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Faculty of Medicine, University of  
Tokyo at Mejirodai, Tokyo, Japan

**Tsuneki Nagasaka**

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Faculty of Medicine, Medical and  
Pharmaceutical University of  
Toyama, Toyama, Japan

To investigate the effect of Danazol on serum

FSH and LH secretion, it was orally administered for 14 days in daily dose of 400mg and 600mg to 4 and 5 postmenopausal or oophorectomized women, respectively.

Blood samples were obtained from an indwelling heparinized 19G butterfly-typed needle inserted into a cubital vein in every 20 minutes for 2 hours to determine the mean FSH and LH levels before and after Danazol medication.

Serum hormones concentrations of all samples were measured with a run of specific RIA.

Mean serum FSH levels were significantly decreased in all women with both daily dose of 400mg and 600mg of Danazol.

Mean serum LH levels were significantly decreased after 400mg of Danazol in only one of 4 women and in 4 of 5 women after 600mg of Danazol.

The present study is the first report to indicate that Danazol can apparently lower serum FSH and LH levels in humans.

(受付: 昭和59年6月19日)

## 正プロラクチン血症性黄体機能不全の 病態にかかわるプロラクチンの意義

Role of Prolactin on Pathophysiology of  
Luteal Insufficiency with Euprolactinemia

大分医科大学産科学婦人科学教室

森 宏 之 松 岡 良

Hiroyuki MORI Ryo MATSUOKA

合 阪 幸 三 木 川 源 則

Kozo AISAKA Tomonori KIGAWA

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Oita Medical College

血中 PRL が25ng/ml 以下の正プロラクチン性 short luteal phase 9例に Bromocriptine を投与したところ7例に臨床効果がみられた。これらの7例には1) PRL の分泌予備能の亢進がみられ、2) PRL の日内変動をみると昼間は低値で、一見正常にみえるが、夜間に高値の出現をみる occulted hyperprolactinemia が存在し、3) PRL の昼間値も正常域にあるものの、正常婦人に比して高値であった。これらのことは正プロラクチン性黄体機能不全症の一部に、その病態に PRL が関与している症例があることを意味しており、その本態は高プロラクチン性黄体機能不全と同一であると考えられた。

(Jap. J. Fertil. Ster., 30(1), 17-21, 1985)

### 緒 言

高プロラクチン血症が、無排卵・黄体機能不全をひき起こし易いことは明らかである。

この場合に、わが国の産婦人科領域においては第32回日本産科婦人科学会総会でのシンポジウム<sup>1)</sup>の結論に準拠して、血中 PRL 値が30ng/ml を越えるものを高プロラクチン血症とし、25~30ng/ml を境界値として取り扱うことが慣用されている。そこで本研究では血中 PRL 値が25ng/ml 以下の黄体機能不全のうちで、ことに高温相の持続が12日未満のいわゆる short luteal phase を対象としてとりあげ、その病態にかかわる PRL の意義を検討することにより、正プロラクチン血症性の黄体機能不全の一部に PRL が関与していることが明らかとなったので報告する。

### 対象および方法

昭和57年4月1日より昭和59年3月31日までの間に当

科外来を不妊を主訴として訪れた婦人のうちで、1) Huhnerテスト、Rubin テスト、精液検査などの一般不妊検査にて異常がなく、2) 基礎体温が2相性ではあるが、高温相の持続が12日未満のいわゆる short luteal phase で、3) 血中 PRL 値が25ng/ml 未満の正プロラクチン血症であり、4) 多毛・肥満などの内分泌症状を伴わなかった9例を対象とした。対象とした症例の詳細を表1に示した。血中 PRL の resting level は平均  $12.8 \pm 4.8$  ng/mg (M $\pm$ SD) であった。

この9例の卵胞期に LHRH 100ug と TRH 500ug を負荷し、PRL・FSH・LH の分泌予備能を検討した。またこの9例を卵胞期に入院させ、安静・臥位の状態で、肘静脈に留置したカニューレより24時間にわたり2時間ごとに採血し、血中 PRL の日内変動を検討した。患者には午後9時に消燈・就眠させ、夜間の採血にあたっては睡眠を妨げないように配慮した。

検査が終了した次周期の月経第5日目より Bromocriptine 5mg/day を3カ月間内服させ、BBT 上の黄体

表 1 研究対象

Case No.	Age	Parity	Duration of Luteal Phase(days)	Resting levels of		
				PRL (ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)
1	38	0	10	7.6	14.8	23.8
2	32	1	11	9.6	8.5	12.5
3	31	1	8	13.4	6.5	17.7
4	29	0	9	12.5	8.8	11.0
5	35	0	11	22.9	8.7	16.4
6	25	0	11	18.6	17.4	17.8
7	27	0	9	8.2	9.4	8.2
8	34	0	11	13.2	4.3	9.6
9	28	0	11	9.2	12.6	29.1

期の長さを測定し、12日未満であつた高温相が14日以上に延長した場合には Bromocriptine 有効例と判定し、不変のものを無効例と判定して、PRL の分泌予備能および日内変動との相関を解析し、また同様に測定した正常婦人の排卵期4例、血中 PRL が25ng/ml 以下でありながら乳汁漏がみられたいわゆる euprolactinemic galactorrhea 3例と比較検討した。

血中 PRL・FSH・LH は第1ラジオアイソトープ社より提供を受けた RIA kit を用いて測定した。データの解析は Student's t テストによりおこなつた。

結 果

1) 9例中7例(表1の1-7までの症例)が Bromocriptine の投与により黄体期が14日間に延長した。これを有効群とした。表1の8, 9の症例は不変であつた。こ

の2例を無効群とした。以下のデータは有効群・無効群の2群に分けて解析した。

2) LHRH 反応性: 100ug の LHRH 投与に対する、FSH・LH の反応性は図1のごとくであつた。有効群の FSH・LH の前値は低く、反応性も良好であつて、これらは正常の FSH・LH 分泌能を保有していると考えられた。また無効群の2例の反応も有効群との差はないと考えられ、有効群・無効群の両者のゴナドトロピン分泌能はともに正常であると考えられた。

3) Bromocriptine の投与により血中 PRL はすみやかに著明な低下をみた。有効群では投与前の resting level が13.3±5.7ng/ml (M±SD) であつたものが1.8±0.5ng/ml (M±SD) と低下した (p<0.005)。無効群の2例では投与前値がそれぞれ13.2ng/ml, 9.2ng/ml であつたものが、ともに1.5ng/ml 以下となつた。両

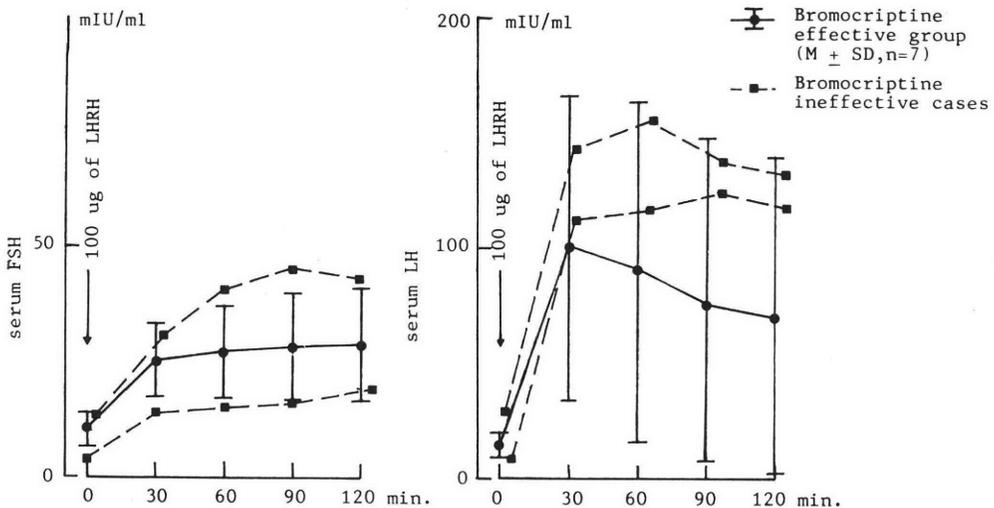


図1 対象の LHRH 反応性; 有効群と無効例の間に LH・FSH いずれの分泌能に差を認めず、反応性も良好・正常であつた

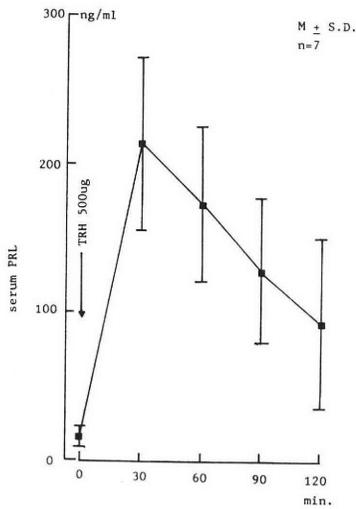


図 2 有効群の TRH に対する PRL の反応性；著明な過剰反応がみられた

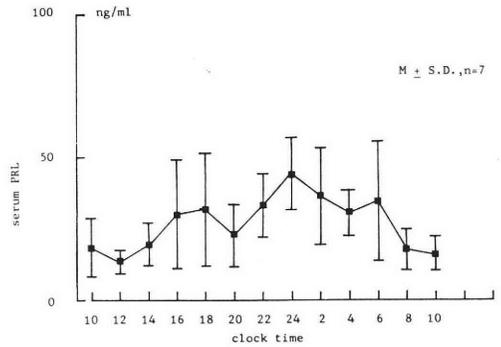


図 4 有効群の PRL の日内変動

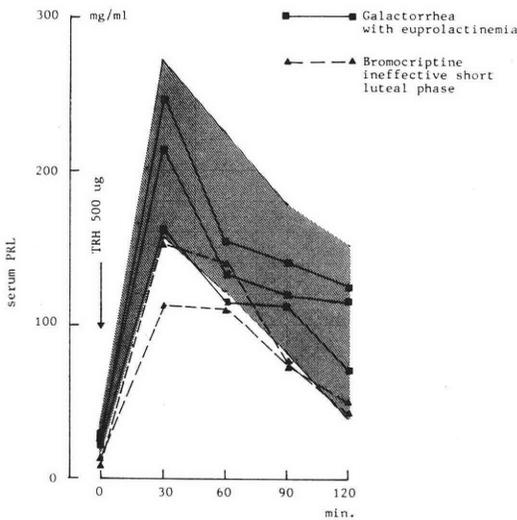


図 3 無効例と正プロラクチン性乳汁漏の TRH に対する PRL の反応性；shadow area は有効群の M±SD を示している。乳汁漏の反応は有効群とほぼ同じで、無効例の反応は低かった

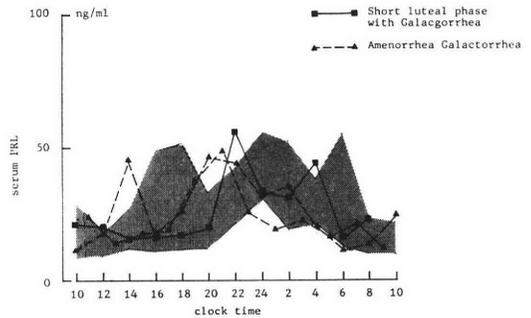


図 5 正プロラクチン性乳汁漏の PRL の日内変動；shadow area は有効群の M±SD を示した

群での Bromocriptine の PRL 低下作用には差がないと考えられた。

4) 有効群の TRH 500ug 負荷に対する血中 PRL の変動は図 2 のとうりであつた。すなわち PRL は著しい分泌反応を示し、頂値は 30 分に出現し、前値が  $17.6 \pm 6.5 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=7$ ) であつたものが 30 分値は  $213.3 \pm 58.7 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=7$ ) となつた。

これを 2 例の無効群および 3 例の正プロラクチン性乳

汁漏と比較すると図 3 に示したとうりであつた。すなわち無効例は有効例に較べて反応は小さく、また乳汁漏は有効例と同程度の著しい反応性を示した。このことは有効例および乳汁漏での PRL 分泌能は亢進状態にあると考えられた。

5) PRL の日内変動をみると図 4 のように有効例では 8:00AM より 20:00PM までの間は PRL は正常域にあると考えられたが、22:00PM-6:00AM の夜間には高値を示し、10:00AM の値が  $18.6 \pm 10.2 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ) であつたのに反して、24:00PM には  $43.2 \pm 12.4 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ) となつた。また 2:00AM には  $36.2 \pm 17.1 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ) となつた。

これと正プロラクチン性乳汁漏と比較すると図 5 のように、有効例と日内変動パターンには差がないと考えられた。

また正常婦人の卵胞期での日内変動と比較してみると、図 6 に示したように正常婦人においても夜間は昼間に比して高値をとるものの、その値は  $30 \text{ ng/ml}$  に近づくか、わずかに越える程度であつた。このことは有効例においては夜間に異常な高値が出現したと考えてよく、その程度は乳汁漏と同程度の高値であつた。

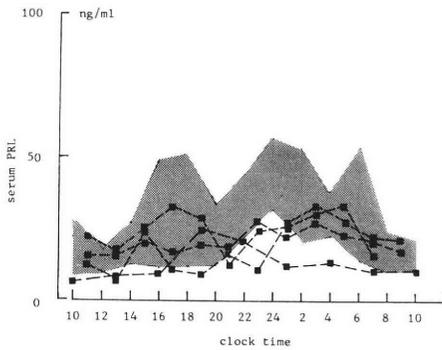


図6 正常婦人の卵胞期における PRL の日内変動; shadow area は有効群の M±SD を示した

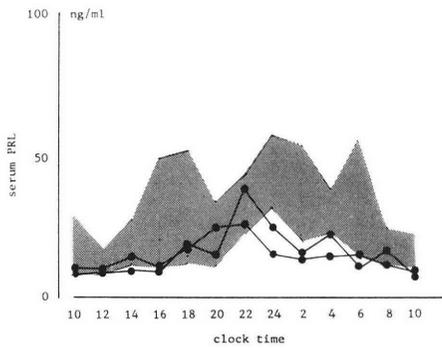


図7 無効例の PRL の日内変動; shadow area は有効群の M±SD を示した

また無効例2例の日内変動は図7に示したとおりであった。有効例に較べて全般的に低値を示し、正常婦人の卵胞期との差はみられないと考えられた。

6) 10:00AM-2:00PM での PRL 値を平均してみると正常婦人の卵胞期の値は  $9.2 \pm 6.1 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=15$ ) であった。無効例は  $10.2 \pm 2.3 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=6$ ) と正常卵胞期と差がみられなかったが、有効群は  $19.0 \pm 7.7 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=21$ ) と有意に高値であり ( $p < 0.005$ )、この値は正プロラクチン性乳汁漏の  $16.3 \pm 3.3 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=9$ ) と同等であった。このことは、 $25 \text{ ng/ml}$  を PRL の昼間値の正常上限とした場合には、有効群・正プロラクチン性乳汁漏はいずれも正プロラクチン血症に分類されるが、その値は正常婦人・無効群に比して有意に高値を示したと考えられた。

一方夜間22:00PM-2:00AM の値を比較すると正常婦人の卵胞期では  $20.9 \pm 6.5 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=12$ ) で、夜間は昼間に較べてその値が2倍高くなるといえた。無効群の値は  $21.4 \pm 8.4 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=8$ ) で正常婦人と有意差がなかった。しかし有効群はそれらに比して高く  $37.0 \pm 11.1 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=28$ ,  $p < 0.005$ ) で、

この値は正プロラクチン性乳汁漏の  $35.5 \pm 12.1 \text{ ng/ml}$  ( $M \pm SD$ ,  $n=12$ ) と同等であった。

このことは、有効群では正常に比して昼間値も高いが、夜間には異常高値が出現し、その程度は乳汁漏をひきおこすほどの高値であると考えられた。

### 考 案

いわゆる short luteal phase の9例に Bromocriptine を投与し、うち7例に黄体期の延長がみられた。これら7例の有効例と2例の無効例を比較すると、1) 両者の FSH・LH 分泌能には差がなく、またそれらは正常であった。2) Bromocriptine により両者の PRL 値はすみやかに著明な低下がみられた。3) TRH 負荷による PRL 分泌予備能の検討では、有効群では著しい亢進がみられ、その程度は正プロラクチン性乳汁漏と同程度であった。4) PRL の日内変動をみると、有効群は、正常婦人に比して夜間に異常高値が出現し、その程度は正プロラクチン性乳汁漏と同程度であった。一方無効群での夜間の値は、有効群より低値であつて、正常婦人との差がみられなかった。5) 有効群では昼間値は正常域内にあるものの、正常婦人および無効群に較べて有意に高かつた。

これらの点と、Bromocriptine の有効性を関連させてみると、Short luteal phase の病態の一部に PRL が関与していることは明らかである。すなわち有効例においては、PRL 分泌予備能の亢進がみられたこと、夜間に高値が数時間にわたり出現したこと、Bromocriptine によつて PRL を低下させることによつて臨床的に改善がみられたこと、昼間値は正常域内にあるものの、正常例・無効例に比して明らかに高値であることなどの事実は、有効例の病態が、血中 PRL 値が  $30 \text{ ng/ml}$  以上の高プロラクチン血症と同一であることを示していると考えられる。

すなわち昼間値は正常範囲内にあつても、夜間に数時間の高値が持続する transient hyperprolactinemia, nocturnal hyperprolactinemia または occulted hyperprolactinemia と呼んでよい状態と考えられる。この病態の存在する可能性については、Kleingerg, D. L.<sup>2)</sup>, Corenblum, B. and Taylor, P. J. ら<sup>3)</sup>も指摘しているが、明らかな証明はなされていなかった。本研究の結果からみたとときの存在が明らかとなつたものと考えられる。またその臨床的意義についても、黄体機能不全の病態の一部と関連していることが明らかとなつたと考えられる。

Kano, T. et al.<sup>4)</sup> は黄体機能不全での血中 PRL は黄体期では正常例と比して差がなかったが、卵胞期では有意に高かつたと述べており、それらに対して Bromo-

criptine が有効であつたとしている。同様に黄体機能不全に対して Bromocriptine が有効であることは Del-Pozo et al.<sup>5)</sup>, Mühlentstedt, D. et al.<sup>6)</sup> によつても指摘されている。Kano, T. et al.<sup>4)</sup> は、高プロラクチン血症と正プロラクチン血症の両者に Bromocriptine を投与し、いずれの場合にも黄体機能の回復をみたこと、さらには正常例でも黄体期の PRL 値は高いことから、PRL の luteolytic 作用を黄体機能不全の病態と考えているが、黄体機能不全例と正常例との差が主として排卵期でみられたことの説明は、これでは困難である。

むしろ黄体機能は、先行する排卵期での卵胞の成熟との関連が深いと考えた方が理解しやすい。McNatty, K. P. et al.<sup>7)</sup> は PRL が顆粒膜細胞でのステロイド合成を抑制するとしており、Kano, T. and Nishikawa, K.<sup>8)</sup> は、高 PRL 血症に対して Bromocriptine を投与し PRL 値を低下させることによつて外因性 HMG への反応性が改善するとしている。これらのことは PRL が卵胞成熟を抑制する因子として働き、排卵障害や黄体機能不全をひき起こしている可能性を示唆するものである。ことに今回示したような昼間にはさほど高値を示さず、いわゆる正プロラクチン血症と診断されるにもかかわらず、夜間には高値を示すような病型は、高度の排卵障害を示すよりも、黄体機能不全を呈する可能性が高いと考えられる。

さらに指摘されなければならないことは、正常 PRL 値の上限值への再検討である。今回の症例は、いずれも昼間値が 25ng/ml 以下であるにもかかわらず、正常例と差があること、そしてその PRL 分泌予備能は充進していること、さらに夜間に有意の高値の出現をみたこと、それらが黄体機能不全の病態と深く関連している可能性が示されたこと、以上の諸点から、正プロラクチン血症の上限值は現在慣用されているものは高すぎると考えられる。正常婦人の昼間値からみたときは、15ng/ml 未満の PRL 値が排卵期での正常上限値と考えることが妥当であると思われる。

PRL が luteotropic 因子として作用すると考えると、PRL を抑制しすぎることが反つて黄体機能不全をひき起こすと考えられるが、今回のわれわれのデータからみると、血中 PRL を測定感度の限界程度まで低下させても、高温相の持続は反つて延長したこと、逆に短縮した例はなかつたことなどの点は、ヒトにおいて PRL は黄体機能の維持に必ずしも必要ないことを示唆しているが、この点は今後の検討を要する。

本稿の一部は第57回日本内分泌学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 倉智敬一：プロラクチンとリプロダクション，日産婦会誌，32，1235，1980。
- 2) Kleiberg, D. L.: Lactation and Galactorrhea in Gynecologic Endocrinology. p 76, Harper & Row, Hargestown, 1980.
- 3) Corenblum, B. and Taylor, P. J.: A rationale for the use of bromocriptine in patients with amenorrhea and normoprolactinemia. Fertil. Steril., 34: 239, 1980.
- 4) Kano, T., Nishikawa, K., Kaneda, T., Miyazaki, K. and Sugimoto, O.: Plasma prolactin in luteal insufficiency and treatment with Bromocriptine. Jap. J. Fert. Ster., 28: 26, 1983.
- 5) Del-Pozo, E., Wyss, G. H., Alcaniz, J., Campano, A. and Naftolin, F.: Prolactin and deficient luteal function. Obstet. Gynecol., 53: 282, 1979.
- 6) Mühlentstedt, D., Wuttke, W. and Schneider, H. P. G.: Prolactin and short luteal infertility. Acta Endocrinol. Suppl., 84: 43, 1977.
- 7) McNatty, K. P., Awers, R. S. and McNeilly, A. S.: Possible role in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. Nature, 250: 653, 1974.
- 8) Kano, T. and Nishikawa, K.: Bromocriptine-HMG therapy for hyperprolactinemic luteal insufficiency. Jap. J. Fert. Ster., 29: 18, 1984.

## Role of prolactin on pathophysiology of luteal insufficiency with Euprolactinemia

Hiroyuki Mori, Ryo Matsuoka,  
Kozo Aisaka and Tomonori Kigawa

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Oita Medical College, Oita

To study the role of PRL on a pathophysiology of luteal insufficiency with euprolactinemia, 5mg of Bromocriptine were administered daily to 9 short luteal-phase with euprolactinemia (PRL less than 25ng/ml). Effectiveness was pointed out in 7 cases out of 9. The effective cases showed 1) increased prolactin secreting capacity which was evaluated by TRH administration, 2) nocturnal hyperprolactinemia instead of euprolactinemia during day time, 3) higher level of prolactin than normal cases during day time. From these results, it is indicated that there are the occulted hyperprolactinemia in the cases of luteal insufficiency with euprolactinemia.

(受付：昭和59年年8月11日特掲)

# 機能性不妊に対する Metharmon®-F の応用

## Metharmon-F Treatment of Unexplained Infertility

慶応大学産婦人科

中村幸雄 吉尾敬徳 片山恵利子  
Yukio NAKAMURA Takanori YOSHIO Eriko KATAYAMA  
井合澄子 玉岡有告 飯塚理八  
Sumiko IAI Yūkoku TAMAOKA Rihachi IIZUKA

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

5年以上の原発性不妊に対し、メサルモン-F (MF) 2錠/日を連日投与し、MFの機能性不妊に対する有効性の機序を検討した。

1) 機能性不妊40例105周期にMFを投与し、5例(12.5%)妊娠した。

2) 9例につきMF 2錠/日連日投与周期、非投与周期の血中LH, FSH, PRL, Estradiol (E<sub>2</sub>), Progesterone (P)を可及的逐日測定比較したところ、FSH, PRL, E<sub>2</sub>には差はみられなかったが、LHピーク、P分泌はMF投与周期の方が高値の傾向を示した。またBBT低温日数、高温日数、排卵期頸管粘液分泌量には差を認めなかった。

3) 5例についてMF投与周期、非投与周期の着床期に内膜診、日付診を行ない、LHピークよりの日数と比較したところ、両周期ともに±1日以内に存在し差を認めなかった。

4) 副作用は特記すべきものはみられなかった。

以上より、MFは内分泌環境が正常である機能性不妊の内分泌動態のバランスを乱すことなく排卵期のLHピーク、黄体期のP産生を促し、機能性不妊の妊娠成立に寄与するものと考えられる。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 22-27, 1985)

### I. 緒言

メサルモン-F (Metharmon-F, 以下MFと略す)は、ホルモン作用のほとんどみられないステロイド代謝系の中間代謝物質および甲状腺末を主成分とする薬剤で(表1)、内服薬であり副作用も少なく、機能性不妊、更年期障害、卵巣欠落症状に以前から広く用いられている。

表1 Metharmon-Fの成分(1錠中)

pregnenolone	1.0 mg
androstenedione	1.0 mg
androstenediol	0.5 mg
testosterone	0.1 mg
estrone	5 µg
乾燥甲状腺	7.5 mg

しかし、その効果発現の機序については、今のところ明確ではない。今回内分泌学およびその他の不妊症検査で異常が認められないにもかかわらず妊娠しない機能性不妊に対し、MFを投与し、その内分泌動態、BBT、子宮内膜組織、頸管粘液分泌の変化を非投与周期と比較検討し、MFの作用機序につき考察を行なった。

### II. 対象

不妊期間5年以上、BBT、子宮内膜組織検査にて排卵を認め、精液検査、卵管疎通性検査、Huhner Test、子宮内膜組織検査いずれにても異常を認めない原発性不妊を対象とした。

### III. 方法

1) MF投与による血中ホルモン動態の検討

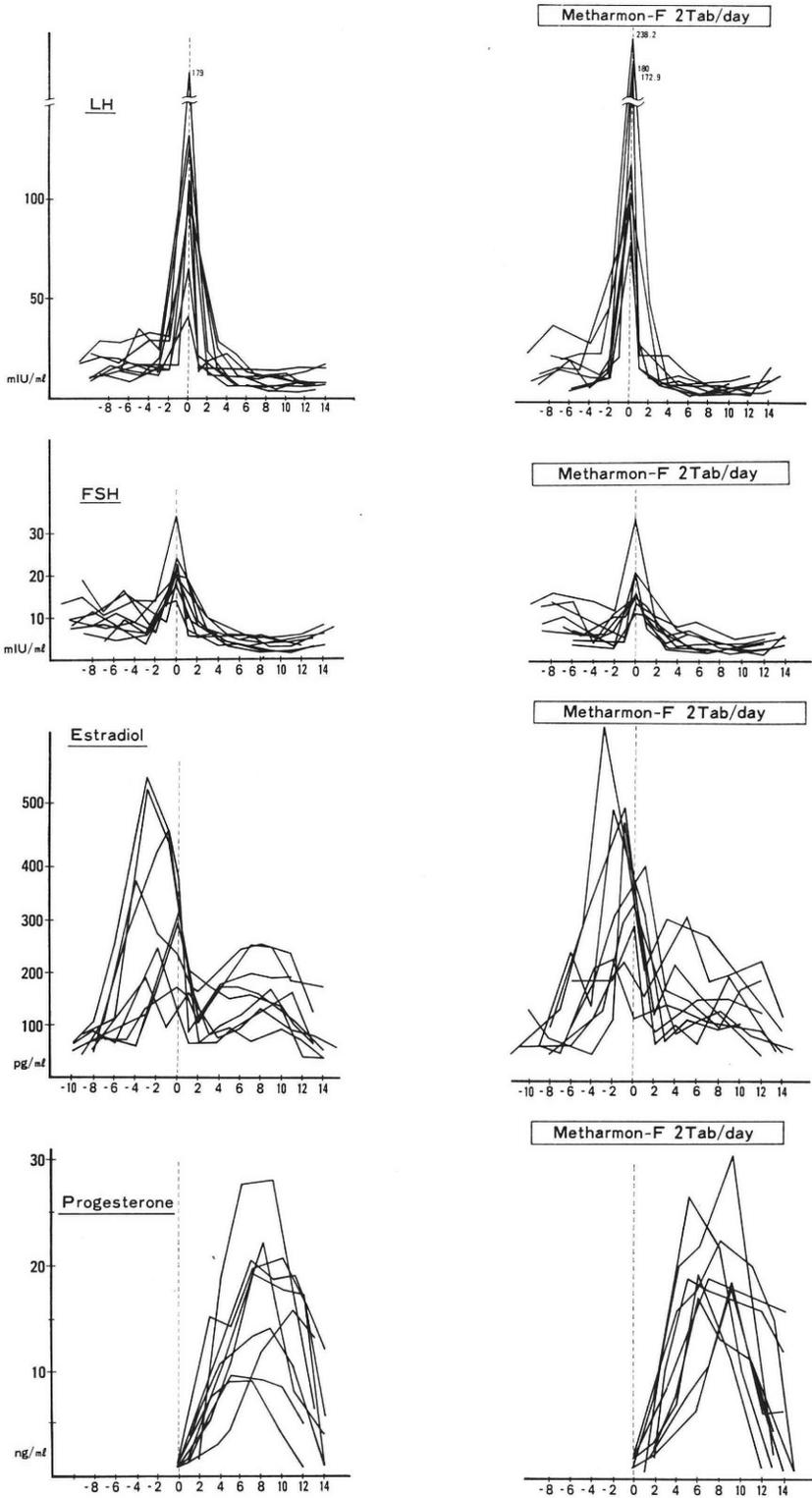


図1 Metharmon-F 投与周期, 非投与周期の血中ホルモン動態の比較 (N=9)

表 2 月経周期別にみた MF $\ominus$  周期, MF $\oplus$  周期の血中 LH, FSH, PRL の平均値 (M $\pm$ S.E.)

項目	月経周期		LH ピーク		黄体期 (+3 ~ +12日)	
	MF $\ominus$ 周期	MF $\oplus$ 周期	MF $\ominus$ 周期	MF $\oplus$ 周期	MF $\ominus$ 周期	MF $\oplus$ 周期
LH (mIU/ml)	17.6 $\pm$ 1.4	17.9 $\pm$ 1.7	104.0 $\pm$ 24.3	139.0 $\pm$ 29.4	10.7 $\pm$ 1.0	9.2 $\pm$ 0.8
			p < 0.2			
FSH (mIU/ml)	9.4 $\pm$ 0.7	8.8 $\pm$ 0.8	21.1 $\pm$ 3.4	18.1 $\pm$ 4.8	4.5 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3
PRL (ng/ml)	6.9 $\pm$ 0.6	6.6 $\pm$ 0.5	12.0 $\pm$ 4.1	15.5 $\pm$ 4.8	9.7 $\pm$ 0.6	9.1 $\pm$ 0.8

原発性機能性不妊 9 例 (25~36歳, 平均年齢 M $\pm$ S. E.=30.7 $\pm$ 1.2歳)を対象に MF 非投与周期 (以下 MF $\ominus$ 周期と略す), MF 投与周期 (MF $\oplus$ 周期と略す, MF 2錠/日を月経開始日より次回月経開始日まで連日服用)に可及的逐日午前 9~11時に採血し, 直ちに血清分離後-20°C にて凍結保存し, 後日一括して血中 LH, FSH, Prolactin (PRL), Estradiol (E<sub>2</sub>), Progesterone (P), TSH, T<sub>4</sub> を測定した。

血中 LH, FSH, PRL, TSH, T<sub>4</sub> は第一ラジオアイソトープ社の RIA キットで<sup>1)</sup>, E<sub>2</sub>, P はそれぞれ E<sub>2</sub>-6-BSA 抗体, P-3-BSA 抗体を用いた RIA 法<sup>2)</sup>によった。

#### 2) MF 投与による子宮内膜組織の変化

機能性不妊 5 例を対象に MF $\ominus$ , MF $\oplus$ 周期の着床期 (+7~+8日)に子宮内膜組織診を行ない, Noyes の方法に準じて日付診断し, 子宮内膜採取日とのズレを比較した。

#### 3) 統計処理

Student の t-test, paired t-test を用い, P<0.01 以下を有意差ありとし, p<0.2 以下を傾向ありとした。

### IV. 成 績

#### 1) MF 投与による妊娠例

原発性機能性不妊 40 例 (26~35歳, 平均年齢 M $\pm$ S.E. =31.2 $\pm$ 1.6歳)で延べ105周期に MF 2錠/日を連日服用させたところ 5 例 (12.5%) が妊娠した。現在まで正常分娩 3 例, 妊娠継続中 2 例で流産例は 0 であった。なお, MF 服用中は, 他の薬剤, 治療はいつさい行なわなかった。また, これらの症例は MF 治療前, 高温期 HCG, Gestagen 投与, AIH 等の治療をうけても妊娠しなかった症例である。

2) MF 投与による血中 LH, FSH, PRL, E<sub>2</sub>, P の変化および BBT, 頸管粘液分泌に及ぼす MF 投与の影響

#### ① LH (図 1, 表 2)

図 1 は MF $\ominus$ ,  $\oplus$ 周期の血中 LH, FSH, E<sub>2</sub>, P の逐日変動を症例別にプロットしたものである。表 2 は, 血中 LH, FSH, PRL 値の平均を各時期ごとに比較したものである。

LH は MF $\ominus$ ,  $\oplus$ 周期ともに卵胞期>黄体期 (p<0.001) を示したが, MF $\ominus$ 周期, MF $\oplus$ 周期間には差をみとめなかった。

LH ピークは MF $\ominus$ 周期 M $\pm$ S.E.=104.0 $\pm$ 24.3mIU/ml, MF $\oplus$ 周期139.0 $\pm$ 29.4mIU/ml でその間に統計学的な有意差はみられないが, MF $\oplus$ 周期の方が MF $\ominus$ 周期より高値の傾向 (P<0.2) を示した。

#### ② FSH (図 1, 表 2)

FSH は MF $\ominus$ ,  $\oplus$ 周期ともに卵胞期>黄体期 (p<0.001) と有意に卵胞期が高いが, MF $\ominus$ 周期, MF $\oplus$ 周期間には差はみられなかった。LH ピークに一致して MF $\ominus$ 周期 M $\pm$ S.E.=21.1 $\pm$ 3.4mIU/ml, MF $\oplus$ 周期 M $\pm$ S.E.=18.1 $\pm$ 4.8mIU/ml とそれぞれ卵胞期, 黄体期の平均より有意に高い (p<0.001) ピークを示したが, MF $\ominus$ 周期, MF $\oplus$ 周期間には差はみられなかった。

#### ③ PRL (表 2)

MF $\ominus$ 周期の黄体期は, 卵胞期より有意 (P<0.01) の高値を示し, MF $\oplus$ 周期でも黄体期は卵胞期より高値傾向 (p<0.02) を示したが, MF $\ominus$ ,  $\oplus$ 周期間にはいずれも差はなかった。また LH ピークに一致して MF $\ominus$ 周期に M $\pm$ S.E.=12.0 $\pm$ 4.1ng/ml, MF $\oplus$ 周期15.5 $\pm$ 4.8ng/ml のピークを示したが卵胞期, 黄体期のそれぞれの平均値の間に有意差は認められず, MF $\ominus$ ,  $\oplus$ 周期間にも差はなかった。

#### ④ E<sub>2</sub> (図 1)

排卵前の E<sub>2</sub> のピーク値は MF $\ominus$ 周期 M $\pm$ S.E. =348.9 $\pm$ 48.3pg/ml, MF $\oplus$ 周期384.8 $\pm$ 46.8pg/ml, 排卵後のピークは MF $\ominus$ 周期173.9 $\pm$ 17.5pg/ml, MF $\oplus$ 周期 196.2 $\pm$ 24.5pg/ml を示したが, いずれも MF $\ominus$ ,  $\oplus$ 周期間には差は認めなかった。

E<sub>2</sub> の図 1 のグラフ上における面積を比較すると, -5

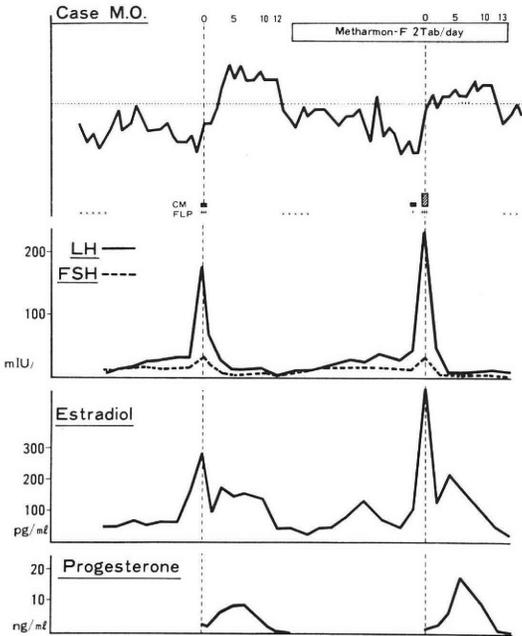


図2 Metharmon-F 投与によって Progesterone 産生増加をみた1例

日~0日間では, MF⊖周期  $M \pm S.E. = 1263 \pm 210$ , MF⊕周期  $1170 \pm 111$ , +1日~+13日間では, MF⊖周期  $1704 \pm 216$ , MF⊕周期  $1781 \pm 223$  で, MF⊖, ⊕周期間に有意差は認められなかった。

⑤ P (図1)

P のピーク値は, MF⊖周期  $M \pm S.E. = 17.6 \pm 2.1 \text{ ng/ml}$ , MF⊕周期  $21.4 \pm 1.5 \text{ ng/ml}$  で, 有意差はないが, MF⊕周期が高値傾向 ( $p < 0.2$ ) を示した。9例中6例では, p のピーク値は MF⊕周期 > MF⊖周期であった。

P の値を図1の面積で比較すると, MF⊖周期  $143.8 \pm 17.3$ , MF⊕周期  $162.6 \pm 14.8$  と有意差はみられないが, MF⊕周期が MF⊖周期より高値傾向 ( $p < 0.1$ ) を示した。9例中7例では, P の面積は MF⊕周期 > MF⊖周期であった。

図2は, MF 投与によって, 明らかにP産生量が増加した症例の血中ホルモン動態の経日的変化を示したものである。MF 投与により LH ピークの増加, P 産生量の増加, BBT 高温日数の1日延長を認めた。

⑥ T<sub>4</sub>, TSH

黄体期中期の血中 T<sub>4</sub>, 平均濃度は, MF⊖周期では  $M \pm S.E. = 5.2 \pm 0.4 \mu\text{g/dl}$ , MF⊕周期では  $6.0 \pm 0.8 \mu\text{g/dl}$  で MF⊖, ⊕周期間に差を認めなかった。

同時期の TSH は, MF⊖周期では  $M \pm S.E. = 4.2 \pm 0.7 \mu\text{U/ml}$ , MF⊕周期では  $4.0 \pm 0.4 \mu\text{U/ml}$  で, 同じく MF⊖, ⊕周期間に差は認められなかった。

表3 BBT 低温期日数・高温期日数の比較

低温期日数 (月経開始より排 卵までの日数)		高温期日数 (排卵より次回 月経迄の日数)	
MF⊖ 周期	MF⊕ 周期	MF⊖ 周期	MF⊕ 周期
症例			
1	12日	15日	15日
2	14	14	14
3	13	14	12
4	14	14	14
5	21	12	13
6	14	14	15
7	12	15	14
8	14	14	14
9	16	13	14
$14.4 \pm 0.9$ 日	$14.4 \pm 1.4$ 日	$13.9 \pm 0.3$ 日	$13.9 \pm 0.3$ 日
(M±S.E.)		(M±S.E.)	

⑦ BBT の比較 (表3)

月経開始より排卵までの日数 (低温期日数), 排卵より次回月経までの日数 (高温期日数) は, 表3に示す如く, いずれも MF⊖, ⊕周期間に差は認められなかった。

⑧ 頸管粘液分泌量の比較

MF⊖, ⊕周期の排卵期における頸管粘液分泌量のピーク値は, MF⊖周期では  $M \pm S.E. = 0.12 \pm 0.18 \text{ ml}$ , MF⊕周期では,  $0.11 \pm 0.15 \text{ ml}$  で, 両周期間に差は認められなかった。また, 羊歯状結晶形成にも差は認められなかった。

3) 子宮内膜組織診の比較

原発性機能性不妊5例 (血中ホルモン逐日観察例とは別の症例) につき着床期 (+7~+8日) に内膜組織を採

表4 子宮内膜組織診の日付診断日と内膜採取日とのズレの比較

	MF⊖ 周期	MF⊕ 周期
症例 1	± 0 日	± 0 日
2	- 1 日	± 0 日
3	± 0 日	- 1 日
4	+ 1 日	+ 1 日
5	+ 1 日	± 0 日

取し, 日付診断を行ない, 内膜採取日 (LH ピークよりの日数) とのズレを比較した。表4の如く MF⊖, ⊕周期ともに日付診と内膜採取日とのズレは±1日以内に存し, ±2日以上は認められなかった。また MF

⊖, ⊕周期間にも2日以上ズレはなかった。

#### 4) 副作用

MF 投与40例中、副作用として嘔気2例、胃部不快感1例を認めたが、これらの症状は服用中止するほどでなく、服用継続により消失した。

### V. 考 察

従来より、MF は更年期障害、卵巣機能失調症の他、機能性不妊に用いられてきた。

雨森<sup>3)</sup>は、排卵障害なく、他の既存検査で異常を認めない正常群444例中70例(15%)に妊娠を報告しており、妊娠例の70%は MF 投与開始3性周期以内に妊娠しているという。岩崎<sup>4)</sup>は、34例中10例に妊娠を報告しており、著効例はいずれも黄体機能不全であったと報告している。

われわれの成績は40例105周期に5例(12.5%)の妊娠を認めたが、この妊娠率は決して高い率ではない。しかしわれわれの対象とした例は、5年以上の不妊症例で、過去に色々な治療法を行なつても妊娠せず、MF 投与周期に妊娠しているところからみて、本剤の有効性は充分示されていると考えられる。

機能性不妊に対する MF の有効性の機序としては、小林ら<sup>5)</sup>は、本剤そのものはホルモン作用を有しないステロイド代謝系の中間代謝物質を主成分としているが、これらの成分が甲状腺末の代謝促進作用の助けを借りて、生体の状況に応じた代謝をうけ臨床効果を発揮するとしており、雨森<sup>3)</sup>は BBT の延長、Pregnandiol 排泄の増加、月経血増加等中枢性、末梢性に黄体機能を賦活し、究極的に子宮内膜をして妊卵の着床に好適な環境整備を行なわしめると推論している。

いずれも黄体機能の改善、P 産生の増大を MF の機能性不妊症の効果の要因としているが、それらを裏付けるデータとしては、P 代謝のアンバランスの改善を認めた岩崎<sup>4)</sup>の報告と、1例だけではあるが P 分泌の増加を認めた佐竹<sup>6)</sup>の報告が見られるのみであった。近年小林ら<sup>5)</sup>は、10例の正常月経周期婦人につき BBT 予定月経前、21, 15, 8日目の3回血中 LH, FSH, E<sub>2</sub>, Progesterone, TSH, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> を測定し、MF 投与により、排卵日周辺(予定月経15日前)の LH ピークの上昇、黄体期中期(予定月経8日前)の P の増加傾向を報告し、MF の黄体機能促進的傾向を認め、MF は有排卵者の卵巣機能を改善こそすれ、内分泌バランスを乱すことはないと報告している。

われわれのデータでも、FSH, PRL, E<sub>2</sub>, TSH, T<sub>4</sub>, BBT, 頸管粘液分泌、子宮内膜組織診は MF 投与によって全く影響を受けなかった。

頸管粘液分泌に関しては、佐竹<sup>6)</sup>は、同様に MF 投与によつて分泌量は変化しないと報告しており、子宮内膜組織診については MF 投与によつて分泌期改善を示す所見が得られたと報告している。

MF 投与によつて現われた変化としては、LH ピークの増加傾向と、黄体期における P 産生の増大傾向であった。

排卵期における LH ピークの意義に関しては、われわれ<sup>7)</sup>は、着床不全による流産例に LH ピークの低い例を認めており、青野<sup>8)</sup>は short luteal phase 例に LH ピークの低い例を認めている。またわれわれ<sup>7,9)</sup>は、Clomiphene 排卵例では、LH ピークの低値例、不定形例を認めており、LH ピークはそれに引き続く黄体の形成に重大な関連性を有すると考えている。MF 投与による LH ピークの増加が黄体形成、黄体機能にもプラスの因子として作用することはいうまでもない。

P のピーク値の増大、P のグラフ上面積比の増大傾向は、MF 投与によつて P の産生量が増加することを意味すると考えられる。

副作用に関しては、胃腸障害、不正出血、発疹等が挙げられており、われわれの症例でも、ごく一部に胃腸障害が認められた。しかし、服用中止に至るほどでなく、引き続き服用することによって消失しており、使用上何等問題となる副作用もなく、また長期服用も可能であった。

甲状腺末の効果については、今回は詳細に検討していないが、T<sub>4</sub>, TSH を見た限りでは、MF 服用によつて甲状腺機能亢進は現れず、小林ら<sup>5)</sup>も、同様の報告をしている。むしろ甲状腺末によるステロイド代謝の円滑な代謝促進作用が MF の P 産生増とあいまって、MF の機能性不妊症への有効性を高めていると考えられる。

このように MF は HCG, Gestagen 剤のごとく、内分泌学的に著しい変化は起こさない。したがって内分泌学的にはほぼ正常である機能性不妊の内分泌動態のバランスを乱す恐れはない。

機能性不妊に対する MF 投与の効果は、ほぼ正常といえる内分泌動態、BBT, 頸管粘液分泌、子宮内膜のバランスを乱すことなく、LH ピーク、P 産生の増大傾向という mild な内分泌動態の変化をひき起こし、着床しやすき環境を形づくるのが妊娠成立に結びつくものと考えられる。

したがって明らかな内分泌動態の異常を示す不妊症(排卵障害、著しい黄体機能不全等)には、まず HCG, Gestagen といった強力なホルモン作用を有する薬剤で内分泌動態その他をある程度迄は正し、その後 MF 投与を試みる事が望ましいと考えられる。

## 参考文献

- 1) 中村幸雄, 黒川博厚, 高 俊昭, 清水謙一, 松本 茂, 小林俊文, 齊藤 薫, 飯塚理八; LH-RH test と血中 LH, FSH の変動—LH, FSH RIA Kit による, 日本不妊会誌, 18:246, 1973.
- 2) 松本 茂, 中村幸雄, 川村尚道, 田辺清男, 飯塚理八; RIA によるステロイドホルモン (E<sub>2</sub>, E<sub>3</sub>, P) の測定法について, ホと臨床, 24: 29, 1971.
- 3) 雨森良彦; 機能性不妊に対する Metharmon-F によるスクリーニング, 産婦の世界, 28: 729, 1976.
- 4) 岩崎寛和, 浅川 浩, 井上好雄, 佐藤啓治, 西川友康, 植村次雄: メサルモン-F の不妊症への応用, 日本不妊会誌, 12: 195, 1967.
- 5) 小林拓郎, 池下久弥, 岩瀬 一, 池川 明: 正常月経周期婦人に対するメサルモン-F 錠の影響, 産と婦, 50: 1568, 1983.
- 6) 佐竹 実, 足立 昇, 光部啓一, 金上宣夫, 南邦弘, 池川 洋: 不妊症に対する Metharmon-F の臨床内分泌学的研究 (その 2), 産と婦, 39: 970, 1970.
- 7) 中村幸雄, シンポジウム「初期流産管理の基礎」黄体機能よりみた着床不全—初期流産の研究, 日産婦誌, 29: 1216, 1977.
- 8) 青野敏博: シンポジウム「排卵と FSH 及び LH の関係—人の正常排卵機構と排卵障害の病態における FSH, LH の意義」日産婦誌, 25: 945, 1973.
- 9) 飯塚理八: 第23回日本産婦人科学会宿題報告「着床の研究」1971.

Metharmon-F treatment of  
unexplained infertility

**Yukio Nakamura, Takanori Yoshio,  
Eriko Katayama, Sumiko Iai,  
Yūkoku Tamaoka, Rihachi Iizuka**

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Keio University School of Medicine

This study was carried out to investigate the

mechanism of the effects of Metharmon-F (MF) on so-called unexplained infertility. Two tablets of MF were administered daily to the 105 menstrual cycles of 40 patients with unexplained infertility of more than 5 years duration.

1. Of 40 patients treated, 5 patients (12.5%) conceived.

2. In 9 patients, blood samples were taken daily or every other day during both the control cycles (no treatment) and the MF-treated cycles, and serum levels of LH, FSH, PRL, Estradiol (E<sub>2</sub>), Progesterone (P) were measured. There were no significant differences between the FSH, PRL, E<sub>2</sub> levels of control and treated cycles, while LH levels at mid-cycle surges and P levels at luteal phases tended to be higher in MF-treated cycles.

3. As for the duration of low phases and high phases of basal body temperature and the amounts of cervical mucous at preovulatory phases, there were no significant differences between the treated and control cycles.

4. In 5 patients, endometrial biopsies were carried out at mid-luteal phases of both treated and control cycles. All the endometriums, datings either from treated or nontreated cycles, were found to be synchronized with the date from the LH surge phase.

5. No remarkable adverse effects were noticed in patients treated with MF.

From these findings, it was suggested that MF facilitate the conception of normal infertile patients by improving midcycle LH surges and P secretion of luteal phases without disturbing other endocrine milieu.

(受付: 昭和59年7月3日・特掲)

# 当大学病院開設後10年間における 不妊症患者の統計的観察

A Clinical Review of the Infertile Women Attending  
our Fertility Clinic During the Past ten years

藤田学園保健衛生大学第2教育病院産婦人科

米谷 国男 伊藤 誠 高橋 正明  
Kunio KOMETANI Makoto ITO Masaaki TAKAHASHI  
千原 啓 越知 正憲  
Hiromu CHIHARA Masanori OCHI

Department of Obstetrics & Gynecology  
Fujita Gakuen University Hospital  
(Second Educational Hospital)

当大学病院開設後約10年間における不妊症患者773例（全新患者の4.8%）の統計的観察を行なった。不妊期間は1年以内であっても年齢を考慮して検査・治療の対象とした。原発性・続発性不妊はそれぞれ535例、238例であり、その比は約7：3であった。初診時平均年齢は原発性不妊 $27.9 \pm 3.53$ 、続発性不妊 $28.9 \pm 3.66$ 歳と接近していた。原発性不妊は5年以内に76.0%が受診したが、残りの24%は受診までに5年以上経過しており、早期受診の必要性が感じられた。不妊原因としては原発性、続発性不妊ともに機能性不妊が最も多く、それぞれ23.4%、26.9%であった。原発性、続発性不妊はそれぞれ179例（33.5%）、100例（42.0%）が妊娠した。2年以内の累積妊娠率は91.4%であり、不妊症の治療期間の一応の目安は2年として良いと思われた。30歳未満の妊娠率が39.4%であるのに対し、30歳以上のそれは30.0%であり、高齢化に伴う妊孕力の低下が示唆された。

(Jap. J. Fert. Ster., 30(1), 28-32, 1985)

## I. 緒 言

わが国においては結婚年齢の高齢化、少産少死という社会情勢に加えて、近時 IVF-ER の成功が次々と報告され、不妊症診療は新しい展開をみせている。当大学病院開設以来、約10年を経過し、その間従来の不妊症のルーチン検査および治療方針で取扱った挙児希望患者の臨床統計について検討したので、ここに報告したい。

## II. 調査対象および検査事項

名古屋保健衛生大学病院を開設した昭和48年5月から、昭和57年12月までの約10年間で挙児希望を主訴として当科外来を受診した不妊症患者、全773例を対象として調査した。不妊期間に関しては特に制限は設けず、年

齢などを考慮して妥当であれば不妊期間が1年以内でも診療対象とした。その内訳は原発性不妊535例、続発性不妊238例であった。不妊原因検索のため行なった routine test としては BBT、頸管粘液検査、子宮卵管造影、卵管通気検査、子宮内膜組織診、月経血結核菌培養、フーナー試験、精液検査を行ない、必要に応じて LH-RH テスト、血中 PRL 測定、腹腔鏡、子宮鏡を行なった。調査事項は次の通りである。

- 1) 不妊症患者の頻度、
- 2) 初診時年齢分布、
- 3) 初診時不妊期間、
- 4) 不妊因子、
- 5) 妊娠に到るまでの期間、
- 6) 不妊因子別にみた妊娠率、
- 7) 年齢よりみた妊娠率、
- 8) 妊娠成立に関与した治療法である。

### III. 結 果

#### 1) 不妊症患者の頻度 (表 1)

全外来新患数に対する割合は、年度別にみると3.1%~7.6%に分布し、平均16,131例中773例(4.8%)であった。初年度(昭和48年)は3.1%と最低、昭和57

表 1 挙児希望患者数の年次推移

年次	外来新患数	挙児希望数	原発不妊	続発不妊
48年	426	—	—	—
49年	1335	54(3.1%)	33	21
50年	1635	58(3.6%)	37	21
51年	1708	97(5.7%)	64	33
52年	1528	74(4.8%)	43	31
53年	1525	99(6.5%)	65	34
54年	2152	70(3.3%)	55	15
55年	1672	107(6.4%)	72	35
56年	2470	86(3.5%)	70	16
57年	1680	128(7.6%)	96	32
総数	16131	773(4.8%)	535(69.2%)	238(30.8%)

年度は7.6%と最高であったが、年度別にみると変動がみられた。原発性、続発性不妊の割合は、各年度によりかなりばらつきがあったが、いずれも原発性不妊の方が多く、全体では原発性不妊535例(69.2%)に対し続発性不妊238例(30.8%)と約7:3の割合であった。

#### 2) 初診時年齢分布 (図1)

図1の表の如く20歳~42歳と広範な分布を示した。こ

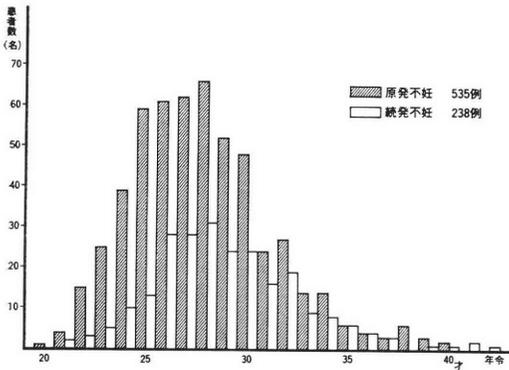


図 1 挙児希望患者の初診時年齢

のうち原発性不妊は25~28歳にピークがあり、ここに全体の46.4%が集中していた。一方続発性不妊は26~30歳にピークがあり、全体の56.7%を占めていた。また平均年齢では、原発性不妊27.9±3.53歳に対し、続発性不妊28.9±3.66歳と続発性不妊にやや高い傾向が見られた。

#### 3) 初診時不妊期間 (図2)

当科受診までの不妊期間は1カ月~19年に分布し、そ

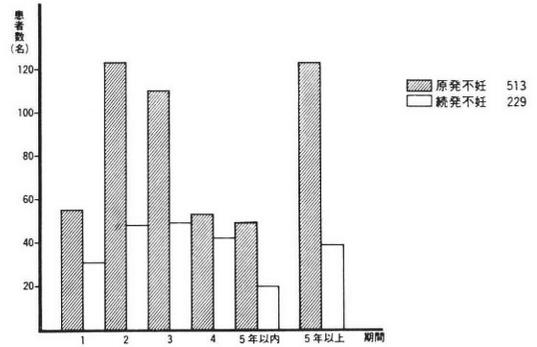


図 2 挙児希望を主訴として来院するまでの期間

のピークは図の如く原発性不妊で2~3年、続発性不妊で2~4年であり、5年以内の受診は、原発性不妊で76.0%、続発性不妊で83.4%であった。すなわち原発性不妊では、その1/4の例で初診までに5年以上経過していることがわかった。一方1年以内の受診は、原発性、続発性不妊合せて81例(11%)あった。

#### 4) 不妊因子 (図3)

不妊因子を検討すると原発性、続発性不妊ともに機能

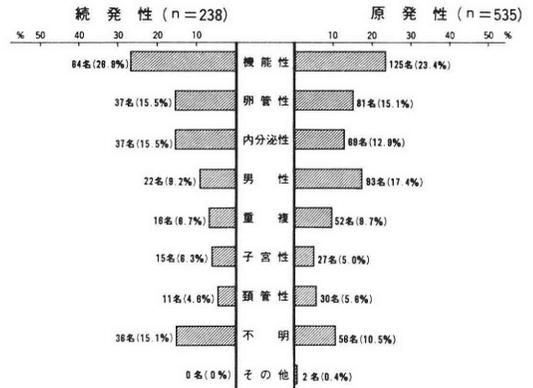


図 3 不妊因子の検討

性因子が最も多く、それぞれ23.4%、26.9%であった。ここでいう機能性不妊とは、排卵性月経があり、両側卵管が疎通し、子宮にも異常がなく、かつ精液所見は正常で、フーナー試験に問題がないものとした。また原発性、続発性不妊ともに卵管性因子、内分泌性因子、男性因子がこれに続き、特に原発性不妊では男性因子の占める割合が高率である事が特徴的だった。

#### 5) 初診後妊娠に至るまでの期間 (図4)

原発性、続発性不妊患者はそれぞれ179例、100例が妊娠した。原発性不妊では、0~3か月で41例、4~6か月で45例、7か月~1年で52例と1年以内に179例中138例(77.1%)が妊娠しており、続発性不妊では、0~3

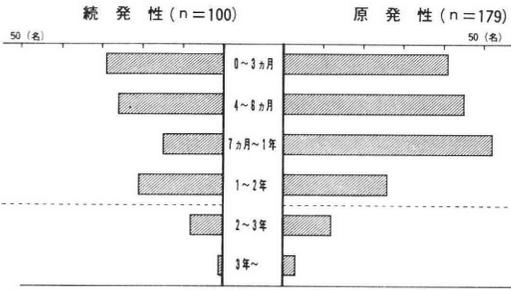


図4 不妊症患者妊娠例の妊娠に至るまでの期間

か月で29例, 4~6か月で26例, 7か月~1年で15例, 1~2年で21例と2年以内に100例中91例(91%)が妊娠している. 全体として2年以内の妊娠が全279例中225例(91.4%)であった.

6) 不妊因子別にみた妊娠率(図5)

妊娠成立は機能性不妊では189例中99例(52.4%), 卵管因子では118例中49例(41.5%), 内分泌因子で106例

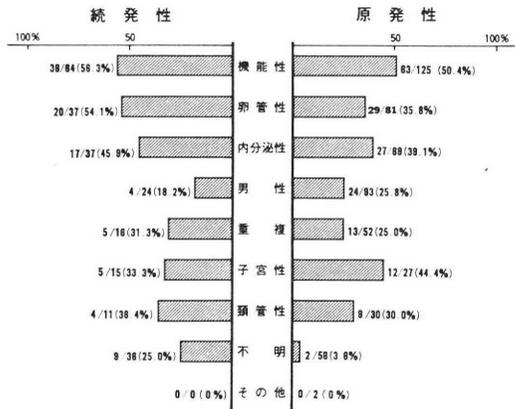


図5 不妊因子別にみた妊娠率

中44例(41.5%)とこの3者で比較的高率であった. また低率であったのは男性因子で117例中28例(24.0%)であり, 特に続発性不妊の男性因子では24例中4例(18.2%)と低い結果が得られた. また同様に卵管因子において原発性不妊と続発性不妊を比べると, 原発性不妊81例中29例(35.8%)に対し, 続発性不妊37例中20例(54.1%)と続発性不妊のものに妊娠率の高い傾向が認められた.

7) 年齢よりみた妊娠率(図6, 表2)

図6に年齢別にみた妊娠率のグラフを示した. しかし年齢により人数のばらつきが激しいため仮に30歳で線をひくと表2のようになる. 30歳未満では原発性不妊384例中141例(36.7%), 続発性不妊144例中61例(46.5%) (%, 全体として528例中208例(39.4%))であるのに対

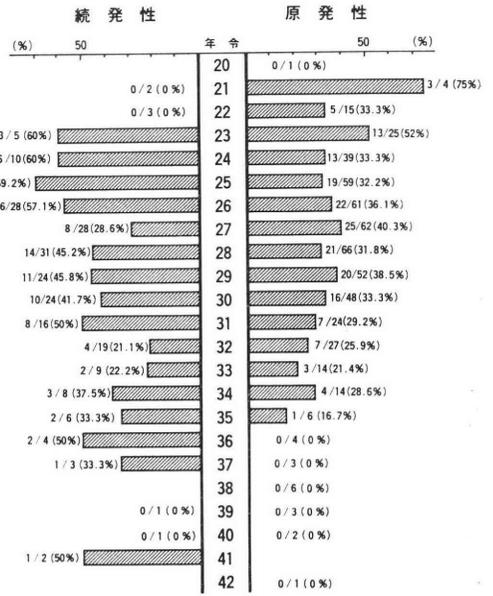


図6 妊娠率の年齢別検討

表2 妊娠率の年齢別検討

	続発性	原発性	計
30才未満	46.5% (61/144)	36.7% (141/384)	39.4% (208/528)
30才以上	35.1% (33/94)	25.2% (38/151)	30.0% (71/245)
計	42.0% (100/238)	33.4% (179/535)	38.1% (279/773)

し, 30歳以上では原発性不妊151例中38例(25.2%), 続発性不妊94例中33例(35.1%), 全体として245例中71例(30.0%)と高齢不妊患者では, その妊孕力も低下している事が想像された. また全体として原発性不妊と続発性不妊を比較すると原発性不妊535例中179例(33.4%), 続発性不妊238例中100例(40.2%)と続発性不妊の方が妊娠率が高い結果が得られた.

8) 妊娠成立に関与した治療法(表3)

表3 妊娠に直接関与した治療法

続発性	治療法	原発性
3	Clomiphene	6
0	Clomiphene-HCG	2
0	Sexovid-HCG	1
1	Clomiphene-Premarin	1
11	HMG-HCG	32
0	PMS-HCG	2
1	Clomiphene-HMG-HCG	1
0	Premarin	1
0	Bromocriptine-HMG	1
4	Kaufmann	8
7	HSG	11
3	Insufflation	4
5	Hydrotubation	8
6	Post-Huhner	17
4	AIH	22
0	AID	15
3	Endometrial-curettage	7
0	Myomectomy	3
0	Ostomy	1
1	Wedge-resection	0
59	No treatment	63

原発性、続発性不妊別に妊娠に直接関与した治療法を表3に示したが、これらをホルモン療法、卵管治療、人工授精、手術と大きく4つに分類して、それぞれの妊娠率を比較すると原発性不妊では、全妊娠数179例のうち、ホルモン療法55例(30.7%)、卵管治療23例(12.8%)、人工授精54例(30.2%)、手術11例(6.1%)に対し、続発性不妊では全妊娠数100例のうち、ホルモン療法20例(20%)、卵管治療15例(15%)、人工授精10例(10%)、手術4例(4%)と原発性不妊ではホルモン療法、人工授精が続発性不妊ではホルモン療法、卵管治療が高率であった。またホルモン療法の中でも HMG-HCG 療法の割合が高く、ホルモン療法全75例中43例(57.3%)であった。

#### IV. 考 察

内視鏡の積極的利用による不妊症の診断・治療が飛躍的に進歩し、わが国でも IVF-ER の成功例が報告され、不妊症診療の新しい局面が展開されてきた。また一方では女性の平均初婚年齢は他国に比してきわめて高いこと、職業婦人の結婚後によくみられる一定期間の避妊などが挙児年齢の高齢化をもたらしている。また婚前交渉も多くみられるようになった。このように社会状況の変動のなかで挙児希望患者の取扱いにも一考を要する時期にあると思われる。前述のわが国の平均初婚年齢は25.3歳(昭和57年度)であり、この年齢は既に女性の妊孕力のピークを過ぎているわけで、したがって挙児希望者の治療は第1に年齢を十分考慮して開始すべきであると考えられる。

不妊症の定義としては、周知の通り各学会によつていろいろな定義がなされているが、今回われわれは挙児希望を主訴として来院した婦人全例をその不妊期間にとらわれず、年齢的考慮を加えた上で、検査および治療の対象とした。その理由は前述のような種々の理由による。

不妊症の頻度に関しては、前述の不妊期間の採り方や報告機関の性質等によりかなりの幅がみられるが、今回の統計では全外来新患数16131例中773例(4.8%)であった。これは諸家の報告<sup>1,2,3)</sup>に比べ大きな差はなかつた。

原発性不妊、続発性不妊の比率であるが、2.2:1で原発性不妊が多く、中居<sup>1)</sup>、寺田<sup>2)</sup>、富田<sup>3)</sup>と同様な値であった。これに対し藤村<sup>4)</sup>は3.7:1と原発性不妊に高い報告をしており、一方品田<sup>5)</sup>は逆に1.6:1と接近した比率を報告している。これも報告機関の性格や地域性によりかなりばらつきがあるようである。

初診時年齢に関しては、原発性不妊平均27.9±3.53歳、続発性不妊平均28.9±3.66歳と続発性不妊に当然高

く、諸家の報告と同様であつた。

初診時不妊期間は寺田<sup>2)</sup>は15%が1年以内、品田<sup>5)</sup>はその21%が1年以内であつたと報告している。われわれの統計では1年以内の受診は原発性、続発性不妊合わせて81例(11%)で、受診までの不妊期間がやや長い傾向がみられた。またさらに原発性不妊の約1/4が受診するまでに5年以上の不妊期間があることは当地域の不妊症に関する意識が、強いては啓蒙がまだまだ低レベルにあることを示していると同時に、早期検査、治療の必然性もあると思われる。

不妊因子が何かを決定することは、今後の治療方針を決めてゆくために最も重要な作業であるが、どれが不妊原因の主役であるかを判定するのに困難を感じる例も少なくない。今回の統計では前述の如く原発性、続発性不妊ともに機能性因子が不妊原因としてトップであり、卵管因子、内分泌因子、男性因子がこれに次いでいた。内分泌因子が最も高い頻度を占める施設が多いと思われるが、当科では機能性不妊が多いことが特徴の一つであり、その理由は、不妊期間を問わず年齢的配慮を加えた上で挙児希望患者のほとんどすべてを取扱つたこと、他医での診療を経ていない(難治性でない)新患が多いこと、黄体機能不全の疑いはあるが、それが不明瞭な場合は内分泌因子には入れず機能性不妊に入れたことなどである。また原発性不妊において男性因子が多いのも当科の特徴の一つである。それ故、当科における人工授精治療例が多く、またこれによる妊娠例も増加してきた。

治療開始後妊娠に到るまでの期間は、2年以内にその9割以上が妊娠に到っている。これは諸家の報告とほぼ同様である。つまり治療の目安としてこの2年間という期間は重要であり、患者にもこれらの事実を充分説明の上、一応2年以内の妊娠を一つの目標とし、不妊因子の早期発見およびそれに対する効果的、集中的な早期治療をすすめていくことが重要であると考えられる。

不妊因子別にみた妊娠率の比較であるが、原発性、続発性不妊において、機能性因子ではそれぞれ50.4%、56.3%、卵管因子では35.8%、54.1%、内分泌因子では39.1%、45.9%と全般的に諸家の報告に比べ高率である結果であつた。特に卵管因子に関しては原発性、続発性不妊ともにいずれも非常に高率であつた。これは卵管因子を診断、分類する際、単に子宮卵管造影にて Perifimbrial adhesion, Peritubal adhesion 等の軽度の所見があつた場合も、他に不妊原因と思えるものが見つからない場合これを卵管因子に分類したことによると考えられる。また全般的に見ても妊娠率は原発性不妊535例中179例(33.4%)、続発性不妊238例中100例(42.0%)、全体で773例中279例(36.1%)と他の報告に比べ高率で

あつた。その理由として挙児希望を主訴として当科を受診した患者に、不妊期間に厳密な規定を設けず早期に治療を開始したこと、そして当科不妊患者は比較的軽症例が多いことなどが挙げられる。また年齢別にみた妊娠率についてみると、高齢になるにしたがって妊娠率が低下する事実が明らかになった。妊娠に直接関与したと考えられる治療は多種多様であつたが、当科の特徴の一つとして、積極的に施行している人工授精による妊娠例が多いことである。長期機能性不妊にある婦人に対してもほぼ全例 A. I. H を施行し、妊娠に成功している例が多い。また、卵管検査後（検査周期を含めて3周期までとした）に妊娠例が多いことは諸家が指摘するように卵管検査が治療的効果を持つという事実を証明していると思われる。

最後に、不妊症診療の基本はやはり他疾患がそうであるように早期発見、早期治療にあることを明記したいと思う。

#### 文 献

- 1) 中居光生, 馬嶋恒雄, 西島正博, 尾崎周一, 前田 徹, 新井正夫, 長内国臣: 当院における不妊外来統計, 日不妊会誌, 25: 4, 506, 1980.
- 2) 寺田夏樹, 前川岩夫, 内藤正文, 小堀恒雄, 高見沢裕吉: 最近の当教室における不妊外来統計, 日不妊会誌, 28: 69, 1983.
- 3) 横山 敬, 楠原浩二, 松本和紀, 安江育代, 木村英三, 蜂屋祥一: 高年不妊婦人の臨床的検討, 日不妊会誌, 28: 76, 1983.
- 4) 森下 一, 森 崇英, 嶋川ひろ子: 当科不妊外来における妊娠成功例の妊娠, 分娩経過の検討, 日不妊会誌, 28: 89, 1983.
- 5) 富田哲夫, 桑原惣隆, 杉浦幸一, 石間友明, 松井一成: 当教室における最近五年間の不妊症に関する統計的考察, 日不妊会誌, 28: 94, 1983.
- 6) 藤村健次, 相良祐輔, 野上一郎, 秋本暁久, 関場 香: 当教室における不妊外来統計, 日不妊会誌, 24: 74, 1979.
- 7) 品田孝夫, 竹中恒久, 横田佳昌, 大和田信夫, 阿美邦栄: 不妊外来における臨床統計的観察, 日不妊会誌, 24: 80, 1979.

### A Clinical review of the infertile women attending our fertility clinic during the past ten years

**Kunio Kometani, Makoto Ito, Masaaki Takahashi, Hiromu Chihara and Masanori Ochi**

Department of Obstetrics & Gynecology  
Fujita Gakuen University Hospital  
(Second Educational Hospital)

A total of 773 infertile women attending our fertility clinic during the past ten years since the establishment of Fujita Gakuen University Hospital in 1973, were analysed to elucidate the clinical features of the infertile women. The incidence of infertile women among the overall patients visited during the same period was 4.8%. 773 infertile women consisted of 535 women with primary infertility (W. P. I.) and 238 women with secondary infertility (W. S. I.). Therefore, the ratio between W. P. I. and W. S. I. was approximately 7 to 3. The average age of both groups at the first visit was  $27.9 \pm 3.53$ ,  $28.9 \pm 3.66$  years of age, respectively. Though 76% women of W. P. I. visited our clinic within five years, the remainder (24%) spent more than five years without having any consultation for infertility. Among various causes of infertility, unexplained infertility had the highest incidence both in W. P. I. and in W. S. I. (23.4%, 26.9%, respectively). 179 W. P. I. and 100 W. S. I. were conceived. The pregnancy rate turned out to be 33.5% and 42.0%, respectively. Accumulative rate of pregnancy within two years after treatment was 91.4%. Therefore, it was suggested that infertile women should be managed extensively with two years limitation.

(受付: 昭和59年3月13日)

# マウス卵巣卵の受精能獲得過程と それに及ぼす HCG, Estradiol, Progesterone の影響

Studies on the Oocyte Maturation with Special Reference to the Role of HCG,  
Estradiol and Progesterone in *in vitro* Maturation of mouse Oocytes

東京大学産科婦人科学教室

香山文美 佐藤孝道

Fumiyoshi KAYAMA Kodo SATO

水野正彦 坂元正一

Masahiko MIZUNO Shoichi SAKAMOTO

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

マウス卵巣卵を PMS・HCG 投与後、経時的に採取し、そのまま、あるいは媒精後、位相差顕微鏡下に観察した。さらに、PMS 投与48時間後の卵巣卵を、HCG, estradiol (E<sub>2</sub>) もしくは progesterone (P) を含む、あるいは含まない溶液中で培養した後媒精し、媒精前後の卵を観察して以下の結果を得た。1) *in vivo* で卵核胞の崩壊は HCG 投与後3-7時間、第1極体の放出は10時間で起こり、第1極体の放出にほぼ一致して受精能を獲得する。2) *in vitro* では、卵核胞の崩壊は1.5-3時間で起こるが、第1極体を放出する卵の頻度は少ない。3) HCG, E<sub>2</sub>, P はいずれも *in vitro* では卵核胞の崩壊、第1極体の放出に影響しない。4) HCG もしくはPは、*in vitro* で卵の受精能を向上させる。5) この作用は、卵丘細胞非付着卵でも認められ、HCG およびPが卵に直接作用する可能性が示唆された。

(Jap. J. Fert. Ster., 30(1), 33-39, 1985)

## はじめに

卵巣卵は LH surge 後、排卵・受精に向けて著しい変化を遂げる。卵の成熟と呼ばれるこの過程は、減数分裂の再開、第1極体の放出など核レベルの成熟と、精子との結合能やその後の発生能の獲得など細胞質もしくは膜レベルでの成熟から成ると考えられる。また、同時に周辺にある卵丘細胞や透明層にも、精子の通過を可能にするような変化が起こることが知られている。

卵の成熟機序に関する研究は、Pincus & Enzmann が卵を卵胞外に取り出すことによつて、自然に減数分裂が再開することを報告したことに始まる<sup>1)</sup>。その後、卵成熟の機序に関する多くの研究成果が発表されてきた。その結果、哺乳動物では卵成熟に LH surge が重要な役割

を果たすこと、減数分裂の再開を抑制する物質 (oocyte maturation inhibitor: OMI) が存在することが明らかとなった<sup>2)</sup>。一方、排卵前の卵胞液中には、高濃度の estrogen (E) や progesterone (P) が存在し、estradiol (E<sub>2</sub>) は1-2 $\mu$ g/ml, P は1-3 $\mu$ g/ml にまで達するとされている<sup>3,4)</sup>。しかし、E, P などのステロイドホルモンが果す役割については、実験動物によつて異なる結果を示唆する報告が多く、また同じ動物で正反対の作用が報告されている場合もあり、ほとんど未解明といつてよい<sup>5-11)</sup>。また、精子との結合能あるいは、その後の発生能の獲得については、減数分裂の再開や第1極体の放出という核レベルでの変化と、時間的に密接な関係があることはわかっているものの<sup>12)</sup>、その機序についてはよくわかっていない。

本研究の目的は、卵成熟の過程における内分泌環境の役割を、マウス体外受精の実験系を用いて検討することにある。この目的のために実験Aでは、主として *in vivo* におけるマウス卵巣卵の受精能獲得過程を、実験Bでは *in vitro* での卵巣卵の成熟と、それに及ぼす human chorionic gonadotropin (HCG), E<sub>2</sub>, P の役割を検討した。

### I. 実験方法

卵の採取には、10-12週齢の成熟 Swiss albino 雌マウスを、精子の採取には、同週齢同系の雄マウスを用いた。卵および精子の培養には、豊田らの開発した modified Krebs Ringer 液 (Na Cl 119.3mM, KCl 4.78mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.71mM, KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> 1.19mM, MgSO<sub>4</sub> 1.19mM, NaHCO<sub>3</sub> 25.07mM, Na-Pyruvate 1.00mM, Na-lactate 21.58mM, glucose 5.56mM) に penicillin potassium 0.075gm/l, streptomycin sulfate 0.050gm/l および bovine serum albumin, fraction V (Kodak 社または Sigma 社) 4gm/l を追加したもの (以下 mKR 液と略す) を用い<sup>13)</sup>, 5% CO<sub>2</sub>, 95% air, 37°C の環境下で培養した。また、mKR 液は使用直前に 1NHCl により pH 7.4 に調整し、0.45 μ のミリポアフィルター (ミリポアフィルター社) にて濾過滅菌した。dish は 35×10mm の Falcon 社製 (No. 3001) を使用した。dish 内の培養液は特に断わらない限り、蒸発や pH の変動を防ぐため、5%CO<sub>2</sub>, 95% air で飽和したパラフィン・オイル (関東化学) で包埋した。

卵巣卵は雌マウス卵巣を、mkR 液中で 26 G 注射針 (テルモ) によつて卵胞を穿刺し採取した。卵管卵は、卵管膨大部を mKR 液中でピンセットによつて割いて採取した。

媒精には、雄マウスの精巣上皮上体尾部を培養液中で切開し、遊走した精子を capacitation のため 2 時間前培養して用いた。媒精時の最終精子濃度は 5-10×10<sup>6</sup>/ml とした。

卵の観察は、媒精した場合にはその2-3時間後に、まず位相差顕微鏡下に行なつた。精子頭部が卵実質と融合し、精子尾部の運動が停止しているものを受精とした。生標本で観察後さらに10%ホルマリンで固定し、ラクモイド染色 (45%酢酸にて溶解した 0.5%ラクモイド液) を行なつて、精子頭部の膨化の有無を固定標本で確認した (図1)。

実験A: *in vivo* におけるマウス卵巣卵成熟過程の観察

雌マウスに pregnant mare serum gonadotropin (PMS: 帝国臓器) 10 IU, HCG (帝国臓器) 10 IU を

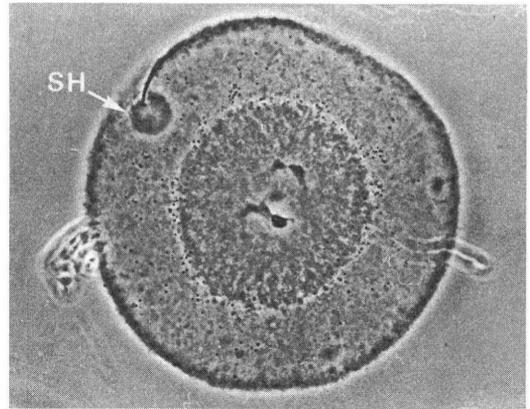


図1 固定標本における受精卵  
膨化した精子頭部(SH)が確認できる

48時間間隔で腹腔内投与後、経時的に卵巣卵を採取し、1) 卵核の状態、2) 受精能の獲得過程を観察した。

卵核の状態は、卵採取後そのまま位相差顕微鏡下にて観察し、その後固定、ラクモイド染色を行ない確認した。

受精能の獲得過程は、卵採取後直ちに0.5ml mKR 液中で媒精して前述の方法により観察し、卵管腔への精子の侵入、卵実質と精子の結合およびそれと卵核の状態との関係を観察した。

実験B: *in vitro* におけるマウス卵巣卵の成熟と、それに及ぼす HCG, E<sub>2</sub>, P の影響

雌マウス腹腔内に PMS 10 IU を投与48時間後に卵巣卵を採取して、卵丘細胞附着群と卵丘細胞非附着群に分けた。

1) 採取した卵巣卵を mKR 液中で一定時間づつ培養した後、媒精し、培養時間と減数分裂の再開、受精能の変化の関係を検討した。

2) ① mKR 液 (対照群) ② HCG 2 IU/ml 添加 mKR 液 ③ HCG 10 IU/ml 添加 mKR 液 ④ DMSO (dimethyl sulfoxide: 帝国臓器) 20 μl/ml 添加 mKR 液 (DMSO 対照群) ⑤ E<sub>2</sub> (帝国臓器) 2 μg/ml および DMSO 20 μl/ml を添加した mKR 液 ⑥ P (帝国臓器) 2 μg/ml および DMSO 20 μl/ml を添加した mKR 液のいずれかで、採取した卵を10時間培養後媒精せしめ、実験Aと同様の観察を行なつた。

なお、DMSO は E<sub>2</sub> および P の溶媒として用いたので、④は⑤と⑥の対照群とした。また、E<sub>2</sub> P, DMSO はパラフィン・オイルに溶解するため、この実験では培養液はすべて 3 ml とし、パラフィン・オイルで包埋せずに培養した。

有意差は  $\chi^2$  検定によつて算出した。

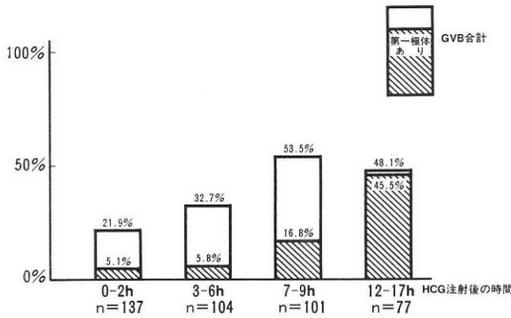


図2 HCG 注射後の時間と減数分裂の再開 (n: 観察した卵の数)

### II. 実験結果

実験 A : *in vivo* におけるマウス卵巣卵成熟過程の観察

#### 1) *in vivo* における卵核の成熟

PMS-HCG 投与後の時間と卵核の状態との関係を見ると、HCG 注射後 0-2 時間では 21.9%、3-6 時間では 32.7%、7-9 時間では 53.5% の頻度で卵核胞の消失 (germinal vesicle breakdown: GVB) が起こり、減数分裂が再開していた (図 2)。また、第 1 極体の放出は卵管卵を含めると、7-9 時間でその頻度は上昇し始め、12 時間以上で 45.5% の卵に第 1 極体の放出が認められた。

#### 2) *in vivo* における卵の受精能獲得

本実験系が体外受精系として問題ないことを確認するために行なった卵管卵の受精率は、79.2% と良好な成績であった。

卵巣卵の受精率は、PMS のみ投与した場合 0% であった。しかし、HCG 投与 2-7 時間後には 10.6-16.7% と上昇し、特に HCG 投与 10 時間後には 53.8% の卵が受精した。すでに大部分の卵が排卵した後の卵巣卵では、HCG 投与 12 時間後の 28.2% から、14 時間後の 15.4% と受精率が順次低下した (図 3)。

また、囲卵腔に精子が侵入した卵の割合は、HCG 投与

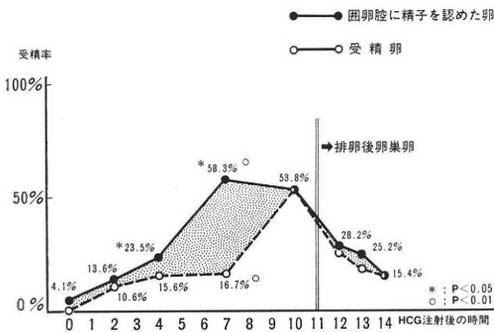


図3 採卵の時期と受精率

前では 4.1% であつたが、HCG 投与 4 時間後には 23.5%、7 時間後には 58.3% と、特に 4-7 時間の間で上昇した。

さらに媒精 2 時間後の減数分裂の stage と受精率の関係を見ると、GVB 前の 3.3% に対し、GVB 後、第 1 極体放出前では 16.1%、第 1 極体放出後では 45.0%、第 2 減数分裂中期以後の卵では 100% と、stage が進むにつれて受精率の増加が見られた (図 4)。

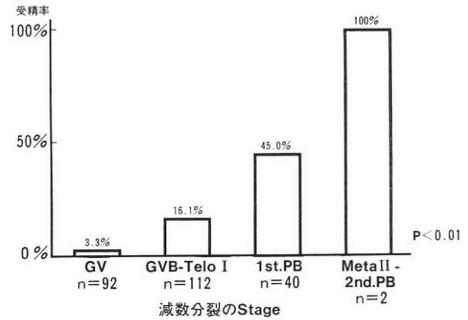


図4 減数分裂の Stage と受精率 (GV: germinal vesicle, GVB: germinal vesicle breakdown, Telo I: 1st. telophase, Meta II: 2nd metaphase, PB: polar body, n: 観察した卵の数)

実験 B : *in vitro* におけるマウス卵巣卵の成熟と、それに及ぼす HCG, E, P の影響

#### 1) 卵巣卵の *in vitro* 培養と、GVB、第 1 極体の放出、受精能の変化

PMS 投与 48 時間後に採取した、卵巣卵を体外培養すると、GVB の頻度は採卵直後の 34.2% から、1.5-3.5 時間で 72.7% に上昇する (図 5)。

また、mKR 液中での培養による第 1 極体の放出は、卵丘細胞の有無にかかわらず、培養 9-10 時間の 10-15% から、14 時間以上培養の 23-30% と増加した。しかし、受精率はすべて 10% 以下で、培養による受精率の改善は認められなかった (図 6, 7)。

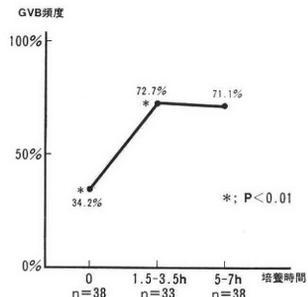


図5 体外培養による減数分裂の再開 PMS 注射 48 時間後の媒精していない卵巣卵 (n: 観察した卵の数)

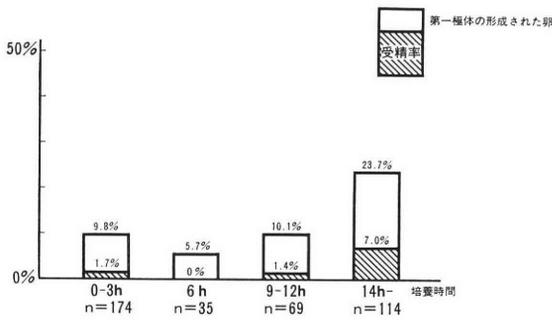


図6 卵丘細胞付着卵巣卵の培養時間と減数分裂の進行・受精率の変化 (n: 観察した卵の数)

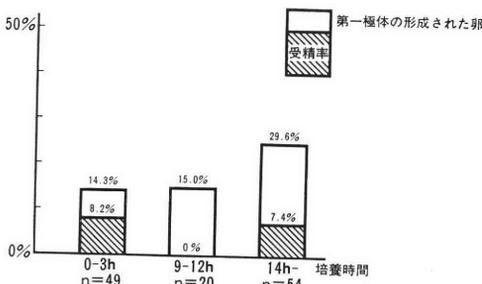


図7 卵丘細胞非付着卵巣卵の培養時間と減数分裂の進行・受精率の変化 (n: 観察した卵の数)

2) HCG, E<sub>2</sub>, もしくはPを含む mKR 液中での培養と GVB の頻度

GVB の頻度は、各ホルモンの添加の有無にかかわらず、培養10時間後には61-97%の高頻度で認められた(図8, 9)。

3) HCG, E<sub>2</sub>, もしくはPを含む mKR 液中での培養と、第1極体を放出した卵の頻度

卵丘細胞の付着、非付着にかかわらず、単純な mKR

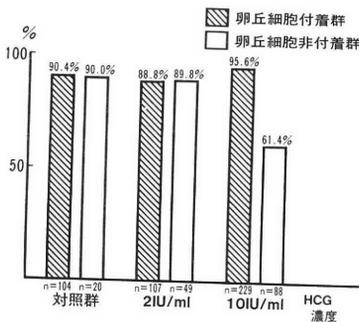


図8 HCG 添加培養の影響—GVB の頻度— (n: 観察した卵の数)

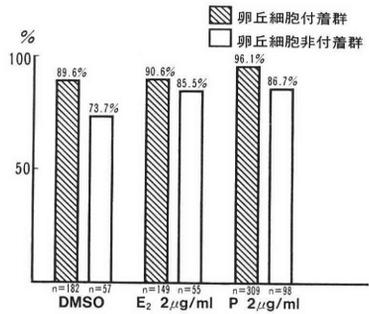


図9 estradiol あるいは progesterone 添加培養の影響—GVB の頻度— (n: 観察した卵の数)

液で培養した群の8.7-15%に第1極体の放出が認められたが、HCG 2IU/ml, 10 IU/ml, DMSO, E<sub>2</sub>, P の群ともにほとんど0%に近く、第1極体の放出がむしろ、これらのホルモンもしくはDMSO 添加で抑制される可能性も示唆された(図10, 11)。

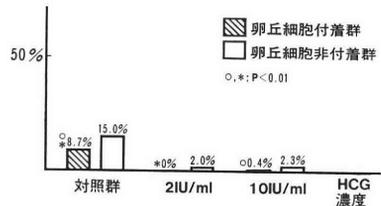


図10 HCG 添加培養の影響—第1極体の形成された卵の頻度—

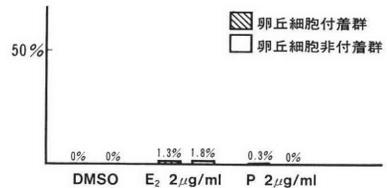


図11 estradiol あるいは progesterone 添加培養の影響—第1極体の形成された卵の頻度—

4) HCG, E<sub>2</sub>, もしくはPを含む mKR 液中での培養と、囲卵腔へ精子が侵入した卵の頻度

囲卵腔に精子の侵入した卵の頻度は、卵丘細胞付着群で対照群の14.4%に比し、HCG 10 IU/ml 添加群で55.5%と高頻度に認められた(P<0.01)。また、有意ではないが、卵立細胞非付着群でも対照群の20.0%に対し、HCG 10 IU/ml 添加で50.0%の卵の囲卵腔に精子が侵入した(図12)。

一方、DMSO のみの添加群でも、対照群に比し高頻度に囲卵腔に精子が侵入する傾向が認められた。特に P

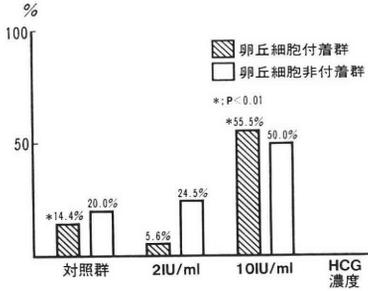


図12 HCG 添加培養の影響  
— 囲卵腔に精子が侵入した卵の頻度—

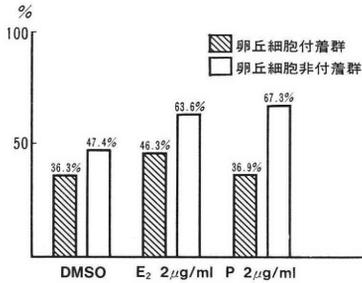


図13 estradiol あるいは progesterone 添加培養の影響  
— 囲卵腔に精子が侵入した卵の頻度—

2μg/ml を添加した卵丘細胞非附着群の卵では、精子が 67.3% と高頻度に囲卵腔に侵入していた (図13)。

5) HCG, E<sub>2</sub>, もしくは P を含む mKR 液での培養と、受精率の変化

卵丘細胞附着群, 非附着群ともに HCG 10 IU/ml の添加によって、受精率がそれぞれ1.0%から14.8% (P < 0.01), 0%から11.4%へと上昇した。一方 HCG 2 IU/ml 添加群では、卵丘細胞附着群でほとんど影響なく、卵丘細胞非附着群では対照群に比して10.2%と高頻度に受精卵が認められた (図14)。

また、P 添加群では卵丘細胞附着群, 非附着群ともに、DMSO 添加群のそれぞれ0.5%, 7.0%に比して、11.3%, 27.6%と高頻度に受精卵が認められたが、E<sub>2</sub> 添加群では DMSO 添加群との間に差を認めなかつた (図15)。

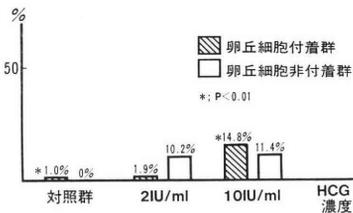


図14 HCG 添加培養の影響  
— 受精卵の頻度—

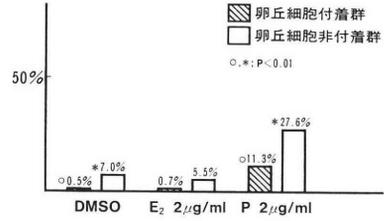


図15 estradiol あるいは progesterone 添加培養の影響—受精卵の頻度—

### III. 考 察

1) 卵は LH surge もしくは HCG 投与後、ある時間を経て第1減数分裂前期から分裂を再開することが知られている。マウスでは HCG 投与2時間以後に GVB が起こり、10時間以後に第1極体放出が見られるという<sup>14)</sup>。今回のわれわれの実験でも GVB は HCG 投与2時間後より増加し、9時間以後で第1極体を放出する卵の頻度が増加した。

また、卵巣卵の受精能も HCG 投与後時間を追って上昇することが知られている。Iwamatsu ら<sup>15)</sup>によれば、HCG 注射後精子の卵への侵入頻度は経時的に上昇し、6時間以後に60%前後の精子侵入を見たという。また、減数分裂の stage との関係では、第1減数分裂の時期には70-80%の精子侵入であつたという。われわれの実験でも同様の経時的变化が観察されており、卵巣卵が受精能を獲得するのは GVB から第1極体放出の時期にほぼ一致することが明らかとなつた。

さらにわれわれは、囲卵腔に精子が侵入してはいるが、精子と卵実質が融合していない卵の頻度から、卵実質の受精能獲得に先立つて、卵丘細胞や透明帯に精子の侵入を容易にするような変化が起こることを明らかにした。卵丘細胞や透明帯に起こる変化が、卵実質の受精能獲得に先行することは、両者が独立して起こる変化であるか、もしくは前者に関連した変化が後者に何らかの影響を及ぼす可能性を示唆している。なお、実験Bで培養時間を10時間としたのは、*in vivo* における受精能獲得に要する時間が HCG 投与後約10時間であつたことによつている。

2) 卵は卵胞から培養液中に放出することによつて、自然に減数分裂の再開、すなわち GVB が起こる。*in vitro* での減数分裂の再開は、*in vivo* で HCG を投与した時よりもすみやかで、かつ高頻度である (図2, 図5)。これは卵胞中に何らかの減数分裂再開の抑制物質が存在し、*in vivo* では LH もしくは HCG によつて、その産生・伝達・作用のいずれかが抑制されるのに

対し, *in vitro* では一挙にその作用が消失して GVB が起こるためと考えられる。

P の卵の減数分裂再開に及ぼす影響については, カエルや魚類では減数分裂再開の作用があることが知られている<sup>16-18)</sup>。この場合 P は卵表面に働いて, 卵内に卵成熟促進因子 (maturation promoting factor: PMF) が作られ, これが減数分裂の再開を促進すると考えられている。しかし, 哺乳動物では P の減数分裂再開における役割は必ずしも明らかではない。 *in vitro* においては, 卵を卵巣外に取り出すだけで GVB が高頻度で見られることから, HCG, E<sub>2</sub>, P が GVB に与える影響については, 本実験から知ることは出来ない。

このように *in vitro* で GVB は高頻度に起るが, 第 1 極体の放出は遅れ, また低頻度である。培養条件が卵に何らかの悪い影響を及ぼす可能性と共に, 第 1 極体放出を促進するような物質が培養液中に欠損している可能性も示唆される。もし第 1 極体の放出を促進するような物質が存在するとしても, それが直接的に HCG, E<sub>2</sub>, P でないことは, 本実験でこれらのホルモンにより, 第 1 極体の放出がむしろ抑制されることから明らかである。

3) HCG は, *in vitro* で 10 IU/ml の濃度で, 卵丘細胞付着群・非付着群ともに, 囲卵腔への精子の侵入および受精の頻度を向上させることが明らかとなった。この作用は 2 IU/ml の濃度では明らかでない。卵丘細胞付着群と非付着群で比較すると, 10 IU/ml の HCG の作用は卵丘細胞付着群で著明であった。しかし, 有意ではないが, 卵丘細胞非付着群でも HCG の添加培養によって囲卵腔への精子侵入, 受精卵の頻度が増加していた。このことは, HCG が卵丘細胞を介さず卵に直接的にも作用しうる可能性を示唆しているといえる。

4) E<sub>2</sub> は 2 μg/ml の濃度で培養液に加えた場合, 囲卵腔への精子の侵入・受精の頻度ともに影響を与えず, 少なくとも本実験における条件下では, 卵の成熟には何の影響も及ぼさないことが明らかとなった。

5) P は 2 μg/ml の濃度で, 囲卵腔への精子の侵入には影響しないが, 卵実質と精子頭部の融合過程である受精能を有意に向上させることが明らかとなった。この変化は卵丘細胞付着群でも非付着群でも同様に認められ, P が卵丘細胞を介さず, 卵に直接作用していることを示唆している。

組織化学的には 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) 活性がハムスター卵胞の基底膜付近の顆粒膜細胞で排卵約 8 時間前に認められ, その頃から P の合成が始まることが報告されている<sup>19)</sup>。LH surge 後, 数時間で P 産生がピークに達することが幾つか報告されている<sup>20, 21)</sup>。このピークは, GVB 後で, かつ第 1 極体を

放出して卵の受精能が向上する前の時期に相当している。この P が卵の成熟や排卵にどのような役割を果たすかはよくわかっていない。

P が卵の受精能獲得に促進的に作用するという今回の実験結果は, GVB の後, 第 1 極体放出および受精能の向上の前に P がピークに達するという報告と一致し興味深い。P によって GVB や第 1 極体放出頻度はほとんど影響を受けないから, P は核レベルの変化を介さず, 卵細胞質もしくは膜に直接作用し, 受精能を獲得させるものと考えられる。また, 核レベルでの成熟と, 細胞質, 膜レベルでの成熟が独立した過程である可能性も示唆されたといえる。

6) 以上, HCG, P とともに卵の受精能獲得に促進的に作用するという結果が得られた。しかし, 両者がどのような関係にあるのか, また HCG や P がどのような機序を介して, 卵の受精能獲得を促進させるのかは今後の課題といえる。

本研究の要旨は, 第 27 回日本不妊学会 (1982 年: 東京) および第 35 回日本産婦人科学会 (1983 年: 大阪) の学術講演会で発表した。

## 文 献

- 1) Pincus G. and Enzmann E. V.: The comparative behavior of mammalian egg *in vivo* and *in vitro*. I. The activation of ovarian eggs., *J. Exp. Med.* 62: 665, 1935.
- 2) Tsafiri A., Dekel N. and Bar-Ami S.: The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation, *J. Reprod. Fert.* 64: 541, 1982.
- 3) McNatty K. P., Hunter W. M., McNeilly A. S., Sawers R. S.: Changes in the concentration of pituitary and steroid hormones in the follicular fluid of human graafian follicles throughout the menstrual cycle, *J. Endocr.*, 64: 555, 1975.
- 4) 庄司 誠, 木村英三, 中田裕信, 大川 清, 蜂屋祥一, 小幡 功, 今川信行: ヒト卵胞成熟機構とステロイド産生機構との関係について—卵胞の形態的観察と卵胞液中ステロイド濃度との比較検討を通して—, *日産婦誌*, 34: 43, 1982.
- 5) Kaplan R., Dekel N. and Kraicer P. F.: Acceleration of onset of oocyte maturation *in vitro* by luteinizing hormone, *Gamete Research* 1: 59, 1978.
- 6) Gwatkin R. B. L. and Andersen O. F.: Hamster oocyte maturation *in vitro*, inhibition by follicular components, *Life Sci.* 19: 527, 1976.
- 7) Smith D. M. and Tenny D. Y.: Effects of steroids on mouse oocyte maturation *in vitro*,

- J. Reprod. Fert. 60 : 331, 1980.
- 8) Eppig J. J. and Koide S. L. : Effects of progesterone and oestradiol-17 $\beta$  on the spontaneous meiotic maturation of mouse oocytes, J. Reprod. Fert. 53 : 99, 1978.
  - 9) McGaughey R. W. : The culture of pig oocytes in minimal medium, and the influence of progesterone and estradiol-17 $\beta$  on mitotic maturation, End. 100 : 39, 1977.
  - 10) 森 崇英, 鈴木 瞭, 森本紀彦, 江崎洋二郎, 久保潔士, 新居延健二, 西村敏雄: ラット卵胞成熟分裂におけるエストロゲンの意義に関する実験的研究, 産婦進歩, 32 : 327, 1980.
  - 11) 森本紀彦: ラット卵細胞成熟分裂における Progesterone の意義に関する実験的研究, 日産婦誌, 33 : 1981, 1981.
  - 12) Thibault C. and Gérard M. : Cytoplasmic and nuclear maturation of rabbit oocyte *in vitro*, Annls. Biol. Anim. Biochim. Biophys. 13 : 145, 1973.
  - 13) Toyoda Y., Yokoyama M. and Hosi T. : Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm, Jpn. J. Anim. Reprod. 16 : 147, 1971.
  - 14) Edwards R. G. and Gates A. H. : Timing of the stages of the maturation divisions, ovulation, fertilization and the first cleavage of eggs of adult mice treated with gonadotrophins, J. Endocrin., 18 : 292, 1959.
  - 15) Iwamatsu T. and Chang M. C. : Sperm penetration *in vitro* of mouse oocytes at various time during maturation, J. Reprod. Fert. 31 : 237, 1972.
  - 16) Goetz F. W. and Bergman H. L. : The effects of steroids on final maturation and ovulation of oocytes from brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and yellow perch (*Perca flavescens*), Biol. Reprod., 18 : 293, 1973.
  - 17) Maller J. L. and Krebs E. D. : Progesterone-stimulated meiotic cell division in *Xenopus* oocytes, J. Biol. Chem., 252:1712, 1977.
  - 18) Baulien E. E., Godeau F., Schorderet M. and Schorderet-Slatkine S. : Steroid-induced meiotic division in *Xenopus laevis* oocytes, surface and calcium, Nature, 275:593, 1978.
  - 19) 新村末雄, 石田一夫: ハムスター顆粒層細胞の黄体化に関する酵素組織化学的研究, 日不妊会誌, 28 : 118, 1983.
  - 20) Szoltys M. : Progestagen dynamics in pre-ovulatory follicles of rats, J. Reprod. Fert. 48 : 397, 1976.
  - 21) Saidapur S. K. and Greenwald G. S. : Ovarian steroidogenesis in the proestrous hamster, Biol. Reprod., 20 : 226, 1979.

Studies on the oocyte maturation  
with special reference to the  
role of HCG, estradiol and  
progesterone in *in vitro*  
maturation of mouse oocytes

Fumiyo Shi Kayama, Kodo Sato, Masahiko Mizuno and Shoichi Sakamoto

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

Two experiments were carried out. In the first experiment, the process of oocyte maturation *in vivo* was studied. Ova collected by puncturing ovaries from female mice treated with PMS and HCG were studied under a phase contrast microscope before and after insemination. Following results were obtained.

1) Germinal vesicle breakdown (GVB) was observed to occur 3 to 7 hours after HCG injection. The first polar body formation was revealed to complete in 10 hours after HCG injection.

2) Remarkably increased fertilizability of oocytes was observed at the almost same time as the completion of the first polar body extrusion.

The second experiment was carried out to study the effect of HCG, estradiol and progesterone on oocyte maturation *in vitro*. Oocytes were collected from ovaries of mice given 10 IU of PMS 48 hours before sacrifice. Oocytes with or without cumulus cells were cultured separately in the medium without HCG, estradiol and progesterone and with one of the hormones. After incubation, ova were studied before or after insemination. Following results were obtained. 3) GVB was observed after incubation of 1.5 to 3 hours, although the incidence of oocytes with first polar body was low even after incubation of 14 hours. 4) Incidence of fertilized ova was also low in the group of oocytes cultured without hormones. 5) Fertilization rate of the oocytes cultured with HCG or progesterone was observed to be increased, although the incidence of completed first polar body was low as same as other groups. 6) HCG and progesterone was suggested to have some direct effect on oocyte itself because increased fertilization rate was observed even in oocytes without cumulus cells.

(受付: 昭和59年3月6日)

# マウス体外受精における $Ca^{2+}$ イオン の役割と影響

Role and Effect of  $Ca^{2+}$  in Mouse *in vitro* Fertilization

東京大学産科婦人科学教室

佐藤孝道 香山文美  
Kodo SATO Fumiyoshi KAYAMA

森田良子 水野正彦  
Yoshiko MORITA Masahiko MIZUNO

Department of Obstetrics and Gynecology,  
University of Tokyo

マウスの卵の体外受精法を用い、受精過程における  $Ca^{2+}$  の役割とその濃度変化の受精に及ぼす影響を3段階の実験で検討した。実験Aでは卵丘細胞の付着した卵管卵を種々の濃度の  $CaCl_2$  を含む培養液中で受精、実験Bでは透明層除去卵を  $CaCl_2$  を含まない培養液中で受精、その後  $CaCl_2$  を追加投与してそれぞれ受精の状態を観察した。また実験Cでは、位相差顕微鏡下に連続的に観察しながら実験Bと同様の操作を行なった。その結果、以下のことが明らかになった。1) マウス卵の受精に  $Ca^{2+}$  は不可欠である。2) 特に、卵と精子の原形質膜の融合の過程に欠くことができない。3) 卵実質膜と精子の接触、それに伴う精子の運動停止に  $Ca^{2+}$  は不要である。4) 培養液中の  $CaCl_2$  の濃度上昇に伴い多精子受精の頻度が増加する。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 40-46, 1985)

$Ca^{2+}$  は、生体のさまざまな機能に重要な役割を果たしているが、受精過程でも精子の運動<sup>1)</sup>、capacitation<sup>2)</sup>、acrosome reaction<sup>3)</sup>、精子と卵実質の結合<sup>3)</sup>、卵割などの各段階<sup>3)</sup>で、細胞外  $Ca^{2+}$  が不可欠であったり、あるいは重要な影響を及ぼすことが知られている。

ウニやカエルでは、精子頭部と卵実質の結合に際して卵外  $Ca^{2+}$  の卵内流入と卵内 free- $Ca^{2+}$  の増加が起こり、これが卵の活性化 (activation) の引金になっていると考えられている<sup>4)</sup>。受精にひきつづき多精子受精防御機転として表層粒の分泌が起こるが、一般に分泌現象も  $Ca^{2+}$  を必要とするから、多精子受精防御機転にも  $Ca^{2+}$  が関与する可能性がある。

われわれはマウス卵の受精過程の顕微鏡下における連続観察から、卵実質と精子の融合過程は、①精子頭部と卵実質の接触、②精子の激しい運動の停止、③精子頭部の卵実質内へのゆつくりとした取り込みの3つの過程に分けられることを明らかにした<sup>5)</sup>。

本研究の目的はこのような受精過程において  $Ca^{2+}$  が果たす役割と、種々の  $Ca^{2+}$  濃度が多精子受精防御機転に及ぼす影響を検討することにある。

## I. 実験方法

実験は、A, B, C の3つの段階に分けて行なった。使用した卵は、PMS (Pregnant Mare's Serum: 帝国臓器) 10 I.U. および HCG (Human Chorionic Gonadotropin: 帝国臓器) 10 I.U. を48時間間隔で腹腔内投与した成熟 Swiss albino 雌マウスより採取した。採取は HCG 投与14時間後に培養液中で卵管膨大部を切開して行なった。精子は成熟 Swiss albino 雄マウス精巣上体尾部より採取したものを、 $CaCl_2$  を含む modified Krebs-Ringer 液 (組成は表1を参照、以下 mKR と略す) 中で capacitation のため2時間前培養した後、受精に用いた。培養はすべて 5%  $CO_2$ , 95% air の環境下で、培養液をパラフィン油 (関東化学) で包埋して行な

表 1 実験に用いた modified Kreds-Ringer 液の組成

	CaCl <sub>2</sub> 濃度変更の ための培養液 ( /l )	精子 capacitation の ための培養液 ( /l )
NaCl	119.37 mM	119.37 mM
KCl	4.78 mM	4.78 mM
CaCl <sub>2</sub>	Ⓐ	1.71 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.19 mM	1.19 mM
MgSO <sub>4</sub>	1.19 mM	1.19 mM
NaHCO <sub>3</sub>	25.07 mM	25.07 mM
Na-pyruvate	1.00 mM	1.00 mM
Na-lactate	10.00 mM	10.00 mM
Glucose	5.56 mM	5.56 mM
Penicillin G	0.075 g	0.075 g
Streptomycin sulfate	0.05 g	0.05 g
Bovine Serum Albumin	6 g	6 g

Ⓐ は, 0, 0.5, 1, 1.5, 3 mM のいずれかとした

った。培養液は使用直前に 1NHCl により pH 7.4 に調整した。

1) 実験 A

雌マウス卵管膨大部から, 0, 0.5, 1, 1.5, 3mM/l のそれぞれの CaCl<sub>2</sub> を含む mKR 0.4ml 中に卵を採取し, capacitation のための前培養した精子で直ちに授精した。授精には, 0.02ml の CaCl<sub>2</sub> を含む精子浮遊液を用いたので, 0mM/l の CaCl<sub>2</sub> 群でも最終的には 0.1mM/l 程度の CaCl<sub>2</sub> が含まれることになる。授精時の精子濃度は 5-10×10<sup>5</sup>/ml とした。受精 2 時間後に位相差顕微鏡にて卵を観察し, 精子侵入の有無, 第 2 極体放出の状態などを検索し, 続いて 10%ホルマリン液で固定後, 0.5%ラクモイドにて染色し, 生標本による所見を確認した。

2) 実験 B

雌マウス卵管膨大部から採取した卵をまず CaCl<sub>2</sub> を含む 0.1% hyaluronidase (Sigma) 含有 mKR に入れ卵

丘細胞を除去した。続いて 0.1% trypsin (Sigma) を含む生理食塩水中で数分間処理し, 透明層を除去, CaCl<sub>2</sub> を含まない mKR 中でよく洗浄の後, CaCl<sub>2</sub> を含まない mKR 0.4ml 中に移した。その後直ちに, capacitation をした精子浮遊液 0.02ml を添加, 授精した。このうち, 一部の卵は授精 20 分後に CaCl<sub>2</sub> を含まない mKR 0.4ml を追加, さらに 1~3 時間培養後実験 A と同じ方法で生標本および固定標本を観察した。残りの卵を含む dish には, 3mM/l の CaCl<sub>2</sub> を含む mKR 0.4ml を授精 20 分後に追加, その 1~3 時間後に同様に観察した。3mM/l の CaCl<sub>2</sub> を含む mKR 追加群では, CaCl<sub>2</sub> の最終濃度は計算上 1.5mM/l になる。

3) 実験 C

実験 B と同様 に作成した 透明層除去 マウス卵を 50×75mm<sup>2</sup> のガラススライド上のワセリンで作った溝の間の CaCl<sub>2</sub> を含まない mKR 中に置き, さらに卵から離れた位置に少量の精子浮遊液を置いた (図 1)。その後

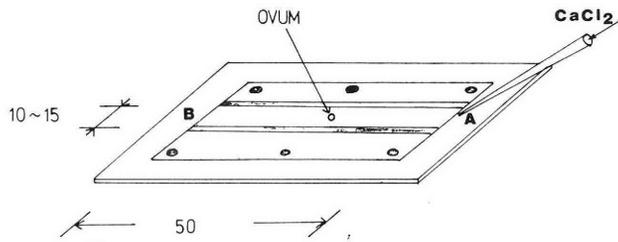


図 1 実験 C に用いた装置

数値の単位は mm, A と B の間 (上方はカバーガラス, 下方はガラススライド, 側方はワセリンで囲まれた空間) にある CaCl<sub>2</sub> を含まない mKR 中にまず卵と精子を置いた。CaCl<sub>2</sub> を含む mKR は A の側から細いピペットで注入し, B の側から濾紙により吸引した

表 2 実験 A :  $CaCl_2$  濃度と受精率

$CaCl_2$ 濃度 (mM/l)	動物数	実験卵数	囲卵腔への精子侵入卵数 (%*)	受精卵数 (%*)	第2極体放出卵数 (%*)
0	9	139	54(38.8)	15(10.8)	4(2.9)
0.5	15	199	156(78.4)	148(74.4)	147(73.9)
1	7	118	109(92.4)	100(84.7)	100(84.7)
1.5	15	143	123(86.0)	121(84.6)	120(83.9)
3	5	89	80(89.9)	78(87.6)	78(87.6)

\*実験卵数に対する%,  $CaCl_2$  が 0.5 mM/l 以上の群の精子侵入卵数, 受精卵数, 第2極体放出卵数は, いずれも 0mM/l の  $CaCl_2$  群と比較して有意の差 ( $p < 0.01$ )

直ちに,  $35 \times 50mm^2$  のカバーガラスをし,  $37^\circ C$  に保温した位相差顕微鏡ステージ上に置き, 卵が軽く固定される程度にカバーガラスを圧迫した. その後, 観察を継続, 精子が卵に付着するのを確認したうえで, ガラススライドとカバーガラスの間に, 1.5mM/l の  $CaCl_2$  を含む mKR を流し, 反対側より濾紙にて培養液を除去,  $CaCl_2$  を含む mKR に置換した. この置換中に起こる卵と精子の変化を観察した後, 更に 10%ホルマリン, 0.5%ラクモイドにて置換, 固定・染色して観察した.

II. 実験結果

1) 実験 A

$CaCl_2$  を, 0, 0.5, 1, 1.5, 3mM/l 含む mKR 中で囲卵腔に精子の進入した卵の割合はそれぞれ, 38.8% (54/139), 78.4% (156/199), 92.4% (109/118), 86.0% (123/143), 89.9% (80/89) であった. また, 精子頭部の膨化をもって受精と定義すると受精率はそれぞれ

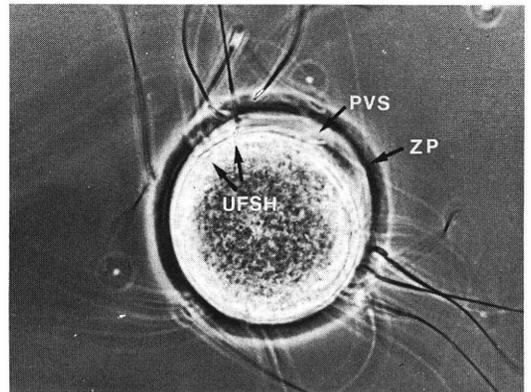


図 3 実験 A :  $CaCl_2$  が 0 mM の mKP 中で見られた卵  
UFSH : 未受精精子頭部, PVS : 囲卵腔, ZP : 透明層  
未受精精子頭部は囲卵腔に進入し卵実質表面に固着して運動を停止しているが精子頭部の膨化は起っていない

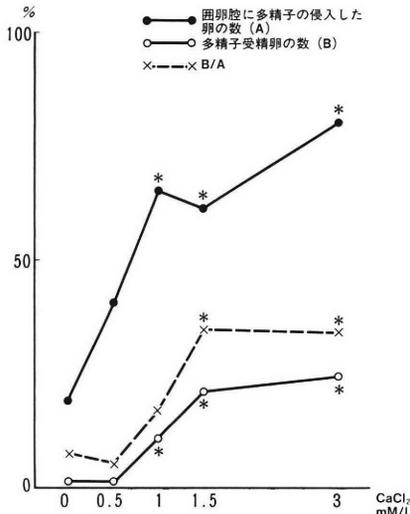


図 2 実験 A :  $CaCl_2$  濃度と多精子受精 A と B は実験卵総数に対する%, \* は 0 と 0.5mM の群に対し有意の差 ( $p < 0.01$ )

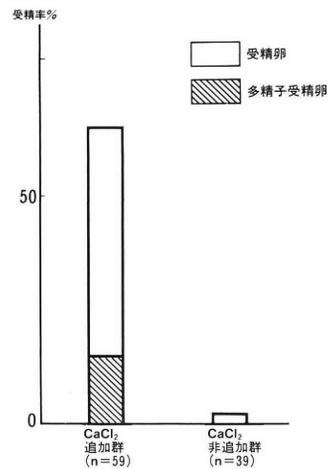


図 4 実験 B :  $CaCl_2$  追加と受精率の変化 ( $p < 0.01$ )

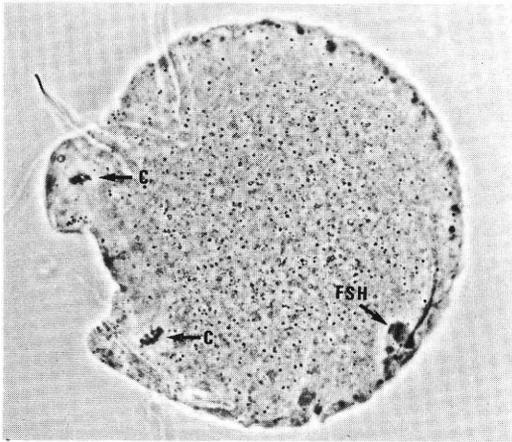


図5 実験B : CaCl<sub>2</sub> 追加群の固定・染色した受精卵  
 FSH: 受精精子頭部, C: 染色体群  
 受精精子頭部は膨化しており, 卵の第二減数分裂は再開して染色体群は両極に移動している

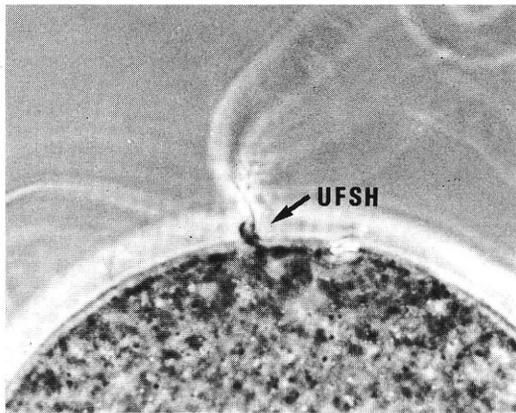


図6 実験B : CaCl<sub>2</sub> 非追加群の卵 (生標本, 位相差顕微鏡下)  
 UFSH: 未受精精子頭部. 精子頭部は卵表面に固着し運動を停止しているが膨化はみられない

れ10.8% (15/139), 74.4% (148/199), 84.7% (100/118), 84.6% (121/143), 87.6% (78/89)であった(表2). また, 囲卵腔に多精子の侵入した卵の割合は, 実験に供した全卵数に対して, それぞれ19.4% (27/139), 40.2% (80/199), 66.9% (79/118), 62.9% (90/143), 82.0% (73/89)であった. さらに, 多精子受精となった卵の割合は, 1.4% (2/139), 2.5% (5/199), 11.9% (14/118), 22.4% (32/143), 27.0% (24/89)であり(図2), CaCl<sub>2</sub> 濃度の増加に伴い, 囲卵腔への多精子進入, 多精子受精のいずれの頻度も増加した. CaCl<sub>2</sub> が 0mM/l の群では, 図3のように囲卵腔に進入した精子が卵表面に固着し運動を停止しているが, 精子

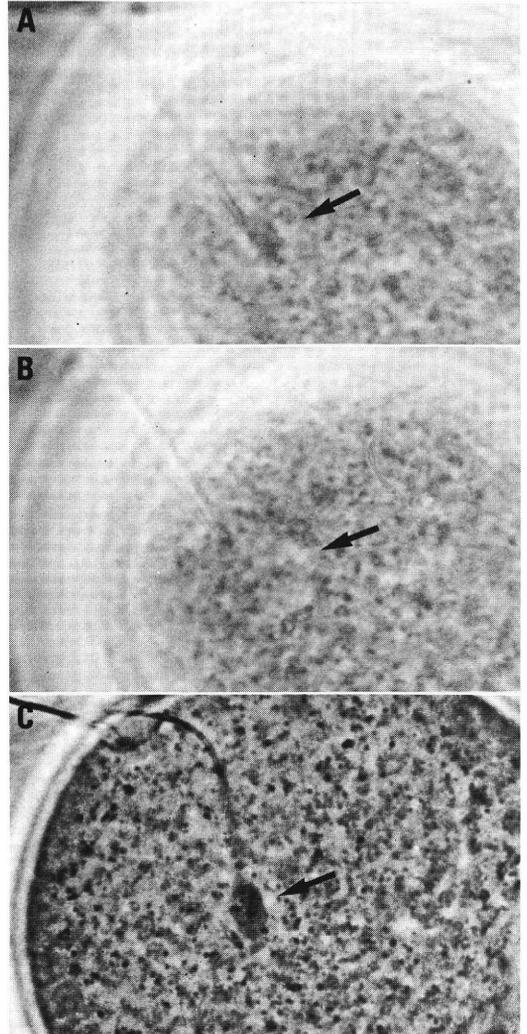


図7 実験C : 実験精子頭部膨化の過程  
 矢印はすべて精子頭部. A : CaCl<sub>2</sub> を含む mKR 追加前, 精子頭部は膨化していない. B : CaCl<sub>2</sub> を含む mKR 追加直後, 精子頭部は膨化し位相差顕微鏡では明瞭な形態を認めなくなる. C : 同一卵の固定, 染色標本, 精子頭部の膨化が確認できる

頭部は膨化していない卵が多数認められた.

第2極体を放出した卵の割合は, CaCl<sub>2</sub> が0, 0.5, 1, 1.5, 3mM/l の群で, それぞれ2.9% (4/139), 73.9% (147/199), 84.7% (100/118), 83.9% (120/143), 87.6% (78/89)で, 0mM/l 以外の群では受精した卵はほとんど100%第2極体を放出していた.

2) 実験B

3mM/l の CaCl<sub>2</sub> を含む mKR を追加した群では, 64.4% (38/59) の卵が受精し, うち23.7% (9/38) が多精子受精であった. CaCl<sub>2</sub> を含まない mKR を追加し

た群では、2.7% (1/39) が受精し、多精子受精卵は認められなかった (図4)。

図5は、 $\text{CaCl}_2$  追加群の固定・染色標本、図6は、 $\text{CaCl}_2$  非追加群の位相差顕微鏡下で観察した生標本である。 $\text{CaCl}_2$  非追加群では、卵表面に固着し運動を停止している卵が多数認められた。しかし、精子頭部の膨化は認められたものは、わずかであった。

### 3) 実験C

受精過程を直視下に観察する本法によつて、精子が接近、付着する過程を観察し得た卵は29個であった。うち19個の卵は付着した精子すべてが運動を続け、しばらく卵表面に留まった後、再び離散するものもあつた。これらの卵では、 $\text{CaCl}_2$  を含む mKR で置換した後も精子頭部の膨化は認められなかった。一方、卵表面と接触、運動を停止した精子が付着した卵は10個であつたが、うち3個の卵では  $\text{CaCl}_2$  を含む mKR に置換とほぼ同時に精子頭部の膨化が認められた (図7)。

## III. 考 察

本実験に用いた  $\text{CaCl}_2$  を含まない mKR は、mKR 作成に用いられる他の物質にも極く少量の  $\text{Ca}^{2+}$  が混入している可能性があり、厳密な意味で  $\text{Ca}^{2+}$ -free とはいえない。さらに本実験では、 $\text{CaCl}_2$  を含む培養液中で capacitation のための前培養をした精子を、受精率の低下を防ぐために洗浄することなく授精に供した。したがつて、実験方法で述べた通り 0mM/l の  $\text{CaCl}_2$  群でも、計算上 0.1mM/l 程度の  $\text{CaCl}_2$  が授精した時点で含まれることになる。

mKR 中の  $\text{CaCl}_2$  濃度を变化させることによつて、Cl<sup>-</sup> 濃度と浸透圧も变化するが、Cl<sup>-</sup> は mKR 中には NaCl によつて多量に含まれており、その影響は無視し得る。一方浸透圧の変化は理論上最大 10mOsm 程度の変化であり、受精率など本実験の結果に大きな影響は及ぼさない。すなわち本実験で、培養液中の free  $\text{Ca}^{2+}$  濃度は不明であるが、種々の  $\text{CaCl}_2$  濃度を選択することによつて培養液中の free  $\text{Ca}^{2+}$  が変化し、その影響が受精率等に反映していると推定できる。

ウニなどの下等動物をはじめ、マウス、ラット、ハムスター、ヒトなど哺乳動物でも  $\text{Ca}^{2+}$  非添加培養液 (厳密な意味で  $\text{Ca}^{2+}$ -free ではない) 中では受精が起こらないことが知られている<sup>3,6,7)</sup>。 $\text{Ca}^{2+}$  が作用する可能性としては capacitation の過程、先体反応、精子の運動性、卵実質と精子の融合過程、初期卵割などが報告されている<sup>1),2),3)</sup>。本実験Aでも 0 および 0.5mM/l の  $\text{CaCl}_2$  を含む mKR 群で受精率の低下がみられ、受精の成立に  $\text{Ca}^{2+}$  がある濃度で存在する必要性が明らかとなつた。

また  $\text{CaCl}_2$  が 0mM/l の群で 38.8% の卵の囲卵腔に精子が進入しながら、精子頭部の膨化のみられた卵がわずか 10.8% であつたことは、卵実質と精子の融合過程に  $\text{Ca}^{2+}$  が重要な役割を果していることを示唆している。

われわれはすでにマウス卵の受精過程の位相差顕微鏡下における連続的観察から、透明層及び囲卵腔を通過した精子は、①まず精子頭部と卵実質の接触、②精子の激しい運動の急激な停止に続いて、③精子頭部の卵実質内へのゆつくりとした没入の過程を経て受精が成立することを報告した<sup>5)</sup>。従来、主として電子顕微鏡による観察から報告されていたのは、卵と精子の原形質膜の融合過程と考えられる③のステップのみであり、①と②の重要性を示唆したのは、われわれのこの報告が最初である。

本実験BとCは、この①、②、③のどのステップに  $\text{Ca}^{2+}$  が必要とされるかを検討する目的で行なつた。その結果、実験Bでは  $\text{CaCl}_2$  を含む mKR を追加することにより精子頭部の膨化がみられることから、①、②、③のいずれかのステップに  $\text{Ca}^{2+}$  が必須であることが証明された。また、 $\text{CaCl}_2$  を含まない mKR を追加した群でも卵実質と接触し運動を停止している精子は認められたので、主として③のステップに  $\text{Ca}^{2+}$  が重要であることが示唆された。しかし、 $\text{Ca}^{2+}$  の少ない培養液中では死滅する精子数も増加するので、死滅した精子が卵実質と接触した可能性も否定できない。すなわち、 $\text{CaCl}_2$  を含む mKR を追加することにより頭部の膨化のみられる精子は、 $\text{CaCl}_2$  を追加後卵実質と接触したものである可能性が存在する。

そこで実験Cを行ない、 $\text{CaCl}_2$  を含む mKR を追加する過程を位相差顕微鏡下に連続的に観察した。スライドガラス上で培養液を置換しながら受精させるため受精率の向上は難しいが、頭部の膨化のみられた精子は  $\text{CaCl}_2$  に置換する前に卵表面と接触、運動を停止した精子に限られていた。さらに卵表面と接触した精子頭部の膨化がみられたのは、 $\text{CaCl}_2$  を含む培養液に置換した直後であつた。以上から、 $\text{CaCl}_2$  を含まない mKR 中で卵表面に接触、運動を停止した精子の少なくとも一部分は受精能という意味では死滅した精子ではないこと、さらに精子の卵表面への接触、運動の停止に  $\text{Ca}^{2+}$  は必須ではないことが示唆された。

本実験結果は、精子と卵実質の結合過程である①、②、③の3つのステップのうち③のステップに  $\text{Ca}^{2+}$  が必須であることを証明したが、同時に①と②のステップが③とは独立した過程であることを逆に証明したともいえる。

実験Aにおいて、 $\text{CaCl}_2$  濃度を上昇させるに従い、多精子受精の頻度が増加する傾向が認められた。多精子受

精の原因としては、多精子受精防御機転が正常に作動しない場合と、受精の場に多精子受精防御機転を上まわるような多数の精子が存在する場合が考えられる。CaCl<sub>2</sub>濃度を上昇させることによつて囲卵腔に多精子の進入する卵の割合も増加するので、CaCl<sub>2</sub>濃度が精子の運動性に影響を及ぼし、結果として多精子受精卵の頻度が変化した可能性も否定できない。しかし、多精子受精卵の頻度と囲卵腔に多精子の進入した卵の割合をみると(図2)、CaCl<sub>2</sub>濃度の上昇に伴い増加しており、高Ca<sup>2+</sup>の条件下では多精子受精防御機転が正常に作動しない可能性も示唆された。

Ca<sup>2+</sup>は前核の形成には不要とされるが<sup>3)</sup>、第2極体の形成に及ぼす影響についての報告はない。実験AのOmM/1 CaCl<sub>2</sub>を含むmFR群では、受精卵に比して第2極体を放出した卵の割合は少なかった。しかし、第2極体の放出そのものにCa<sup>2+</sup>が必要なのか、それとも受精時点でのCa<sup>2+</sup>の不足が結果として第2極体の放出を妨げたのかは本実験では明らかでない。

Ca<sup>2+</sup>は細胞内のさまざまな系を活性化させる作用があり、cAMPと並んで細胞内メッセンジャーとして注目を浴びている。ウニ卵では受精直後に卵内のfree Ca<sup>2+</sup>が急増すること<sup>4)</sup>、Ca<sup>2+</sup>の膜透過性を亢進させる抗生物質であるionophore A23187で単為生殖がみられること<sup>5)</sup>などから、受精に伴う卵の活性化には細胞外Ca<sup>2+</sup>の卵内への流入と卵内のfree Ca<sup>2+</sup>の上昇が重要であると考えられている。

一般に膜と膜の融合や分泌現象にはCa<sup>2+</sup>が不可欠であると考えられている。精子頭部が卵実質内にゆつくりと取り込まれる過程も卵と精子の原形質膜の融合であると考えられており、本研究でもCa<sup>2+</sup>が必須であることが明らかにされた。さらに、多精子受精防御機転には、卵実質表面に存在する表層粒の分泌が重要と考えられているが、Ca<sup>2+</sup>の濃度がそれに何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。このように、Ca<sup>2+</sup>は受精とそれに伴う諸現象の鍵を握る物質であると考えられる。

#### IV. おわりに

卵と精子の原形質膜融合と考えられる受精現象におけるCa<sup>2+</sup>の役割を検討した。

(本研究の御指導をいただいた前東京大学産科婦人科学教室主任教授、現東京女子医科大学教授坂元正一先生に深謝します。なお、本研究の一部は、第27回日本不妊学会、第35回日本産科婦人科学会学術講演会において発表した。)

#### 文 献

- 1) Heffner, L. A., and Storey B. T.: The role of calcium in maintaining motility in mouse spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 218: 427, 1981.
- 2) Reyes, A., Goicoechea, B., and Rosado, A.: Calcium ion requirement for rabbit spermatozoal capacitation and enhancement of fertilizing ability by ionophore A 23187 and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *Fertil. Steril.* 29: 451, 1979.
- 3) Yanagimachi, R.: Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Res.* 5: 323, 1982.
- 4) Zucker, R. S., Steinhardt, R. A., and Winkler, M. M.: Intracellular calcium release and the mechanisms of parthenogenetic activation of the sea urchin egg. *Dev. Biol.* 65: 285, 1978.
- 5) Sato, K., and Blandau, R. J.: Time and process of sperm penetration into cumulus-free mouse eggs fertilized *in vitro*. *Gamete Res.* 2: 295, 1979.
- 6) Miyamoto, H., and Ishibashi, T.: The role of calcium ions in fertilization of mouse and rat eggs *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 45: 523, 1975.
- 7) Sano, K., and Kanatani, H.: External calcium ions are requisite for fertilization of sea urchin eggs by spermatozoa with reacted acrosomes. *Dev. Biol.* 78: 242, 1980.
- 8) Steinhardt, R. A., Epel, D., Carroll, E. J., and Yanagimachi, R.: Is calcium ionophore a universal activator for unfertilized eggs? *Nature* 252: 41, 1974.

#### Role and effect of Ca<sup>2+</sup> in mouse *in vitro* fertilization

Kodo Sato, Fumiyoshi Kayama, Yoshiko Morita and Masahiko Mizuno

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokyo

Role and effect of Ca<sup>2+</sup> in fertilization process have been studied using the method of *in vitro* fertilization. Ova were collected from the ampullae of superovulated Swiss albino female mice. Spermatozoa from cauda epididymis of male mice was capacitated by incubating them in the medium containing Ca<sup>2+</sup>. In the first experiment, ova were inseminated with capacitated spermatozoa in the medium (modified Krebs-Ringer solution) containing 0, 0.5, 1, 1.5, 3 mM/1 of CaCl<sub>2</sub> and

observed under a phase contrast microscope 2 hours after insemination. Fertilization rate of each group was 10.8 %, 74.4 %, 84.7 %, 84.6 % and 87.6 %, respectively. Polyspermic fertilization was observed at the rates of 1.4 %, 2.5 %, 11.9 %, 22.4 % and 27.0 %, respectively. In the second experiment, zona-free ova were inseminated in  $\text{CaCl}_2$ -free medium and  $\text{CaCl}_2$  was added into the medium 20 minutes later. Fertilization rate of ova in  $\text{CaCl}_2$ -free medium was 2.4 %, whereas it was 64.4 % after the addition of  $\text{CaCl}_2$ . In the third experiment, sperm-egg

interaction during the addition of  $\text{CaCl}_2$  was observed continuously under a phase contrast microscope. Attachment of spermatozoa to the vitelline surface could take place even in the medium without  $\text{CaCl}_2$ , but fusion of spermatozoa with vitelline surface was revealed to require  $\text{CaCl}_2$ . In conclusion,  $\text{Ca}^{2+}$  was suggested to be indispensable for fertilization, especially for sperm-vitelline surface membrane fusion. High concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  might induce polyspermic fertilization.

(受付：昭和59年5月10日)

# 成熟マウスの過排卵反応に及ぼす PMS または HCG 反復処理マウス血清の影響

Effect of Serums of Mice Repeatedly Injected with PMS  
or HCG on the Superovulatory Response in Mice

東京農業大学畜産学科

石 島 芳 郎

Yoshiro ISHIJIMA

Department of Zootechnical Science, Tokyo  
University of Agriculture

日本大学医学部衛生学教室

伊 藤 雅 夫 丸 瑠 璃 子 清 水 敏 朗  
Masao ITO Ruriko MARU Toshiaki SHIMIZU

Department of Hygiene, School of Medicine,  
Nihon University

PMS と HCG による反復過排卵処理マウスの反応低下の要因解析の一環として、PMS または HCG を単独で2回処理した後のマウス血清中の反応抑制物質の存在を bioassay により検索した。

被検血清は、ICR 系の成熟雌マウスに PMS 5 IU または HCG 5 IU を12日間隔で2回処理したマウスを、3回目の処理日に当る12日後に殺して採取した血液より作製した。Bioassay には同系統の成熟マウスに PMS 5IU、ついで50時間後 HCG 5 IU を注射する過排卵誘起法を用い、PMS 2回処理マウス血清は PMS と同時に注射する方法で、また HCG 2回処理マウス血清は HCG と同時に注射する方法で調べた。

その結果、PMS を2回反復処理したマウス血清0.1~0.4ml を PMS と同時に注射した場合、成熟マウスの過排卵反応には全く影響を与えなかった。それに対し、HCG を2回反復処理したマウス血清0.1~0.4 ml を HCG と同時に注射した場合は、排卵反応の抑制が顕著にあらわれた。

このことから、反復過排卵処理マウスの反応低下の原因が処理に用いる HCG の反復に起因することが証明された。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 47-51, 1985)

## 緒 言

性腺刺激ホルモンによる過排卵処理を同一個体に反復した場合、処理回数がすすむと排卵反応が著しく低下することが、ウシ (Willett et al. 1953, 山内, 中原, 1961, 杉江ら1972), ウサギ (佐久間ら1964, Maurer et al. 1968, 角田ら1978, 石島1982), マウス (Lin and Bailey 1965, 穴吹ら1977, 1978, 石島, 佐久間1977, 石島1978, 石島ら1978, 金山ら1981, 1982, 1983 a, b)

およびゴールデンハムスター (石島, 小林1983) などで知られており、一方でこの原因解析がすすめられている (Lin and Bailey 1965, Jainudeen et al. 1966, Maurer et al. 1968, 杉江1975, 金山ら1983a, b).

この反復過排卵処理による反応低下の原因について、著者らは、マウスを対象に一連の検討を行ない、その一端が反復処理により血中に反応抑制物質が産生されるためであり、とくにこれは処理に用いる HCG 側の影響が大きいかを示唆した (石島ら1979, 1981).

本研究では、この点を裏付けるために、あらかじめ PMS または HCG を単独で 2 回反復処理したマウスの血清中の反応抑制物質の存在を bioassay によつて検索した。

実験材料および方法

この実験には、日本大学医学部衛生学教室で閉鎖集団として維持している ICR 系の成熟マウス (体重 38g 前後) を用いた。マウスの飼育は、室温 21~24°C, 14 時間照明 (6:00~20:00 まで点灯) の条件下で、育成用固型飼料 (オリエンタル) と水を不断に給与して行なつた。

検査用の血液を採取するマウスには、Fig. 1 に示すような処理を行なつた。すなわち、雌マウスに 5IU の PMS (オルガノン社) または 5IU の HCG (動薬検標準品) を 12 時間隔で 2 回皮下注射し、ついで、それぞれ 3

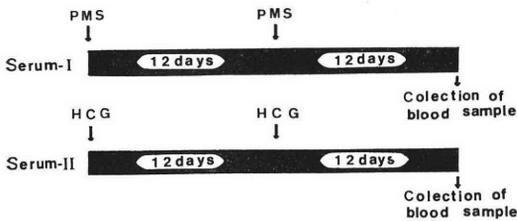


Fig. 1 Diagram of experimental procedure. PMS or HCG was administered to mice 2 times and blood samples were collected 12 days after the last injection of PMS or HCG

回目にあたる 12 日後にマウスを殺して採血を行なつた。血清は常法により作製し、検定まで冷凍保存した。血清は PMS 処理のものは 10 匹、また HCG 処理のものは 15 匹のものを混合して用いた。

被検血清は、便宜上、PMS 2 回注射の血清を serum-I、また HCG 2 回注射の血清を serum-II と名付けた。

Bioassay は、発情休止期のマウスに 5IU の PMS を皮下注射し、ついで 50 時間後に 5IU の HCG を皮下注射する成熟マウスの過排卵反応法を用いた。被検血清は、serum-I の場合は PMS 注射の際にほぼ同時に、また serum-II の場合は HCG 注射の際にほぼ同時に皮下注射した。

排卵検査は、いずれの場合も HCG 注射後 24~26 時間にマウスを殺し、卵管内卵子を灌流した後、顕微鏡下で数の算定と形態の観察を行なつた。

実験成績

PMS または HCG を単独で 2 回処理したマウスの血清中に過排卵反応を抑制する物質が存在するかどうか、

Table 1 Bioassay of the antigonadotropic activity of serums of mice following 2 successive administrations of PMS or HCG

Treatments	No. of mice used	No. of mice ovulated	% of mice ovulated	Mean no. of ova ovulated ± S.E.	Mean no. of normal ova ± S.E.	% of normal ova
PMS	10	10	100	34.9 ± 3.92	28.6 ± 3.10	81.6
PMS + 0.1ml Serum-I	3	3	100	32.0 ± 8.03	27.6 ± 6.75	86.3
PMS + 0.2ml Serum-I	10	10	100	34.0 ± 4.05	29.5 ± 4.33	86.0
PMS + 0.4ml Serum-I	10	10	100	32.5 ± 2.97	29.0 ± 2.43	89.2
PMS	3	3	100	19.7 ± 4.68	19.0 ± 5.02	96.4
PMS	10	10	100	16.7 ± 2.91	15.6 ± 2.91	93.4
PMS	10	6	60	13.8 ± 3.67	9.0 ± 3.55	65.2
PMS	10	7	70	12.4 ± 3.21	5.8 ± 1.10	46.8
Saline	10	10	100	14.8 ± 1.26	12.0 ± 1.90	81.1
Saline	10	8	80	14.9 ± 4.74	13.5 ± 3.50	90.6
Saline	10	5	50	11.8 ± 2.50	11.8 ± 2.50	100

The bioassay method was used superovulatory response in adult female mice. Superovulation was induced by the subcutaneous injection of 5 IU PMS and followed 50 hours later by the subcutaneous injection of 5 IU HCG. The blood samples were additionally treated together with injection of PMS or HCG.

成熟マウスの過排卵反応法を用いて検討した。その結果は Table 2 に示すとおりである。

Table 1 から明らかなように、PMS を 2 回処理したマウス血清 (serum-I) を、過排卵処理の際の PMS 注射時に、0.1, 0.2 および 0.4ml 同時に注射した結果、いずれの血清量でも排卵陽性率、平均排卵数は過排卵対照区とかわりがなかった。

一方、HCG を 2 回処理したマウス血清 (serum-II) を、過排卵処理の際の HCG 注射時に、0.1, 0.2 および 0.4ml 同時に注射した結果、0.1 および 0.2ml での排卵陽性率は過排卵対照区と変わりなかったが、平均排卵数は著しく低下しており、0.4ml では排卵陽性率、平均排卵数共に顕著な低下がみられた。

また、HCG のみの誘起排卵においても、serum-II をを同時に注射した場合、排卵阻止される個体が認められた。

### 考 察

石島ら (1979, 1981) は、先に、PMS-HCG による反復過排卵処理マウスの反応低下の原因の一端が、反復処理を受けたマウスの血中に反応抑制物質が産生されるためであること、しかもこれは処理に用いる HCG 側に影響されていることを示唆した。

本研究は、このことを裏付けるために、マウスに PMS または HCG を単独で 2 回反復処理し、3 回目の処理に該当する日に採血して調整したそれぞれの血清に、過排卵反応を抑制する物質が存在するかどうか bioassay により検討した。

今回の PMS または HCG 処理の反復間隔 (12日) は、反復過排卵誘起において、3 回目から典型的に排卵反応が低下する 10 日間隔にあうように設定した (石島, 佐久間 1977, 石島ら 1978)。今回供試した ICR 系は、CF #1 系と同様に排卵陽性率は 3 回目から低下していくが、排卵した個体の排卵数はそれほど低くならないことが知られている系統で (石島ら 1978)、これによって反応抑制物質が証明されれば、むしろ説得力があるという意味合いから選ばれた。

Bioassay は、先の石島ら (1979) の場合と同様成熟マウスの過排卵反応法を用い、PMS を 2 回反復処理したマウスの血清 (serum-I) の場合は、過排卵処理の際の PMS 注射時に同時に注射する方法、また HCG を 2 回反復処理したマウス血清 (serum-II) の場合は、過排卵処理の際の HCG 注射時に同時に注射する方法で調べた。

その結果、PMS を 2 回反復処理したマウス血清 (serum-I) は、成熟マウスの過排卵反応にまったく影響を

与えなかつたが、HCG を 2 回反復処理したマウス血清 (serum-II) は、明らかに排卵反応を抑制する作用が認められた。このことは、HCG 反復処理血清中に HCG 拮抗物質が存在することを示唆していた。

この結果は、すでに Maurer et al. (1968) がウサギの過排卵誘起において、FSH-LH, PMS-HCG の反復によつて排卵反応が低下するのは排卵ホルモン (LH, HCG) に対する抗体が産生されるためとの主張を支持する結果であつた。しかし、Maurer et al. も bioassay による推論であつて本実験と同じように抗体の証明は行なつていない。

今回の拮抗物質か抗 HCG そのものなのか、あるいは HCG の生物活性を中和する別の物質なのかは、さらに immunoassay による検討が必要であらう。

Jainudeen et al. (1966) はウシの過排卵誘起において、PMS の反復によつて排卵反応が低下するのは、PMS の作用を抑制する抗体が産生されるためとしている。しかし今回の結果からは、PMS を反復した血清中に PMS 拮抗物質の存在は否定された。この違いは動物種によるものかも知れない。

ただ、石島ら (1979) がすでにみているように、PMS と HCG を組み合わせた反復過排卵処理マウス血清中には、HCG 拮抗物質のほかにも PMS 拮抗物質も存在していた。したがつて本実験の結果が正しいとすれば、この PMS 拮抗物質も、HCG 反復処理により生じた物質に由来する可能性がある。

この点は、今回の実験が PMS または HCG をそれぞれ単独で反復処理して得た血清を、対応したホルモンとのみ検定したにすぎないので、交叉試験をまたないと断定できない。

いずれにしても、今回の実験結果から、PMS-HCG による反復過排卵処理マウスの反応低下の原因が、HCG の反復に起因することが裏付けられた。

最近、ウシの反復過排卵誘起において、PMS と PGF<sub>2α</sub> の組み合わせで HCG を用いない場合に、比較的反応を落さずにすむこと (Lubbadeh 1980, 小林 and King 1981, Kanagawa et al. 1981)、ゴールデンハムスターのように PMS 単独で過排卵誘起できるものでは、反復処理によつて排卵数の低下現象はあるものの、排卵しなくなる個体はみられないこと (石島, 小林 1983)、また、マウスの反復過排卵誘起において、各種の製剤を組み合わせた場合、排卵系ホルモンに HCG を用いた場合に排卵反応の低下が認められること (遠藤ら 1983) などが知られているが、これらのことは、今回の結果を間接的に裏付けているものと思われる。

## 文 献

- 1) 穴吹一広, 石島芳郎, 平林 忠: マウスの反復過排卵誘起, とくに短期間の反復処理の影響, 畜産の研究, 31: 899, 1977.
- 2) 穴吹一広, 石島芳郎, 平林 忠: マウスの反復過排卵誘起, とくに性周期を考慮した反復間隔について, 畜産の研究, 32: 1255, 1978.
- 3) 遠藤 克, 泉 政明, 金山喜一, 佐久間勇次: マウスの反復過排卵誘起に関する研究, 各種製剤の組み合わせによる検討, 日不妊会誌, 28: 601, 1983.
- 4) 石島芳郎: 過排卵処理マウスの排卵反応, 家畜繁殖誌, 24(5): lvi-lviii, 1978.
- 5) 石島芳郎: 反復過排卵処理家兎の排卵反応の推移, 獣畜新報, 733: 448, 1982.
- 6) 石島芳郎, 小林軍次郎: ゴールデンハムスターの反復過排卵誘起, 東京獣畜誌, 31: 121, 1983.
- 7) 石島芳郎, 佐久間勇次: 性腺刺激ホルモンによるマウスの反復過排卵誘起, 日不妊会誌, 22: 245, 1977.
- 8) 石島芳郎, 穴吹一広, 遠藤 克, 佐久間勇次: 反復過排卵処理に対するマウスの排卵反応の系統差, 日不妊会誌, 23: 59, 1978.
- 9) 石島芳郎, 小松博道, 伊藤雅夫, 青山 滋: マウスの過排卵に及ぼす PMS または HCG の反復前処理の影響, 日不妊会誌, 26: 263, 1981.
- 10) 石島芳郎, 穴吹一広, 平林 忠, 伊藤雅夫, 大沢雄治, 神田 晋: 反復過排卵処理マウス血清中の反応抑制物質の検索, 日不妊会誌, 24: 1, 1979.
- 11) Jainudeen, M. R., Hafez, E. S. E., Gollnick, P. D. and Moustafa, L. A.: Antigonaotropins in the serum of cows following repeated therapeutic pregnant mare serum in jectons. *Am. J. Vet. Res.*, 27: 669, 1966.
- 12) Kanagawa, H., Ishikawa, T. and Inoue, T.: Ovarian response after four continuous administrations of gonadotrophin in beef cattle. *Jpn. J. Vet. Res.*, 29: 1, 1981.
- 13) 金山喜一, 遠藤 克, 佐久間勇次: 反復過排卵誘起による排卵反応低下要因の解析—I マウスの反復誘起排卵における排卵反応, 日大農獣報, 40: 45, 1983 a.
- 14) 金山喜一, 矢部勝弘, 佐久間勇次: マウスにおける反復過排卵処理後の自然発情回帰までの日数とその排卵数について, 日不妊会誌, 26: 477, 1981.
- 15) 金山喜一, 矢部勝弘, 佐久間勇次: マウスの反復過排卵処理における処理間隔と排卵反応との関係, 日大農獣報, 39: 171, 1982.
- 16) 金山喜一, 矢部勝弘, 遠藤 克, 佐久間勇次: マウスの反復過排卵処理における排卵反応低下に対する HCG 増量の効果, 東京獣畜誌, 31: 57, 1983 b.
- 17) 小林軍次郎, King, S. J.: 牛の反復過排卵誘起における採卵成績, 畜産の研究, 35: 1497, 1981.
- 18) Lin, T. P. and Bailey, D. W.: Difference between two inbred strains of mice in ovulatory response to repeated administration of gonadotrophins. *J. Reprod. Fert.*, 10: 253, 1980.
- 19) Lubbadeh, W. F.: Repeated superovulation with non-surgical recovery of embryos in dairy cows. *Dissertation Abst. Int.*, B, 40: 3602, 1980.
- 20) Maurer, R. R., Hunt, W. L. and Foote, R. H.: Repeated superovulation following administration of exogenous gonadotrophins in dutch-belted rabbits. *J. Reprod. Fert.*, 15: 93, 1968.
- 21) 佐久間勇次, 石島芳郎, 石田一夫: FSH 製剤による家兎の過排卵反復誘起に関する研究, 特にアンチホルモン産生に対する考察, 日不妊会誌, 9: 1, 1964.
- 22) 杉江 信: 牛の人工妊娠の実用化, 反復多排卵誘起(続報), 畜試年報, 13: 59, 1975.
- 23) 杉江 信, 相馬 正, 福光 進: 牛の人工受胎に関する研究, 反復過剰排卵誘起処置について, 日畜会報, 43(学会号): 45, 1972.
- 24) 角田幸生, 入谷 明, 西川義正: 家兎の過排卵ならびに反復過排卵誘起に関する研究, 日畜会報, 49: 89, 1978.
- 25) Willett, E. L., Buckner, P. J. and McShan, W. H.: Refractoriness of cows repeatedly superovulated with gonadotrophins. *J. Dairy Sci.*, 36: 1083, 1953.
- 26) 山内 亮, 中原達夫: 牛における過剰排卵について, 家畜繁殖誌, 6: 147, 1961.

Effect of serums of mice repeatedly injected with PMS or HCG on the superovulatory response in mice

Yoshiro Ishijima

Department of Zootechnical Science,  
Tokyo University of Agriculture

Masao Ito, Ruriko Maru and  
Toshiaki Shimizu

Department of Hygiene, School of  
Medicine, Nihon University

The effect of serums of mice following 2 successive injections of PMS or HCG on the superovulatory response in mice were examined. Adult female mice of ICR strain were used in this experiment. Blood samples were collected from mice receiving 2 successive injections of PMS or HCG at 12 days interval (Fig. 1).

The bioassay was made by superovulatory response in adult mice. Superovulation was induced by the subcutaneous injection of 5 IU of PMS and 5 IU of HCG 50 hours later. The each samples were additionally treated together with injection of PMS or HCG.

The results obtained are presented in Table 1. From results of bioassay, the anti-hormonal activity was found in serums of mice receiving 2 successive injections of HCG.

(受付：昭和59年3月29日)

# 妊娠ラットにブスルファンを投与して卵母細胞を退行させた新生児卵巣における性索細胞の動態について

Behavior of Sex Cord Cells in Young Rat Ovaries in Which Oocytes Were Disintegrated by Busulphan Administration to Pregnant Parent Rats

新潟大学農学部畜産学科

小 泉 攻 石 田 一 夫  
Ko KOIZUMI Kazuo ISHIDA

Department of Animal Husbandry, Faculty of Agriculture, Niigata University

妊娠13日のラットにブスルファンを投与して卵母細胞を退行させた新生児（出生直後～生後60日）の卵巣において、顆粒層細胞へ移行すべき性索細胞がいかなる態度を示すものかについて調べた。出生直後から生後10日の新生児の卵巣では、性索細胞は塊をなして支質に存在していたが、生後11日にいたり一次間質腺細胞に移行して増殖し、支質に多数認められた。一次間質腺はその後次第に減少した。以上の結果から、正常な卵巣においては、大部分の性索細胞は卵母細胞を取り囲んで顆粒層細胞に移行するが、一部のものは一次間質腺細胞に移行したのち、徐々に退行することが推察された。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 52-56, 1985)

## 緒 言

ブスルファン (Busulphan, 1,4-butanediol dimethanesulfonate) は骨髄において白血球の形成を阻害する作用をもつアルキル化剤の一種で、慢性の骨髄性白血病の治療薬として用いられているが、1953年、Bollag<sup>1)</sup>がミレラン (Myleran, ブスルファンと同一物) を投与した成熟ラットの性腺に精上皮細胞や卵母細胞の退行がみられることを報告して以来、ブスルファンのラット性腺に及ぼす影響に関する研究が多く、研究者によつて進められ、その結果、ブスルファンは生殖細胞に対して選択的に退行作用のあることが明らかとなつた<sup>2-11)</sup>。すなわち、胎児の性腺において原始生殖細胞が生殖隆起へ移動する時期から生殖隆起内で糸分裂をする時期 (妊娠13~17日) に妊娠ラットにブスルファンを腹腔内注射すると、新生児の性腺では生殖細胞がほとんど欠如する。このことは、胎児の卵巣については Heller and Jones<sup>9)</sup>, Forsberg and Olivecrona<sup>10)</sup>, および三浦・石田<sup>11)</sup>

によつて、また、新生児の卵巣については Hemsworth and Jackson<sup>7,8)</sup>, Heller and Jones<sup>9)</sup>, および Forsberg and Olivecrona<sup>10)</sup> によつて調べられている。すなわち、胎児の卵巣においては、卵祖細胞や卵母細胞はほとんど消失しており、支質は性索細胞の塊とこれらの中に介在する線維芽細胞によつて占められている。新生児の発育卵巣においても、卵母細胞がほとんど欠如しているため、卵胞や黄体の形成はきわめて少ないという。しかし、これらの報告<sup>7-10)</sup>においては、正常ならば卵母細胞を取り囲んで顆粒層細胞に移行すべき性索細胞が卵巣発育の過程でいかなる態度を示すものかについては全く触れられていない。本実験は、ブスルファンを投与した妊娠ラットから得た新生児の卵巣について性索細胞の動態を観察したものである。

## 材料および方法

供試動物として、ウイスター系ラットの雌 (体重約200g) を使用した。飼育は24°C に調節したコイトロ

ン (EA-8HW) 内で行ない、点灯は午前 4 時から午後 6 時までの 14 時間とした。まず、これらのラットの性周期を調べ、正常な周期のみられるもの 17 匹を選んで、発情前期に同系統の雄と一晩同居させた。翌朝、膣垢内に精子の存在を確認し、この日を妊娠 1 日とした。妊娠 13 日にブスルファン (マブリン散、武田薬品工業株式会社) をアラビアゴムに懸濁して体重 100g 当たり 1 mg 腹腔内に注射した。卵巣は出生直後から生後 60 日までの新生児から 5 日間隔で採取したが、生後 10 日から 15 日までのものからは毎日採取した。採取した卵巣は直ちにカルノフスキー液 (pH 7.4) に 4°C で 12 時間、前固定し、0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) を数回交換しつつ一晩洗浄したのち、1% 四酸化オスミウム 0.1M カコジル酸緩衝液 (pH 7.4) に 4°C で 3 時間、後固定した。脱水はアセトン上昇系列によって行ない、クエトール 812 に包埋した。光学顕微鏡による観察のために、試料は 1 μm の厚切り切片とし、飽和水酸化カリウム・エタノール溶液で包埋剤を除去したのち、トルイジンブルーで染色した。電子顕微鏡による観察のために、JUM-7 型超ミクロトームを用いて超薄切片を作成し、JEM-100B 型透過電子顕微鏡を用いて写真を撮影した。なお、電子染色はウランと鉛で行なった。

## 結 果

妊娠 13 日のラットにブスルファンを投与することによって、新生児の卵巣に含まれる卵母細胞の大部分は消失したが、ごくわずかのものは残留していた。そのため、発育期のいずれの時期の卵巣にも原始卵胞はみられなかったが、二次卵胞 (生後 10~20 日)、胞状卵胞 (生後 11 日~60 日) および黄体 (生後 35~60 日) が少数形成されていた。

次に、これらの卵巣を Dawson and McCabe<sup>12)</sup> の記載に準じて幼児期、幼年初期、幼年後期 (成熟前期) および成熟期の 4 期に整理して、卵巣の状態を記載する。

### 幼児期の卵巣 (出生直後~生後 10 日)

出生直後と生後 5 日の卵巣において、支質は性索細胞の塊で満たされており、その間に線維芽細胞が介在していた (図 1)。電子顕微鏡によって観察すると、性索細胞は短い細胞質突起を有しており、線維芽細胞と隣接している部分の細胞間隙には基底膜がみられた。核は核膜の陥入が著しく、ミトコンドリアは細胞質に散在しており、基質の電子密度が高く、板状クリステを有していた。粗面小胞体は断片状で少なかった。遊離リボソームは多数存在していたが、ポリソームを形成しているものは少なかった。また、ライソソーム様小体も少数認められた (図 2)。生後 10 日の卵巣には、残留卵母細胞を中

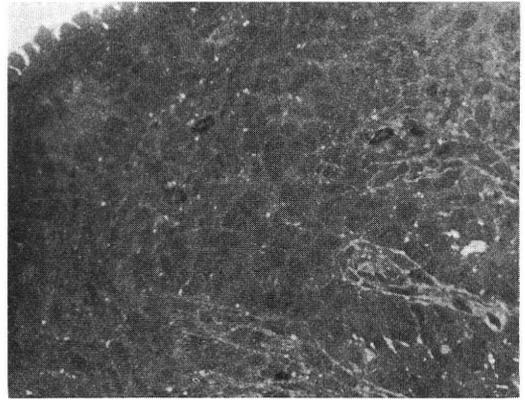


Fig. 1 Light micrograph of an ovary from a newborn rat, showing masses of sex cord cells in the stroma.  $\times 400$

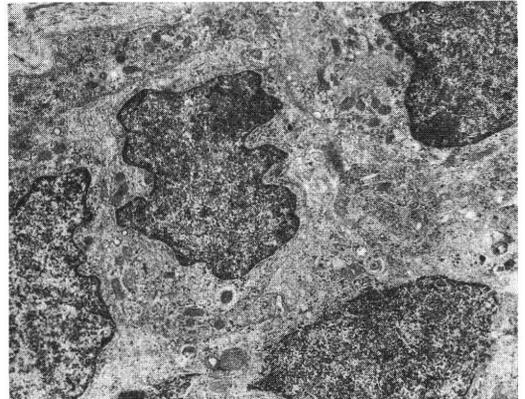


Fig. 2 Electron micrograph of four sex cord cells in an ovary from a newborn rat.  $\times 3,000$

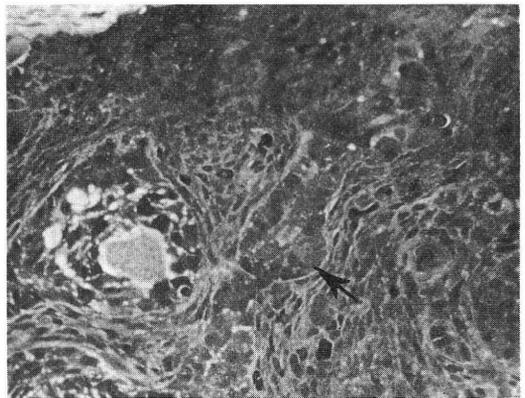


Fig. 3 Light micrograph of an ovary from a 10-day-old rat, showing a mass of sex cord cells (arrowed) spread toward a follicle that had been formed for a surviving oocyte.  $\times 250$

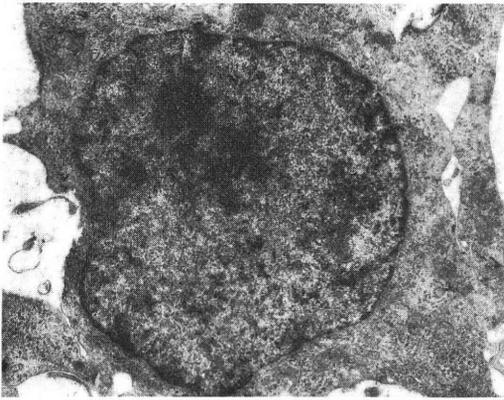


Fig. 4 Electron micrograph of a granulosa cell in an ovary from a 10-day-old rat.  $\times 5,000$

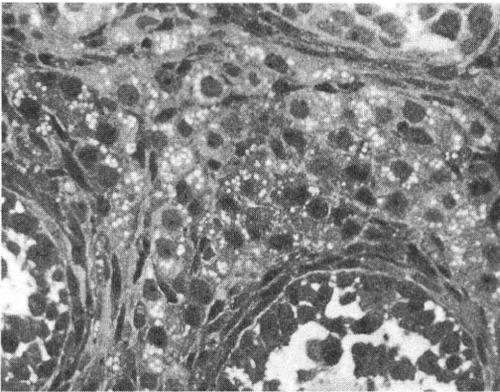


Fig. 5 Light micrograph of an ovary from an 11-day-old rat, showing masses of primary interstitial tissue.  $\times 400$

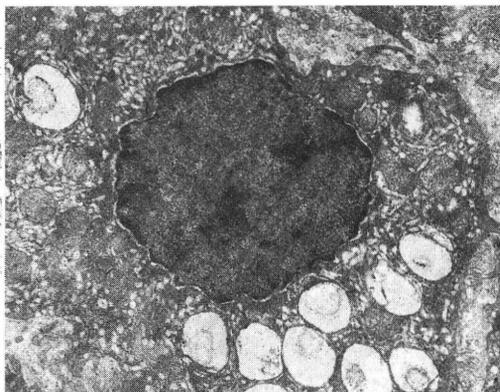


Fig. 6 Electron micrograph of a primary interstitial cell in an ovary from an 11-day-old rat.  $\times 3,000$

心として形成された二次卵胞が少数認められたが、この周囲に表在上皮直下にある性索細胞の塊が伸びている像

が観察された(図3). 二次卵胞内の顆粒層細胞の微細構造を調べたところ、この細胞は大きな細胞質突起を持っており、核は不定型であった。ミトコンドリアは基質の電子密度が中程度で、板状クリステを有していた。粗面小胞体は槽状であった。性索細胞にはみられなかったが、ゴルジ装置が中程度に発達していた。遊離リボソームは多く、ポリソームを形成していた(図4)。これらの構造は性索細胞のものとはかなり相違していた。

#### 幼年初期の卵巣(生後11~20日)

生後11日の卵巣において、大部分の性索細胞は一次間質腺細胞に移行していた。この細胞は光学顕微鏡下では多くの空胞(脂肪滴)によって特徴づけられ(図5)、電子顕微鏡下では、核は円型で、ミトコンドリアは基質の電子密度が低く、管状クリステを有していた。滑面小胞体は細胞質に多数観察された。遊離リボソームは多く、ポリソームを形成していた。また、脂肪滴が多数認められた(図6)。光学顕微鏡下でははっきりしないが、電子顕微鏡下では性索細胞の塊がなお支質に少数認められた。生後11日から20日の卵巣において、一次間質細胞は支質に塊をなして存在していたが、残存する卵胞の周囲では、これを厚く取り囲んでいた。

#### 幼年後期の卵巣(生後25~30日)

この時期の卵巣では、残留卵胞が大型の胞状卵胞に発達していた。しかし、閉鎖卵胞は存在せず、二次間質腺の形成はなかつた。一次間質腺は塊をなして支質に少量観察された。

#### 成熟期の卵巣(生後35~60日)

生後35日の卵巣には、黄体が少数出現した。生後40日から60日までの卵巣においても黄体は認められ、それらのごく少数の胞状卵胞が存在していた。しかし、幼年後期の卵巣と同様、これらの時期の卵巣にも閉鎖卵胞はみられなかつた。したがって、二次間質腺は存在せず、ごくわずかの一次間質腺が黄体の表面に沿って支質に観察された。

## 考 察

Forsberg and Olivecrona<sup>10)</sup> は、妊娠9~13日(陰垢に精子のみられた日を妊娠1日)にブスルファンを投与したラットの出生直前の胎児の卵巣の性索では、卵母細胞はわずかしか含まれておらず、顆粒層細胞が索状に配列していたと述べている。しかし、本実験において、ブスルファン投与ラットから得られた出生直後から生後10日までの新生児の卵巣では、支質に塊をなして存在する細胞の微細構造は性索細胞のもの<sup>10)</sup>と同じで、顆粒細胞のものとは異なっていた。したがって、これらの時期の細胞はまだ顆粒層細胞に移行しておらず、性索細胞のま

までであることが明らかとなつた。さらに彼ら<sup>10)</sup>は、妊娠 9～13日にブスルファンを投与したラットから得られた生後100日の新生児の卵巣には、黄体が形成されていたと述べており、Heller and Jones<sup>9)</sup>も妊娠14日にブスルファンを投与したラットから得られた生後3カ月の新生児の卵巣には、不定形の黄体様組織構造と支質の黄体化がみられたと報告している。本実験においても、妊娠 35～60日の新生児ラットの卵巣には少数の黄体が形成されていた。これら成熟期の卵巣にみられる黄体は、ブスルファン投与後残留した卵母細胞が中心となつて形成された卵胞から排卵を経て作られたものであろう。一方、本実験においては観察されなかつたが、Heller and Jones<sup>9)</sup>が生後3カ月の新生児卵巣で述べている支質の黄体化は、胞状卵胞の退行によつて生ずる二次間質腺を指しているものと思われる。しかし、従来の報告には、顆粒層細胞に移行すべき性索細胞の動態についての記載は全くみられない。

従来のブスルファン投与ラットの卵巣に関する研究<sup>8-10)</sup>では、ヘマトキシリン・エオジン染色標本<sup>8-10)</sup>や過沃素酸・シッフ染色標本<sup>10)</sup>を用いているため、性索細胞の確認はむずかしいように思われる。そこで本実験では、カルノフスキー液と四酸化オスミウムで二重固定したのち、常法通り電子顕微鏡用に作成した厚切り切片のトルイジンブルー染色標本を観察した。その結果、性索細胞の動きは容易に観察できた。さらに本実験では、微細構造も調べて細胞の確認を行なつた。すなわち、生後10日の新生児卵巣の支質に塊をなしたり、卵胞を取り巻いてみられる性索細胞は、生後11日には一次間質腺細胞に移行していた。性索細胞の一次間質腺細胞への移行は、光学顕微鏡的には細胞質における空胞の存在によつて推定されたが、さらに、微細構造の特徴(滑面小胞体の出現とミトコンドリアクリステの管状化)によつて確認された。

Dawson and McCabe<sup>12)</sup>によると、ラット卵巣において、一次間質腺の出現の初期には、大部分の間質腺は卵胞と関係なく不規則な塊として支質に認められるという。しかし、間質腺の索は卵胞の顆粒層としばしば連続しており、卵胞を三日月状に取り囲む像がみられることから、顆粒層細胞が卵胞膜の部分的破壊によつて卵胞から支質に流出し、一次間質腺細胞に移行すると考察している。しかし、なお、彼ら<sup>12)</sup>は支質に残存する性索細胞(potential follicular cell)が一次間質腺細胞に移行する可能性も考えなければならぬと述べている。最近、Mori and Matsumoto<sup>14)</sup>は、通常卵胞退行像がみられないウサギの卵巣(1～3カ月齢)を光学顕微鏡的、電子顕微鏡的、組織化学的、生化学的に観察し、一次間質腺

細胞は性索細胞と顆粒層細胞が起源であることを報告した。しかし、ラットにおいては、性索細胞が一次間質腺細胞へ直接移行することについての明白な証拠は現在までのところ得られていない。本実験では、ブスルファン投与によつて卵母細胞を退行させた新生児ラットの卵巣において、正常な場合顆粒層細胞へ移行すべき性索細胞が、卵胞の形成がほとんどないために一次間質腺細胞へ移行する像が認められ、Dawson and McCabe<sup>12)</sup>が推察した性索細胞から一次間質腺細胞への移行が実証された。

生後21日以降の正常ラット卵巣では、胞状卵胞の退行による卵胞膜内層起源の二次間質腺の形成がみられるが<sup>12)</sup>、ブスルファン投与ラットでは二次間質腺はみられなかつたため、一次間質腺の存在は容易に観察できた。しかし、一次間質腺は徐々に減少し、生後35日以降ではきわめて僅かであつた。

## 文 献

- 1) Von Bollag, W.: Der Einfluss von Myleran auf die Keimdrüsen von Ratten. *Experientia*, 9: 268, 1953.
- 2) Von Bollag, W.: Cytostatica in der Schwangerschaft. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 84: 393, 1954.
- 3) Bock, M. and Jackson, H.: The action of triethylenemelamine on the fertility of male rats. *Brit. J. Pharmacol.* 12: 1, 1957.
- 4) 石川一郎, 横谷 肇, 渡辺順明, 荒蕁義知, 梶原 彊: Myleran の急性および慢性毒性, 武田研究所年報, 16: 64, 1957.
- 5) Jackson, H., Fox, B. W. and Craig, A. W.: The effect of alkylating agents on male rat fertility. *Brit. J. Pharmacol.* 14: 149, 1959.
- 6) Jackson, H., Partington, M. and Fox, B. W.: Effect of 'Busulphan' ('Myleran') on the spermatogenic cell population of the rat testis. *Nature*, 194: 1184, 1962.
- 7) Hemsworth, B. N. and Jackson, H.: Effect of 'Busulphan' on the foetal gonad. *Nature*, 195: 816, 1962.
- 8) Hemsworth, B. N. and Jackson, H.: Effect of busulphan on the developing ovary in the rat. *J. Reprod. Fert.* 6: 229, 1963.
- 9) Heller, R. H. and Jones, H. W. Jr.: Production of ovarian dysgenesis in the rat and human by busulphan. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 89: 414, 1964.
- 10) Forsberg, J.-G. and Olivecrona, H.: The effect of prenatally administered busulphan on rat gonads. *Biol. Neonat.* 10: 180, 1966.
- 11) 三浦裕晃, 石田一夫: ブスルファン投与ラットにおける卵巣の形成, 新大農研報, 36: 59, 1984.

- 12) Dawson, A. B. and McCabe, M.: The interstitial tissue of the ovary in infantile and juvenile rats. *J. Morph.* 88 : 543, 1951.
- 13) 三浦裕晃, 石田一夫: 発生過程におけるラット卵巣の構築と構築諸細胞の微細構造, *新大農研報*, 36 : 47, 1984.
- 14) Mori, H. and Matsumoto, K.: On the histogenesis of the ovarian interstitial gland in rabbits. I. Primary interstitial gland. *Am. J. Anat.* 129 : 289, 1970.

Behavior of sex cord cells in young  
rat ovaries in which oocytes were  
disintegrated by Busulphan  
administration to pregnant  
parent rats

**Ko Koizumi and Kazuo Ishida**

Department of Animal Husbandry  
Faculty of Agriculture  
Niigata University

While there often are investigations where

Busulphan that disintegrates oocytes is used, what would happen of sex cord cells that normally get transformed into granulosa cells surrounding oocytes was our question. Therefore, the behavior of sex cord cells in newborn to 60-day-old rat ovaries were studied when their parent females had been administered with 1 mg of Busulphan on Day 13 of pregnancy.

In the ovaries of rats, newborn to 10-day-old, the masses of sex cord cells were present in the stroma. With those that are 11 days old, the sex cord cells had transformed into primary interstitial cells and proliferated. Thereafter, however, the cells decreased gradually.

Dawson and McCabe (1951) suggested the possibility of sex cord cells' transforming into primary interstitial cells, aside from the proved transformation of sex cord cells into granulosa cells and then into primary interstitial cells. The present investigation has shown that sex cord cells can directly get transformed into interstitial cells.

(受付: 昭和59年4月2日)

# 透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子進入 に及ぼす各種血清アルブミンの影響

Effects of Various Kinds of Serum Albumin on Human  
Sperm Penetration into Zona-free Hamster Ova

旭川医科大学生物科学教室

上口 勇次郎 美 甘 和 哉

Yujiroh KAMIGUCHI Kazuya MIKAMO

Department of Biological Sciences,  
Asahikawa Medical College

ヒト精子の *in vitro* 受精能獲得に要する血清アルブミンの効果を、透明帯除去ハムスター卵への精子進入率を指標に、7種のアルブミン製品と8名の健常男性からの14精液試料を用いて調査した。

1) アルブミンにはどの精液試料にも有効で、高い精子進入率を示したものと、ある試料にのみ有効なものがあった。

2) 精液試料によつては、どのアルブミンでも有効な例と、特定のアルブミンのみ有効な例とがあり、後者の場合、どのアルブミンが有効かは個人によりそれぞれ異なつていた。

3) 同一個人から得られた2回の精液試料の間で、同一アルブミンでも効果が大きく異なる場合があった。

4) 進入率の良否と各アルブミン製品中の脂肪酸、燐脂質、コレステロールの含有率との間には一定の関連性はなく、上述のアルブミン・精子間の親和性にみられる著しい個人差の原因は現在のところ不明である。

以上の結果をもとに、従来のハムスターテストの信頼性やヒト精子染色体研究法の改善策が論じられた。

(Jap. J. Fert. Ster., 30(1), 57-64, 1985)

## 結 言

透明帯を除去したゴールデンハムスター卵にヒト精子を進入させ、前核を形成させることができる<sup>1)</sup>。この方法は男性不妊症患者の精子の受精能検査(ハムスターテスト)<sup>2-9)</sup>やヒト精子の染色体検査<sup>10-14)</sup>に応用されている。

従来のハムスターテストでは精子の受精能獲得方法や媒精方法は各研究者によりそれぞれ異なつていゝ。また、それらの結果をみると、妊孕性の確認された男性あるいは正常精液所見を示した男性群(対照群)においてすらも精子進入率は各個人により<sup>2-9)</sup>、また、同一個人でも精液試料毎に<sup>9)</sup>、大きく異なつていゝ(0~100%)。したがつて、これらのテストで得られた精子進入

率が各個人の精子の受精能力をどの程度正確に反映しているかは甚だ疑問である。

一方、精子染色体分析に関しては Rudak ら<sup>10)</sup>の報告後、Martin らの一連の研究がある。これらの研究でも受精率は各調査例の間で大きく変動しており(3~88%)、最終的に核型分析できた精子核板数にも大きな差が認められる<sup>11,12)</sup>。すなわち、前述した精子進入率の著しい個人差はここでも研究上の障害となつていゝ。

精子進入率に影響を与える要因として、これまで、ハムスター卵の卵管内あるいは培養液中での老化<sup>15)</sup>、媒精時の精子濃度<sup>16)</sup>、精子の受精能獲得時間にもみられる個人差<sup>17,18)</sup>、などが報告されていゝ。一方、ラット<sup>19,20)</sup>やハムスター<sup>21,22)</sup>の精子では受精能獲得溶液に加える血清アルブミンの品質によつて受精能力が影響を受けることが

示唆されている。しかし、ヒト精子を用いたこれまでの研究には、品質の異なる種々のアルブミンの精子に対する影響を比較、検討したものはない。従来の研究者はそれぞれ違う品質のアルブミン1種を実験に用いているが、アルブミン以外の実験条件（受精能獲得溶液の組成、受精能獲得時間、媒精時間、精子濃度など）が異なっているため、それらの結果を直接比較することはできない。

今回、われわれは予備実験段階で得られた知見をもとに、異なる7種類の血清アルブミンを選択し、さらにアルブミン以外の実験条件を同一にしたうえで、精子の受精能獲得に及ぼす影響を調査した。その結果、アルブミンの品質の違いが、前述した精子進入率の個人差あるいは同一個人での精液試料差をもたらす最も重要な原因の一つであることを確認したので報告する。

材料と方法

以下に述べる実験方法の概要は図1に示されている。

(1) 溶液

実験用の各溶液は modified-BWW (mBWW) 液<sup>3)</sup>を基本として作成された。

精子の浮遊および各処理過程での精子や卵子の洗浄には mBWW 液+0.3%血清アルブミンが用いられた。また、0.1%ヒアルロニダーゼ (300 NF units/mg, Sigma 社)、0.1%トリプシン (1:250, Difco 社) および 10 $\mu$ M イオノフォア A23187 (Calbiochem-Behring 社) もこの溶液を用いて作成された。イオノフォアはジメチルスルホキシド(UVS-35, 半井化学)へ 1mM の濃度に溶解したものを原液とし、分注して冷凍庫(-20°C)に保存した。使用直前に原液を上記の mBWW 液で10 $\mu$ M に希釈し、pH を7.4に調整して用いた。

精子の受精能獲得および媒精には mBWW 液+3.5%血清アルブミンが用いられた。調査した血清アルブミンの種類はヒト血清アルブミン (HSA) 5種と牛血清アルブミン (BSA) 2種である。各アルブミンの特徴の詳細は表1および2に示されている。各製品中の脂肪

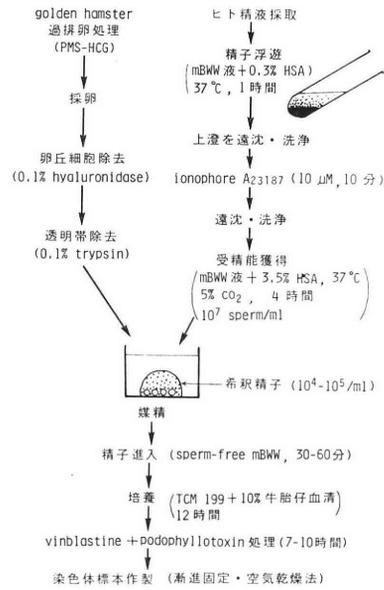


図1 実験方法の概要

酸、磷脂質およびコレステロールの含量 (表2) はそれぞれ、高橋ら<sup>23)</sup>、Takayama ら<sup>24)</sup>、および Allain ら<sup>25)</sup>の酵素法によつて測定された。

受精卵の培養には TCM 199 (阪大微研) +10%非動化牛胎仔血清 (Gibco) が用いられた。

(2) 卵の準備

成熟雌ゴールデンハムスターの性周期第1日目(排卵日)に0.2 IU/g 体重の PMS (帝国臓器製薬) を鼠径部に筋注し、さらに58時間後に0.2 IU/g 体重の HCG (持田製薬) を投与することにより過排卵を誘発した。HCG 投与後17時間目に卵管膨大部より未受精卵を採取し、0.1%ヒアルロニダーゼ処理により卵丘細胞を除去した。mBWW 液で卵を2・3度洗浄した後、さらに0.1%トリプシン処理により透明帯を除去し、mBWW 液で洗浄して実験に用いた。

(3) 精子の準備および媒精

精液は8名の健常男性(年齢20~32歳)から用手法に

表1 受精能獲得に用いられた7種の血清アルブミン

アルブミンの種類	製品の等級	製造会社	lot 番号
I	HSA fraction V	Sigma Chem.	100F-02061
II	HSA ≥95% pure, lyophilized	The Green Cross Co.	TO 002 TF
III	HSA crystallized & lyophilized	Sigma Chem.	121F-9308
IV	HSA fraction V	Miles Lab.	147
V	HSA fraction V	Sigma Chem.	12F-0051
VI	BSA fraction V	Calbiochem.	002068
VII	BSA essentially fatty acid-free	Sigma Chem.	42F-9365

表 2 各種血清アルブミン中の脂肪酸、燐脂質およびコレステロールの含量

化合物	血清アルブミン						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
脂 肪 酸 (nEq/mg 試料)	37.10	7.79	22.94	1.35	23.93	3.57	0.22
燐 脂 質 (ng/mg 試料)	232	432	598	133	731	448	100
コレステロール (ng/mg 試料)	20.9	18.6	25.5	13.9	37.1	32.5	27.8

て得られた。精液を 37°C で液化した後、swim up 法<sup>29,30)</sup>によって運動能の高い精子のみを回収した。精子の受精能獲得時間には個人差があるので<sup>18)</sup>、この差をできるだけ少なくするためにイオノフォア A23187 処理 (10 $\mu$ M, 10分間) を行なった。この抗生物質はヒト<sup>27)</sup>および他の哺乳類<sup>28-30)</sup>で受精能獲得、先体反応を促進することが知られている。異なる血清アルブミン (3.5%) を含む 7 種類の mBWW 液 0.3ml ずつを滅菌プラスチック製ペトリ皿の底に滴下し、パラフィン油で被つたものをあらかじめ用意して置き、上記の処理後に洗浄、遠沈した精子を最終濃度 10<sup>7</sup>/ml になるように加えた。精子懸濁液を 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 下で 4 時間培養して受精能を獲得させた後、精子濃度を 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>/ml に希釈し、透明帯除去卵を加えて媒精を行なった。長時間 (3 時間) の媒精を行なうと、実験例によっては極端な多精子受精のため卵が傷害を受け、萎縮することがある。そこで、媒精を開始してから卵を解剖顕微鏡 (×80倍) 下で経時的に観察し、卵表に 20~30 の精子が付着した時点で精子を含まない mBWW 液に移し換えて、さらに 30~60 分間追加培養を行なった。

(4) 精子の運動能保有率の測定

精子懸濁液をピペットで静かに攪拌して一部の沈殿精子を再浮遊させた後、少量の液をスライドグラスに載せ、手早く検鏡した。位相差顕微鏡 (×400倍) 下で、運動力のある精子とない精子の数を大まかに数えることによって運動能保有率を概算した。

(5) 精子進入率の判定

媒精終了後、卵を TCM 199+10%非動化牛胎仔血清中で 12 時間培養し、さらに分裂阻害剤を含む TCM 199 で 7 時間培養した。その後、漸進固定・空気乾燥法<sup>31-33)</sup>を用いて卵子染色体標本作製し、ギムザ染色を施した。精子進入率は、精子由来の核板、雄性前核あるいは膨化した精子頭部の有無によって判定した。なお、受精卵の長時間培養および卵子染色体標本作製の過程は、この実験と平行して行なわれた精子染色体分析法の改良を目的としたものである。したがって、精子進入率の判定

に従来の方法<sup>1)</sup>は用いなかっただ。

結 果

7 種類の血清アルブミンを用いて、8 名から得られた精液試料を調査した。A~F の 6 調査例については精液採取時期を変えて同じ実験を 2 度行なった。ただし、アルブミン I は一度しかテストされなかつた。

1. 精子の運動能

調査例 A~D, F および H では、イオノフォア処理後の精子の運動能保有率は処理前の 70~90% に保たれていた。一方、調査例 E および G では運動能保有率の著しい低下 (約 30%) が認められた。しかし、後に述べるようにこの低下はかならずしも精子進入率の低下の原因にはならなかつた。また、4 時間の培養後 (媒精時) の精子

表 3 一定数の精子 (20~30) が卵表に付着するのに要する時間 (分) : 7 アルブミン群および 8 調査例間での比較

調査例		血清アルブミン						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
A	1	20	24	11	51	11	56	28
	2	—	28	23	45	25	65	35
B	1	11	34	6	20	6	29	9
	2	—	11	11	12	11	14	11
C	1	18	27	13	28	13	18	15
	2	—	25	20	39	32	21	18
D	1	12	22	55	30	55	35	35
	2	—	7	12	18	10	20	11
E	1	95	65	56	64	55	87	89
	2	—	74	93	80	102	72	79
F	1	30	60	60	40	60	60	60
	2	—	40	30	90	70	60	60
G	1	—	16	10	15	10	12	10
H	1	38	55	40	57	62	72	72

表 4 精子進入率 (%) : 7 アルブミン群および 8 調査例間での比較

調査例		血 清 ア ル ブ ミ ン						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
A	1	100(28/28)*	100(31/31)	100(22/22)	84(26/31)	100(25/25)	96(23/24)	91(21/23)
	2		100(18/18)	96(24/25)	83(15/18)	70(14/20)	20( 4/20)	90(18/20)
B	1	100(24/24)	100(31/31)	100(15/15)	88(28/32)	100(17/17)	95(21/22)	77(17/22)
	2		100(17/17)	100(20/20)	70(14/20)	92(12/13)	79(15/19)	85(17/20)
C	1	100(27/27)	86(19/22)	100(27/27)	86(18/21)	92(24/26)	96(23/24)	96(23/24)
	2		95(19/20)	88(22/25)	63(12/19)	72(18/25)	60( 9/15)	59(10/17)
D	1	97(29/30)	100(37/37)	54(13/24)	97(37/38)	39( 9/23)	91(21/23)	35( 8/23)
	2		100(31/31)	92(24/26)	76(13/17)	57(16/28)	75(12/16)	81(13/16)
E	1	88(21/24)	64(14/22)	97(29/30)	57(13/23)	67(20/30)	67(10/15)	100(15/15)
	2		53( 9/17)	72(18/25)	60(12/20)	30( 6/20)	60(12/20)	30( 6/20)
F	1	87(27/31)	85(17/20)	54(19/35)	65(13/20)	10( 2/20)	45( 9/20)	42( 8/19)
	2		45( 9/20)	49(17/35)	10( 2/20)	28( 8/29)	20( 4/20)	62(13/21)
G	1		90(28/31)	83(19/23)	30(10/33)	55(12/22)	61(14/23)	79(19/24)
H	1	100(27/27)	100(21/21)	57(16/28)	55(11/20)	25( 5/20)	30( 6/20)	10( 2/21)

\* 百分率 (精子進入卵数 / 調査卵数)

の運動能保有率は 8 調査例とも培養開始時のほぼ 80~90% に保たれており、アルブミン I-VII 群の間でも大きな運動能保有率の差は認められなかった。

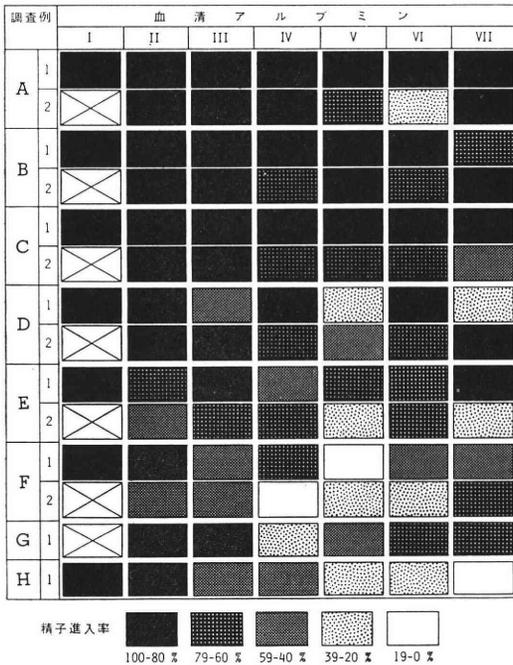


図 2 精子進入率 (%) : 7 アルブミン群および 8 調査例間での比較

### 2. 精子の卵表への付着

精子の卵表への付着度合は、媒精を開始してから一定数の精子 (20~30) が卵に付着するまでの時間で表わされた (表 3)。付着に要する時間には個人差が認められ、調査例 B, C, D および G では比較的短く、E や H では長かった。また、同一個人でも受精能獲得に用いたアルブミンの種類によって付着時間に差が認められた。精子付着に長い時間を要した実験群では、卵表をヒットしても、そこに留まらない精子の比率が高かったもので、これらの精子懸濁液では先体反応誘起率が低かったものと考えられる。

精子が卵表に付着すると付着精子の鞭毛運動によって卵が回転するが、興味深いことには、ほとんどすべての卵の回転方向は左回り (anticlockwise) であった。この回転の速度は精子の受精能力の良否とも深い関係があり、回転速度の速いもの (10~20秒/1回転) ほど良い受精率が得られた。われわれはこの現象を受精能を判定する指標の一つとして利用した。また、回転中の卵の最上部付近の卵表への精子付着率は他の部域よりも高い傾向を示した。

### 3. 精子進入率

上述のように卵の回転速度の早い群では精子進入率が高く、遅い群では低い傾向がみられた。また、後者では TCM 199 で培養中に卵表から脱落してしまう精子が多

かつた。

精子進入率は調査例により、また、受精能獲得に用いた血清アルブミンの種類により大きく異なっていた(表 4, 図 2)。アルブミン I—VII 群の間で進入率を比較すると、I—III では比較的多数の調査例が高い進入率を示した。一方、IV—VII では特定の調査例でのみ進入率が高かつた。また、進入率を A—H の 8 調査例の間で比較すると、A—C ではどのアルブミンを用いても高い進入率が得られたが、D—H では特定のアルブミンでのみ進入率が高かつた。後者の調査例の場合、高い進入率を示すアルブミンは各調査例ごとにそれぞれ異なっており、両者の間に一定の関係は認められなかつた。調査例 E と G では受精能獲得開始時点での精子の運動能保有率がかなり低かつたが、それにもかかわらず、特定のアルブミン群では高い進入率が得られた。このことは、精子の運動能の低下がかならずしも進入率の低下の直接的原因になつていないことを示している。また、調査例 A のアルブミン VI, D の VII, E の VII, あるいは F の IV などの実験例のように、同一個人でも 1 回目と 2 回目のテストの間で進入率が著しく異なる場合が認められた。

### 考 察

血清アルブミン以外の実験条件を同一にした今回の実験は、精子受精能獲得に用いられたアルブミンには多数例に対しても幅広く有効なものと、そうでないものがあることを明らかにした。アルブミン I と V の比較からわかるように、同じ製品でも lot 番号が異なるだけで有効性には大きな差が認められる。このことは各製品に夾雑物として混入しているなんらかの有効成分、あるいは阻害成分の量的違いが受精能獲得率に影響を与えている可能性を示唆している。Lui と Meizel<sup>21)</sup> は BSA に混在する脂肪酸を除去することによりハムスター精子の先体反応誘起率が数倍高くなることを報告したが、われわれの実験では、脂肪酸含量の少ないアルブミン群(表 2) で特に精子進入率が高いという結果は得られなかつた。また、Davis<sup>19, 20)</sup> は BSA 溶液中の磷脂質が精子に移動し、逆に精子からコレステロールが BSA 溶液中に移動することによつてラット精子の先体反応が促進されると報告した。このことはコレステロール含量が少なく、磷脂質に富むアルブミンほど先体反応誘起に有効であることを示唆しているが、われわれの結果では、これらの化合物の含量(表 2) と精子進入率(表 4) の間には一定の関連性は認められなかつた。カテコールアミン類(エピネフリン, セロトニン等)が受精能獲得, 先体反応を促進するという報告もあるが<sup>24)</sup>、アルブミン中でのこれらの化合物の含量は今回測定されなかつた。これ

らの化合物を含め、種々のアルブミン夾雑物の影響は今後さらに検討されなければならない。

一方、受精能獲得に有効なアルブミンの種類は各個人によりそれぞれ異なり、また、同一個人でも精液採取時期により異なる場合があるので、これらの要因によつてもアルブミンの効果は修飾されていると考えられる。結局、受精能獲得の良否は各アルブミンと各個人の精子の間の親和性の違いによつて決定されるということができると、この親和性が具体的にアルブミンと精子の間のどのような相互作用に基づくかは今のところ不明である。

本実験ではイオノフォア A23187 処理による受精能獲得の促進が行なわれた。この処理を用いることによつて、従来の報告の場合よりもはるかに低い精子濃度と短い媒精時間で高い受精率を得ることができた。調査例 E および G にみられるようにイオノフォア処理に対する精子の反応性には個人差があるが、この処理を加えていない予備実験でも、用いるアルブミンの種類によつて受精率が大きく異なるという結果が得られているので、処理そのものがこの現象の主原因ではないと思われる。

このようにアルブミンと精子の間の親和性には大きな個人差があるので、受精能獲得に 1 種類のアルブミンしか用いていない従来の研究はこの観点から再考されなければならない。例えば、最近、精子の受精能獲得時間に個人差があることが報告されたが<sup>17, 18)</sup>、この受精能獲得時間も用いるアルブミンの種類を変えれば変化する可能性を含んでいる。また、従来のハムスターテストで精子進入率が低かつた調査例では、偶然、用いたアルブミンがその個人の精子に適さなかつたことによるという可能性が考えられる。したがつて、このテストを男性不妊症患者の精子の受精能力の診断に応用する場合には症例ごとに多種類のアルブミンを用いた詳細な検討が必要である。もちろん、今後の課題としてアルブミン溶液中のいかなる成分が精子の受精能獲得を促しているのか、また、それを阻害する物質が含まれているか等の検討が行なわれる必要があろう。ヒトの体外受精の研究においても、精子の前培養および媒精に BSA<sup>35)</sup>、HSA<sup>36, 37)</sup>、あるいは非動化患者血清<sup>38)</sup>などが用いられているが、精子の受精能力がアルブミンの品質により影響されるということは考慮されなければならない問題であらう。

上述の問題点はヒト精子染色体の研究においても重要である。これまでの報告では染色体分析率の低い調査例が多いが<sup>11, 12)</sup>、このなかには精子、アルブミン間の不適合が原因になつている場合もあると考えられる。この点を克服するためには、あらかじめ何種類かのアルブミンを用いて受精能獲得を行ない、予備的媒精実験により最も高い受精率の得られた精子懸濁液を本実験に用いること

が望ましい。この方法はくりかえし精液試料を得ることが難しい症例の場合には特に有効である。われわれはこの点のほかにも従来の方法にいくつかの改良を加え、従来の報告よりもはるかに高い精子染色体分析率を得ることができた。この方法の詳細は別に報告する予定である。

本研究を行なうにあたり有益な助言を頂き、血清アルブミン試料の一部を提供して頂いたハワイ大学解剖学・生殖生物学教室の柳町隆造教授に深く感謝する。また、技術的協力を頂いた鳥取大学解剖学第一講座の舟木賢治博士、帝人生物医学研究所の菅原茂樹氏、旭川医科大学生物学教室の立野裕幸氏、および、血清アルブミンの化学分析の協力を頂いた旭川医科大学内科学第二講座の衛藤雅昭氏に謝意を表す。

本研究は文部省科学研究費補助金(試験研究(2), No. 58890006)の援助を受けたものである。

### 文 献

- 1) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Rogers, B. J.: The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.* 15 : 471, 1976.
- 2) Rogers, B. J., Campen, H. V., Ueno, M., Lambert, H., Bronson, R. and Hale, R.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil. Steril.* 32 : 664, 1979.
- 3) Overstreet, J. W., Yanagimachi, R., Katz, D. F., Hayashi, K. and Hanson, F. W.: Penetration of human spermatozoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: A study of fertile donors and infertile patients. *Fertil. Steril.* 33 : 534, 1980.
- 4) Hall, J. L.: Relationship between semen quality and human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Fertil. Steril.* 35 : 457, 1981.
- 5) Tyler, J. P. P., Pryor, J. P. and Collins, W. P.: Heterologous ovum penetration by human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 63 : 499, 1981.
- 6) Zausner-Guelman, B., Blasco, L. and Wolf, D. P.: Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: A comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fertil. Steril.* 36 : 771, 1981.
- 7) Cohen, J., Weber, R. F. A., van der Vijver, J. C. M. and Zeilmaker, G. H.: *In vitro* fertilizing capacity of human spermatozoa with the use of zona-free hamster ova: Interassay variation and prognostic value. *Fertil. Steril.* 37 : 565, 1982.
- 8) Martin, R. H. and Taylor, P. J.: Reliability and accuracy of the zona-free hamster ova assay in the assessment of male fertility. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 89 : 951, 1982.
- 9) Margalioth, E. J., Laufer, N., Navot, D., Voss, R. and Schenker, J. G.: Reduced fertilization ability of zona-free hamster ova by spermatozoa from male partners of normal infertile couples. *Arch. Androl.* 10:67, 1983.
- 10) Rudak, E., Jacobs, P. A. and Yanagimachi, R.: Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature (London)* 274 : 911, 1978.
- 11) Martin, R. H., Lin, C. C., Balkan, W. and Burns, K.: Direct chromosomal analysis of human spermatozoa: Preliminary results from 18 normal men. *Am. J. Hum. Genet.* 34 : 459, 1982.
- 12) Martin, R. H., Balkan, W., Burns, K., Rademaker, A. W., Lin, C. C. and Rudd, N. L.: The chromosome constitution of 1000 human spermatozoa. *Hum. Genet.* 63 : 305, 1983.
- 13) Balkan, W. and Martin, R. H.: Chromosome segregation into the spermatozoa of two men heterozygous for different reciprocal translocations. *Hum. Genet.* 63 : 345, 1983.
- 14) Balkan, W., Burns, K. and Martin, R. H.: Sperm chromosome analysis of a man heterozygous for a pericentric inversion of chromosome 3. *Cytogenet. Cell Genet.* 35 : 295, 1983.
- 15) Berger, T., Marrs, R. P., Saito, H. and Kletzky, O. A.: Factors affecting human sperm penetration of zona-free hamster ova. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 145 : 397, 1983.
- 16) Martin, R. H. and Taylor, P. J.: Effect of sperm concentration in the zona-free hamster ova penetration assay. *Fertil. Steril.* 39:379, 1983.
- 17) Perreault, S. D. and Rogers, B. J.: Capacitation pattern of human spermatozoa. *Fertil. Steril.* 38 : 258, 1982.
- 18) 齊藤 晃, 星 和彦, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: ヒト精子の受精能獲得時間の個人差, *日本不妊誌*, 29 : 90, 1984.
- 19) Davis, B. K., Byrne, R. and Hungund, B.: Studies on the mechanism of capacitation II. Evidence for lipid transfer between plasma membrane of rat sperm and serum albumin during capacitation *in vitro*. *Biochim. Biophys. Acta* 558 : 257, 1979.
- 20) Davis, B. K., Byrne, R. and Bedigian, K.: Studies on the mechanism of capacitation: Albumin-mediated changes in plasma membrane lipids during *in vitro* incubation of rat sperm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 1546, 1980.

- 21) Lui, C. W. and Meizel, S.: Biochemical studies of the *in vitro* acrosome reaction inducing activity of bovine serum albumin. *Differentiation* 9 : 59, 1977.
- 22) Yanagimachi, R.: *In vitro* sperm capacitation and fertilization of golden-hamster eggs in a chemically defined medium. In “*In Vitro* Fertilization and Embryo Transfer” Edited by Hafez, E. S. E. and Semm, K., Lancaster, MTP Press Ltd., p. 65, 1983.
- 23) 高橋十郎, 藤井一寿, 林 長倉: 脂肪酸活性化酵素反応を用いた脂肪酸定量へのアプローチ, *臨床化学*, 4 : 179, 1975.
- 24) Takayama, M., Itoh, S., Nagasaki, T. and Tanimizu, I.: A new enzymatic method for determination of serum choline-containing phospholipids. *Clin. Chim. Acta* 79:93, 1977.
- 25) Allain, C. G., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C.: Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20 : 470, 1974.
- 26) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 対木 章, 齊藤 晃, 鈴木雅洲, 林 恵子, 柳町隆造: われわれの行っている精液静置法 “layering method” による精液中からの良好精子の分離, *日本不妊誌*, 28 : 101, 1983.
- 27) 井上正人, 根岸則武, 吉野かほる, 藤井明和: Ionophore A 23187 によるヒト精子の先体反応, *日本不妊誌*, 25 : 153, 1980.
- 28) Green, D. P. L.: The induction of the acrosome reaction in guinea pig sperm by the divalent metal cation ionophore A 23187. *J. Cell Sci.* 32 : 137, 1978.
- 29) Russell, L. D., Peterson, R. N. and Freund, M.: Direct evidence for the formation of hybrid vesicles by fusion of the plasma and outer acrosomal membranes during the acrosome reaction of boar spermatozoa. *J. Exp. Zool.* 208 : 41, 1979.
- 30) Smith, M., Peterson, R. N. and Russell, L. D.: Penetration of zona-free hamster eggs by boar sperm treated with the ionophore A 23187 and inhibition of penetration by anti-plasma membrane antibodies. *J. Exp. Zool.* 225 : 157, 1983.
- 31) Kamiguchi, Y., Funaki, K. and Mikamo, K.: A new technique for chromosome study of murine oocytes. *Proc. Japan Acad.* 52 : 316, 1976.
- 32) 上口勇次郎, 舟木賢治, 美甘和哉: 齧歯類卵子および未着床胚の染色体標本作製法, *先天異常*, 18 : 41, 1978.
- 33) Mikamo, K. and Kamiguchi, Y.: A new assessment system for chromosomal mutagenicity using oocytes and early zygotes of the Chinese hamster. In “Radiation-Induced Chromosome Damage in Man” Edited by Ishihara, T. and Sasaki, M., New York, Alan R. Liss, Inc., p. 411, 1983.
- 34) Meizel, S.: Stimulation of sperm fertility *in vitro* by exogenous molecules. *Reproduction* 5 : 169, 1981.
- 35) Trounson, A. O., Leeton, J. F., Wood, C., Webb, J. and Kovacs, G.: The investigation of idiopathic infertility by *in vitro* fertilization. *Fertil. Steril.* 34 : 431, 1980.
- 36) Lopata, A., Johnston, I. W. H., Hoult, I. J. and Speirs, A. I.: Pregnancy following intrauterine implantation of an embryo obtained by *in vitro* fertilization of a preovulatory egg. *Fertil. Steril.* 33 : 117, 1980.
- 37) Trounson, A. O., Mohr, L. R., Wood, C. and Leeton, J. F.: Effect of delayed insemination on *in vitro* fertilization, culture and transfer of human embryos. *J. Reprod. Fert.* 64 : 285, 1982.
- 38) 鈴木雅洲, 星 和彦, 星合 晃, 齊藤 晃, 桃野耕太郎, 森 良一郎, 京野広一, 対木 章, 今泉英明, 長池文康, 上原茂樹, 永沼孝子, 広瀬洋子: 体外受精・胚移植により受精・着床に成功した卵管性不妊症の1例, *日本不妊誌*, 28 : 439, 1983.

Effects of various kinds of serum albumin on human sperm penetration into zona-free hamster ova

Yujiro Kamiguchi and Kazuya Mikamo

Department of Biological Sciences,  
Asahikawa Medical College

The effect of serum albumin on *in vitro* capacitation of human spermatozoa was studied using sperm penetration assay with zona-free hamster ova. Seven kinds of commercially available albumin were used with 14 semen samples from 8 healthy men, and the following results were obtained.

1) Among the seven albumins, some effectively induced high penetration rates in all semen samples examined, while others were only effective in some samples.

2) Some semen samples were capacitated by all albumins with high penetration rates, but others were capacitated only by a few albumins. In the latter case, the effective albumins were different for each individual.

3) The effectiveness of the same kind of albumin varied remarkably, in some cases between two semen samples obtained from the same donor

at different times.

4) The amount of three biochemical contaminants, i. e. fatty acid, phospholipid and cholesterol, varied considerably among the seven albumins. But, there was no positive correlations between the amount of these contaminants and the sperm penetration rate. Thus, we were not able to explain the mechanism of the albumin-sperm

affinity.

On the basis of above-mentioned results, we discussed two points; (1) the reliability of previously reported hamster tests and (2) methodological improvements necessary for analyzing human sperm chromosomes.

(受付: 昭和59年6月6日)

## STUDIES ON ARTIFICIAL INSEMINATION INTO THE OVIDUCT THROUGH THE TUBAL FIMBRIA IN RABBITS

Kiichi KANAYAMA, Tuyoshi ENDO, Gunjiro KOBAYASHI  
and Yuji SAKUMA

Department of Veterinary Physiology, College of Agriculture  
and Veterinary Medicine, Nihon University,  
Fujisawa, Kanagawa 252, Japan

---

**Abstract:** The technique for artificial insemination into the oviduct through the tubal fimbria was studied on rabbits. The animals, which had been treated with PMSG to cause superovulation, were laparotomized under general anesthesia and semen was injected into the oviduct with a capillary through the tubal fimbria. The semen had been obtained from mature males by the artificial vagina method, and diluted with physiological saline solution to 1:10. An hour later HCG was administered to induce ovulation and then, after 36 to 42 hours, the oviduct and uterus were irrigated to obtain ova.

The amount of semen injected into the oviduct varied among the animals but ranged from 1.5 to 2.5 ml. The total number of ovulation points was 166 in the 11 rabbits and that of ova obtained from the oviduct was 81, 43 of which were cleaved ova from 10 subjects. The development stages of those ova were within the range of 2 to 8-cell cleavage; 4-cell stage was the most frequent as 32 ova fell under this category; 10 were in 8-cell stage. These cleaved ova appeared morphologically normal, developing normally. Of the 81 ova collected, 23 were uncleaved and 14 were degenerated.

The cleaved ova obtained were transferred to the five recipients to be confirmed normal embryos. Recipients had been mated by vasectomized males. The ova were transferred 1 to 11 for each recipient. It was found later that three out of five recipients either had fetuses implanted or gave birth to the young. No morphological abnormalities were detected in the implanted fetuses or in the placentae. The newborn rabbits were functionally as well as morphologically normal.

The foregoing results suggested that artificial insemination by injecting a small amount of semen into the oviduct through the tubal fimbria could lead to a normal fertilizing process and that it could be used to treat oligospermia in human.

(*Jap. J. Fert. Ster.* 30(1), 65-70, 1985)

---

### Introduction

It is known that spermatozoa must stay in the female reproductive tracts for a certain length of time so that they can enter the zona pellucida of an ovum and fertilize it. In this period there occurs two successive changes in the spermatozoa: one is sperm capacitation<sup>1,2)</sup>, a physiological or biochemical change, and the other is acrosome reaction<sup>3)</sup>, a minute morphological change in the

spermatozoa. Sperm capacitation was first found in a rabbit and has been studied further since then. Rabbit spermatozoa, passing through the uterus and oviduct, are reported to be capacitated in 5 to 6 hours<sup>2,4)</sup>. It was demonstrated that 10 to 11 hours were required to bring about sperm capacitation if it took place either in the oviduct alone<sup>5)</sup> or in the uterus alone<sup>6)</sup>. Thus it was revealed that spermatozoa need not pass all through the female reproductive tracts to be

capacitated.

It is said that in a rabbit less than a few hundred spermatozoa ejaculated in the vagina can reach the ampulla of the uterine tube<sup>7)</sup> to participate in fertilization. Sperm capacitation can be achieved within the oviduct alone as already mentioned, so it should be possible to fertilize an ovum with a limited number of spermatozoa, by injecting a small amount of semen from the tubal fimbria. The idea led us to undertaking of the present investigation.

Oligospermia has been treated chiefly with hormones by urologists, and now *in vitro* fertilization and embryo transfer (IVF & ET) are being put to a wider use on the cases unresponsive to hormonal therapy. IVF & ET were at first indicated for tubal sterility, but now they are tried to deal with oligospermia as they need only a small number of spermatozoa.

The first newborn originating from IVF & ET was reported in 1978<sup>8)</sup> and the first success in this country was recorded by Suzuki et al.<sup>9)</sup> in 1983. IVF & ET are the last resort to treat sterilities due to tubal sterility and oligospermia, though their propriety is quite controversial<sup>10)-12)</sup>.

We have been studying the treatment of sterilities, oligospermia in particular, by injecting semen into the oviduct through the tubal fimbria so that *in vitro* fertilization can be avoided. The present paper is to report on our attempt at artificial insemination into the oviduct through the fimbria and the resultant birth of the normal young. The success of this technique implies its possibility of offering opportunities to explore the mechanism of fertilization by means of experiments.

### Materials and Methods

The subjects were female Japanese white rabbits, mature and weighing 2.8 to 3.5kg. The animals were subjected to our simple procedure for induction of superovulation<sup>13)</sup> so that the number of ovulated ova would be increased. That is, 50 to 75 IU of PMSG was injected into the auricular vein. Seventy-two hours later the animal was laparotomized by midline abdominal incision under general

anesthesia with a pentobarbital derivative. As shown in Fig. 1, semen was injected into the tubal fimbria after the presence of mature follicles was confirmed. The semen was obtained from a mature male by the artificial vagina method and diluted to 1:10 with physiological saline kept at 37°C. It was injected with a glass capillary inserted into the tubal fimbria carefully so as to avoid hemorrhage. Then the abdominal muscles and the skin were sutured and one hour after the insemination 75 IU of HCG was injected into the auricular vein to induce ovulation.

Ova were collected 35 to 42 hours after the HCG administration by irrigating the excised oviduct and uterus or by irrigating the oviduct alone under general anesthesia. The ovaries were explored for ovulation points along with ova.

The obtained cleaved ova were transferred to recipient female rabbits to determine their capability of developing into fetuses. The recipient was mated with a vasectomized male when the donor was given HCG intravenously (i. e., 1 hour after the insemination) so that their ovulation was synchronized. The recipient was then laparotomized under general anesthesia and, after ovulation points were checked for in the ovaries, the cleaved ova were transferred to the oviduct through the tubal fimbria with a glass capillary.

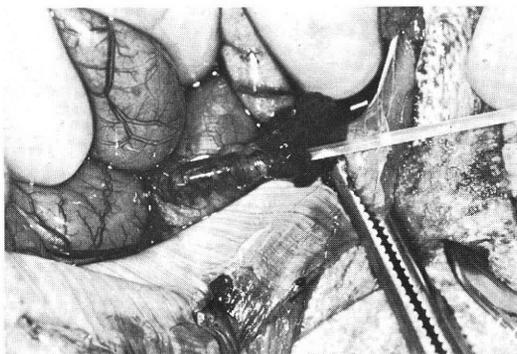


Fig. 1 Injection of semen into oviduct through tubal fimbria with a glass capillary.

### Results

The amount of diluted semen injected into the oviduct ranged roughly between 0.15 and 0.25ml, though it varied among the animals. Table 1 shows the results of the experiment.

Table 1 Results of artificial insemination into oviduct through tubal fimbria in rabbits

Anim. No.	No. of ovulation points	No. of ova recovered	Developing stages of eggs						
			1	2	4	8	16-	D	
1	8	7(6)							7(6)
2	15	13(5)	4(3)		4	5(2)			
3	15	15(6)	6(2)		5				4(4)
4	26	4			4				
5*	9	5		1	2				2
6*	12	4	1		1	1			1
7*	10	6	2		3				1
8*	10	7	3		1	3			
9*	6	6	2			3			1
10*	39	30	11		11				8
11*	16	1			1				

D : Degenerating, ( ) : Recovered from uterus

\* : Irrigation of oviduct alone under general anesthesia

Table 2 Summarized results of artificial insemination into tubal fimbria

No. of Anim. examined	Total No. of ovulation points	No. of Anim. having yielded cleaved ova	Total No. of ova recovered*	Developing stages of eggs					
				1	2	4	8	16-	D
11	166	10	81	23	1	32	10	0	14

D : Degenerating

\* : Recovered from oviduct

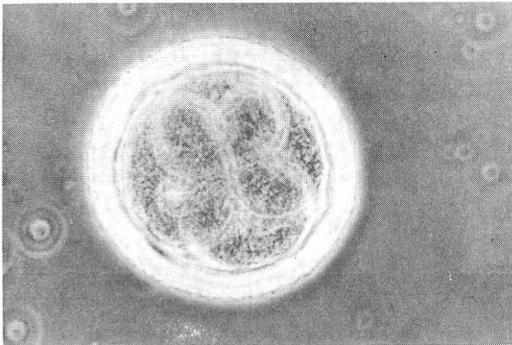


Fig. 2 4-cell stage egg obtained by artificial insemination into oviduct.

Ova were obtained from all the 11 cases, 10 of which yielded cleaved and supposedly fertilized ova. The number of ovulation points ranged from 8 to 39 and that of recovered ova from 1 to 30. Cases No. 1 to No. 4 were sacrificed and their oviducts and uteri were irrigated to recover ova. As a result 2 morphologically normal ova at 8-cell stage were obtained from the uterus of No. 2. In the

7 cases from No.5 to No.11 the oviduct was irrigated under general anesthesia without being excised, but the recovery of ova was comparable to that with the excised oviduct.

Table 2 gives a summary of Table 1. The total number of ovulation points was 166 and that of ova recovered from the oviduct was 81. That is, the rate of ova recovery was 49%. The failure to recover about half the ovulated ova might be attributed to the mechanical stimulus to the tubal fimbria at the time of semen injection which must have prevented many of the ova from entering the tubal fimbria.

The total number of the cleaved ova recovered was 43; their development ranged between 2-cell and 8-cell stages. The 4-cell stage had the highest incidence (32/43) and 10 were at 8-cell stage. This means that more than half the ova recovered were cleaved ones at 4-cell or 8-cell stage of morphologically normal appearance. There were also 23 uncleaved ova and 14 degenerated ones: these might

Table 3 Ratio of artificially inseminated and cleaved ova capable of developing into fetuses

Recipient No.	No. of ova transferred	Developing stages of ova transferred	No. of implanted fetuses or the newborn
1	4	4-cell	3
2	3	2-cell : 1 4-cell : 2	2
3	3	8-cell	0
4	11	4-cell	3
5	1	4-cell	0

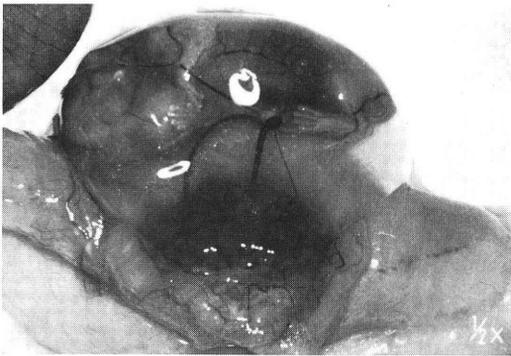


Fig. 3 Implanted fetus on the 22nd day of gestation—developed from artificially inseminated into oviduct and transplanted into recipient.

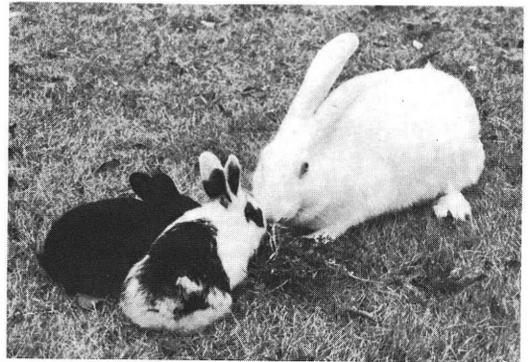


Fig. 4 Recipient and the young originating from artificial insemination into oviduct.

be either unfertilized, or fertilized by an abnormal spermatozoon or by plural spermatozoa. Fig. 2 shows an embryo at 4-cell stage obtained in the present experiment.

Table 3 shows the result of the transfer of the cleaved ova carried out to confirm the normality of the ova obtained by the artificial insemination into the oviduct through the tubal fimbria. The cleaved ova at 2-to 8-cell stages obtained by this technique were transferred to the oviducts of 5 recipients mated by vasectomized males. As a result 3 out of the 5 had fetuses implanted or gave birth to the young. As seen in Fig. 3, on morphological abnormality was demonstrated in the implanted fetus or in its placenta at the 22 days of gestation. Fig. 4 shows a newborn rabbits from another recipient: they give no evidence of morphological or functional abnormalities and are growing normally.

Thus it was proved that the cleaved ova obtained by injecting semen into the oviduct

through the tubal fimbria were normal embryos.

### Discussion

The present technique for artificial insemination is an attempt to inject semen into the oviduct of a laparotomized female from the tubal fimbria with a capillary. It was feared that this might cause such a serious mechanical stimulus to the morphologically and functionally delicate tubal fimbria as to prevent the subsequent pickup of the ovulated ova. It turned out, however, that ova were collected from all the 11 subjects, all of which but one yielded morphologically normal ova. The ratio of the recovered ova to the ovulation points was about 50%: but this ratio is expected to be improved in the future by relieving the stimulation to the tubal fimbria. It is also expected that the rate of cleaved ova recovery will remarkably improve if we can capacitate ejaculated spermatozoa in vitro and inject them into the tubal fimbria after ovulation.

In mammals some unfertilized ova can present cleavage. Most of them are regarded as fragmenting ova, but some may be attributed to parthenogenesis. Pincus<sup>14)</sup> is the only worker who reported the development of ova of artificial parthenogenesis into fetuses, and it is usually very hard to bring such an ovum to be implanted<sup>15)</sup>. It is possible that the cleaved ova in the present experiment included fragmenting or parthenogenetic ova. But when these cleaved ova were transferred to 5 recipients, 3 became pregnant and were confirmed to have normally developing fetuses. So it may be safely said that the cleaved ova obtained in the present experiment were embryos yielded by normal fertilization. This means that injection of semen into the oviduct through the tubal fimbria can lead to the normal fertilization process.

It is said that in rabbits it takes about 10 hours for spermatozoa to be capacitated in the oviduct alone<sup>5)</sup>. It is also known that the fertilizability of the spermatozoa in the female reproductive tracts can last 24 to 30 hours<sup>16)</sup>. On the other hand the fertility of the ovulated ova is reported to be 6 to 8 hours<sup>17)</sup>. Therefore in the present experiment the injected spermatozoa had stayed in the oviduct for about 10 hours, i.e., acquired full capacitation according to the literature, when ovulation took place. It is considered that a spermatozoon invades the ovum in 3 hours after ovulation in the physiological fertilization<sup>18)</sup>. But the present experiment suggested that the development of the embryo 36 to 42 hours after the ovulation was somewhat delayed from that in the physiological fertilization following copulation<sup>19)</sup>. This might be explained as that ovulation was delayed from what had been expected or that the capacitation of the spermatozoa injected from the tubal fimbria required a longer time than reported by Adams and Chang<sup>5)</sup>.

It is thought that about  $2 \times 10^8$  spermatozoa are ejaculated in a rabbit and that a few hundred reach the ampulla of the uterine tube<sup>7)</sup>. Thus it is about  $10^{-6}$  of the ejaculated spermatozoa that can participate in fertilization. This restriction to the number of spermatozoa may have a physiological significance to effect selection of the spermatozoa and inhibition of polyspermy.

The amount of semen ejaculated at a time is about 1 ml, which contains about  $2 \times 10^8$  spermatozoa in rabbit. In the present experiment, about 0.2ml of semen already diluted to 1:10 was used for insemination: i.e., about  $10^6$  spermatozoa were injected into the oviduct. So normal fertilization could be effected by this technique with about 2% of the spermatozoa ejaculated at a time.

On the other hand, the number of the spermatozoa injected into the oviduct in the present study is  $10^4$  times as many as that of spermatozoa which normally can reach the ampulla of the uterine tube following copulation. So theoretically it should be possible to drastically reduce the number of spermatozoa to be injected into the oviduct. In fact we experienced that fertilization could be effected with 0.2ml of ejaculated semen diluted to 1:10<sup>5</sup> (not yet published). The number of the spermatozoa was about 1000 in this case. It was thus indicated that only a small number of spermatozoa is required for the artificial insemination into the oviduct through the tubal fimbria. We are trying to establish the minimum number of spermatozoa required for this technique, which will be reported in the near future.

IVF & ET are new techniques indicated for oligospermia unresponsive to hormonal therapy by urologists. But their ethical and moral propriety is still under heated discussion and not a few people assume a critical attitude<sup>10-12)</sup>. The present technique seems to have suggested a possibility of application to treatment of human oligospermia not by *in vitro* but by *in vivo* fertilization. We are also exploring another possibility of this technique by applying in to treat tubal sterility in which the junction of the oviduct and uterus is blocked. It will also prove valuable to reproductive physiology as it is expected to disclose abundant information regarding the process of fertilization.

#### References

- 1) Austin, C. R.: Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res. Ser. B*, 4 : 581, 1951.
- 2) Chang, M. C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168 : 697, 1951.

- 3) Austin, C. R. and Bishop, M. W. H.: Role of the rodent acrosome and perforatorium in fertilization. Proc. R. Soc. Lond. Ser. B., 149 : 241, 1958.
- 4) Noyes, R. W.: The capacitation of spermatozoa. Obstet. Gynecol. Survey, 14 : 785, 1959.
- 5) Adams, C. E. and Chang, M. C.: Capacitation of rabbit spermatozoa in fallopian tube and in the uterus. J. Exp. Zool., 151 : 159, 1962.
- 6) Chang, M. C.: Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. Nature, 175 : 1036, 1955.
- 7) Braden, A. W. H.: Distribution of sperms in the genital tract of the female rabbit after coitus. Aust. J. Biol. Sci., 6 : 693, 1953.
- 8) Steptoe, P. C. and Edwards, R. G.: Birth after the reimplantation of a human embryo. The Lancet, 2 : 366, 1978.
- 9) Suzuki, M., Hoshi, K., Hoshiai, H., Saito, A., Momono, K., Mori, R., Kyono, K., Tsuiki, A., Imaizumi, H., Nagaike, F., Uehara, S., Naganuma, T. and Hirose, Y.: Pregnancy obtained by *in vitro* fertilization and embryo transfer. Jap. J. Fert. Ster., 28 : 439, 1983.
- 10) Schlesselman, J. J.: How dose one assess the risk of abnormalities from human *in vitro* fertilization? Am. J. Obstet. Gynecol., 135 : 135, 1979.
- 11) Evans, M. I. and Dixler, A. O.: Human *in vitro* fertilization. J. Am. Med. Assoc., 245 : 2324, 1981.
- 12) Tiefel, H. O.: Human *in vitro* fertilization. A conservative view. J. Am. Med. Assoc., 247 : 3235, 1982.
- 13) Sakuma, Y., Kanayama, K., Endo, T., Kobayashi, G. and Sato, K.: A study on superovulation in rabbits by intravenous injection of PMSG-I. Estimation of effective dose of PMSG. Jap. J. Fert. Ster., 28 : 79, 1983.
- 14) Pincus, G.: Observations on the living eggs of the rabbit. Proc. Roy. Soc. Lond. Ser. B, 107 : 132, 1930.
- 15) Chang, M. C.: Development of parthenogenetic rabbit blastocysts induced by low temperature storage of unfertilized ova. J. Exp. Zool., 125 : 127, 1954.
- 16) Bedford, J. M. and Shalkovsky, R.: Species-specificity of sperm capacitation in the rabbit. J. Reprod. Fert., 13 : 361, 1967.
- 17) Chang, M. C.: *In vitro* fertilization of mam-

malian eggs. J. Anim. Sci., 27 : Suppl., 1 : 15, 1968.

- 18) Brackett, B. G.: *In vitro* fertilization of mammalian ova. Adv. Biosci., 4 : 73, 1970.
- 19) Ishijima, Y., Ito, M., Hirabayashi, T. and Sakuma, Y.: Effect of the estrogen pre-treatment on the induced superovulation by PMS in rabbits. II. Experiments on the speed of descending the genital tract and cleavage-rate of ova. Jap. J. Animal Reprod., 13 : 71, 1967.

### 家兎における卵管内人工授精に関する研究

金山喜一・遠藤 克・小林軍次郎

佐久間勇次

(日本大学農獣医学部獣医生理学教室)

卵管采から卵管内に精液を注入する卵管内人工授精についてウサギを用いて検討した。PMSG の投与により過排卵処理を施したウサギを全身麻酔下で開腹して、精液を卵管采より卵管内にキャピラリーで注入した。精液は成熟雄より人工膾法で採取したもので、生理的食塩液で10倍に稀釈したものを供試した。精液注入後1時間目に HCG を投与して排卵を誘起し、これから36~42時間目に卵管と子宮を灌流して卵子の検索を行なった。

卵管采から卵管内に注入した稀釈精液の液量は個体により一様ではなかつたが、おおむね1.5~2.5 ml の範囲であつた。供試11例における排卵点の合計は166個で、卵管から回収された卵子は81個であつた。供試11例のうち10例から合計43個の分割卵子が回収された。これら卵子の分割ステージは2細胞期から8細胞期の範囲にあり、4細胞期のものが32個と最も多く、次いで8細胞期の10個であつた。これらの分割卵子は正常な発育を遂げていると思われる形態的に正常な卵子であつた。また、81個の回収卵子のうち未分割卵子が23個、変性卵子が14個含まれていた。

さらに、得られた分割卵子が正常な受精卵子であることを確認するために胚移植試験を行なった。卵管内人工授精において得られた2細胞期から8細胞期の分割卵子を偽妊交尾を行なった5羽の recipient に1~11個の範囲で移植したところ、3羽の recipient に着床胎児または産子の分娩を認めた。着床胎児、胎盤における形態的な異常は認められなかつた。また産子においても、形態のおよび機能的に何らの異常も認めていない。

以上の成績より、卵管采から卵管内に少量の稀釈精液を注入する卵管内人工授精においても正常な受精過程が遂行されることが明らかとなつた。すなわち、卵管内人工授精が乏精子症(精子過少症)の治療手段として応用できる可能性が本実験によって示唆された。

(受付・昭和59年6月13日)

## Kallikrein の不妊症への試み

### Studies on Kallikrein for Infertility

京都府立医科大学産婦人科学教室

玉 舎 輝 彦 大 野 洋 介  
Teruhiko TAMAYA Yousuke OHNO  
和 田 圭 介 岡 田 弘 二  
Keisuke WADA Hiroji OKADA

Department of Obstetrics and Gynecology.  
Kyoto Prefectural University of Medicine

Kallikrein の妊孕性向上に対する有効性を知るため clomiphene や human menopausal gonadotropin を乏精子症に用い、治療し、少なくとも6カ月以上不妊であった患者に kallikrein を投与し精子濃度の増加や精子運動能の増加などの可能性を検討した。Kallikrein 投与によって精子濃度の増加には著変はなかつたが、精子運動能は正常精子濃度群、HMG または clomiphene 投与乏精子症群、無治療乏精子症群いずれの群でも増加している例が多く、合計44例中33例(75%)にその効果が認められた。また特に kallikrein による精子運動能の改善されたものと妊娠との関係を見ると、妊娠したのは正常精子濃度群および HMG 投与乏精子症群で多く認められた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 71-79, 1985)

#### 緒 言

組織での細胞増殖の促進が kallikrein-kinin 系を介して起こる可能性<sup>1)</sup>が考えられた。そこでこの考えから kallikrein を乏精子症の患者に投与すると精子濃度ならびに精子運動率が増加することが報告され<sup>2)</sup>、その後、内外でこの事実が追試確認されてきた<sup>3,4)</sup>。主に指摘されていることは kallikrein の精子運動能の増加であり、このことは *in vitro*<sup>5)</sup> や *in vivo*<sup>6)</sup> で認められている。

そこで今回は特に、現在までに乏精子症に広く用いられている clomiphene、や gonadotropin を用い治療し、少なくとも6カ月以上不妊であった患者にその上 kallikrein を投与し、kallikrein の妊孕性向上に対する有効性を検討した。加えるに kallikrein の精子数増加や精子運動能の増加などの可能性をも検討した。

#### 対象および研究方法

京都府立医科大学付属病院産婦人科不妊外来を訪れた患者が対象となり、試験期間は昭和58年8月1日より昭和59年8月31日までとした。不妊期間は2年以上とし

Table 1 Seminal analysis according to Eliasson Scores<sup>6)</sup>  
Eliasson Scores

Sperm Density ( $\times 10^6/ml$ )	
$\geq 60$ :	0
40-59 :	1
20-39 :	3
$\leq 19$ :	10
Sperm Motility (%)	
$\geq 60$ :	0
50-59 :	1
31-49 :	3
$\leq 30$ :	10
Sperm Motile Efficiency (ME/min)	
$\geq 70$ :	0
50-69 :	1
31-49 :	3
$\leq 30$ :	10

た。女性側では排卵障害(無排卵)以外の異常はない者、つまり通常行なわれている不妊検査で異常がない者

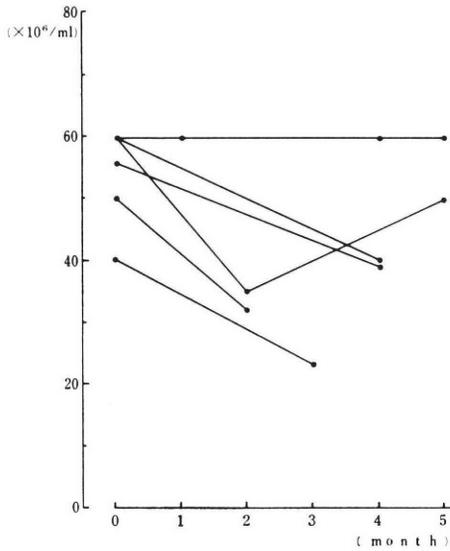


Fig. 1 Alteration of sperm density during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group I patients, who had normal concentration of sperm density ( $\geq 4 \times 10^7/\text{ml}$ ).

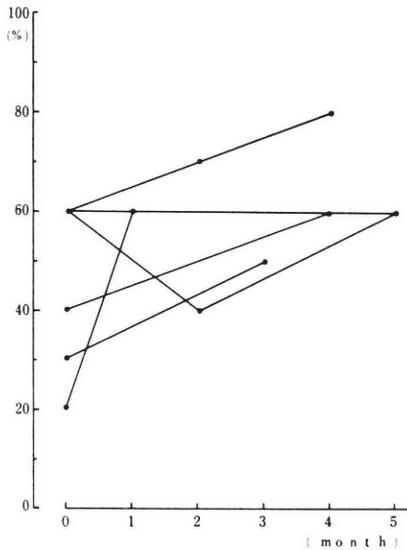


Fig. 2 Alteration of sperm motility during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group I patients.

が対象となった。排卵障害を訴えるものは適宜治療を行ない正常排卵周期を回復した者を対象とした。そこでこの不妊女性の夫で、既往疾患に流行性耳下腺炎、陰囊水腫、停留辜丸、その他淋疾、副辜丸炎、ヘルニア、辜丸外傷、熱性疾患のない男性に®Kallikrein (パイエル社

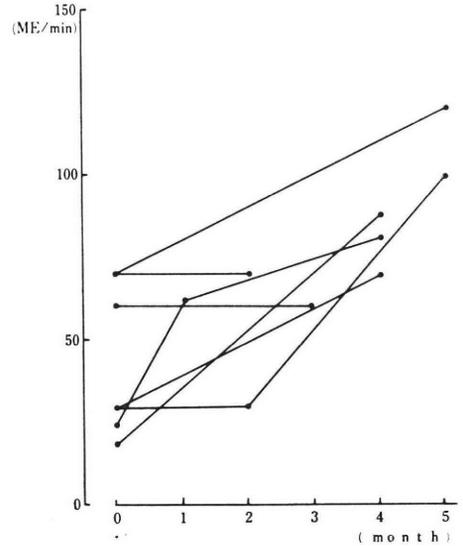


Fig. 3 Alteration of sperm motile efficiency during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group I patients.

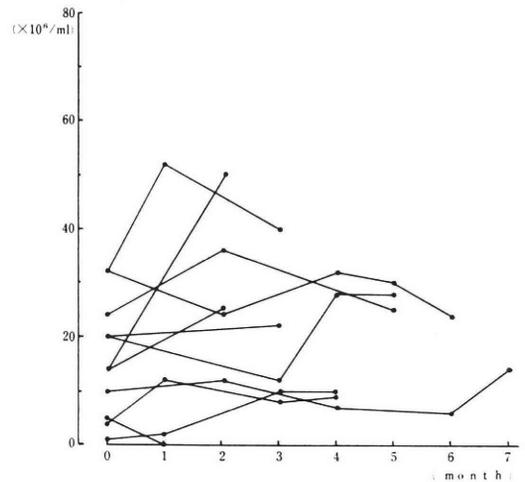


Fig. 4 Alteration of sperm density during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group II patients, who had been treated with human menopausal gonadotropin (HMG, 150I.U., i.m. twice a week) due to oligospermia ( $< 4 \times 10^7/\text{ml}$ ), but had failed to get pregnancy at least over 6 months of this therapy.

製 hogpancreatic kallikrein 製剤, 1錠 10kallikrein Unit) を1日12錠を3カ月以上投与した。この場合、男性を4群に分けた。すなわち第1群は精子運動率および運動能の如何にかかわらず精子濃度が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上

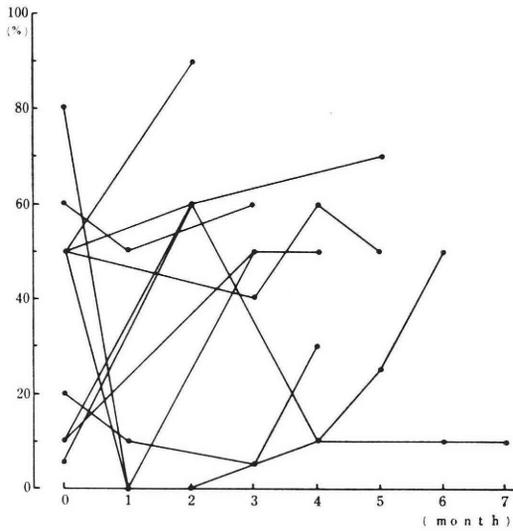


Fig. 5 Alteration of sperm motility during the treatment of kallikrein (120K. U./day) in Group II patients.

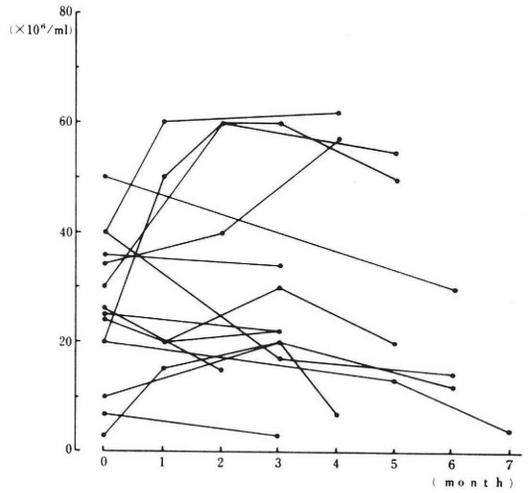


Fig. 7 Alteration of sperm density during the treatment of kallikrein (120K. U./day) in Group III patients, who had been treated with clomiphene citrate (25mg/day) due to oligospermia ( $<4 \times 10^7/ml$ ), but had failed to get pregnancy at least over 6 months of this therapy.

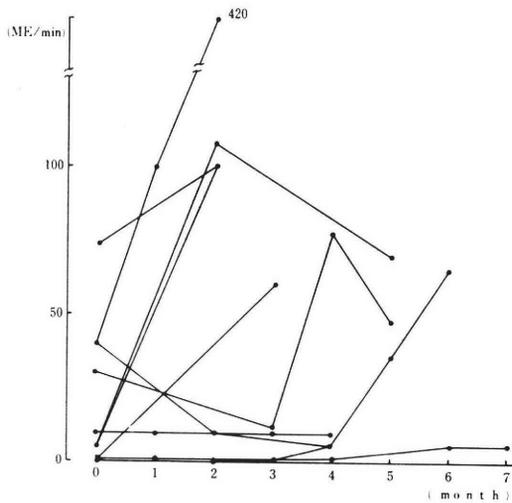


Fig. 6 Alteration of sperm motile efficiency during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group II patients.

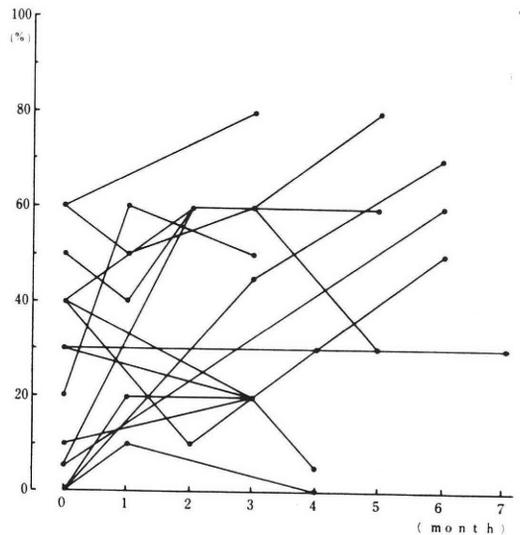


Fig. 8 Alteration of sperm motility during the treatment of kallikrein (120K. U./day) in Group III patients.

である群とした。さらに乏精子症 ( $<40 \times 10^6/ml$ ) のうち、第2群 human menopausal gonadotropin (HMG, 150IU, 週2回) 投与群および第3群は clomiphene (25mg/日) 連続投与群とし、第2群と第3群は少なくとも kallikrein 投与前6カ月以上投与され、精子濃度の増加、運動率の改善の有無にかかわらず妊娠しなかつた場合とした。これら患者の HMG または clomiphene 治療前の精子濃度は  $<40 \times 10^6/ml$  であり、中には kallikrein 投与時は  $\geq 40 \times 10^6/ml$  になっていたものも含

む。さらに第4群は上記乏精子症精子濃度 ( $<40 \times 10^6/ml$ ) で kallikrein のみ投与したものとした。以上のように4群にわけて検討した。

また治療前に血中ホルモン値を可能な限り測定し、異常値の有無を知り、他の疾患との鑑別をした。kallikre-

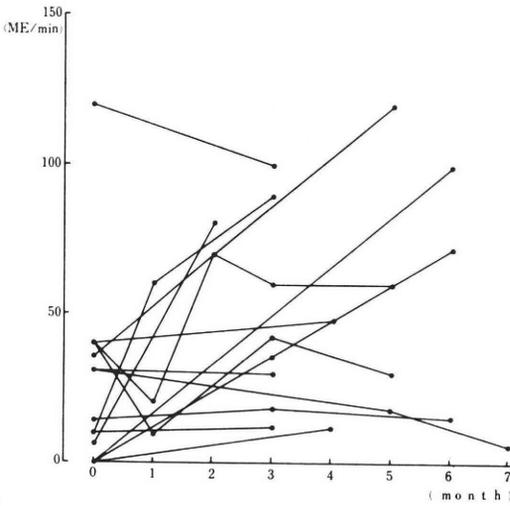


Fig. 9 Alteration of sperm motile efficiency during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group III patients.

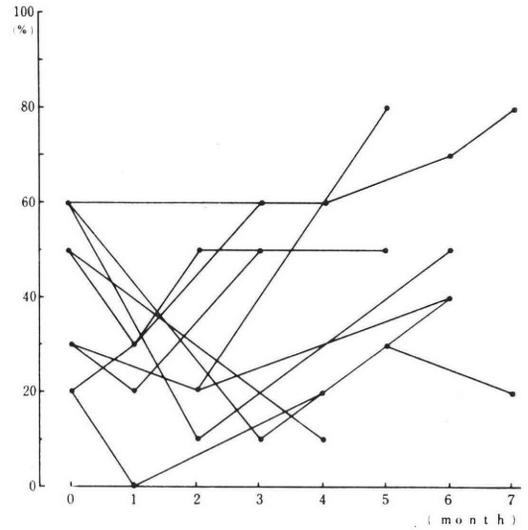


Fig. 11 Alteration of sperm motility during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group IV patients.

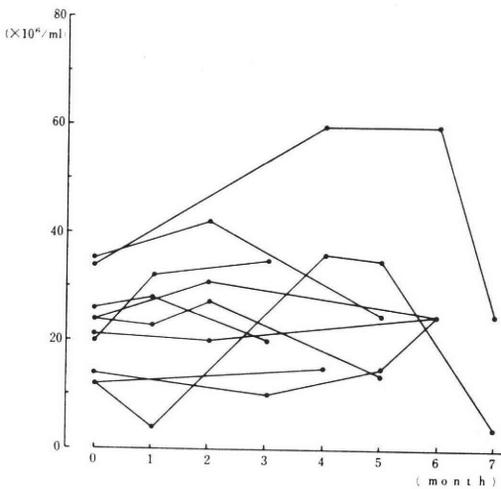


Fig. 10 Alteration of sperm density during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group IV patients, who were oligospermic ( $<4 \times 10^7/ml$ ) but without treatment.

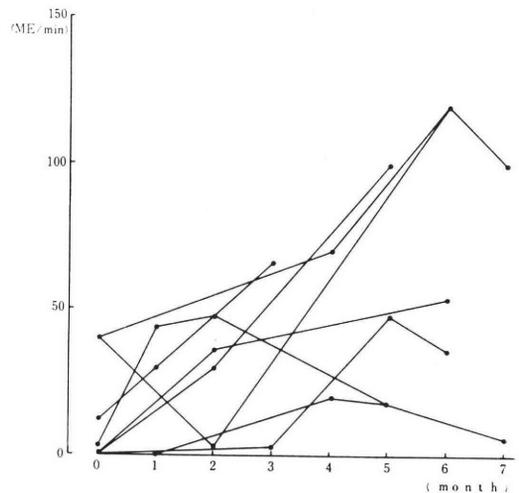


Fig. 12 Alteration of sperm motile efficiency during the treatment of kallikrein (120K.U./day) in Group IV patients.

in 投与中および投与後は一般に血中ホルモン値には変動が認められない<sup>4)</sup>ので、投与後は特別測定しなかつた。なお血中ホルモン (Prolactin, FSH, LH, testosterone, estradiol-17 $\beta$ ) 値は RIA にて測定した。

効果判定は Eliasson Scores<sup>7)</sup> を考慮し、そのうち精子濃度、精子運動率、精子運動能を表 1 に示したように score を作り、評価し、さらに妊娠率からも検討した。

結 果

分類された 4 群における kallikrein 投与による精子数、精子運動率および精子運動能の投与期間における変動を第 1 群 (8 例) は図 1, 2, 第 2 群 (12 例) は図 3, 4, 第 3 群 (15 例) は図 5, 6, 第 4 群 (10 例) は図 7, 8 にそれぞれ示した。その有効、無効の要約を表 2 に示した。その結果、各群に多少違いがあり、第 1 群では減少しているように思える。しかし、各群合計したも

Table 2 Summary of effects of kallikrein on sperm density, sperm motility and sperm motile efficiency in each group. The effectiveness was the increase of either sperm density, sperm motility or sperm motile efficiency.

Sperm Density

Effect \ Group	Group I	Group II	Group III	Group IV	Total
Increased	1	9	6	5	21
No Change	2	0	0	0	2
Decreased	5	2	9	5	21
Total	8	11	15	10	44

Sperm Motility

Effect \ Group	Group I	Group II	Group III	Group IV	Total
Increased	6	6	10	5	27
No Change	2	3	2	2	9
Decreased	0	2	3	3	8
Total	8	11	15	10	44

Sperm Motile Efficiency

Effect \ Group	Group I	Group II	Group III	Group IV	Total
Increased	6	9	10	8	33
No Change	2	2	2	2	8
Decreased	0	0	3	0	3
Total	8	11	15	10	44

Table 3 Relation between effectiveness of kallikrein and pregnancy. The effectiveness was the same as that described for Table 2.

Group I			Group IV		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)	Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	7/ 8 (87.5)	2 ( 25 )	Yes	8/10 ( 80 )	0 ( 0 )
No	1/ 8 (12.5)	0 ( 0 )	No	2/10 ( 20 )	0 ( 0 )
Group II			Total		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)	Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	10/12 (83.3)	3 ( 25 )	Yes	38/45 (84.4)	6 (13.3)
No	2/12 (16.7)	0 ( 0 )	No	7/45 (15.6)	0 ( 0 )
Group III					
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)			
Yes	13/15 (86.7)	1 ( 6.7 )			
No	2/15 (13.3)	0 ( 0 )			

Table 4 Relation between effectiveness of kallikrein and pregnancy. The effectiveness was the increase of Eliasson scores.

Group I		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	7/ 8 (87.5)	2 ( 25 )
No	1/ 8 (12.5)	0 ( 0 )
Group II		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	8/12 (66.7)	3 ( 25 )
No	4/12 (33.3)	0 ( 0 )
Group III		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	6/15 ( 40 )	1 ( 6.7)
No	9/15 ( 60 )	0 ( 0 )
Group IV		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	7/10 ( 70 )	0 ( 0 )
No	3/10 ( 30 )	0 ( 0 )
Total		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	28/45 (62.2)	6 (13.3)
No	17/45 (37.8)	0 ( 0 )

のからすると精子濃度には、kallikrein 投与によつて変化はなかつた。しかし、精子運動率は kallikrein 投与により各群で増加し、合計でも増加率が高かつた。

また精子運動能は各群とも増加している例が多く、当然合計でも44例中33例(75%)に kallikrein が有効と認められた。

一方精子濃度、精子運動率、精子運動能および妊娠のどれか1つに改善が見られる場合を有効として、各群で有効(率)と妊娠(率)との関係を見ると(表3)、各群とも有効率は高く、合計でみると45例中38例(84.4%)が有効とみなされた。また妊娠は第1群(正常精子濃度)と第2群(HMG 投与乏精子症)に比較的高率にみられた。また Eliasson Scores で改善がみられたものも同様な結果となつた。しかし、kallikrein に対する有効率は低下した(表4)。kallikrein が最も著効を示す

Table 5 Relation between effectiveness of kallikrein to sperm motile efficiency and pregnancy.

Group I		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	7/ 8 (87.5)	2 ( 25 )
No	1/ 8 (12.5)	0 ( 0 )
Group II		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	9/12 ( 75 )	3 ( 25 )
No	3/12 ( 25 )	0 ( 0 )
Group III		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	10/15 (66.7)	1 ( 6.7)
No	5/15 (33.3)	0 ( 0 )
Group IV		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	7/10 ( 70 )	0 ( 0 )
No	3/10 ( 30 )	0 ( 0 )
Total		
Effectiveness	No. (%)	Pregnancy (%)
Yes	33/45 (73.3)	6 (13.3)
No	12/45 (26.7)	0 ( 0 )

として知られている精子運動の改善についての臨床測定上、最も信頼性が高い精子運動能の改善された有効(率)と妊娠(率)との関係を見ると(表5)、特に第1群と第2群に妊娠が多く認められた。特に両群とも25%ほどに認められた。さらに第3群(clomiphene 投与乏精子症)で1例妊娠が認められたが、妊娠率は低かつた。これら妊娠したものは人工授精したものではなかつた。

このように kallikrein 投与により、いずれかの因子に改善、Eliasson Score の改善または精子運動能の改善が有効であつたものと kallikrein 投与前に測定し得た血中ホルモン値との関係を検討し、それぞれ図13, 14, 15に示した。これからわかるように有効と判定したものと無効と判定したものと血中ホルモン値との関係には特記する違いはなかつた。

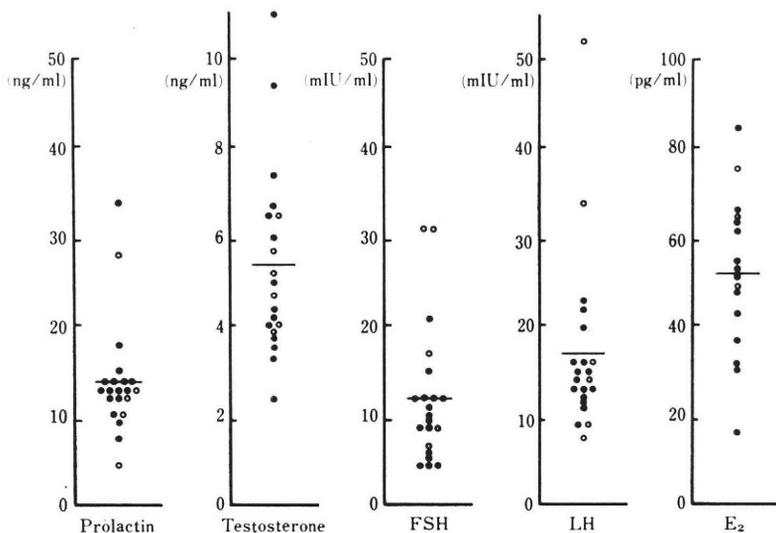


Fig. 13 Relation between effectiveness of kallikrein and serum hormone levels before this treatment. The effectiveness (●) was the same as that described for Table 2. ○ : no effectiveness.

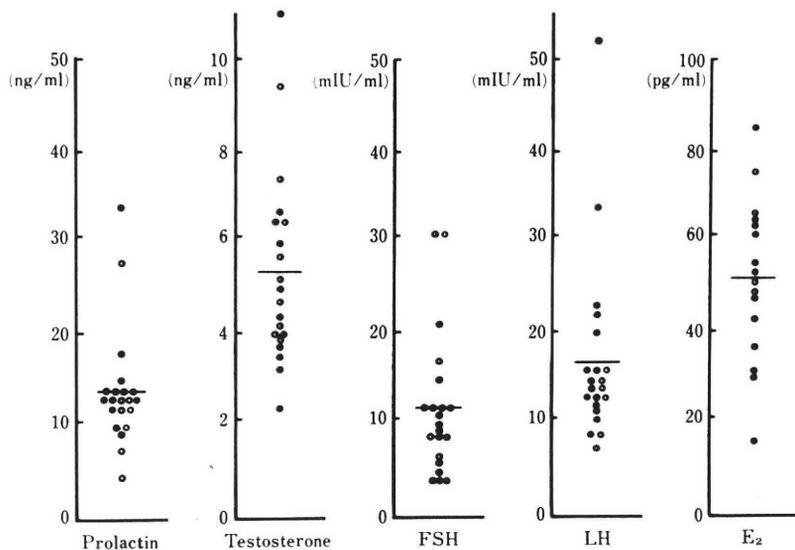


Fig. 14 Relation between effectiveness of kallikrein and serum hormone levels before this treatment. The effectiveness (●) was the same as that described for Table 4. ○ : uneffective.

考 案

今までに kallikrein が精子の増殖および運動性の増進する可能性に関して臨床的に精子濃度および運動率の増加<sup>2,4)</sup>ということを示されてきた。これらの他に妊孕性向上と関連した事実が知られているが、要は kallikrein 投与により妊孕性が増加することが十分期待し

うる。

本研究で報告したように kallikrein による精子の運動率、運動能の改善が *in vitro*<sup>5)</sup> および臨床<sup>6)</sup>で報告されてきた。しかし kallikrein による精子濃度の増加も報告されてきたが、本研究ではこの点については十分な確認が得られなかった。

従来の精子運動率は検者の主観に左右されることが大

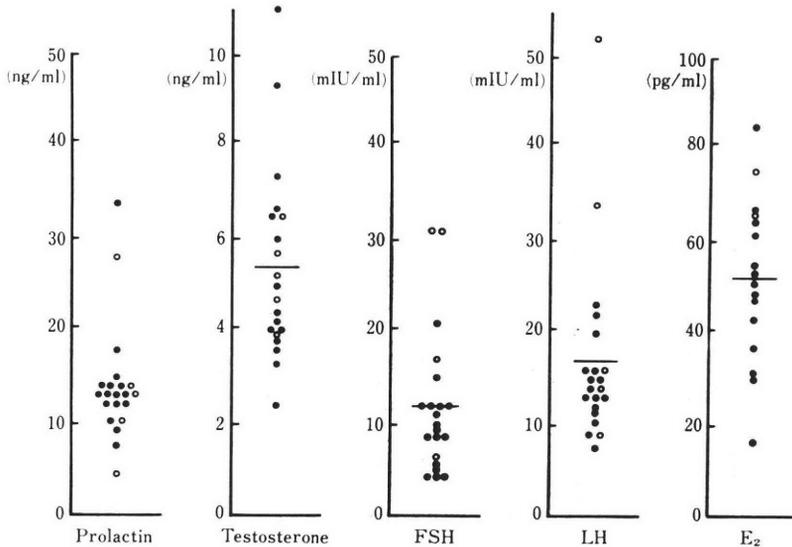


Fig. 15 Relation between effectiveness of kallikrein and serum hormone levels before this treatment. The effectiveness (●) was the same as that described for Table 5. ○ : no effectiveness.

きいため Eliasson<sup>7)</sup> の score をも利用し、その score のうち、精子奇形率と妊孕性とは関係が少ないことが知られている<sup>8)</sup>ので除外した。また従来の精子運動率測定法では精子の運動の質が、まったく考慮されないので精子運動能 (sperm motile efficiency) を用い、これは妊孕性と関係すると考えられるので重点を置いた。

今回は特に一般的に使用されている HMG や clomiphene で精子濃度増加をはかり、6 カ月以上経過し妊娠しなかつたものに、kallikrein を用い、この有効性を検討した。今回の結果からすると正常精子濃度の群、および、強力な精子増加作用をする HMG とがもつとも妊孕率が高く、これらの群における kallikrein の与える妊孕性への増大が強く考えられる。

正常精子濃度の場合および HMG で刺激された場合には kallikrein-kinin 系を介して有効に kallikrein が働き、妊孕性が高まつたことが考えられる。一方 clomiphene 投与された場合、内因性の gonadotropin を増加させ、その結果精子濃度が増加することになる。しかし、精子濃度が増加する割には妊孕率は期待するほど高くない<sup>9)</sup>。この場合に kallikrein を投与しても、高い妊孕率を得られなかつた。これは clomiphene の直接精子や精漿への影響を無視しえないのかもしれない。無治療の乏精子症でも kallikrein が有効に働いているようであるが妊孕性向上には未知の要素が関係していることは否定できない。

血中ホルモン値は kallikrein の有効性との関係をもともと推測するためのものでなく、例えば高 PRL 血症

が及ぼす影響を除外することであり、さらに精巣前障害の除外の可能性を検討するためである。しかし、HMG や clomiphene による無治療で乏精子症に kallikrein を投与し、血中ホルモン値を測定し得た症例が少なく、十分なことがいえない。

#### 文 献

- 1) Rixon, R. H., Whitfield, J. F., and Bayliss, J.: The stimulation of mitotic activity in the thymus and bone marrow of rats by kallikrein. *Horm. Metab. Res.*, 3: 279, 1971.
- 2) Stuttgart, G.: Clinical substantiation of the effects of kallikrein. In *Kininogenases Kallikrein*: vol. 1, ed. by G. L. Haberland, J. W. Rohen, C. Schirren and P. Huber: P 189, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1973.
- 3) Schill, W. B., Falco, O. B., and Haberland, G. L.: The possible role of kinins in sperm motility. *Int. J. Fertil.*, 19: 163, 1974.
- 4) 松本 修, 羽間 稔, 高田健一, 富岡 取, 守殿貞夫, 石神襄次: 男性不妊とカリクレイン—高単位カリクレイン錠の有用性について—, *日不妊誌*, 25: 531, 1980.
- 5) Schill, W. B.: Influence of the kallikrein-kinin-system on human sperm motility *in vitro*. In *Kininogenases Kallikrein* vol. 2, ed. by G. L. Haberland, J. W. Rohen, C. Schirren and P. Huber: P 47, F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1975.
- 6) Schill, W. B.: Improvement of sperm motility in patients with asthenozoospermia by kallikrein treatment. *Int. J. Fertil.* 20: 61, 1975.

- 7) Eliasson, R. : Parameters of male fertility. In Human Reproduction, Conception and Contraception : p 39, Harper & Row Publishers Inc., Hagerstown, 1973.
- 8) MacLeod, J. and Gold, R. Z. : The male factor in fertility and infertility. IV. Sperm morphology in fertile and infertile marriage. Fertil. Steril. 2 : 394, 1951.
- 9) 大野洋介, 玉舎輝彦, 岡田弘二 : クロミフェンによる乏精子症の治療 (第 3 報). 産と婦. 50 : 1502, 1983.

#### Studies on kallikrein for infertility

**Teruhiko Tamaya, Yousuke Ohono,  
Keisuke Wada, and Hiroji Okada**

Department of Obstetrics and Gynecology,  
Kyoto Prefectural University of Medicine

The effectiveness of kallikrein (120 k.u./day)

was studied in clomiphene-treated or human menopausal gonadotropin (HMG)-treated oligospermic patients who had failed to get pregnancy at least over 6 treated months. Although the increase of sperm density by kallikrein was not remarked. However sperm motile efficiency was improved in 33 out of 44 cases (75 %) by kallikrein.

The relation between effectiveness of sperm motile efficiency and pregnancy, by kallikrein revealed the high rate of pregnancy in the kallikrein treated normospermic and HMG-treated patients.

(受付 : 昭和 59 年 9 月 11 日, 特掲)

## Testosterone Uptake into the Isolated Seminiferous Tubules and Leydig Cell Function in Patients with Idiopathic Infertility

Masahiko HOSAKA, Yuhzo KINOSHITA, Akira IWASAKI  
Ryuichi NISHIMURA and Shudo TAKAI

Department of Urology, Yokohama City University School of Medicine

**Abstract:** To evaluate a cause of idiopathic male infertility, testosterone uptake into the seminiferous tubules and Leydig cell function in infertile men were studied.

Plasma and intratesticular testosterone concentrations were measured by radioimmunoassay. Testicular steroidogenesis activities was determined using cell free homogenate (supernatant at 800×g) obtained from testicular biopsy. The seminiferous tubules was isolated with collagenase. To determine the testosterone uptake into the seminiferous tubules, the isolated tubules was incubated with radioactive testosterone in Eagle's minimum essential medium for 20 min. at 33°C.

Plasma and intratesticular testosterone concentrations in idiopathic infertile men were  $5.1 \pm 1.1$  ng/ml ( $M \pm SD$ ,  $n=12$ ) and  $2.6 \pm 1.2$  ng/mg ( $M \pm SD$ ,  $n=12$ ), respectively. The ability of  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase for pregnenolone was markedly increased in 4 out of 5 infertile men. In contrast, 4 out of 5 infertile men had lower activities of  $17\alpha$ -hydroxylase for pregnenolone. C17-20 lyase and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase showed similar activities to the control employed in the present studies.

The amount of testosterone uptake in very mild germ cell maturation arrest, aspermatogenesis, severe germ cell maturation arrest and regressive hypospermatogenesis were  $70.8 \pm 6.1$  ( $M \pm SD$ ,  $n=5$ ),  $16.4 \pm 1.1$  ( $n=4$ ),  $42.7 \pm 12.4$  ( $n=8$ ) and  $43.7 \pm 12.4$  ( $n=4$ ) fmol/100 mg tubules, respectively. The testosterone uptake into the tubules in 12 idiopathic infertile men (8 oligospermics with severe germ cell maturation arrest and 4 azoospermics with aspermatogenesis) was significantly decreased in comparison with very mild germ cell maturation arrest used as control ( $p < 0.001$ ).

Since the idiopathic infertile men examined have abundant testosterone production, eventhough the steroidogenesis pathway is, in part, different from normal, and since they showed a decreased incorporation of testosterone in the isolated tubules, one of the causes of idiopathic male infertility may possibly be the lack of some mechanisms to retain testosterone in the seminiferous tubules.

**Key words:** Male infertility, Isolated seminiferous tubules, Testosterone uptake, Leydig cell function.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 80-86, 1985)

### Introduction

It is well known that approximately 10-15% of all married couple are childless, and that the male factor accounts for the child-

lessness in approximately 50% of the cause. However, the cause of male infertility has remained obscure, thereby treatment of idiopathic infertile men is one of difficult problems.

In the present paper, to evaluate one of the causes of idiopathic male infertility, pl-

asma and intratesticular testosterone concentrations, testicular steroidogenesis activities and the testosterone uptake into the isolated seminiferous tubules were studied in 12 infertile men, 8 oligospermics and 4 azoospermics.

### Materials and Methods

Testicular tissue of biopsy size was obtained from idiopathic infertile men, patients with varicocele and previously untreated patients with prostatic cancer.

$4\text{-}^{14}\text{C}$ -pregnenolone (55.7 mCi/mmol),  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -progesterone (55.7 mCi/mmol),  $4\text{-}^{14}\text{C}$ - $17\alpha$ -hydroxypregnenolone (60.0 mCi/mmol)  $4\text{-}^{14}\text{C}$ - $17\alpha$ -hydroxyprogesterone (50.0 mCi/mmol),  $4\text{-}^{14}\text{C}$ -4-androstenedione (60.0 mCi/mmol) and  $1, 2\text{-}^3\text{H}$ -testosterone (52.0 Ci/mmol) were purchased from New England Nuclear Co. (Boston, Massachusetts). Collagenase (type IV) was purchased from Worthington Biochemical Co. (Freehold, New Jersey). NAD and NADPH were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri). Silica gel G and G254 were purchased from E. Merck (Darmstadt, Germany). Sepadex LH-20 was obtained from Pharmacia Fine Chemicals (Sweden).

#### *Separation of seminiferous tubules*

The testis tissue was gently minced into small pieces (approximately 2mm in size) in room temperature and incubated in 3 ml of Krebs Ringer buffer (pH 7.4) containing 3mg collagenase at  $33^\circ\text{C}$  for 5 min. with continuous stirring. The tissue was filtered through a screen and washed with 10 ml of Krebs Ringer buffer. The incubation of the seminiferous tubules was repeated in the collagenase medium at  $33^\circ\text{C}$  for 10 min..

#### *Measurement of testosterone uptake into the isolated seminiferous tubules*

The isolated seminiferous tubules was incubated with  $^3\text{H}$  labelled testosterone in 3ml Eagle's minimum essential medium (pH 7.4) at  $33^\circ\text{C}$  for 20 min.. The fragment of tubules were washed with Krebs Ringer buffer and filtered through the screen to wash radioactive steroids which remained outside tubules. Then, the tubules were homogenized with 5ml of 0.25M sucrose solution. Extraction of steroids was repeated three times with 3ml of

methylene dichloride. Separation of radioactive steroids was carried out by thin layer chromatography with a solvent system of benzene and acetone(4:1, v/v). The radioactivity of steroid fractions was measured in a liquid scintillation spectrometer.

#### *Determination of plasma and intratesticular testosterone concentrations*

Plasma testosterone level was measured by a radioimmunoassay using the antibody against testosterone-11-succinate-BSA. Chromatographic purification of testosterone before radioimmunoassay was performed. The interassay and intraassay coefficients of variation were 10.7 and 7.3, respectively.

For determination of intratesticular testosterone concentration, 20-30mg of the testis tissue was weighed and homogenized in 0.25 M sucrose solution. Subsequently, testosterone was extracted from the homogenate of the testis equivalent to 0.4mg of wet tissue weight and then separated from other steroids by a Sephadex LH-20 micro column chromatography with a solvent system of n-hexane, benzene and methanol (80:15:5, v/v/v). The purified testosterone was measured by a specific radioimmunoassay. Correction for losses during the purification was made adding  $^3\text{H}$ -testosterone (approximately, 3,000 dpm) to the homogenate before extraction. The interassay coefficient of variation was 8.3 and the intraassay coefficient of variation was 9.4.

#### *Testicular steroidogenesis activity*

20-50 mg of testicular tissue was homogenized. The supernatant fraction at  $800\times\text{g}$  was used as the enzyme preparation.

Radioactive steroid substrate of known specific activity was diluted with corresponding authentic non-radioactive material to provide a concentration of steroid saturating for enzyme. The substrates used were pregnenolone (7.16nmol), progesterone (4.06 nmol),  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone (31.3nmol) and 4-androstenedione (42.8nmol). The coenzymes used were NAD (120 $\mu\text{M}$ ) and NADPH (200  $\mu\text{M}$ ) for the incubation of pregnenolone; NADPH (50 $\mu\text{M}$ ) for other substrates. The incubation medium contained the enzyme preparation,  $^{14}\text{C}$ -labelled steroid substrate,

0.25M sucrose, 17mM tris and 1.7mM MgCl<sub>2</sub>. The final volume was adjusted to 3 ml. incubations were carried out at 37°C for 20 min. In an atmosphere of 95 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub> with constant shaking.

After adding cold carrier steroids (100 μg each), extraction was repeated three times with 10ml of methylene dichloride. The combined extracts were dried over anhydrous disodium sulfate and concentrated at 40°C under reduced pressure. Ascending chromatography was performed for the separation of steroids using 20×20 cm of thin layer plates precoated with silica gel G and GF254 (4:1, W/W). The development of thin layer plate with the solvent system of benzene and ace-(4:1, v/v) distinctly separated the metabolites from the progesterone, 17α-hydroxyprogesterone and 4-androstenedione. In addition to this procedure, second development with a solvent system of chloroform and ether (4:1, v/v) was required for the separation of metabolites from pregnenolone and 17α-hydroxypregnenolone. The enzyme activity was determined by sum of metabolites from individual substrate and expressed as nmol product/100mg testicular tissue/20 min..

**Results**

*Experimental conditions in the evaluation of testosterone uptake into isolated tubules*

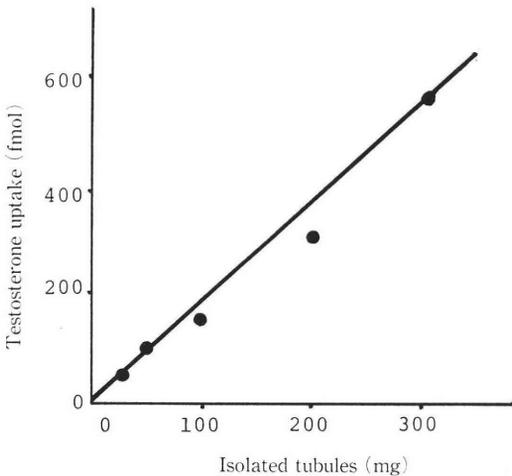


Fig. 1 Correlation between amount of isolated seminiferous tubules and testosterone uptake into the tubules. Incubations were carried out for 20 min. at 33°C

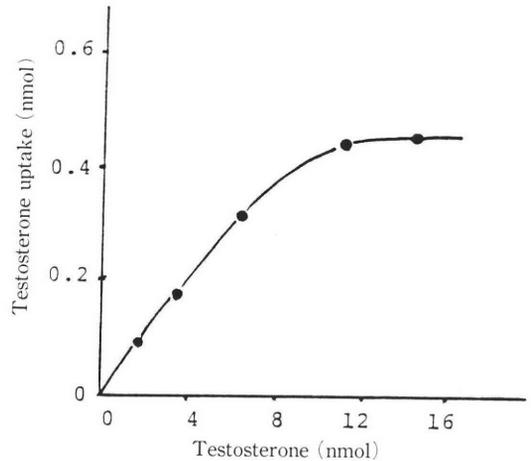


Fig. 2 Saturability of testosterone in isolated seminiferous tubules. 100 mg of isolated seminiferous tubules was incubated with various amount of radioactive testosterone for 20 min. at 33°C under the conditions indicated in the text

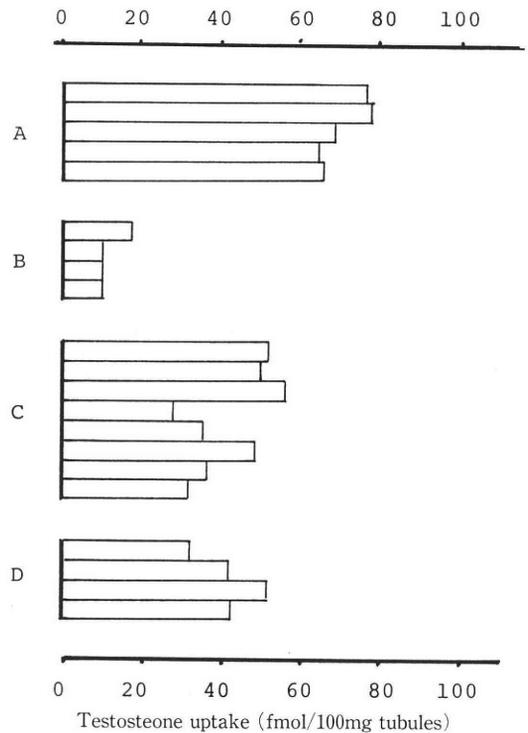


Fig. 4 Testosterone uptake into isolated seminiferous tubules in various status of spermatogenesis  
 A: very mild maturation arrest B: aspermatogenesis C: severe maturation arrest D: regressive hypospermatogenesis.

Table 1 Plasma and intratesticular testosterone concentrations and sperm count in idiopathic infertile men

Case	Age	Sperm count ( $\times 10^4$ /ml)	Plasma testosterone (ng/ml)	Intratesticular testosterone (ng/mg)
I. S.	25	252	4.1	1.1
G. T.	34	360	6.0	3.0
T. I.	32	320	5.5	2.8
K. K.	35	5	6.3	3.6
T. A.	32	10	3.7	1.0
Y. T.	37	210	3.1	1.4
T. S.	20	32	5.7	3.0
K. T.	23	72	4.7	1.6
Y. I.	35	Azoo	6.0	5.0
T. A.	24	Azoo	4.3	1.8
N. H.	31	Azoo	5.2	2.7
T. Y.	37	Azoo	6.5	4.2
M $\pm$ SD (n=12)			5.1 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 1.2

Azoo : Azoospermia

The amount of testosterone uptake into 100 mg of isolated tubules revealed a linear increase during the course of incubation time up to 60 min.. Relationship between the amount of incorporated testosterone and weight of the tubules demonstrated a distinctly positive correlation (Fig. 1). For the amount of testosterone uptake, 100 mg of the tubules was saturated with more than 12 nmol of testosterone under the condition of 20 min. of incubation time and temperature of 33°C (Fig. 2). These data confirmed that incubation of 20 nmol ( $1.5 \times 10^5$  dpm) of testosterone and 100 mg of isolated tubules for 20 min. at 33°C is suitable for the measurement of testosterone uptake into the isolated seminiferous tubules in the infertile men studied.

*Testosterone uptake into the isolated seminiferous tubules in various status of spermatogenesis.*

The infertile men examined in the present studies were classified into 4 groups according to the status of spermatogenesis. Twelve idiopathic infertile men, from whom plasma and intratesticular testosterone concentrations were determined, were included in group B and C (Fig. 4). Five patients with varicocele, who revealed almost normal spermatogenesis with very mild germ cell arrest and

clinical subfertility, were used as control (group A). Four patients with prostatic cancer (group D) revealed regressive hypospermatogenesis. The amount of testosterone uptake into the isolated tubules in group A, B, C and D was  $70.8 \pm 6.1$  (n=5),  $16.4 \pm 1.1$  (n=4),  $42.7 \pm 12.4$  (n=8) and  $43.7 \pm 12.4$  (n=4) (M $\pm$ SD) fmol/100 mg tubules, respectively. In the 12 idiopathic infertile men, the testosterone uptake into the tubules was significantly decreased ( $p < 0.001$ ).

*Plasma and intratesticular testosterone concentrations in idiopathic infertile men*

Plasma and intratesticular testosterone concentrations were determined in 12 idiopathic infertile men. All patients had normal concentrations of testosterone both in plasma and testicular tissue (Table 1). Intratesticular testosterone concentration in aged men with prostatic cancer was  $0.49 \pm 0.17$  ng/mg tissue (M $\pm$ SD, n=20). The results clearly indicated that the infertile men examined had significantly higher concentrations of intratesticular testosterone compared with the aged men.

*Testicular steroidogenesis activities in idiopathic infertile men*

Fig. 3 shows testicular steroidogenesis activities in idiopathic infertile men. The ac-

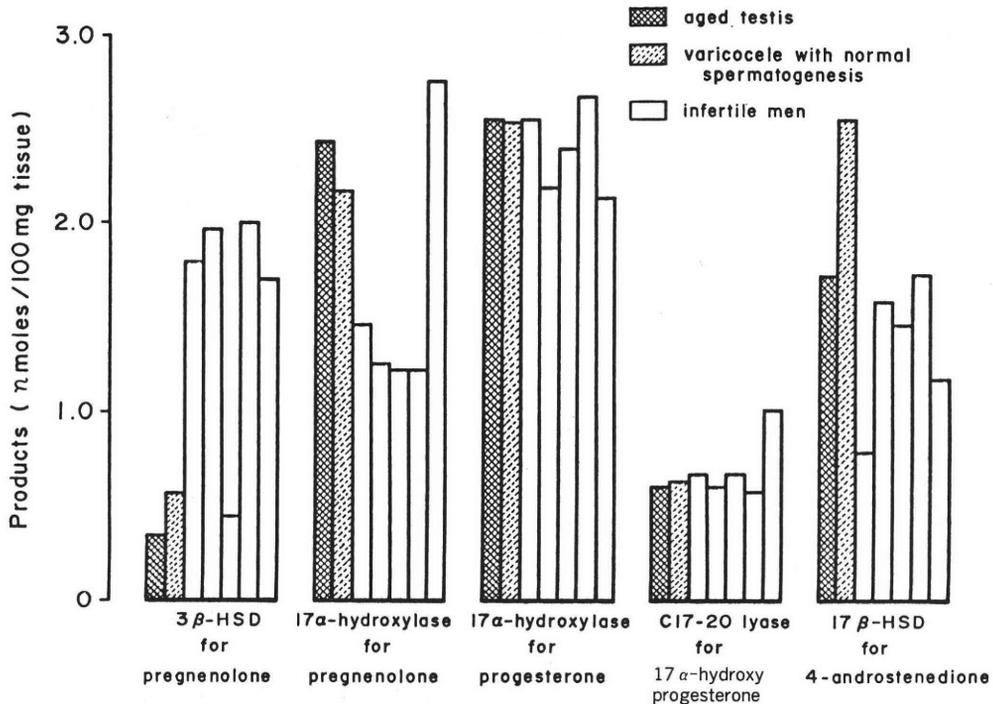


Fig. 3 Testicular steroidogenesis activities in idiopathic infertile men  
HSD: hydroxysteroid dehydrogenase

tivity of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase for pregnenolone was markedly increased in 4 out of 5 infertile men in comparison with the control of an aged man and a varicocele with normal spermatogenesis. In contrast, 4 out of 5 infertile men had lower activities of 17α-hydroxylase for pregnenolone than that of the control. There was no significant difference between the control and infertile men in the activities of 17α-hydroxylase for progesterone, C17-20 lyase for 17α-hydroxyprogesterone and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase for 4-androstenedione.

### Discussion

Twelve infertile men of azoospermics and oligospermics with the sperm count of less than  $4 \times 10^6$ /ml were examined in the present studies. The histology of the testis demonstrated either aspermatogenesis or at least severe germ cell maturation arrest in spermatogenesis. The intratesticular testosterone concentrations of the infertile men examined were markedly higher than those of aged men. It has been noted that testosterone

concentrations in the testis is approximately 100 times of the serum levels<sup>1)</sup>, and that the maintenance of normal spermatogenesis requires high concentration of testosterone. Recently, Baranetsky et al<sup>2)</sup> reported that physiological doses of testosterone can initiate normal spermatogenesis in patients with hypogonadotropic hypogonadism. Therefore, the intratesticular testosterone concentration per se seems to be sufficient to maintain normal spermatogenesis for the infertile men in the present studies.

On the other hand, the activity of 3β-hydroxysteroid dehydrogenase for pregnenolone was markedly increased in the infertile men compared with the control with varicocele who has normal spermatogenesis. In the infertile men, 17α-hydroxylase showed lower activities for pregnenolone substrate, whereas the activities for progesterone substrate showed similar to the control. Our results are consistent with those of Oshima et al<sup>3)</sup> who stated that testosterone formation may be greater by way of 4-ene-3-oxosteroid pathway in some group of infertility. There is a possibility that Leydig cells produce testosterone by

the way of 4-ene-3-oxosteroid pathway under a specific condition, while 5-ene-3-hydroxy-steroid pathway for testosterone biosynthesis is dominant in normal human<sup>4)</sup>. C 17-20 lyase in the human has higher affinity for 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone than for 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and the property of C 17-20 lyase for 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone is low affinity and high capacity for the substrate<sup>5)</sup>. Then, both pathway of testosterone production from pregnenolone in the human may have a physiological significance to maintain normal testosterone concentration, because sufficient amount of testosterone was formed by way of 4-ene-3-oxosteroid pathway in some infertile men.

The seminiferous tubules in the human could be isolated by our method of two step incubation in the collagenase medium. No apparant pathological changes in the isolated seminiferous tubules were recognized after the application of the technique. We reported previously<sup>6)</sup> that testosterone may directly act on the seminiferous tubules in the human, since no significant conversion of testosterone to dihydrotestosterone and androstanediol did occur in the tubules. Most of testosterone incorporated into the tubules seems to remain as testosterone itself. Saturability of testosterone uptake probably indicates that the amount of incorporated testosterone in the tubules was limited by some factors other than the testosterone concentration outside the tubules. The testosterone uptake into the tubules from infertile men with severe maturation arrest and aspermatogenesis was significantly decreased ( $p < 0.001$ ).

The seminiferous tubules contain at least two species of protein which have a specific affinity to affinity androgens. They are androgen receptor and androgen binding protein (ABP). Although intercellular localization of androgen receptor in the seminiferous tubules is still controversial, Sar et al.<sup>7)</sup> observed selective accumulation of radioactive testosterone in Sertoli cells, but not in spermatogonia. Lyon et al.<sup>8)</sup> demonstrated that androgen resistant germ cell line could transform into spermatozoa in male mice where chimeric is present for androgen resistant and normal genotype. They suggested that Sertoli cell is essential base of androgen effect on germ-

inal epithelium.

Androgen binding protein is produced by Sertoli cells under control of FSH<sup>9)</sup>. Musto et al.<sup>10)</sup> reported that ABP concentrations are low in infertile rats with Hre gene. Furthermore, there is a significant correlation between intratesticular testosterone and ABP levels<sup>11)</sup>. These probably suggest a interrelationship between androgens and two kinds of binding protein, androgen receptor and ABP, which are produced and localize in Sertoli cells. Testosterone in Sertoli cell may involve a role of initiation and maintenance of spermatogenesis. In fact, testosterone induces meiotic division of germ cells<sup>12)</sup>. Furthermore ABP also plays a role of transporting testosterone to the epididymis through the lumen of seminiferous tubules.

From the recent knowledges mentioned above, testosterone may be present in Sertoli cells as protein binding complexes. The amount of testosterone incorporated in the isolated tubules in the current study may reflect the capacity of accumulation of testosterone in Sertoli cells. Our results of significant decrease in testosterone uptake into the seminiferous tubules in idiopathic infertile men may suggest that some group of idiopathic infertility could result from insufficient androgen binding systems in Sertoli cells, even though there is abundant testosterone outside the tubules.

## References

- 1) Hosaka, M., Oshima, H., Nankin, H. and Troen, P.: Studies of the human testis. XI, Leydig cell clusters and levels of intratesticular testosterone and 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47: 1164, 1978.
- 2) Baranetsky, N. G. and Carlson, H. E.: Persistence of spermatogenesis in hypogonadotropic hypogonadism treated with testosterone. *Fertil. Steril.*, 34: 477, 1980.
- 3) Oshima, H., Nankin, H. R., Troen, P., Yoshida, K. and Ochiai, K.: Leydig cell number and function in infertile men. In: *The Testis in Normal and Infertile Men*, Troen, P., and Nankin, H. R. (eds.), Raven Press, New York, 1977.
- 4) Yanaihara, T. and Troen, P.: Studies of the human testis. I, Biosynthetic pathways for androgen formation in human testicular

- tissue in vitro. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 34 : 783, 1972.
- 5) Hosaka, K., Oshima H. and Troen, P.: Studies of the human testis. XIV, Properties of C 17-20 lyase. *Acta Endocrinol.* 94 : 389, 1980.
  - 6) Hosaka, M., Nishimura, R., Takai, S. and Harada, M.: Testosterone metabolism in human isolated seminiferous tubules. *Jap. J. Fert. Ster.* 28 : 143, 1983. in Japanese
  - 7) Sar, M., Stumpf, W. E., McLean, W. S., Smith, A. A., Hansson, V., Neyfeh, S. N. and French, F. S.: Localization of androgen target cells in the rat testis: Autoradiographic studies. In: *Hormonal regulation of Spermatogenesis*. F. S. French, V. Hansson, Z. M. Rilzn, and S. N. Neyfeh, (eds.), Plenum Press, New York, pp. 311, 1975.
  - 8) Lyon, M. F., Glenister, D. H. and Lamorux, M. L.: Normal spermatozoa from androgen-resistant germ cells of chimeric mice and the role of androgen in spermatogenesis. *Nature.* 258 : 620, 1975.
  - 9) Sanborn, B. M., Elkington, J. S. H., Chowdhury, M., Tcholakian, R. M. and Steinberger, E.: Hormonal influences on the level of testicular androgen binding activity: Effect of FSH following hypophysectomy. *Endocrinology*, 96 : 304, 1975.
  - 10) Musto, N. A. and Bordin, C. W.: Decreased levels of androgen binding protein in two lines of infertile rats with Hre gene. In: *The Testis in Normal and Infertile Men*, P. Troen and H. R. Nankin, (eds.), Raven Press, New York, pp. 57, 1977.
  - 11) Lee, J. A., Yoshida, K., Hosaka, M., Stratico, D., Hsu, A-F., Winters, S. I., Oshima, H. and Troen, P.: Studies of human testis. XV, Androgen-binding protein and function of Leydig cells and tubules in aged men with prostatic carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 50 : 1105, 1980.
  - 12) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis. *Physiol. Rev.* 51 : 1, 1971.

### 特発性男子不妊症における分離精細管へのテストステロン取り込み能とライデッヒ細胞機能に関する検討

横浜市立大学医学部泌尿器科学教室

穂坂正彦, 木下裕三, 岩崎 皓,

西村隆一, 高井修道

特発性男子不妊症を対象とし、ライデッヒ細胞機能とテストステロンの精細管内取り込み能との関連を検討した。

男子不妊症12例の血中テストステロン値、精巣組織中テストステロン値はいずれも正常であった。精巣テストステロン代謝に関する各種酵素の活性を測定した結果、5例中4例は4-ene-3-oxosteroid経路よりテストステロンが生成されるものと推定された。一方、コラゲネースにより分離された精細管へのテストステロンの取り込み能は、軽度の精子形成障害は $70.8 \pm 6.1$  (M $\pm$ SD, n=5) fmol/100mg tubules, 無精子形成は $16.4 \pm 1.1$  (n=4), 高度精子形成障害は $42.7 \pm 12.4$  (n=8) であり、特発性男子不妊症におけるテストステロンの取り込み量は著明に低下していた。

すなわち、特発性男子不妊症ではテストステロンの生成経路は正常とは異なる例が認められたが、終局的にはその生成分泌量は正常であり、テストステロンの精細管内貯留機構に異常があるものと推定された。

(受付: 昭和59年9月18日・特掲)

# 無精子症におけるリブローズ-ペプチド

## Study on D-Ribulose-peptide in Azoospermia

東邦大学第一産婦人科学教室

伊藤元博 有沢克夫 中岡義明  
Motohiro ITO Katuo ARISAWA Yoshiaki NAKAOKA

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

東邦大学生化学教室

渡辺仁 天野久夫  
Hitoshi WATANABE Hisao AMANO

Department of Biochemistry,  
Toho University, School of Medicine

D型リブローズを含むペプチド性物質（リブローズ-ペプチド）が生殖細胞に特異的に存在することから、我々は精子機能との関連について種々検討してきた。その一連の研究として、ブタ精液の精子、精漿を分離し、リブローズ-ペプチドの存在を確認したところ、類似の物質が両者のいずれにも存在することが判明した。本物質が精漿中にも存在するという事実に着目し、リブローズ-ペプチドが精子単独由来のものか、生殖器系の付属器官からも産生されているのかを知るために、無精子症患者の精液を用い、本物質の存在の有無と存在するとすれば正常精液との量的関係はいかなるものかという二点について検討を加えた。

- i) 無精子精液中にも正常精液中より見出されたリブローズ-ペプチドと同一の物質が存在した。
- ii) 無精子精液と正常精液との量的関係は後者は前者の約2倍であつた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 87-91, 1985)

### I. 緒言

リブローズペプチドは、D型リブローズを含むペプチド性の物質で、生殖細胞<sup>1,2)</sup>に普遍的に存在するものであり、他の体組織にはみられない特殊のものであることから、生殖生理になんらかの役割を演じていると推測し、精子機能との関連について検索してきた。

本物質がブタ精液<sup>3)</sup>では、精子、精漿のいずれにも存在し、とりわけ精漿中に多く存在するという事実より、本物質が精子単独由来のものか、あるいは生殖器系付属器官からも産生されているのかを知る目的で、今回無精子症患者の精液を用い、リブローズ-ペプチドの存在の有無を検討し、正常精液との量的関係についても比較検討した。

### II. 実験材料および方法

- (1) 使用した精液の採取および処理 (図1)

図1は無精子症患者の精液からのリブローズ-ペプチドの抽出精製方法の概略である。

本実験に使用した精液量は約5mlで、等量の10%トリクロール酢酸を加え良く攪拌し除蛋白する。除蛋白後、3000rpmで5分間遠心し、生じた上清に1%フェノールフタレインを指示薬とし、10%水酸化カリウムを1滴ずつその変色点迄添加した。この混合液に25%酢酸バリウム0.5mlと4溶の98%冷エタノールを加え、-20°Cにて一昼夜冷凍庫に貯蔵した。トリクロール酢酸添加より以上の過程迄は低温下でできるだけ迅速に行う。

(2) カラムクロマトグラフィーによる試料の精製

生じた沈澱物は「バリウム不溶画分」と「バリウム溶エタノール不溶画分」を含んだ沈澱物で、十分攪拌した後、等量の冷水で3回抽出し、濾液はアンバーライトCG120 (H<sup>+</sup>型)と混合し、混和後ガラスフィルターを通じて、AG<sub>3</sub>-X4A中に濾過流注させた。アンバーライ

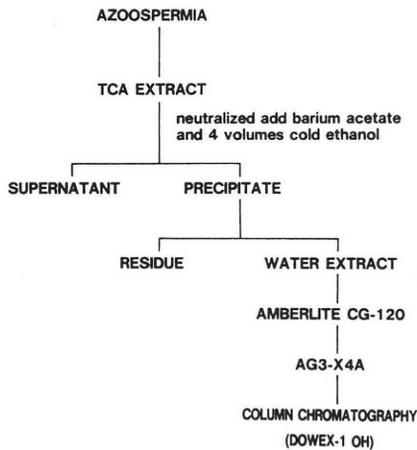


図1 EXPERIMENTAL PROCEDURE

ト CG120 (H<sup>+</sup> 型) によって酸性化した溶液はこれによつて直ちに中和される. かくして得られた溶液を Dowex-1 (OH 型) (200~400メッシュ) のカラム (10×60 mm) に吸着させ, 0.1Mアンモニア水と0.3Mギ酸アンモン1:10の混合液を100mlの混合槽に向う濃度勾配法を用いてクロマトグラフィーを施行した. 1時間60 mlの流速で溶出させ3mlずつ分画採取した. クロマトグラフィーの全行程は4°Cの低温下で行なつた.

### (3) 分析方法

#### 1) 定量

ペントースは Mejsbaum 法<sup>2)</sup>によつて行つた.

#### 2) 糖反応

濾紙上での糖反応としては, 塩酸アニシジン法<sup>3)</sup>, アンスロン・リン酸法<sup>7)</sup>を行ない, 溶液についての糖反応はオルシン反応<sup>8)</sup>, ジフェニールアミン反応, レゾルシ

ン反応, システィンカルバゾール反応を行なつた.

#### 3) 試料中に含まれる糖成分の分離法

約5ml中にリブースとして約3mgの糖成分が含まれる試料を, Rosevear<sup>9)</sup>らの方法に従つて Dowex 50×2 (H<sup>+</sup> 型) (200~400メッシュ) 5mlと混じて封管し, 105°C, 66時間加水分解し, 濾液を濃縮したものを糖試料とした.

#### 4) 糖のペーパークロマトグラフィー

下記の展開剤を用いて展開した.

i) n-ブタノール:酢酸:水 (4:1:2 v/v)

室温で8時間展開

ii) n-ブタノール:酢酸:水 (4:1:1 v/v)

室温で8時間展開

iii) n-ブタノール:アセトン:水 (5:5:2 v/v)

室温で10時間展開

#### 5) 糖の臭素酸化

Seegmiller らの方法に従つて行なつた.

#### 6) 糖の酵素学的検索

#### 7) アミノ酸組成

試料を6N塩酸で105°C, 24時間封管中で加水分解し, 日立 K.L.A II型アミノ酸自動分析装置を用いて行なつた.

## III. 実験成績

### (1) カラムクロマトグラフィーによる分離精製

(図2)

図1に示した実験方法で得られた各分画について, リブースを標準として測定したペントース量を図2に示す. 左がヒト正常精液のペントース量で, 右が無精子症のペントース量である. 無精子症のペントース陽性部分

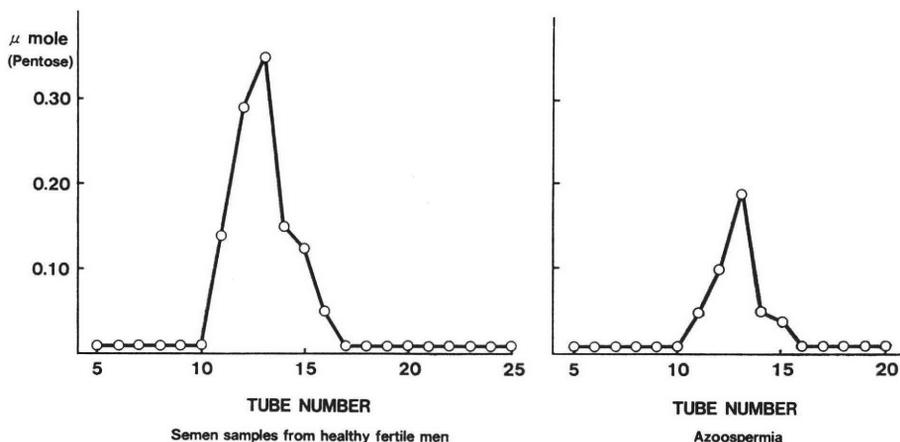


図2 CHROMATOGRAPHY OF THE RIBULOSE CONTAINING SUBSTANCE FROM HUMAN SEMEN AND AZOOSPERMIA ON A COLUMN OF DOWEX-1 (OH) (10×60mm)

表 1

Glucose-oxidase	Negative		
Fructose-R	Negative		
Bromine-oxidation	Resistant		
Orcinol-HCl-R	Max.1	670nm	green
	Max.2	540nm	
Diphenylamine-R	Max.	610nm	green
Resorcinol-R	Max.	490nm	yellow red
Cysteine carbazole-R	Max.	540nm	pink
Cysteine carbazole-R Time course	Max.	15min	pink

の位置は正常精液のそれと一致し30~45ml の間に出現しており、正常精液には無精子症に比べ約2倍量多く含まれている。

このペントース陽性部分を集め、15倍量の冷アセトンを加え、一昼夜冷暗所に放置すると白色絮状沈澱が生じる。

この沈澱物はヒト正常精液<sup>9)</sup>においては、リブローズペプタイドであることが判明しているが、無精子症患者の精液の場合もこれと同一物質であるか、あるいはこの類似物質であるかどうか検索する目的でこの分離した試料について以下の検討を試みた。

(2) 分離した試料についての分析

1) 糖成分について

試料に含まれる糖成分について分析を試みるため、前述の Rosevear らの方法により試料を Dowex 50 により水解し、遊離糖としてから以下の検索を行なった。

a) 糖反応 (表 1)

表 1 は各種糖反応の結果である。

グルコース-オキシダーゼ反応、フルクトース反応はいずれも陰性、Brom 酸化は抵抗性を示した。オルシソ吸収スペクトルはケト型ペントースであるリブローズに典型的な540nm と670nm に吸収極大が認められ、発色反応は緑色であった。他の糖反応はジフェニールアミン

表 3

Samples	Semen from healthy fertile men	Azoospermia
	Sugar	D-ribose
Amino acid	Lysine	Lysine
	Histidine	Histidine
	Arginine	Arginine
	Aspartic acid	Aspartic acid
	Threonine	Threonine
	Serine	Serine
	Glutamic acid	Glutamic acid
	Proline	Proline
	Glycine	Glycine
	Alanine	Alanine
	Valine	Valine
	Isoleucine	Isoleucine
	Leucine	Leucine

反応では吸収極大は610 nm に認められ、発色色調は緑色、レゾルシノール反応では吸収極大は490nm、発色色調は黄赤色、シスチン-カルバゾール反応では吸収極大は540nm に認められ、発色色調は桃色であった。またシスチンカルバゾール反応の時間は、発色色調の最大到達時間が15分であった。

以上の結果よりこの遊離糖はケト型ペントースであるリブローズであることがほぼ推定された。

b) 遊離糖のペーパークロマトグラフィー (表 2)

遊離糖および各種ペントースの既知標品を前述の三種類の溶媒でそれぞれ展開させ、アンスロン・リン酸試薬、アニシジン塩酸試薬によつて呈色させて得た Rf 値および発色色調を表 2 に示した。Rf 値と色調から既知リブローズとよく一致した。

c) 酵素学的検索

呈色反応より本物質中に含まれる糖はケト糖であることが明確になり、Rf 値よりリブローズであることが示

表 2

	n-Butanol Acetic Acid Water	4n-Butanol 1Acetic Acid 2Water	4n-Butanol 1Acetone 1Water	5o-Anisidine- 5HCl 2	p-Anisidine- HCl	Anthrone- phosphoric acid
Sample	0.34	0.37	0.41	Pink	Pink	Dark violet
D-Ribulose	0.34	0.37	0.41	Pink	Pink	Dark violet
D-Xylulose	0.37	0.42	0.46	Pink	Pink	Dark violet
D-Arabinose	0.28	0.27	0.30	Brownish red	Brownish red	(-)
D-Xylose	0.30	0.30	0.33	Brownish red	Brownish red	(-)
D-Ribose	0.33	0.37	0.37	Brownish red	Brownish red	(-)
D-Desoxyribose	0.40	0.51	0.51	Dark red	Dark red	light Violet

唆されたが、D型かL型リブローズであるかを決定するために、酵素を使用し、糖の化学構造である光学活性を調べた。

水解処理後の遊離糖は D-ribitol-dehydrogenase の作用を受けることから、上記の実験結果とあわせ本物質中に含まれる糖はD型リブローズであると決定されている。

#### d) アミノ酸組成 (表3)

この物質がニンヒドリン反応陽性であるため試料を6N塩酸で105°C, 24時間封管中で水解後、アミノ酸分析を行ない、その種類をヒト正常精液より得られたアミノ酸と比較した。両者とも同一のアミノ酸が検出された。

### IV. 考 案

精子機能に関する研究は形態学的、生化学的に検討されてきたが、ことに近年その方法論の開発から生化学的研究の進展はめざましい。

我々は受精鶏卵卵黄中から全く新しい酸可溶性分画に属するリン酸化合物として見出されたリブローズ-ペプチドが、ヒト卵胞液、ヒト精液、魚卵などの一連の生殖細胞にのみ存在する特殊なものであることから、生殖生理に何んらかの役割を演じている可能性を考え、精子機能との関連について検索してきた。

その一連の研究として、ブタ精液を用い、精子、精漿を分離し、両者におけるリブローズ-ペプチドの存在の有無を検索したところ、本物質はいずれにも存在していることが判明した。そこで本物質が精子中で生成される。ある種の分泌細胞より精漿中に分泌されるのか、あるいは精子単独ではなく、精漿分泌器官からも産生されているのかを知る目的で、無精子症患者の精液を用い、この精漿中に本物質が存在するか否か、また存在するとすれば正常精液との量的関係はどうであるかという二点について検討した。

無精子症患者の精液約5mlを10%トリクロール酢酸より抽出し、これより「バリウム不溶」、「バリウム溶エタノール不溶」分画を集め、この中からペントースを指標として得られた物質をDowex-1(OH型)カラムクロマトグラフィーより求めた。ペントース陽性部分は正常精液と同位置の溶出液量30ml~45mlに出現し、正常精液は無精子症に比べ約2倍多く含まれていた。このペントース陽性部分を集めて分析を試み、糖反応、ペーパークロマトグラフィーのRf値、呈色色調、酵素学的検索により本物質がD型リブローズと決定された。

また塩酸水解から13種類のアミノ酸が検出された。以上の実験結果から正常精液より分離された物質と同じリブローズを含むペプチド性物質が無精子症患者の精液中

にも存在することが判明した。

リブローズ-ペプチドは正常精液のみでなく、無精子症患者の精液中にも存在することから、本物質が必ずしも精子単独由来のものでなく、生殖器系付属器官からも産生されている可能性は濃厚である。

精子運動機能維持に必要なエネルギー供給源としては主に細胞外に存在する種々の基質が利用されていることは既知の事実であるが、同時に内在基質が利用されることも知られている。精子中に存在するリブローズ-ペプチドが精子の運動エネルギー供給の内在基質となっているかどうかはまだ十分解明されないが、無精子症の精液中にも存在し、その量的関係は正常精液の1/2であることから、運動エネルギーとの関連のみでなく、精巣および精巣上体内でのリブローズ-ペプチドの濃度を測定し、精子成熟過程との関連について、さらに本物質の生殖器系付属器官における産生部位の検索について今後検討してゆく必要があると考える。

### 文 献

- 1) 天野久男：鶏卵発生初期の卵黄中に見出されたリブローズを含む物質について、生化学，42：68，1970。
- 2) 林 晴男：人卵胞液に存在するD型リブローズを含む物質について、日不妊誌，16：160，1971
- 3) 長岡貞雄：ヒト精液に見出されたD型リブローズを含む物質について、日不妊誌，18：17，1973。
- 4) 伊藤元博：ブタ精子、精漿中におけるリブローズ-ペプチド、日不妊誌，28：57，1983。
- 5) Mejbbaum, W.: Z. Physiol. Chem., 258: 117, 1939.
- 6) Mukhjei, S., Srivastava, H. C.: Nature, 169: 330, 1952.
- 7) Dreywood, R.: Ind. Eng. Chem. Ana. Ed., 18: 499, 1946.
- 8) Bial, M.: Dent. Med. Wochschr., 29: 477, 1903.
- 9) Rosevear, J. W., Smith, E.: J. Biol. Chem., 236: 425, 1961.

### Study on D-Ribulose-peptide in azoospermia

Motohiro Ito, Katuo Arisawa  
and Yoshiaki Nakaoka

1st. Department of Obstetrics and Gynecology,  
Toho University, School of Medicine

Hitoshi Watanabe and Hisao Amano

Department of Biochemistry,  
Toho University, School of Medicine

A peptide containing D-ribulose was found in

reproductive tissues such as the human semen, human follicular fluid, chick embryo and fish egg.

This new compound was referred to as ribulose-peptide. This compound may play an important role in biochemical embryogenesis.

In our previous paper<sup>4)</sup>, it was suggested that this substance was present in both pig sperm and seminal plasma.

However, the origin of the ribulose-peptide were not established, and it is the purpose of this study to see whether the ribulose-peptide was de-

rived from only the spermatozoa or the accessory organs of reproduction.

Specimens of semen were obtained by masturbation from 2 azoospermic men, and then the methods used in this study have been described elsewhere<sup>3)</sup>.

As a result, the present study demonstrated the presence of a similar ribulose-peptide in azoospermic seminal fluid.

(受付：昭和59年3月28日)

# ヒト精漿中のアンジオテンシン変換酵素について

## Angiotensin Converting Enzyme in Human Semen

東邦大学医学部泌尿器科学教室

藤尾 幸司 田中 貞雅 松橋 求

Kouji FUJIOT Teiga TANAKA Motomu MATSUHASHI

高波 真佐治 牧 昭夫 三浦 一陽

Masaharu TAKANAMI Akio MAKI Kazukiyo MIURA

中山 孝一 白井 将文 安藤 弘

Koichi NAKAYAMA Masatumi SHIRAI Ko ANDO

Department of Urology, Toho University School of Medicine

正常男子と95例の男子不妊症患者の精漿中のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 濃度を測定した。測定方法は、cushman-cheung 法の Lieberman 変法で行なった。

結果：正常者の精漿は $1483 \pm 242$ Unit (Unit: nmol/ml/min) で、無精子症24例の精漿では、 $2101 \pm 859$ Unit で、正常者との間に統計学的に  $p < 0.05$  で有意差を認めた。精子判定基準として、Eliasson-score の変法 (東邦大法) を用いており、不妊症例では、精子濃度・運動率において、正常者に対して有意な差を認めた。精子運動能指数 (SMEI) においても有意な差を認めた。SMEI において、score O群は $2135 \pm 899$ Unit で score 10群は $2734 \pm 1307$ Unit でこの score 間で  $p < 0.05$  で有意な差を認めた。不妊症例の精漿中の angiotensin I は平均 $53.9 \pm 22.6$ pg/ml で angiotensin II は $34.7 \pm 9.16$ pg/ml であり、正常男子の精漿中濃度と同じであった。

(Jap. J. Fert. Ster., 30(1), 92-96, 1985)

### I. 緒言

アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin converting enzyme, 以下 ACE と略す)<sup>1)</sup> は、angiotensin I を昇圧物質 angiotensin II に変換する酵素で、生体内に広く分布し、特に、肺・腎・血清中に活性が認められる<sup>2)</sup>。また本酵素は、ブラジキニンを不活性フラグメントにする酵素であるキナーゼ II と同一酵素であると報告されている<sup>3)</sup>。

精漿中における精子の運動に対して、キニン・カリクレイン系が運動能を増強するということより<sup>4)</sup>、それを不活性化する ACE の存在が問題となる。われわれは、精漿中の ACE 濃度を測定することにより、本酵素の精子運動能に与える影響を検討したので報告する。

### II. 検査材料と測定方法

検査材料は、正常男子13例と、不妊を主訴として東邦

大学医学部附属大森病院リプロダクションセンター泌尿器科部門を受診した男性不妊症患者95例より得た精液である。なお、これらの男性不妊症患者の精液の状態は、Eliasson score<sup>5)</sup> の変法である精液の総合判定基準 (東邦大法) (表1) を用いて評価した。この精液の総合判定法は、精液の sperm density, morphology, motility, sperm motile efficiency index をその状態に応じて0, 1, 3, 10と score で評価し、この4項目の score の総和で精液を総合的に評価する方法である。

ACE の測定方法は、用手的に精液を採取し、液化をまつて精液の一般検査を行なった後、ハリソン氏修正液を等量加え7.5% Ficol 液に重層し、 $250 \times g$ . 15分間室温で遠心し、精漿部分を分離して、これを材料とした<sup>6)</sup>。ACE の測定法は、Cushman-Cheung 法の Lieberman 変法を用いた。

Angiotensin I, angiotensin II の測定には、radio-

表 1 精液の総合判定基準  
東邦大法 (Eliasson score の変法)

Sperm Density (10 <sup>6</sup> /ml)	Score	Sperm Morphology (% normal)	Score
≥60	0	≥60	0
40-59	1	50-59	1
20-39	3	40-49	3
<20	10	<40	10
Sperm Motility (%)	Score	Sperm Motile Efficiency Index	Score
≥60	0	≥70	0
50-59	1	50-69	1
31-49	3	31-49	3
≤30	10	≤30	10
Strong Agglutination =	3		

以上の項目の Score の和より精液の状態を次のように判定する  
 ≤1: 正常 2~4: 異常が疑われる 5~10: 病的  
 ≥11: 高度の病的状態

immunoassay 法を用いた。

III. 測定成績

1) 正常男子の精漿 ACE 濃度

正常男子13例の精漿中の ACE 濃度は、1483±242 Unit (Unit: nmol/ml/min.) であつた。血清中の ACE 濃度の正常値が25~50Unit であることから、精漿中には ACE が極めて高濃度に含まれていることが判明した (図 1)。

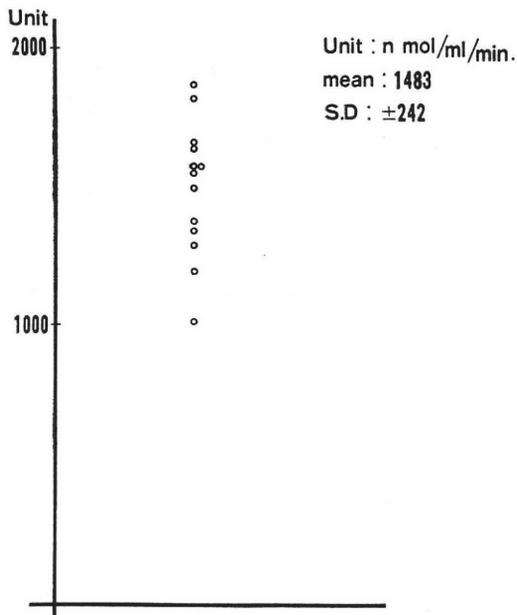


図 1 正常男子の精漿中のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 濃度

2) 精液分析と ACE 濃度

a) 無精子症と ACE 濃度

無精子症29例の精漿中の ACE 濃度は、2101±859 Unit で、正常男子の精漿中の ACE 濃度に比し、危険率 5%以下で有意の増加を認めた (図 2)。

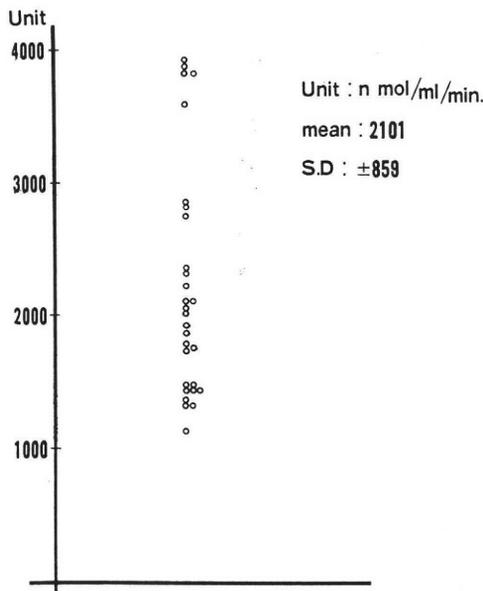


図 2 無精子症患者の精漿中のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 濃度

b) Sperm density と ACE 濃度

68例の不妊症患者の sperm density における各々の score と ACE 濃度を比較してみた。score 0群 (n=12) の平均 ACE 濃度は、3163±1340Unit であり、score 1群 (n=4) は、2341±919Unit, score 3群 (n=20) は、2566±1106Unit, score 10群 (n=32) は、2454±1200Unit であつた。これら各群間の ACE 濃度には、有意差はみられなかつたが、正常群 (N群) の ACE 濃度と比較してみると、score 1群は、有意な差

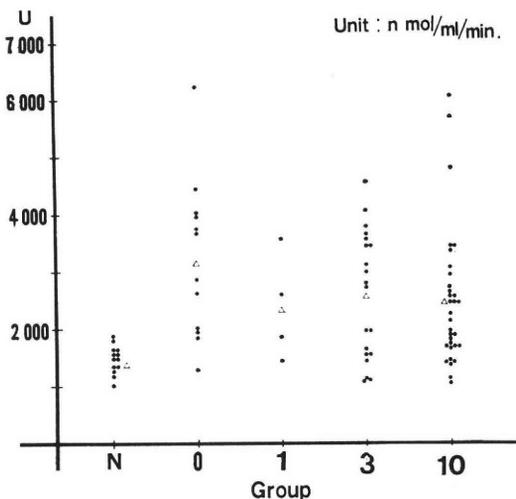


図 3 男子不妊症における精子数と精漿中のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 濃度

は認められないが, score 0, 3, 10群は, 危険率5%以下で統計学的な有意差をもつて増加していた(図3).

c) Sperm motility と ACE 濃度

score 0群 (n=22) の平均 ACE 濃度は, 2469±1145Unit で, score 1群 (n=12) は2526±806Unit, score 3群 (n=12) は2814±1185Unit, score 10群 (n=15) は2740±1567Unit であつた. また, これら各群間の ACE 濃度には, 有意差は認められなかつた. しかし, 正常群と比較すると各 score 群とも危険率5%以下で統計学的に有意な増加を認めた(図4).

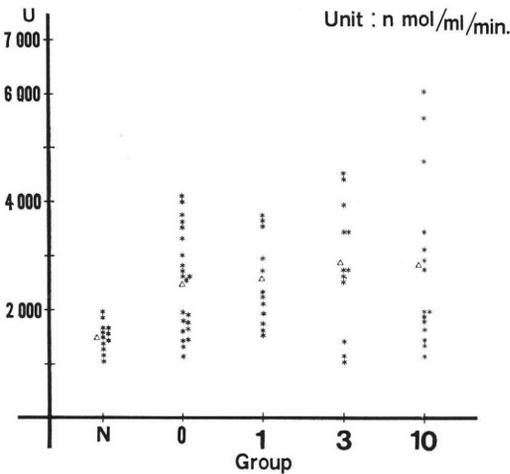


図4 男子不妊症における精子運動率と精漿中のアンジオテンシン変換酵素(ACE)濃度

d) Sperm motile efficiency index (精子運動能指数, SMEI<sup>8)</sup>) と ACE 濃度

SMEI の score 0群 (n=19) の平均 ACE 濃度は, 2135±899Unit, score 1群 (n=3) は3603±503Unit, score 3群 (n=10) は2568±1159Unit, score 10群 (n=39) では2734±1307Unit であつた. また各群間の ACE 濃度を比較してみると score 0群と score 10群との間で統計学的に有意な増加を認めた. 一方, 正常群と比較すると score 0群では, 有意な差は認められなかつたが, score 3と10群間では, 危険率5%以下で統計学的に有意な増加を認めた(図5).

3) 精漿中の angiotensin I, angiotensin II濃度

正常群 (n=10) の精漿中の平均 angiotensin I 濃度は68.4±31.2pg/ml, angiotensin II は35.3±16.4pg/ml であつた. 一方, 無精子症を除く不妊症群 (n=20) では, angiotensin I の平均精漿中濃度は 53.9±22.6 pg/ml, angiotensin II は34.7±9.16pg/ml であつた. ACE 活性が高い不妊症群で angiotensin II濃度が増加してい

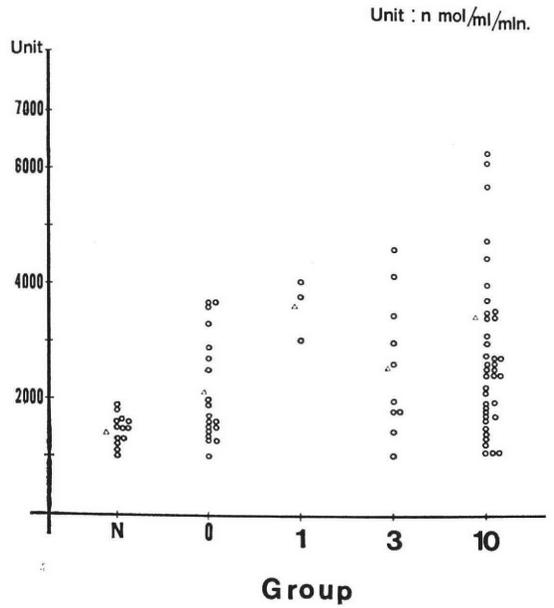


図5 男子不妊症における精子運動能指数(SMEI)と精漿中のアンジオテンシン変換酵素(ACE)濃度

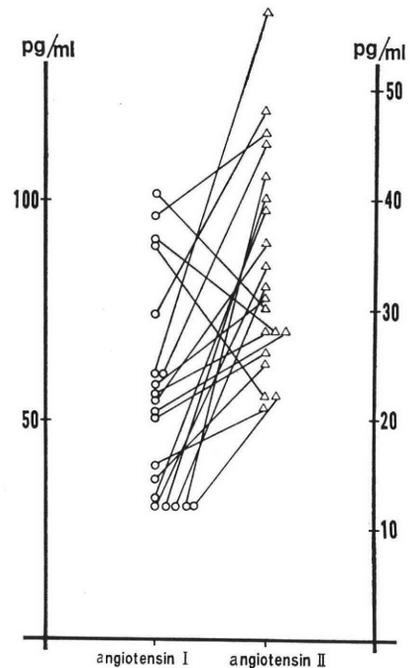


図6 男子不妊症における精漿中の angiotensin I. II. 濃度

るのではないかと予測したが, 正常群と同程度の濃度であつた(図6).

4) 血清 testosterone, FSH, LH, prolactin 値と

ACE 濃度

Sperm density, sperm motility, SMEI の各 score 群における ACE 濃度と testosterone, FSH, LH, prolactin との相関関係を検討したが、相関は得られなかった。

IV. 考 案

ヒト精漿中には、種々の物質の存在が報告されているが、その一つとして ACE の存在が知られている<sup>9)</sup>。その由来について、Depierre ら<sup>9)</sup>は、ヒト精漿中より ACE を精製し、肺由来の ACE と生化学的に比較したところ、その類似性を指摘している。また、Yokoyama ら<sup>10)</sup>は、ヒト前立腺組織より ACE の抽出を行い、同様の結果を得ている。しかし、前立腺由来の ACE は、肺由来の ACE と異なり可溶性であるということから、精漿中の ACE は、前立腺由来であると結論している。ま

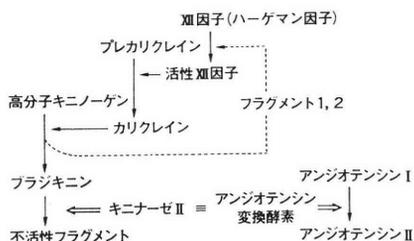


図7 キニン遊離系と制御

た、Cushman ら<sup>11)</sup>は、ラット睾丸中に ACE が存在することを報告しており、清家ら<sup>12)</sup>は、ラット副睾丸組織中に ACE の存在を示し、精子の成熟過程との関係を報告している。このように精漿中の ACE は、肺由来の酵素以外に、前立腺、副睾丸、睾丸由来の酵素の存在が考えられる。しかし、精漿中に存在する ACE の生理学的意義については、現在のところ全く不明である。

レニン・アンジオテンシン系とキニン・カリクレイン系の関係を見ると、ACE は、angiotensin I を angiotensin II に変換し、ブラジキニンを分解し不活性フラグメントにするキナーゼⅡと同一酵素であることは既に述べたが(図7)、このような反応は、血中・組織内で認められており同様な反応が精漿中でも起こっていると考えられる。Igic ら<sup>13)</sup>は、*in vitro* において ACE によるブラジキニンと angiotensin I の酵素作用を研究し、ACE によりブラジキニンは、完全に不活性化され、angiotensin I は、約60%が angiotensin II に変換されたと報告している。不妊症患者の angiotensin II 濃度は、前述の如く正常者の濃度と同等であったことから考えると、精漿中の ACE は、主としてブラジキニンの不活性

化作用を行っているものと推測され、その結果として精子運動能の抑制を引き起こしていると考えられる。

V. 結 語

正常男子と男性不妊症患者の精漿中の ACE 濃度の測定を行ない、精子の運動能に与える影響を検討した。その結果は以下の如くであった。

- 1) 正常男子の精漿中 ACE 濃度は、 $1483 \pm 242$ Unit (Unit: nmol/ml/min) であった。
- 2) 無精子症例の精漿中 ACE 濃度は、 $2101 \pm 859$ Unit で、正常群との間に統計学的な有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。
- 3) 精子判定基準として Eliasson score の変法(東邦大法)を用いた。
  - a) 精子濃度・運動率において、正常群との間に統計学的な有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。しかし、各 score 間での有意差は認められない。
  - b) 精子運動能指数 (SMEI)<sup>14)</sup> においては、score 0 群は、 $2135 \pm 899$ Unit, score 3 群は  $2568 \pm 1159$ Unit, score 10 群は  $2734 \pm 1307$ Unit である。正常群に対して score 3, 10 群は有意に増加していた ( $P < 0.05$ ) が、0 群では有意の差は認められなかった。各 score 間では、score 0 群と score 10 群の間で統計学的に有意な差を認めた ( $P < 0.05$ )。
- 4) 不妊症例の精漿中の angiotensin I 濃度は  $53.9 \pm 22.6$ pg/ml, angiotensin II は  $34.7 \pm 9.16$ pg/ml であり正常群の精漿中濃度と同じであった。

以上より精漿中の ACE は、キニン・カリクレイン系を介して精子運動能に密接な関係があると推論した。

文 献

- 1) Skeggs, L. T., Dorer, F. E., Kahn, J. R., et al.: The biochemistry of renin-angiotensin system and its role in hypertension. Am. J. Med. 60: 737, 1976.
- 2) Nishimura, K., Hiwada, K. and Ueda, E.: Purification of angiotensin-converting enzyme from human lung. Biochem. Biophys. Acta. 36: 247, 1977.
- 3) Erdör, E.: Angiotensin I converting enzyme. Circ. Res. 36: 247, 1975.
- 4) Schill, W. B., Haberland, G. L.: Winkungen von verschiedenen komponenten des kallikrein-kinin systems auf spermatozoenmotilität *in vitro*. Klin. Wschr. 53. 73. 1975.
- 5) Eliasson, R.: Analysis of semen, In progress in infertility. 2nd ed, 691, Little, Brown and Co., Boston, 1975.
- 6) 兼子 智, 森脇 千秋, 佐藤 博久, 小林 俊文, 飯

塚理八：ヒト精子の客観的運動能解析法の開発  
日不妊誌, 25(4) : 73, 1980.

- 7) Cushman, D. W., Cheung, H. S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.* 20 : 1637, 1971.
- 8) 三浦一陽：ヒト精液の評価, 臨泌, 25 : 452, 1981.
- 9) Depierre, D., Bargetz, J. P. and Roth, M. : Dipeptidyl Carboxypeptidase from human seminal plasma. *Biochem. Biophys. Acta.* 523 : 469, 1978.
- 10) Yokoyama, M., Hiwada, K., Kokubu, T., et al. : Angiotensin-converting enzyme in human prostate. *Clin. Chim. Acta.* 100 : 253, 1980.
- 11) Cushman, D. W. and Cheung, H. S. : Concentration of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 250 : 261, 1971.
- 12) 清家 泰, 横山雅好, 岩田英信, 越知憲治, 竹内正文 : ラット副睾丸におけるアンジオテンシン変換酵素の産生 : 第2回アンドロロジー学会, 130, 1983.
- 13) Iqic, R, Erdor, E. D, Yeh, H. S. J, et al. : Angiotensin I converting enzyme of the lung. *Circ. Res.* 31 (suppl II) : II-52, 1972.
- 14) 光川史郎 : 精子運動の新測定法 : 精子運動能の臨床的検討, 日泌尿会誌, 70 : 1221, 1979.

## Angiotensin converting enzyme in human semen

**Kouji Fujio, Teiga Tanaka,  
Motomu Matsuhashi, Masaharu Takanami,  
Akio Maki, Kazukiyo Miura,  
Koichi Nakayama, Masafumi Shirai  
and Ko Ando**

Department of Urology, Toho University  
School of Medicine

In normal and 95 cases of infertile seminal plasma the activity of angiotensin converting enzyme was measured by Lieberman methods modified Cushman-Cheung method.

The result were evaluated as follow :  
Azospermia had higher concentration of angiotensin converting enzyme than normal seminal plasma ( $P < 0.05$ ).

Using the modified Eliasson score (Toho methods) in semen analysis, on the sperm density and motility the level of angiotensin converting enzyme of infertile seminal plasma elevated higher than that ( $P < 0.05$ ). Especially, on the sperm motile efficiency index (SMEI), score 10 group had higher concentration of angiotensin converting enzyme than score 0 group ( $P < 0.05$ ).

The angiotensin I and angiotensin II level of infertile seminal plasma were detected as well as normal those.

This studies were indicated that angiotensin converting enzyme in seminal plasma was concerned with sperm motility.

(受付 : 昭和95年5月21日)

## 特発性男子不妊症のホルモン療法

### Hormonal Therapy for Idiopathic Male Infertility

千葉大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 島崎 淳教授)

角 谷 秀 典 川 村 健 二

Hidenori SUMIYA Kenji KAWAMURA

伊 藤 晴 夫 島 崎 淳

Haruo ITO Jun SHIMAZAKI

Department of Urology, Chiba University School of Medicine  
(Director: Prof. Jun Shimazaki)

旭中央病院泌尿器科

村 上 信 乃

Shino MRAKAMI

Department of Urology, Asahi-chuo Hospital

特発性男子不妊症の患者73例に対して、クエン酸クロミフェン (45例)、HCG (6例)、HCG/HMG (22例) 投与によるホルモン療法を施行した。クエン酸クロミフェン投与例では、精子濃度の改善率は37.0% (24週)、運動率の改善率22.2% (24週) であり、妊娠例は3例であった。投与前 FSH 値の高いものは治療に反応しにくかった。HCG 投与例の成績は不良であり、精液所見は改善しなかった。HCG/HMG 投与例では、1例に妊娠成立をみた。また、各投与例で投与前後の血清 LH, FSH, プロラクチン, テストステロン, エストラジオールの変化について検討を加えた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 97-102, 1985)

#### 結 言

特発性男子不妊症に対して、様々な薬物療法が試みられているが、まだ有効率の高い薬物を見ない<sup>1)</sup>。しかし、近年の薬物療法の傾向はホルモン製剤を非ホルモン製剤より良いとするものが多くなっている。今回、クエン酸クロミフェン及びゴナドトロピンを使用し、その治療成績について検討したので報告する。

#### 対象ならびに方法

千葉大学医学部泌尿器科外来を訪れ、特発性男子不妊症の診断を受けた患者を対象とした。このうち、45例にクロミッド® (クエン酸クロミフェン) 25mg 連日投与を12週行なった。うち27例は、24週まで投与を受けた。また6例にゴナドトロピン® (HCG) 1,000単位を週2回連続12週筋注した。うち4例は24週筋注を行なった。同じく、22例にゴナドトロピン® (HCG) 1,000単位、ヒュメゴ

ン® (HMG) 75単位同時投与を週2回連続12週筋注し、うち10例については24週筋注した。クエン酸クロミフェン HCG, HCG/HMG, 投与前後の精子濃度、運動率<sup>2)</sup> および血清 LH, FSH, テストステロン, プロラクチンなどの変化について検討した。なお、精液は、5日間以上禁欲させたのち、用手法で採取させ、室温に30分放置後、鏡検した。血中 LH, FSH, の測定はそれぞれ“LH キット第一” および“FSH キット第一” (第一 RI 社) による。また、プロラクチンは“プロラクチンリアキット” (ダイナボット社) によるラジオイムノアッセイにより行なった。テストステロンは“テストステロン H3 キット” (CIS 社) によりエストラジオールは“エストラジオール H3 キット” (CIS 社) により行なった。正常範囲は、LH 6.5~34.5mIU/ml, FSH 1.9~21.8mIU/ml プロラクチン 2~20 ng/ml, テストステロン 300~850ng/dl およびエストラジオール 300~850pg/ml であ

Table 1 治療効果判定基準 (飯塚ら<sup>3)</sup>)

効果判定	精子濃度		運動率
	30×10 <sup>6</sup> /ml 以上の症例	30×10 <sup>6</sup> /ml 未満の症例	
著効	20×10 <sup>6</sup> 以上の増加	10×10 <sup>6</sup> 以上の増加	20%以上の増加
有効	10×10 <sup>6</sup> 以上の増加	5×10 <sup>6</sup> 以上の増加	10%以上の増加
不変	10×10 <sup>6</sup> 未満の増減	5×10 <sup>6</sup> 未満の増減	10%未満の増減
悪化	10×10 <sup>6</sup> 以上の減少	5×10 <sup>6</sup> 以上の減少	10%以上の減少

Table 2 クエン酸クロミフェン

初診時精子濃度	著効例および有効例(12週)			著効例および有効例(24週)			妊娠成立
	症例	精子濃度	運動率	症例	精子濃度	運動率	
0×10 <sup>6</sup> (/ml)	8	1	1	4	1	1	1
30×10 <sup>6</sup> 未満	30	7	3	18	7	3	1
30×10 <sup>6</sup> 以上	7	4	2	5	2	2	1
計	45	12	6	27	10	6	3

(飯塚らによる判定基準による)

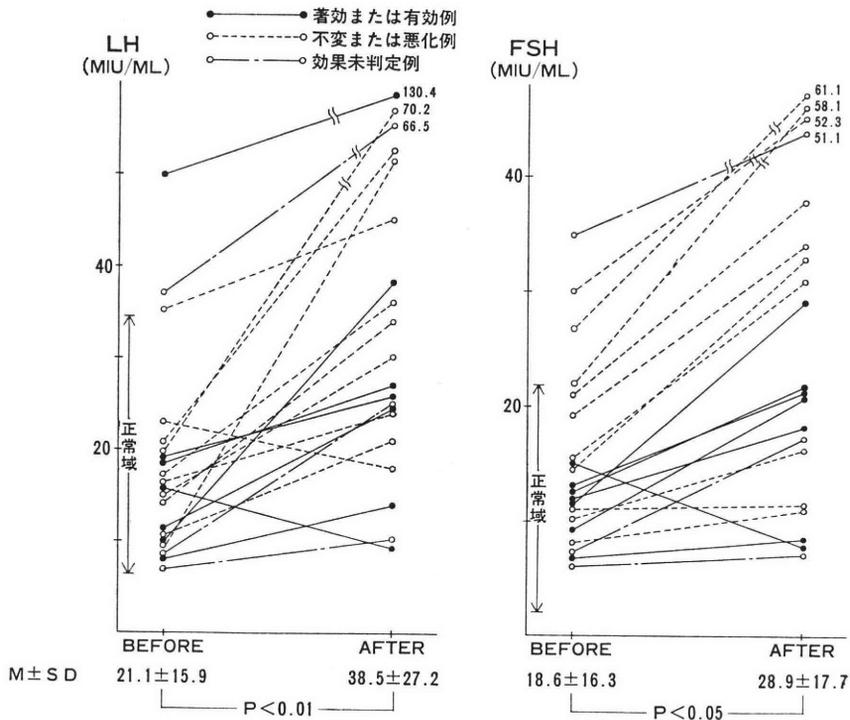


Fig. 1 <クエン酸クロミフェン> 投与前後の血清 LH, FSH

る。精液所見の変化については、飯塚ら<sup>3)</sup>による治療効果判定基準にしたがった(表1)。そのうちの著効および有効のものを改善群とし、不変および悪化のものを非改善群とした。

結果

<クエン酸クロミフェン>

クエン酸クロミフェン投与例では、12週で45例中12例

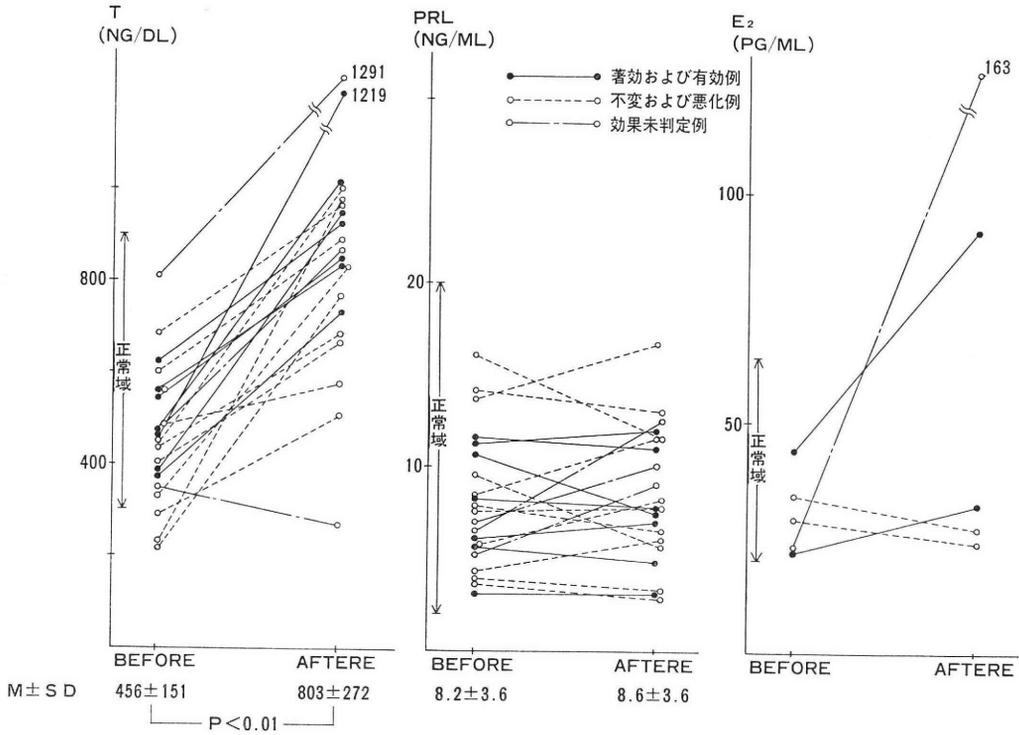


Fig. 2 <クエン酸クロミフェン> 投与前後の血中テストステロン, プロラクチン, エストラジオール

Table 3 HCG

初診時精子濃度	著加例および有効例(12週)			著効例および有効例(24週)			妊娠成立
	症例	精子濃度	運動率	症例	精子濃度	運動率	
0×10 <sup>6</sup> (/ml)	—	—	—	—	—	—	—
30×10 <sup>6</sup> 未満	6	0	0	4	0	0	0
30×10 <sup>6</sup> 以上	—	—	—	—	—	—	—
計	6	0	0	4	0	0	0

(飯塚らによる判定基準による)

に精子濃度の改善を, 6例に運動率の改善をみとめた. 3例に妊娠成立をみた. 12週投与に比べ, 24週投与の方が精子濃度・運動率ともにより改善の傾向をみとめた. 初診時の精子濃度の高い群は, その低い群に比べ成績は良好であった. 血清 LH・FSH は投与後有意の上昇をみとめた.

非改善群では投与後の LH・FSH の値が, 改善群に比し有意に高い値をみとめた. 精子濃度の改善群は非改善群に比べ, 投与前 FSH 値は, 有意に低値を示した. 血清テストステロン値は, クエン酸クロミフェン投与前後で有意な上昇をみた. 血清プロラクチン値は投与前後で変動をみとめなかつた. 血清エストラジオール値は, 例数も少なく有意の変化はみられなかつた. 投与前のテ

ストステロン値と精子濃度の改善とは, 有意な関係はなかつた.

<HCG>

HCG 投与例では, 12週, 24週ともに, 精子濃度および運動率の改善はみとめなかつた. HCG 投与前後の血清 FSH 値は有意に下降したが, 血清 LH・テストステロン・プロラクチンについては一定の傾向をみとめなかつた.

<HCG/HMG>

HCG/HMG 投与例で, 12週では, 22例中2例に精子濃度の改善を, 5例に運動率の改善をみとめた. 24週では, 精子濃度の改善したものはなく, 12例中2例に運動率の改善をみた. 妊娠成立は1例であった. 血清テスト

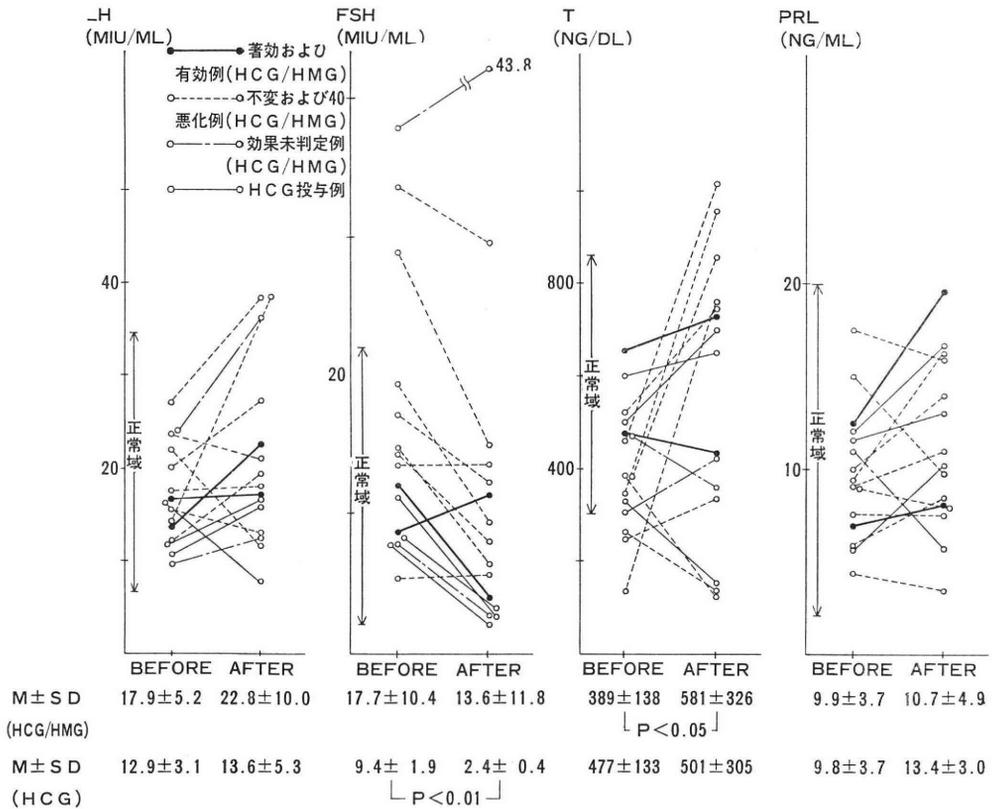


Fig. 3 <HCG/HMG, HCG> 投与前後の血清 LH, FSH, テストステロン, プロラクチン

Table 4 HCG/HMG

初診時精子濃度	著効例および有効例 (12週)			著効例および有効例 (24週)			妊娠成立
	症例	精子濃度	運動率	症例	精子濃度	運動率	
0 × 10 <sup>6</sup> (/ml)	6	0	1	4	0	1	0
30 × 10 <sup>6</sup> 未満	16	2	4	8	0	1	1
30 × 10 <sup>6</sup> 以上	—	—	—	—	—	—	0
計	22	2	5	12	0	2	1

(飯塚らによる判定基準による)

ステロン値は、投与後有意に上昇した。血清 LH, FSH, プロラクチン値は一定の傾向をみなかつた。

### 考 案

クエン酸クロミフェンは、1961年 Greenblatt らにより、排卵誘発剤として開発された。これは視床下部レベルで、エストラジオールと拮抗することにより、内因性ゴナドトロピンの分泌をたかめ、造精機能を促進するといわれている<sup>4)</sup>。しかし、投与量によっては、逆に造精機能を抑制するとされている。1日投与量としては25

mg から50mg とするものが多い<sup>5)</sup>。諸家のクエン酸クロミフェンによる治療成績は、Palti ら<sup>6)</sup>は有効率25% (50mg/日投与)、Schellen ら<sup>7)</sup>は64% (50mg/日投与)、Paulson ら<sup>8)</sup>は79% (25mg/日投与)、Jones らは75% (25mg/日投与)、Ansari ら<sup>10)</sup>は100% (5 mg/日投与)、小寺ら<sup>11)</sup>は53.7% (5 mg/日投与)と報告している。自験例では24週投与で、精子濃度の改善率は37.0%であつた。投与後の血中ホルモンの変化は、LH・FSH・テストステロン・エストラジオールのいずれも有意に上昇したという報告が多い。自験例では、投与後 LH・FSH・

テストステロンの有意の上昇をみとめたが、プロラクチンは不変であった。エストラジオールについては自験例では例数が少なく、今後検討したい。本剤の作用機序が内因性ゴナドトロピン上昇にあるので、投与前 FSH 値の高いものは治療に反応しにくいといわれている。自験例でも、投与前 LH または FSH の高値のものは、治療に反応しなかつた。このような例は睾丸障害が高度なのですでに回復する可能性を失なつていていると考えられる。

HCG, HMG および PMSG 等のゴナドトロピンが、ホルモン療法として用いられている。これらのうち PMSG は有効であるという報告もあるが<sup>12)</sup>、抗体産生をおこしやすく、主に前 2 者が用いられている。HCG 投与により、Leydig cell を刺激しテストステロン産生が増し、精細管周囲のテストステロン濃度が高まり精子形成が亢進するとされている。一方、HMG 投与により Germ cell の分化が促進するといわれている<sup>13)</sup>。Danezis ら<sup>14)</sup> は、HMG 単独療法を行なつており、11例中 5 例に精子濃度の改善をみたしている。HCG 単独療法は、Mehan ら<sup>15)</sup> は良好な成績を得ており、40例中 17例に妊娠成立をみとめているが、投与前 FSH 高値あるいは睾丸生検所見の極度に悪いものは、対象外であるとしている。一方、Margalioth ら<sup>16)</sup> は 47例中 3 例に妊娠成立を、8 例に精子濃度の改善をみたしと報告しており、HCG 単独療法については治療成績、投与量、投与方法など一定の評価は得られていない。精子形成過程には、FSH およびテストステロンの両者が必要であるとされており<sup>17)</sup>、睾丸内テストステロン濃度を高める HCG と FSH 作用を有する HMG を両者併用することは、合目的であると思われる。文献的に、HCG/HMG 併用例では、HCG 週 3,000~5,000単位、HMG 週 150~225単位使用されており、精液所見の改善率は 25~50% であるとされている<sup>18)</sup>。

今回、内因性または外因性にゴナドトロピンを変動させる薬剤の男子不妊症に対する効果を検討した。これらのうち、内因性に变化させるクエン酸クロミフェンが最もすぐれていることがわかつた。効果をさらに良いものとするために、ゴナドトロピンの上昇を生理的にするなど投与方法等を改善する必要があると考える。

## 結 語

1. 特発性男子不妊症 73 例に対して、クエン酸クロミフェン、HCG、HCG/HMG 投与によるホルモン療法を行なつた。

2. クエン酸クロミフェン投与例では、精子濃度の改善率は、26.7% (12週)、37.0% (24週) であつた。運動率については、それぞれ改善率は 13.3% (12週)、22.2% (24週) であつた。

3. クエン酸クロミフェン投与例では、投与前 FSH 値の低いものが、有意に精子濃度が改善した。

4. HCG 投与例、HCG/HMG 投与例の成績は比較的の不良であつた。

本論文の要旨は、第 28 回日本不妊学会総会において発表した。

## 文 献

- 1) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊藤晴夫, 島崎 淳: 男子不妊症の臨床的観察. 日不妊会誌, 28: 56, 1983.
- 2) 島崎 淳, 伊藤晴夫: 男性性機能検査, 臨床検査 MOOK, No. 7, 147, 1981.
- 3) 飯塚理八, 己斐秀豊, 高橋輝雄, 仁科進弘: 男性不妊に対する Vitamedin の効果, 臨婦, 20: 41, 1966.
- 4) Schellen, T. M. C. M.: Clomiphene treatment in male infertility, Int. J. Fertil. 27: 136, 1982.
- 5) Paulson, D. F. and Wacksman, J.: Clomiphene citrate in the management of male infertility, J. Urol. 115: 73, 1976.
- 6) Palti, Z.: Clomiphene therapy in defective spermatogenesis, Fertil. Steril. 21: 838, 1970.
- 7) Schellen, A. M. C. M. and Beek, J. H. M. J.: The use of clomiphene treatment for male sterility, Fertil. Steril. 25: 407, 1974.
- 8) Paulson, D. F.: Clomiphene citrate in the management of male hypofertility: predictors for treatment selection, Fertil. Steril. 28: 1266, 1977.
- 9) Jones, T. M., Fang, V. S., Rosenfield, R. L. and Schoenberg, H. W.: Parameters of response to clomiphene citrate in oligospermic men, J. Urol. 124: 53, 1980.
- 10) Ansari, A. H., Wieland, R. G. and Klein, D. E.: Cisclomiphene citrate in the management of oligospermia. J. Urol. 108: 131, 1972.
- 11) 小寺重行, 池本 庸, 桂井清人, 稲葉善雄, 町田豊平: 特発性男子不妊症に対するクエン酸クロミフェン少量長期投与の治療成績, 日不妊会誌, 28: 35, 1983.
- 12) 長田尚夫, 井上武夫, 平野昭彦, 田中一成: PMSG 療法が有効であつたと思われる男子不妊症の 1 例, 日不妊会誌, 31: 165, 1977.
- 13) Steinberger, E.: Hormonal control of mammalian spermatogenesis. Physiol. Rev. 51: 1, 1971.
- 14) Danezis, J. M. and Batrion, M. L.: The effect of human postmneopausal gonadotropins on infertile men with severe oligospermia, Fertil. Steril. 18: 788, 1976.

- 15) Mehan, D. J. and Chehval, M. J. : Human chorionic gonadotropin in the treatment of the infertile man, *J. Urol.* 128 : 60, 1982.
- 16) Margalioth, E. J., Laufer, N., Persistz, E., Gaulayev, B., Shemesh, A. and Schenker J. G. : Treatment of oligoasthenospermia with human chorionic gonadotropin : hormonal profiles and results, *Fertil. Steril.* 39 : 841, 1982.
- 17) 島崎 淳, 伊藤晴夫, 布施秀樹 : 男性性機能の調節, *日本臨床*, 40 : 32, 1982.
- 18) Schill, W. B. : Recent progress in pharmacological therapy of male subfertility, *Androl*, 11 : 77, 1979.

### Hormonal therapy for idiopathic male infertility

**Hidegori Sumiya, Kenji Kawamura,  
Haruo Ito and Jun Shimazaki**

Department of Urology, Chiba University  
School of Medicine  
(Director: Prof. Jun Shimazaki)

**Shino Murakami**

(Department of Urology, Asahi-chuo Hospital)

Seventy-three cases of idiopathic male inferti-

lity were treated with hormonal therapy; forty-five with clomiphene citrate (25mg oral daily), six with human chorionic gonadotropin (HCG, 1000 IU twice weekly), and twenty-two with HCG (1,000 IU) and human menopausal gonadotropin (HMG, 75 IU twice weekly).

#### 1) clomiphene citrate

Only three patients impregnated their wives following treatment. Sperm concentration improved in 37% of the patients. During treatment LH, FSH and testosterone levels were risen significantly. Prolactin levels remained unaltered. Patients with elevated basal FSH levels did not respond to the treatment.

#### 2) HCG

No patient improved their sperm concentration and sperm count. During treatment FSH levels were decreased significantly.

#### 3) HCG/HMG

Only a patient impregnated his wife following treatment. During treatment testosterone levels were risen significantly.

(受付: 昭和59年3月10日)

# 赤外線サーモグラフィーを用いた 精索静脈瘤の臨床的研究

Clinical Study on Varicocele using with  
Infrared Thermography

関西労災病院泌尿器科

松下全巳 島谷昇 広岡九兵衛  
Masami MATSUSHITA Nobori SHIMATANI Kuhei HIROOKA

Department of Urology, Kansai-rousai Hospital

神戸大学医学部泌尿器科

守殿貞夫 岡伸俊 浜口毅樹  
Sadao KAMIDONO Nobutoshi OKA Takeki HAMAGUCHI  
岡田弘 羽間稔 松本修  
Hiroshi OKADA Minoru HAZAMA Osamu MATSUMOTO  
石神襄次  
Joji ISHIGAMI

Department of Urology, Kobe University School of Medicine

男性不妊と関わりのある精索静脈瘤の客観的診断、予後評価および病因検索の一手段として赤外線サーモグラフィーを応用し、興味ある知見を得た。

対象は、精索静脈瘤患者33例（うち不妊を主訴とした者30例）、正常対照7例である。サーモグラフィーで陰嚢部皮膚温を測定した結果、睾丸部平均温度では、静脈瘤患者が正常対照に比し、左右共に1~2°C高く、左右別では、左側が右側より高い傾向が認められた。高位結紮術後には、左右差が無くなり、睾丸部平均温度も対照に近づいている。不妊症との関連では高温のものに精液所見の悪い傾向がうかがわれた。

以上より、赤外線サーモグラフィーは、精索静脈瘤の臨床に有用であり、本症と男性不妊との関連性が示唆された。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 103-108, 1985)

## 緒言

近年、医用電子機器の発達はめざましく、その臨床応用も多方面にわたっている。その1つである赤外線サーモグラフィーは、被検者に侵襲を与えず、かつ比較的簡便な診断機器である。本機器は、表在皮膚温の測定を目的とし、表在性疾患、具体的にあげるならば皮膚科疾患や、振動障害、血管病変および神経障害に基づく末梢血行障害ならびに乳房疾患等の診断に有用とされ<sup>1,2)</sup>、実

際に臨床に應用されている。泌尿器科領域では、おもに陰嚢内疾患に用いられ欧米ではその有用性が報告<sup>3)</sup>されているが、わが国では、いまだ十分に検討されていない。

今回、われわれはコンピューター処理可能の赤外線サーモグラフィーが導入されたのを機会に、精索静脈瘤患者の診断および治療経過の観察に本機器を応用し、本症と不妊に関する2、3の知見を得たので報告する。

方 法

1. 測定機器

日本電子社製、医用サーモビュア：JTG-MD、およびビデオプロセッサ：TG-VPA を使用した(図1)。1回の測定 SCAN TIME は4秒である。なお、本機器の

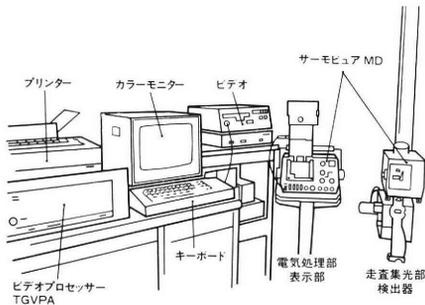


図1 赤外線サーモグラフィー装置

測定値はマイクロコンピュータにより解析され、モニターに描出されるとともに、データのプリントアウトが可能である。

2. 研究対象

対象は、神戸大学医学部附属病院泌尿器科不妊外来を受診した精索静脈瘤患者30名および3名の左鼠径部痛を主訴とした患者の計33名で、年齢分布は、14~61歳、平均31.3歳であった。静脈瘤の Grade<sup>4)</sup> は、I-3例、II-24例、III-6例である。

本検査は、術前に28例、術後に19例行なわれ、そのうち術前後ともに測定しえた例は14症例であった。

対照は、陰嚢内疾患を認めず正常精液所見を有する男子7名で、年齢分布は、22~29歳、平均23.7歳である。

3. 測定方法

室温26°C にコントロールされた室内に被験者を下半身裸にて30~60分間とめおき、皮膚温(体温)の調整をはかり、同室にてサーモグラフィー検査を行なった。まず、立位にさせ腹壁にテープで陰嚢を固定し、陰嚢部を

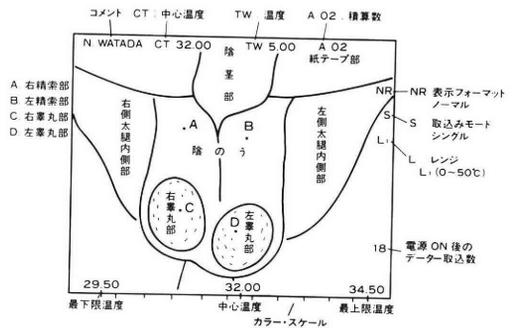
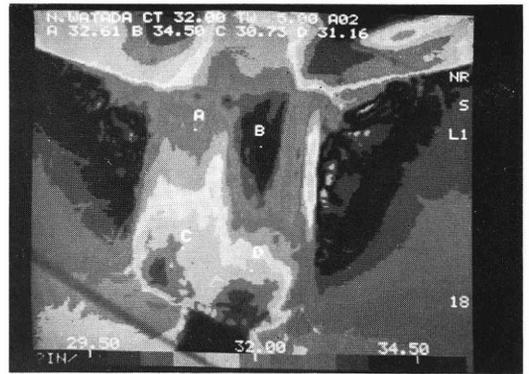


図2 サーモグラフィー画像 (画像処理I-ポイントモード)

充分に露出させ、かつ大腿部の幅射熱をさけるため大腿を開かせ、そのままの体位にて測定された。ついで仰臥位にて測定を行なう。測定された各部位の温度は、ビデオプロセッサで処理され、以下に示されている画像あるいはヒストグラムの様式で表示される。

画像処理I-ポイントモード

被写体から検出された赤外線は、電気処理されサーモビュアにより温度分布像として描出されるが、さらにビデオプロセッサにより地図状の、0.5°C 幅のカラー帯域としてモニターに表示される(図2)。高温は暖色に、低温は寒色に描かれ、画像上の任意の部位に、縦・横カーソルの交点を一致させると、その部位の温度が測定される。すなわち、左右精索部あるいは睾丸部などと、自由に各ポイントにおける皮膚温の測定が可能で、この画像処理方法をポイントモードとする。なお、画像内に描かれる温度幅(TW)は5°Cが限界であるが、通常は陰嚢部皮膚温度の中心温度(CT)を32~32.5°Cに設定することにより、測定全域の温度は充足され、測定範囲を逸脱することはない。左精索静脈瘤症例における実際の画像(図2)でみると、左側上部陰嚢(図中B点:34.50°C)に高温域が明確に描かれ、同側下部陰嚢にも高温域が観察される。

画像処理II-エリアヒストグラム



図3 画像処理II-エアモード

エアヒストグラムは、サーモ画像上にカーソルを用いて一定面積を設定し（左右睾丸部に一致した区域、図3）、そのエア内の温度分布を0.5°Cごとに細分化しヒストグラムに表示するとともに、2.5°Cごとにまとめて百分率で表示されたものである（図4）。

精索部温度は、睾丸と鼠径部の中間の精索の走行に一致した陰囊皮膚ポイント温度（画像処理I）を、睾丸部

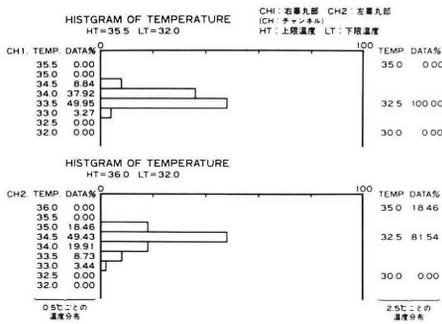


図4 立位睾丸部温度ヒストグラム

温度は、睾丸に一致した一定域（約2cm角）内の各温度ヒストグラム（エアヒストグラム）の平均温度とした。

結果

1. 精索静脈瘤患者群と対照群の温度分布（図5）

対照群の平均睾丸部皮膚温は、立位—左 29.56±0.71°C、右 29.47±0.63°C、臥位—左 29.63±0.62°C、右 29.47±0.61°C と左右差および立位臥位の体位別の差もなかつた。精索部温では、立位—左 32.80±0.60°C、右 32.71±0.61°C、臥位—左 32.58±0.78°C、右 32.26±0.57°C と、左右差は立位で0.1°C、臥位で0.3°C。体位別では、臥位にて左0.2°C、右0.5°Cの下降がみられた。

一方、精索静脈瘤患者群28例では、睾丸部皮膚温は、

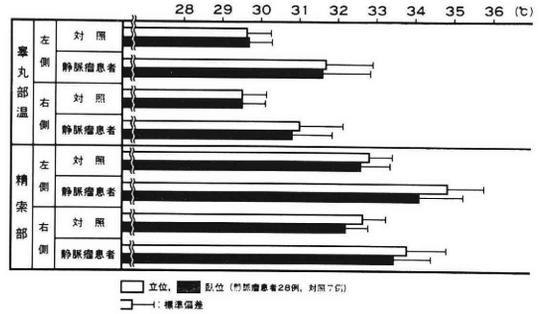


図5 睾丸部および精索部の温度分布

立位—左 31.66±1.25°C、右 31.05±1.14°C、臥位—左 31.56±1.27°C、右 30.89±1.05°C と立位、臥位ともに約0.6°C 左側が高い。体位別温度差は、左側で0.1°C、右側で0.1°C と変化は少ない。精索部温は、立位—左 34.88±0.94°C、右 33.80±0.99°C、臥位—左 34.02±1.17°C、右 33.49±0.97°C で、左右差は立位で約1°C、臥位で約0.5°C 左側が高く、体位別では、臥位に比べ立位で、左側0.8°C、右側で0.3°C 高かつた。患者群は、

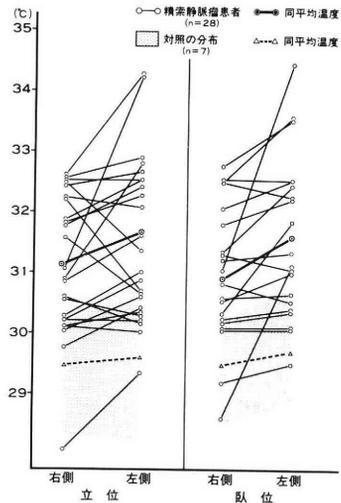


図6 睾丸部温度左右差

対照群に比し、睾丸部温で立位で左側約2°C、右側で1.5°C 高く臥位でもほぼ同様である（図6）。精索部温でも、患者群が立位で左側約2°C、右側約1°C 対照より高く、臥位でも同じである。

以上のように、患者群では、静脈瘤の存在によるものと思われる左陰囊皮膚温の高温化とともに右側陰囊温度も高かつた。

2. 高位結紮術前後の立位睾丸部温（図7）

14例に対する高位結紮術前後の立位睾丸部温度をみると、術前の平均値で、左 32.05±1.27°C、右 31.42±

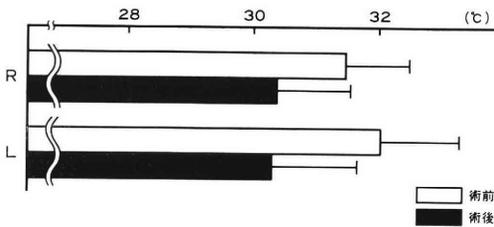


図7 高位結紮術前・後の立位平均辜丸部温の変化 (n=14)

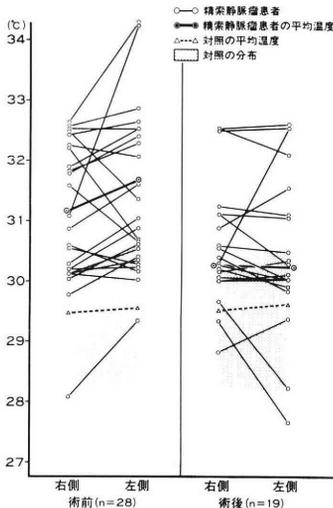


図8 高位結紮術前後の立位辜丸部温

測定日	術前			術後(2W.)			術後(1~3M.)		
	0	50	%100	0	50	%100	0	50	%100
35.0	R	25							
	L	24							
32.5	R	30		7					
	L	28		0.2			2		
30.0	R	68		22			100		
	L	34		3			3		
27.5	R			31					
	L			2					

図9 辜丸部温度分布

症例 Y.S. 27歳 診断：左精索静脈瘤

0.99°Cであったものが、術後には、左30.30±1.32°C、右30.39±1.21°Cとなっていた。左側で約1.7°C、右側で約1°Cの低下が認められた(図8)。これら術後の左右の平均辜丸部温は正常対照群に近似していた。この低下は臥位でも同様に認められた。図9は、術前後に観察された1症例のエリアヒストグラムで、術後2週目の辜丸部温度は著明に低下し、その後やや上昇するものの術前と比較して低下している。多数例で同様の経過を示した。

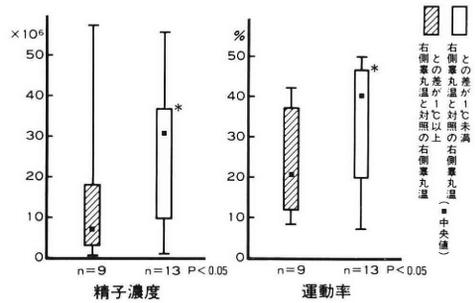


図10 精索静脈瘤患者における辜丸部温の高低と精液所見

### 3. 辜丸部温の高低と精液所見(図10)

精索静脈瘤患者の右側辜丸部温が、対照の右側辜丸部温より1°C以上高いもの9例(高値群)、1°C未満の差のもの13例(低値群)に分けて、精液所見を比較した。高値群の精子濃度は、 $7 \times 10^6$  (3~18 $\times 10^6$ )/ml、運動率は20(12~37)%であった。低値群では、精子濃度 $30 \times 10^6$  (10~37 $\times 10^6$ )/ml、運動率40(20~46)%と濃度、運動率とも高値群の方が、有意に悪い傾向が認められた。

### 考 察

陰嚢内疾患の診断は、触診により、時に視診により比較的容易であるが、なかには、困難な場合を経験する。サーモグラフィーは、そのような場合の客観的診断法の1つとして期待されており、辜丸腫瘍、副辜丸炎、精液瘤、陰嚢水腫および精索静脈瘤などの診断に試みられ<sup>5)</sup>、なかでも血管病変である精索静脈瘤に有用とされる。

精索静脈瘤の客観的な診断法としては、サーモグラフィーだけでなく、逆行性内精静脈造影、シンチスキャン、あるいは超音波ドップラー法などがあげられる。サーモグラフィーの診断率は、静脈造影にやや劣るとされるが<sup>6,7)</sup>、検査に際しての侵襲の度は、比較にならないほど少ない。侵襲が少ないという点では、シンチスキャンも同様であるが、サーモグラフィーに比し、false positiveの頻度は少ないものの発見率において劣る<sup>7,8)</sup>。

サーモグラフィーには、液晶体温計を応用した陰嚢接触式サーモグラフィーと、体表の赤外線を検出する赤外線サーモグラフィーの2種がある。接触式サーモグラフィーは液晶体温計を陰嚢皮膚に直接あて、色調の変化により温度を知るもので<sup>9-10)</sup>、簡便ではあるが、正確に定量的な情報を与えてくれない。赤外線サーモグラフィーは、精緻な温度分布の測定が可能であるが、高価なことが欠点である。

赤外線サーモグラフィーによる精索静脈瘤患者の陰嚢

皮膚温度は、右側に比し左側が $1^{\circ}\text{C}$ 以上高温を示すものがほとんどで、そのうち $3^{\circ}\text{C}$ 以上の左右差を認めるものが50%近くあるとされる<sup>12)</sup>。今回、我々の行なつた結果でも左側に高温域が描出されたが、左右差は平均 $1^{\circ}\text{C}$ であった。静脈瘤の Grade 別画像では Grade I で hot spot, Grade II・III で陰囊左側全域にわたる高温帯, Grade III で時に陰囊全体の高温化が認められるという<sup>6,12)</sup>。そして陰囊の、高温部と任意の低温部位の温度は、Grade I で $1.5\sim 2^{\circ}\text{C}$ 、II, III では $3^{\circ}\text{C}$ 以上の差のことが多く、Grade と温度は相関するとされている<sup>6,12)</sup>。今回は Grade 別症例数にばらつきがあるため詳細な検討を加えなかつたが、Grade と温度差とは相関しないとの印象を持った。

精索静脈瘤患者の20~50%に造精機能障害がみられ<sup>13)</sup>、これは温度障害、中毒物質の存在あるいは辜丸組織の低酸素状態などに原因するといわれる<sup>14)</sup>。しかし片側性静脈瘤と男性不妊との関連性には常に疑問が投げられる。高温環境が、辜丸機能を障害することは、動物実験等で証明され<sup>15)</sup>、Agger らは、高位結紮により精索静脈瘤患者の左右辜丸の温度差が術後にはなくなり、温度低下が著明なほど精液所見が改善されることを指摘している<sup>16)</sup>。Zorgniotti らは、精索静脈瘤患者の辜丸温は高く、温度が高いほど辜丸容積は小さく、精子の奇型率が高く、温度が高いほど辜丸容積は小さく、精子の奇型率が高く報告している<sup>17)</sup>。今回の成績でも、高位結紮術後に辜丸部温は低下すること、術前辜丸部温の高いものほど精液所見（精子濃度、運動率）が悪い傾向を認めた。また左側だけの精索静脈瘤でありながらその右側辜丸部温度は患側より低いが、正常対照のそれよりも高い症例が9例認められ、かつこれらの症例では、いずれも造精障害が強かつた。これらの事実から、左側の高温が右側にも波及し、結果として両側辜丸の造精機能障害をもたらしたものと推測され、本症による不妊が、温度障害によることを裏付ける1つの成績と考えられた。

以上、赤外線サーモグラフィーの有用性が述べられたが、次にあげるような問題が残されている。陰囊部温の測定時には、外側に大腿の高温帯があるため、その影響を可能なかぎり排除すべきである。我々は、両下肢を開排させ検査を行なつたが、諸家の報告では金属箔などにより大腿部を遮閉したもの、何の処置もとらないものなどと一定していない<sup>3)</sup>。また皮膚温への室温の影響をさけるため、一定の温度下で検査されるべきで、今回は30~60分間、 $26^{\circ}\text{C}$ の室温下で体表温を調整し、被験者の体温分布を $36.2\sim 36.8^{\circ}\text{C}$ に一定させた。体温調整の記載のない報告例が多いが、調整された例でも $20^{\circ}\text{C}$ で6分間<sup>18)</sup>と不十分であり、一般的に統一された環境下に行なわれていない。本邦のように四季の温度変化が著明で

夏季に高温多湿であることを考えあわせれば、皮膚温の測定にはかなりの誤差が発生することが推測され、充分検討されなければならない問題と考えられる。

陰囊内の小さな炎症（副辜丸炎など）病巣は、hot spot として描出される。したがってサーモグラフィーによる本症の診断に際しては、このような false positive の原因となるような他の疾患を除外することが重要である。

## 結 語

精索静脈瘤33症例に対して赤外線サーモグラフィーを応用し、次のような知見を得た。

- 1) 精索静脈瘤患者、術前検査症例28例の左右別温度差は、立位辜丸部温で左側が右側に比し $0.6^{\circ}\text{C}$ 、立位精索部温でも左側が約 $1^{\circ}\text{C}$ 高かつた。
- 2) 精索静脈瘤患者では、正常対照に比し辜丸部皮膚温が、立位左側で約 $2^{\circ}\text{C}$ 、右側で約 $1.5^{\circ}\text{C}$ 高かつた。高位結紮術前後の辜丸部温を測定しえた14例中10例のそれは、正常対照と同程度に低下していた。
- 3) 精索静脈瘤患者のうち、右側辜丸部温が対照の右側辜丸部温より $1^{\circ}\text{C}$ 以上高いものに強い造精障害が認められた。これは本症と不妊が、温度障害と関連することを示唆している。

(なお、本文の要旨は、第33回泌尿器科学会中部連合総会（浜松）において発表した。)

## 文 献

- 1) 岩谷真宏：四肢末梢循環障害のサーモグラフィー、医用サーモグラフィー、194、中山書店、1984。
- 2) 大橋泰彦、内田 勲、尾内能夫：癌のサーモグラフィー、医用サーモグラフィー、129、中山書店、1984。
- 3) Gold, R. H., Ehrlich, R. M., Dowdy, B. S. A. and Young, R. T.: Scrotal Thermography Radiology, 122: 129, 1977.
- 4) 広川 信、岩本晃明、藤井 浩、日下部きよ子：精索静脈瘤の臨床的研究、陰囊シンチグラムによる診断について、日泌会誌、70: 53, 1979。
- 5) 平山 嗣：陰囊内疾患におけるサーモグラフィーの応用、泌尿紀要、24: 11, 923, 1978。
- 6) Comhaire, F., Monteyne R. and Kunnen, M.: The Value of Scrotal Thermography as compared with selective retrograde venography of the internal spermatic Vein for the Diagnosis of "subclinical" varicocele. Fertil. Steril 27: 6, 694, 1976.
- 7) Comhaire, F. H., Kunnen M., Vandeweghe, M. and Simons, M.: Comparison of Four Different Methods for the Diagnosis of Vari-

- cocele: Varicocele and Male Infertility II, 78, Springer, Verlag, 1984.
- 8) Comhaire, M., Vandeweghe F. and Simons, M.: Comparison between thermography and venous scintigraphy of the scrotum in the diagnosis of varicocele: *Inter J. Andrology*, 4: 663, 1981.
  - 9) Göblyös, P., Vydra, G., Szabolcs, I., Irsy, G., Göth, M. and Szilágyi, G.: Liquid Crystal Thermography of the Testicles in the diagnosis of Infertility, *Europ. J. Radiol*, 2: 246, 1982.
  - 10) Lewis, R. W. and Harrison, R. M.: Contact Scrotal Thermography. II. Use in the Infertile Male, *Fertil, Steril*, 34: 3, 259, 1980.
  - 11) Lewis, R. W. and Harrison, R. M.: Contact Scrotal Thermography: Application to Problems of Infertility: *J. Urol*, 122, July, 40, 1979.
  - 12) Monteyne, R. and Comhaire, F.: The Thermographic Characteristics of Varicocele: an Analysis of 65 Positive Registrations, *Brit. J. Urol*, 50: 118, 1978.
  - 13) Lee, H. Y., Shim, H. B. and Lee, K. S.: Effects of Varicolectomy on Spermatogenesis: Varicocele and Male Infertility II, 100, Springer Verlag 1984.
  - 14) Comhaire, F. H., Kunnen, M. and Simons, M.: Physiopathology of Testicular Dysfunction in Varicocele and Male Infertility II, 43, Springer Verlag, 1984.
  - 15) 福井信立: 辜丸と温熱との問題, *皮紀要*, 5: 437, 1925.
  - 16) Agger, P.: Scrotal and Testicular Temperature: It's relation to sperm count before and after operation for Varicocele, *Fertil Steril*, 22: 5, 286, 1971.
  - 17) Zorngiotti, A. W. and Macleod, J.: Studies in Temperature, Human semen quantity and Varicocele, *Fertil, Steril*, 24: 11, 854, 1978.
  - 18) Zorngiotti, A. W., Toth, A. and Maelesd, J.: Infrared Thermometry for Testicular Temperature Determinations, *Fertil, Steril*, 32: 3, 347, 1979.

## Clinical study on varicocele using with infrared thermography

**Masami Matsushita, Nobori Shimatani and  
Kuheji Hirooka**

Department of Urology, Kansai-rosai  
Hospital

**Sadao Kamidono, Nobutoshi Oka,  
Takeki Hamaguchi Hiroshi Okada,  
Minoru Hazama, Osamu Matsumoto and  
Joji Ishigami**

Department of Urology, Kobe University  
School of Medicine

As a means of objective diagnosis, prognostic evaluation and causative examination of varicocele which is related with male infertility, an infrared thermography was applied, and interesting findings were obtained.

The subjects were 33 patients of varicocele (of which 30 cases complained infertility) and seven normal controls. When the scrotal skin temperature was measured by thermography, the testicular mean temperature was 1 to 2°C higher at both sides in the patients as compared with that of the controls, and the temperature of the left side tended to be higher than that of the right side. After the high ligation, the right and left side difference was eliminated, and the testicular mean temperature became closer to that of the normal controls. In relation to the infertility, the semen findings tended to be worse in patients with higher temperature.

Consequently the infrared thermography was useful in clinical examinations of varicocele, and the relationship between this disease and male infertility was suggested.

(受付: 昭和59年7月25日特掲)

# Precocious Puberty due to a Hypothalamic Hamartoma. Studies of Sleep-Wake Pattern of Luteinizing Hormone Release and Testicular Steroidogenesis Activities

Kazuhiko SATO, Masahiko HOSAKA, Yuhzo KINOSHITA  
and Ryuichi NISHIMURA

Department of Urology, Yokohama City University School of Medicine

---

**Abstract:** One 9/12 year-old boy with precocious puberty due to a hypothalamic hamartoma was described. The testicular capacity was 8 ml in both sides. The genitalia revealed Tanner's stage 3 and pubic hair stage 2. Serum testosterone concentration was significantly high equal to the normal level of adult male. Serum gonadotropins was normal equivalent to the age. Stimulation of gonadotropin releasing hormone (Gn-RH) and human chorionic gonadotropin (HCG) showed normal response observed in normal adult male. Serum gonadotropins, especially LH, was increased up to the maximum level at the period of the rem stage which was induced by trichloride. Then, sexual development of the boy was classified as mid puberty.

In studies of testicular steroidogenesis activities,  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase,  $17\alpha$ -hydroxylase, C 17-20 lyase and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase were active as much as aged man and a varicocele with normal spermatogenesis.

Histological findings of the testis revealed development of germ cell to spermatocyte, in part, to spermatid and mature Leydig cells.

It is likely suggested that LH release in sleep can induce testicular enzyme activities to produce testosterone from pregnenolone, and that mid puberty already has normal function of Leydig cells.

**Key words:** Precocious puberty, gonadotropin release, Leydig cell function  
(Jap.J. Fert. Ster. 30(1), 109-113, 1985)

---

## Introduction

Although central nervous system tumor such as hypothalamic glioma, astrocytoma and hamartoma may cause true precocious puberty, hamartoma of the hypothalamus have seemed to be rare. Judge et al<sup>1)</sup> speculated that hamartoma acts as an accessory hypothalamus. Recently, Hochman et al<sup>2)</sup> reported immunohistochemical demonstration of luteinizing releasing hormone in the hamartoma removed from 2 11/12 year-old boy with precocious puberty. They also suggested that hypothalamic hamartoma may autonomously produce luteinizing releasing hormone. However distinct cause of the sexual precocity induced by hamartoma re-

mains to be unknown. The present report was aimed to evaluate the endocrine status of precocious puberty with hypothalamic hamartoma. For the purpose, we studied the sleep-wake patterns of luteinizing release and testicular steroidogenesis activities.

## Case Report

One 9/12 year-old boy was admitted for the evaluation of progressive development of external genitalia. The patient was the product of a full-term pregnancy and spontaneous delivery. His birth weight was 3,400g. Developmental milestones were normal. Rapid physical growth, enlargement of the genitalia and pubic hair growth had commented by one year of age. He had the deep voice

of an adolescent. His overall mental development was appropriate for the age. No family history of sexual precocity could be elicited. At 1 9/12 year of age, the appearance of a muscular was adolescent with normal body proportion. He was 90.2 cm tall and weighed 16.7 kg. The testicular capacity was 8 ml in both sides. The genitalia were Tanner stage 3 and the pubic hair was stage 2.

On radiograms, his bone age was about 4 year-old. Computed tomography revealed an area of increased density in the interpeduncular cistern. There was no enhancement of the density upon the injection of contrast. The visible part of the tumor was removed by neurosurgery. The tumor was histologically determined as hamartoma. The histological findings of the testis tissue was as follows. In most part of the seminiferous tubules, germ cells developed at least to spermatocyte. The meiotic division was suspected and degenerated spermatid were recognized in part of the seminiferous tubules. In interstitium, there were obvious mature Leydig cells (Fig. 1).

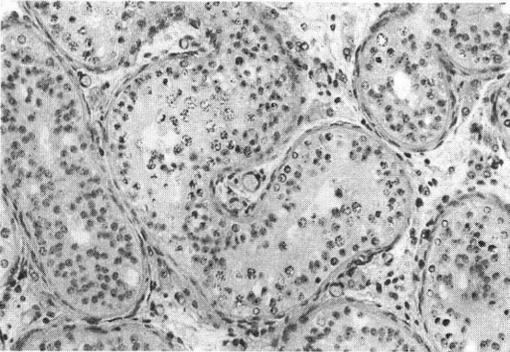


Fig. 1 Histological findings of the testis: Germ cells develop to spermatocyte, in part, to spermatid. Mature Leydig cells are recognized

## Methods

### Endocrine studies

Basal levels of serum FSH, LH, GH and steroid hormones were determined by radioimmunoassay. Gonadotropin releasing hormone (Gn-RH) test was performed by subcutaneous injection of 100  $\mu$ g Gn-RH. Blood was drawn before, 30 min. and 60 min. after the injection. FSH, LH and GH levels

were measured. For HCG stimulation test, 1,000 IU HCG was intramuscularly injected. Blood was sampled before and in the morning of the fourth day. The changing pattern of gonadotropin release in sleep was evaluated by the rem stage induced with 30 mg of trichloride per oral.

### Testicular steroidogenesis activities

20-50 mg of testicular tissue was homogenated. The cell free homogenate was used as the enzyme preparation. Radioactive steroid substrate of known specific activity was diluted with corresponding authentic non-radioactive material to provide a concentration of steroid saturating for the enzyme. The substrates used were pregnenolone (7.16 nmol), progesterone (4.06 nmol), 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone (3.84 nmol), 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone (31.3 nmol) and 4-androstenedione (42.8 nmol). The coenzymes used were NAD (120  $\mu$ M) and NADPH (200  $\mu$ M) for the incubation of pregnenolone and HADPH (50  $\mu$ M) for the other substrates. The incubation medium was adjusted to the volume of 3 ml contained the enzyme preparation, <sup>14</sup>C labelled steroid substrate, 0.25 M sucrose, 17 mM tris (pH 7.4) and 1.7 mM MgCl<sub>2</sub>. Incubations were carried out at 37°C for 20min. in an atmosphere of 95 % CO<sub>2</sub> and 5 % O<sub>2</sub> with constant shaking.

After adding cold carrier steroid (100  $\mu$ g each), extraction was repeated three times with 10 ml of methylene dichloride. The combined extracts were dried over anhydrous disodium sulfate and concentrated at 40°C under reduced pressure. Ascending chromatography was performed for the separation of steroids on thin layer plates precoated with silica gel G and G254 (4:1, w/w). The solvent system of benzene and acetone (4:1, v/v) was applied for separation of the metabolites from progesterone, 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone and 4-androstenedione. Addition to the solvent system, chloroform and ether (4:1, v/v) was used for further separation of metabolites from pregnenolone and 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone. The enzyme activity was determined by the sum of metabolites from individual substrate to testosterone and demonstrated as nmol product/100 mg testicular tissue/20 min..

## Results

As shown in Table 1, serum FSH level was normal corresponding to the age. Serum LH level was minimally high. Serum testosterone showed markedly high level. The level was equal to the normal level of adult men. Gn-RH and HCG test demonstrated the normal response recognized in normal adult male (Table 2).

Plasma GH level was significantly increased at the moderate stage of sleep monitored by EEG. Plasma FSH and LH were increased up to the maximum level at the period of the rem stage indicating the similar level of normal adult men (Fig. 2).

Table 1 Basal hormone levels

Compound	Case	Normal level	
FSH	4.8	4-42	mIU/ml
LH	8.8	2-32	mIU/ml
GH	0.6	<5	ng/ml
ACTH	10.0	15-85	pg/ml
Progesterone	0.3	0.1-1.0	ng/ml
17 $\alpha$ -Hydroxy-progesterone	0.7	0.1-4.0	ng/ml
DOC	0.2	0.02-0.2	ng/ml
11-Desoxy-cortisol	0.6	0.2-1.2	ng/ml
Corticosterone	3.0	1-10	ng/ml
Cortisol	97.0	40-150	ng/ml
Aldosterone	20.0	5-50	pg/ml
DHEA	0.9	1.2-7.5	ng/ml
DHEA-S	81.6	400-1500	ng/ml
Androstenedione	0.2	0.5-1.5	ng/ml
Testosterone	5.1	3-8	ng/ml
Estrone	56.8	5-40	pg/ml
Estradiol	16.5	10-40	pg/ml
Estriol	5.0	<5	pg/ml
HCG	3.3	<15	mIU/ml

3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity was slightly elevated in comparison with a varicocele with normal spermatogenesis and a patient with prostatic cancer. The activities of 17 $\alpha$ -hydroxylase for pregnenolone and C 17-20 lyase for 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone revealed similar value to a patient with prostatic cancer, while 17 $\alpha$ -hydroxylase for progesterone and C 17-20 lyase for 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone showed slightly lower activities than these of the control. 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the case was similar to the aged man employed as control (Fig. 3).

## Discussion

In the patient with precocious puberty caused by hypothalamic hamartoma, basal gonadotropin levels were normal equivalent to the age. Serum testosterone levels revealed significantly high equivalent to the level in normal adult male. It was found that releasing of gonadotropins, especially LH, were markedly increased up to the normal level of adult male during the rem stage.

Hormonal change during puberty have been well reported<sup>3)</sup>. Significant enhancement of episodic LH release is seen in early, mid and late stage of puberty. However, the episodic release occurs only in sleep. In early puberty, the episodic release of LH is apparently lower than that in the mid puberty. LH release in late puberty begins to increase during wakefulness. In contrast, pattern of FSH release is similar to LH, but the level of FSH has been noted to be lower than LH in both early and mid puberty. The case was reasonably classified as mid puberty under consideration of the gonadotropins releasing pattern.

Testicular enzyme activities concerning te-

Table 2 Gn-RH and HCG stimulation test Plasma FSH and LH : mIU/ml, Plasma testosterone : ng/ml

	Gn-RH test			HCG test	
	Before	30min.	60min.	Before	After
FSH	4.4	9.8	9.4	—	—
LH	10.2	87.5	85.4	—	—
Testosterone	—	—	—	3.62	18.00

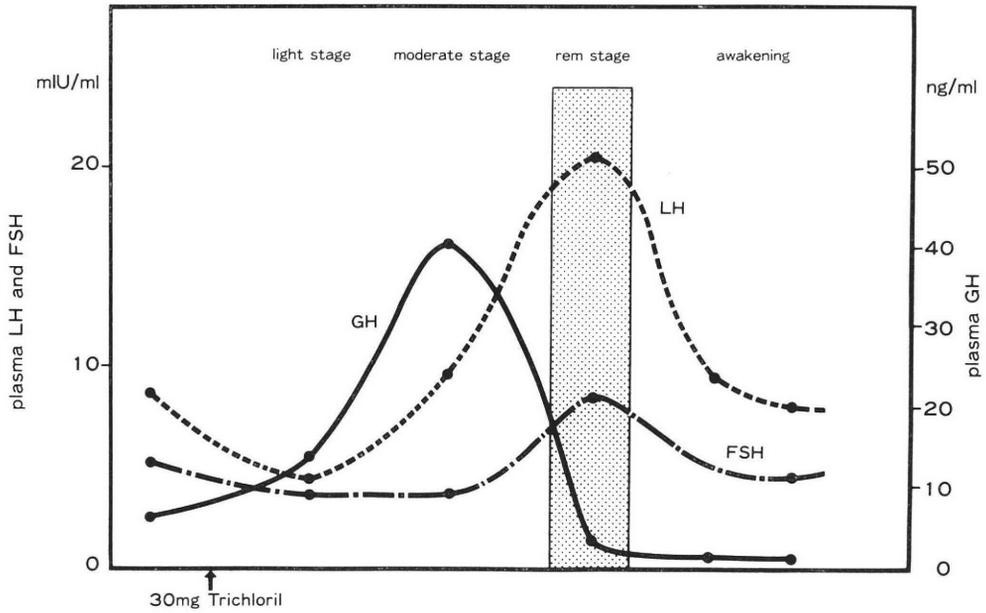


Fig. 2 Sleep-wake patterns of FSH, LH and GH in plasma, Sleep was induced by trichloide

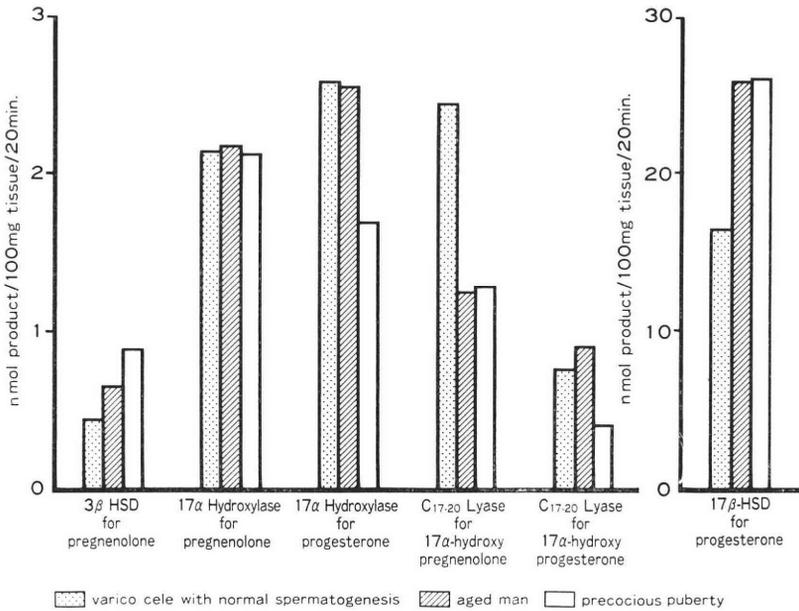


Fig. 3 Testicular steroidogenesis activities

stosterone production during puberty has remained unknown. 3β-hydroxysteroid dehydrogenase is recognized by histochemical technique in both testes of new-born within two days and of 16 year-old boy following the administration of HCG, but not in the testis of boys aged 5 to 6 year-old<sup>4)</sup>. Also, the dehydrogenase in rat testis is markedly

enhanced at the beginning of sexual maturation<sup>5)</sup>. Mizutani et al<sup>6)</sup>. reported that a 7 year-old boy with virilizing interstitial cell tumor showed a significant formation of 4-ene-3-oxosteroid from pregnenolone in the testicular tissue adjucent to the tumor. Recently, Oshima et al<sup>7)</sup>. proved the presence of enzyme activities related to biosynthesis of

testosterone from pregnenolone in 4 year-old boy with idiopathic precocious puberty, although very limited  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity. The boy revealed tanner stage 2 and no mature Leydig cells in histological examination of the testis. Then, they suggested that  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase might occur at the advance stage of puberty in the human testis. In contrast, active  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase is present in immature human testis. Furthermore, activation of  $17\alpha$ -hydroxylase and C 17-20 lyase may proceed to the induction of the dehydrogenase.

In our case, the enzyme activities related testosterone metabolism from pregnenolone,  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase,  $17\alpha$ -hydroxylase, C 17-20 lyase and  $17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, were distinctly present in comparison with the control employed in the present studies. Histological findings of the testis demonstrated developed germ cells at least to spermatocyte, in part, to spermatid and obvious mature Leydig cells. As previously mentioned, the case had normal adult male level of serum testosterone. LH releasing was recognized only in sleep. It is likely suggested that LH release in sleep can induce activities of the testicular enzymes to produce testosterone from pregnenolone, and that mid puberty already has normal function of Leydig cell.

#### References

- 1) Judge, D. M., Kulin, H. E., Page, R., Santen, R. and Trapukdi, S.: Hypothalamic hamartoma; A source of ruteinizing-hormone-releasing factor in precocious puberty. N. Engl. J. Med. 296 : 7, 1977.
- 2) Hochman, H. I., Jujge, M. D. and Reichlin, S.: Precocious puberty and hypothalamic hamartoma. Pediatrics, 67 : 236, 1981.
- 3) Parker, D. C., Judd, H. L., Rossman, L. G. and Yen, S. S. C.: Pubertal sleep-wake patterns of episodic LH, FSH and testosterone release in twin boys. Clin. Endocrinol. Metab. 40 : 1099, 1975.
- 4) Sengoku, K.: Histochemical studies on the human testes, especially on the interstitial cells of Leydig. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ. 14 : 51, 1967.
- 5) Shikita, M., Hall, P. F.: The action of human chorionic gonadotrophin *in vivo* upon microsomal enzymes of immature rat testis. Biochem. Biophys. Acta. 136 : 484, 1967.
- 6) Mizutani, S., Tsujimura, T., Akashi, S. and Matsumoto, K.: Lack of metabolism of progesterone, testosterone and pregnenolone to  $5\alpha$ -products in monkey and human testes compared with rodent testes. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44 : 1023, 1977.
- 7) Oshima, H., Ishiwata, D., Hatakeyama, S. and Yokokawa, M.: *In vitro* steroidogenesis in testes of three infants, two with ambiguous external genitalia and one with true precocious puberty; evidence for the presence of active  $17\beta$ -hydroxysteroid oxidoreductase in immature human testes. Endocrinol. Japon. 27 : 59, 1980.

### Hamartoma による中枢性思春期早発症例

#### 覚醒-睡眠における LH 分泌型と精巣テ

#### ストステロン生合成の検討

横浜市立大学医学部泌尿器科教室

佐藤和彦, 穂坂正彦

木下裕三, 西村隆一

1歳9か月の男児の hamartoma による中枢性思春期早発症を経験した。精巣容量は左右ともに8ml. Tanner の分類では外陰部3度, 恥毛2度である。精巣組織所見は, 減数分裂を認める精母細胞がみられ, Leydig 細胞はすでに成熟していた。血中性腺刺激ホルモンは年齢相当で低値であるが, 血中テストステロン値は著明に高値で, 正常成人男子値であつた。また Gn-RH, HCG 刺激試験での LH およびテストステロンの反応型は, 正常成人男子に一致していた。トリクロライドで睡眠を誘発し覚醒時から睡眠にいたる LH, FSH の変動を検討した結果, 本症例では睡眠時のみ性腺刺激ホルモンの著明な分泌があることが判明した。したがつて, 本症は思春期中期に分類された。プレグネノロンからテストステロンにいたる各種酵素はテストステロンを十分に生成するにたる活性を保持していた。すなわち, 睡眠時のみの LH 分泌により, 精巣テストステロン代謝酵素は成人男子と同等の活性をすでに得ていることが明らかにされた。

(受付・昭和59年9月18日・特掲)

## 不妊を主訴とした46, XYq-の1例

46, XYq- in a Patient with Male Infertility

富山医科薬科大学泌尿器科学教室

笹川 五十次 寺田 為義 片山 喬  
Isoji SASAGAWA Tameyoshi TERADA Takashi KATAYAMA

Department of Urology, Faculty of Medicine,  
Toyama Medical and Pharmaceutical  
University

46, XYq- という染色体異常を持った33歳の男子不妊患者の臨床的所見について報告した。理学的所見としては、精巣が小さいこと以外に異常はなかった。精液中には精子は認められなかった。血中 LH, FSH は正常よりもやや高値を示したが、血中テストステロンは正常値以下であった。精巣組織は、germinal cell aplasia の像を呈していた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 114-118, 1985)

### 緒 言

性染色体異常としてY染色体の長腕欠失は稀である。我々は不妊を主訴として来院した46, XYq- の1例を経験したので、若干の文献的考察を加えて報告する。

### 症 例

患者：33歳・男性・会社員

初診：1983年9月12日

主訴：不妊

既往歴：4歳の時、ジフテリアに罹患した。

家族歴：特記すべきことなし。

現病歴：結婚後6年になるが、嫡子ができないため、1980年4月近医受診し、無精子症と診断された。1983年9月12日精査を目的として、富山医科薬科大学附属病院泌尿器科を受診した。妻の妊娠歴はない。性欲・勃起・射精は正常である。また、出生時の父親および母親の年齢はそれぞれ28歳と24歳であった。

現症：身長161cm。体重54kg。女性化乳房なし。胸部理学的に正常。腹部は平滑で肝・脾・腎を触知せず。陰莖は正常(図1)。精巣は右6ml, 左7mlと小さかった。精巣上体、精索は正常。前立腺は小くのみ大、弾性硬。

入院時検査所見

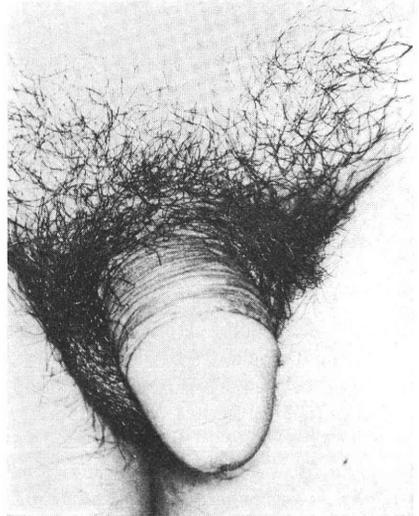


図1 外陰部所見

- 1) 血液生化学的検査。一般検査、尿検査はいずれも正常。
- 2) 精液検査(2回施行)：2回とも水様で精液量は2.0, 2.5ml, 精子を全く認めなかった。高倍率下にて赤血球を2~3個認めた。
- 3) 内分泌学的検査：Plasma FSH 25mIU/ml, LH 42mIU/ml, testosterone 2.1ng/ml, prolactin 18ng/ml, estradiol 10pg/ml, LH-RH 負荷試験では、LH, FSH

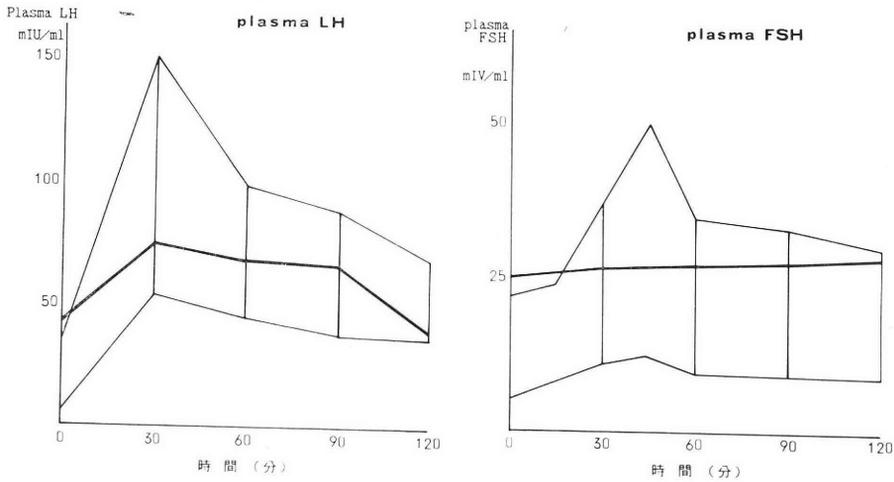


図2 LH-RH 負荷試験  
血中 LH, FSH とも反応は低下している

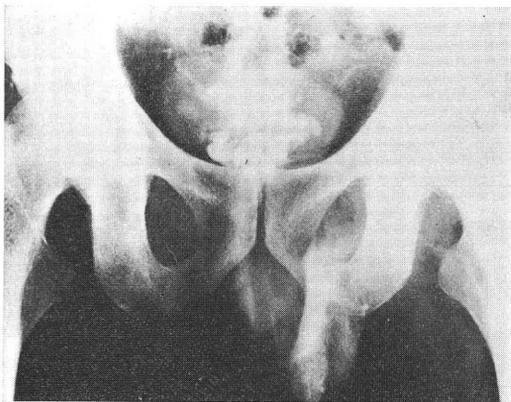


図3 精管精囊造影  
精管の通過障害は認められないが、精囊は  
発育不全を示している

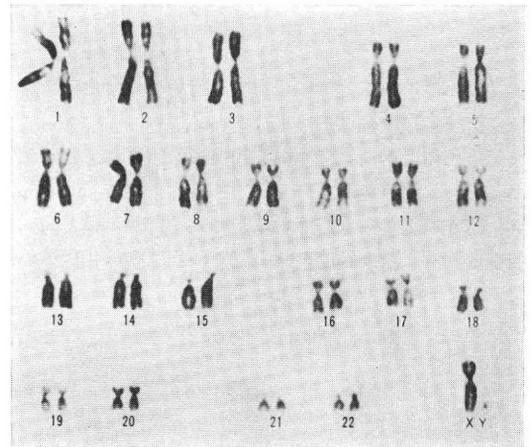


図5 染色体検査 (G バンド法)  
Y染色体の長腕の欠失が認められる

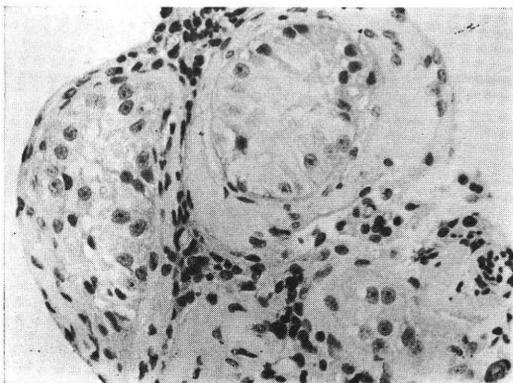


図4 精巣組織像  
germinal cell aplasia を呈している

とも反応は低下していた (図2)。

無精子症の精査のため、1983年9月19日精巣生検および精管精囊造影を施行した。精管精囊造影では、膀胱内に造影剤が流入して見にくいですが、精管の通過障害はなかった。また、精囊は発育不全を示した (図3)。

病理組織学的所見：精巣には精細管壁の硝子化が種々の程度にみられ、強いものでは管腔が消失し、Sertoli細胞のみのものもみられた (図4)。

染色体検査所見：トリプシン処理によるバンド法 (図5) やキナクリンマスタードによる蛍光分染法 (図6) では常染色体には異常はみられず、性染色体はX染色体には異常はみられなかったが、Y染色体の長腕の欠失がみられた。

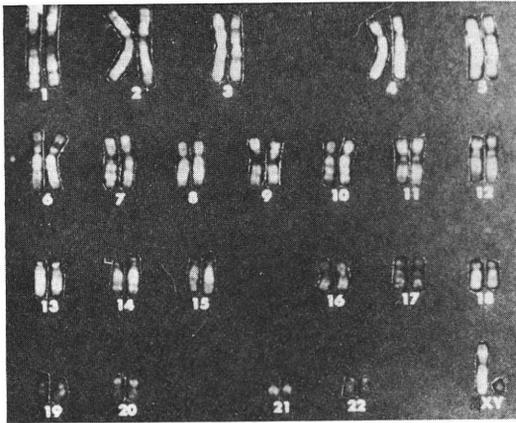


図6 染色体検査（蛍光分染法）  
Y染色体の長腕の欠失が認められる

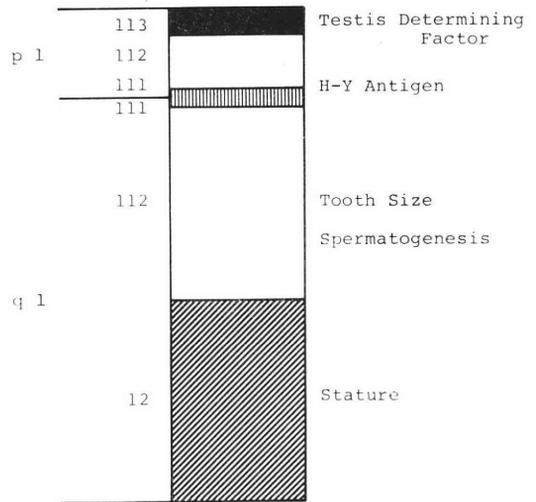


図7 Y染色体の gene map

以上の検査所見から、この患者の不妊は精巣の精子形成障害によるもので46, XYq- という染色体異常が原因と考えた。

考 察

Y染色体は性腺分化において、精巣への分化を誘導し性の決定に重要な役割を果たす。

Y染色体の構造異常は現在10種類報告されている。すなわち、2個の着糸点をもつ二動原体染色体 dic(Yp), dic(Yq)<sup>1)</sup>、着糸点を中心として両腕部が対称で同一の遺伝座を有する同腕染色体 i(Y)<sup>2)</sup>、2個の相同体でな

い染色体間で部分交換を起こしたもの t(Y)<sup>3)</sup>、転座に由来して生じた変異染色体 der(Y)<sup>4)</sup>、両腕に切断が生じ、着糸点を含む中央部の両端が再結合した環状染色体 r(Y)<sup>5)</sup>、2か所で切断が生じ、中央部が180° 転じて再結合した inv(Yp+, q-)<sup>6)</sup>、染色体の一部が切れ、他の染色体に組み込まれた ins(Y)<sup>7)</sup>、染色体が部分的に二重になっている dup(Y)<sup>8)</sup>、付随体を有する s(Y)<sup>9)</sup>、自験例のように染色体の一部が切れて失われたもの del(Yp), del(Yq)<sup>10)</sup> などがあり、単独あるいはモザイクの形で存在する(表1)。

表1 Y染色体の構造異常

同腕染色体	i(Y)
転座	t(Y)
二動原体	dic(Yp), dic(Yq)
転座に由来する変異染色体	der(Y)
環状染色体	r(Y)
逆位	inv(Yp+, q-)
挿入	ins(Y)
重複	dup(Y)
付随体	s(Y)
欠失	del(Yp), del(Yq)

46, XYq- はこれらの中でも稀で、1961年 Vaharu<sup>11)</sup>が初めて報告して以来世界で数十例、本邦でも自験例を含めて5例にすぎない<sup>12-15)</sup>(表2)。表現型は男性または女性を呈すが、本邦例では全て男性を呈した。また、染色体異常には両親の高齢が一因となることが多いため、生下時の両親の年齢を調べてみたが、高齢傾向はなかった。臨床像としては、外性器異常<sup>11,18)</sup>、

表2 46, XYq- の症例 (モザイク例を除く)

No.	報告年度	報告者	年令	主 訴	表現型	核 型	生下時年齢		身長	体重	外性器異常	第二次徴	知能遅延	奇 形 合併 症
							母親	父親						
1	1978	原田ら	48Y	低身長	男性	46,XYq-	25	31	138.7	25.0	-	+	+	口蓋裂 第4,5指の短指症 第5趾の短趾症
2	1979	山田ら	21Y	性器發育不全	男性	46,XYq-			161.0		+	-	-	女性化乳房
3	1983	藤田ら	11Y	外性器異常	男性	46,XYq-	23	25	138.0	32.5	+	/	-	
4	1983	広川ら	33Y	男性不妊	男性	46,XYq-	31		159.5	69.0	-	+	-	無精子症
5	1983	自験例	33Y	男性不妊	男性	46,XYq-	24	28	161.0	54.0	-	+	-	無精子症

低身長<sup>11,12,16,20)</sup>, 知能障害<sup>12)</sup>, 性腺發育不全, 短指趾症<sup>12,17)</sup>, 無精子症<sup>16,19)</sup>, 進行性筋萎縮症<sup>18)</sup>などの報告があり, 中でも外性器異常や低身長の報告が多く, 自験例でも身長がやや低いことと無精子症がみられた。

次に精巣への分化に必要な Y 染色体の gene map を示すと(図7), 短腕には, 特に動原体付近において, 精巣決定因子(testis determining factor; TDF)が存在する<sup>21)</sup>。これは H-Y 抗原(histocompatibility Y antigen)と同一ではないかと考えられており<sup>22)</sup>, これらの存在により性腺分化は精巣へと導かれる。他方, 長腕は一般に性腺の分化に関与しないものとされ, 活性のないものと考えられていたが, Yq- において無精子症や低身長がみられることなどから, 現在のところ q112 の遠位端には精子形成をコントロールする因子があり<sup>23)</sup>, q12 には身長に影響を与える因子が存在すると考えられている<sup>24)</sup>。自験例でも無精子症と身長がやや低かつたことから, q112 まで欠失があるのではないかと思われた。

### 結 語

不妊を主訴とした46, XYq- の1例を経験したので, 若干の文献的考察を加えて報告した。

稿を終るに際し, 性染色体異常につき御教示を頂いた富山医科薬科大学医学部第1解剖学教室松田健史教授に深謝致します。

本論文の要旨は, 第19回日本不妊学会北陸支部総会(昭和58年12月)において発表した。

### 文 献

- 1) Armendares, S., Buentello, L., Salamanca, F. and Cantu, J. M.: A dicentric Y chromosome without evidence of sex chromosomal mosaicism, 46, XYqdic, in a patient with features of Turner's syndrome. *J. Med. Genet.* 9: 96, 1972.
- 2) Jacob, P. A. and Ross, A.: Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature* 210: 352, 1966.
- 3) van den Berghe, H., Fryns, J. P. and David, G.: An autosome Y translocation restudied. *Humangenetik* 20: 375, 1973.
- 4) Berger, R., Lejeune, J. and Roy, J.: Trisomie 21 et Y metacentrique. *Ann. Genet.* 13: 187, 1973.
- 5) Khudr, G. and Benirschke, K.: Y ring chromosome associated with gonadoblastoma in situ. *Obstet. Gynecol.* 41: 897, 1973.
- 6) Nielsen, J. and Rasmussen, J.: Pericentric Y inversion. *J. Genet. Hum.* 22: 21, 1974.
- 7) Sofuni, I., Tanabe, K., Naruto, J. and Awa, A. A.: A new type of inversion of a human Y chromosome. *Humangenetik* 30: 91, 1975.
- 8) Sperling, K. and Lackman, I.: Large human Y chromosome with two fluorescent bands. *Clin. Genet.* 2: 352, 1971.
- 9) Genest, P.: Hereditary transmission since 300 years of a satellited Y chromosome in a family. *Ann. Genet.* 16: 35, 1973.
- 10) Fried, K., Rosenblatt, M. and Varsano, D.: A boy with 46, X, del(Y) due to a de novo mutation. *Hum. Hered.* 25: 472, 1975.
- 11) Vaharu, T., Patton, R. G., Voorhess, M. L. and Gardner, L. I.: Gonadal dysplasia and enlarged phallus in a girl with 45 chromosomes plus "fragment". *Lancet* i: 1351, 1961.
- 12) 原田禮子, 石飛和幸, 二宮哲博, 山藤靖展, 原田義道: 微小Y染色体を伴った短軀症の1症例内科, 41: 348, 1978.
- 13) 山田清美, 長谷川知子, 岩動孝一郎: 46, XYq- の1例: Yq- ヘテロクロマチンの意義について考察, 人遺誌, 24: 177, 1979.
- 14) 藤田幸利, 近藤捷嘉, 平野 学, 亀井義広, 大橋洋三, 松本 茂, 寺尾尚民, 住吉義光, 白石行正: Y染色体長腕部分欠損を認めた尿道下裂兼陰莖陰囊不完全位置異常症の1例, 日泌尿会誌, 74: 2154, 1983.
- 15) 広川 信, 岩崎 皓, 松下和彦, 朝倉茂夫: 男子不妊外来で診断された46, XYq- の症例について, 日不妊会誌, 28: 578, 1983.
- 16) Yunis, E., Garcia-Conti, F. L., Caballero, O. M. T. and Girald, A.: Yq deletion, aspermia and short stature. *Hum. Genet.* 39: 117, 1977.
- 17) Meisnes, L. F. and Inhorn, S. L.: Normal male development with Y chromosome log arm deletion (Yq-). *J. Med. Genet.* 9: 373, 1972.
- 18) Muldal, S. and Ockey, C. H.: Deletion of Y chromosome in a family with muscular dystrophy and hypospadias. *Brit. Med. J.* I: 291, 1962.
- 19) Neu, R. L., Barlow, M. J. and Gardner, L. I.: A 46, XYq- male with aspermia. *Fertil. Steril.* 24: 811, 1973.
- 20) Langmaid, H. and Laurence, K. M.: Deletion of the long arms of the Y chromosome with normal male development and intelligence. *J. Med. Genet.* 11: 208, 1974.
- 21) Davis, R. M.: Localization of male determining factors in man. *J. Med. Genet.* 18: 161, 1981.
- 22) Wachtel, S. S.: Where is the H-Y structural gene? *Cell* 22: 3, 1980.
- 23) Tiepolo, L. and Zuffardi, O.: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y

chromosome long arm. Hum. Genet. 34 : 119, 1976.

- 24) Yamada, K., Ohta, M., Yoshimura, K. and Hasekura, H. : A possible association of Y chromosome heterochromatin with stature. Hum. Genet. 58 : 268, 1981.

#### 46, XYq-in a patient with male infertility

**Isoji Sasagawa, Tameyoshi Terada  
and Takashi Katayama**

Department of Urology, Faculty of Medicine,  
Toyama Medical and Pharmaceutical  
University

Clinical features of 33 years old infertile male

associated with chromosomal abnormality, 46, XYq-, were reported.

Physical examination of the patient revealed normal habitus except the small testes. No sperm was observed in the seminal fluid.

The plasma LH and FSH values were slightly high in level compared with normal ones but the plasma testosterone value was below the normal range.

Histopathological examination of the pathologic testes represented a germinal cell aplasia.

(受付 : 昭和59年5月15日)

# AIH にて挙児に成功した逆行性射精の1例

—高度乏精子症で HMG/HCG 療法により改善—

A Case of Retrograde Ejaculation Whose Wife Conceived  
by Artificial Insemination with Husband's Semen  
—Treated by HMG/HCG Injection for Severe Oligozoospermia—

昭和大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 今村一男教授)

吉田英機 吉田 徹 渡辺政信  
Hideki YOSHIDA Tohru YOSHIDA Masanobu WATANABE  
内藤善文 今村一男  
Yoshifumi NAITOH Kazuo IMAMURA

Department of Urology, School of Medicine, Showa University  
(Director: Prof. Kazuo Imamura)

昭和大学医学部産婦人科学教室 (主任: 中山徹也教授)

矢内原 巧  
Takumi YANAIHARA

Department of Obstetrics and Gynecology, School  
of Medicine, Showa University  
(Director: Prof. Tetsuya Nakayama)

29歳の警察官。交通事故による腰椎圧迫骨折に対する外科手術後に発生した逆行性射精で、配偶者間人工授精 (AIH) により妊娠に成功した1例を経験したので報告した。本症例は精子濃度0.2million/ml の高度乏精子症を伴っていたため HMG/HCG 療法を施行したところ精液所見の著明な改善を認め、その後4回目の AIH にて妻の妊娠に成功し、正常分娩にて男児 (体重3,390g) を出産した。

逆行性射精に対し、AIH にて妊娠に成功した例は本邦においては第10例目であるが、高度の乏精子症を伴い、加療により精液所見の著明な改善を認めて成功した例は本症例が最初のものである。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 30(1), 119-123, 1985)

## 緒 言

男性不妊症の原因としての逆行性射精の占める頻度はさほど多いものではないが、近年の交通事故、骨盤内手術や整形外科的手術の増加に伴い今後増加しうことは充分予想される。我々は交通事故による腰椎圧迫骨折に対する、整形外科的手術後に発生した逆行性射精に高度の乏精子症を伴い、HMG/HCG 療法により精液所見の著明な改善を得、Hotchkiss の方法<sup>1)</sup>に準じ配偶者間人工授精を行ない挙児に成功した1例を経験したので報告

する。

## I. 症 例

患者: [ ] 29歳, 警察官  
初診: [ ]  
主訴: 射精障害  
家族歴: 特記すべきことなし  
既往歴: 昭和46年7月, 白バイ運転中に転倒し第5腰椎の圧迫骨折  
現病歴: 昭和46年腰椎圧迫骨折により某病院整形外科

に入院。ギプス固定にて4カ月後に退院。その後は射精は正常であつたが、腰痛と下肢のしびれが継続したため同年11月、第1回目の前方固定術を受けた。その後も射精障害はなかつたが腰痛が持続したため、昭和52年10月第2回目の前方固定術を受けた後約2週間目に orgasm はあるものの精液の射出がないことに気付いていたが放置。昭和56年2月、射精障害を承知の上結婚したが、妻の強い挙児の希望があり昭和56年9月3日、当科を紹介され来院した。妻は25歳で当院産婦人科にて精査の結果正常であつた。

現症：身長178cm、体重70kg で体格良好。外性器、前立腺とも正常。睾丸は両側13ml とやや小さいが硬度は正常。両側精管も触知。上腹部から下腹部にかけて約30cm の手術痕を認めた。

検査所見

神経学的検査正常。尿所見、血液、生化学検査正常。末梢血中ホルモン値は FSH 12mIU/ml, LH 14mIU/ml, PRL 32ng/ml, testosterone 6.2ng/ml と軽度の高PRL 血症はあるものの頭部レ線所見ではトルコ鞍の形状は正常であつた。

膀胱鏡・尿道鏡所見

膀胱鏡所見は正常であつたが尿道鏡にて内尿道口は軽度開大し、Schramm 現象を認めた。精阜は正常であつたが30ml の軽度残尿を認めた。

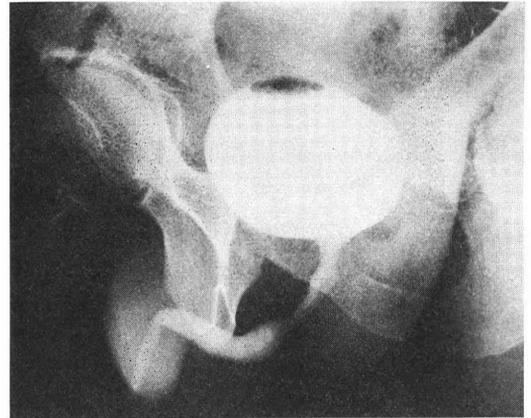


図1 排尿時尿道撮影

レ線所見

腰椎単純撮影で第5腰椎の圧迫骨折後の変形を認め、排泄性尿道撮影で図1に示したように膀胱頸部の軽度開大を認めた。

精液所見

残尿を認めたため導尿後、生食10ml を膀胱内に注入し、masturbation 後再導尿し採取液を1000rpm、5分間遠沈し検鏡したところ、精子濃度は $0.2 \times 10^6/ml$  の高度乏精子症で運動精子は認められなかつた。

睾丸生検は患者の承諾が得られず施行できなかつた。

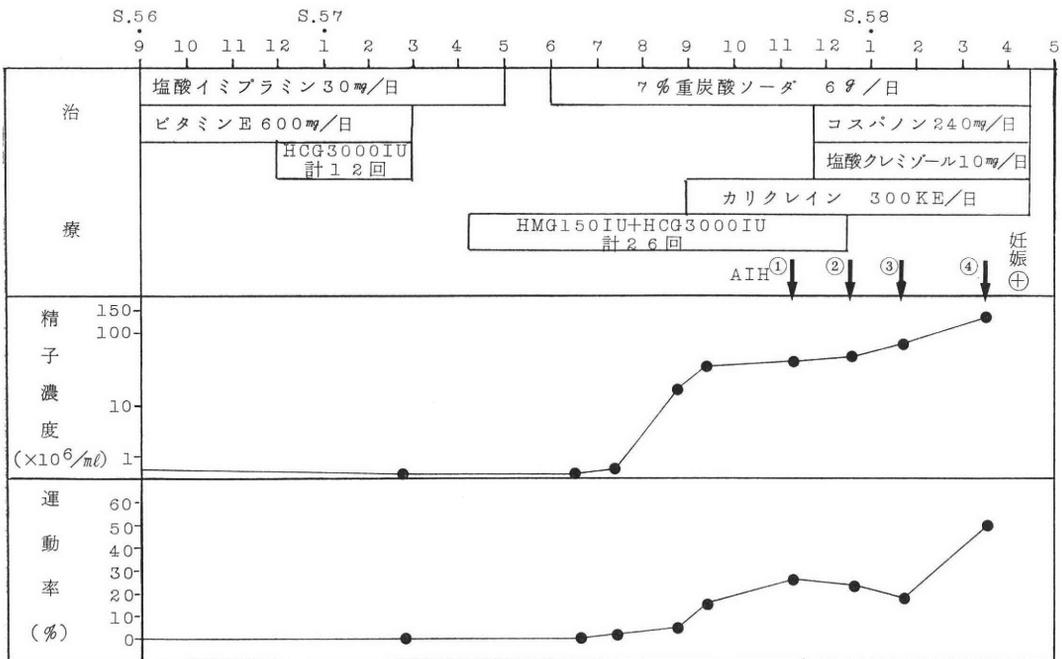


図2 治療経過と精液所見の変化

以後の精液検査は採取液を総べて遠沈して沈渣を回収し 1 ml の生食に浮遊し、通常の方法により<sup>2)</sup>精子濃度と運動率の測定を行った。

#### 治療および経過

治療経過について図 2 に示した。塩酸イミプラミン 30 mg とビタミン E 600 mg の内服を開始したが、仕事の都合で来院できないため近医に治療継続を依頼し、さらに HCG 3000 IU 週 1 回の内分泌療法も試みたが約 6 カ月経過するも順行性射精は得られず、精液所見も初診時と

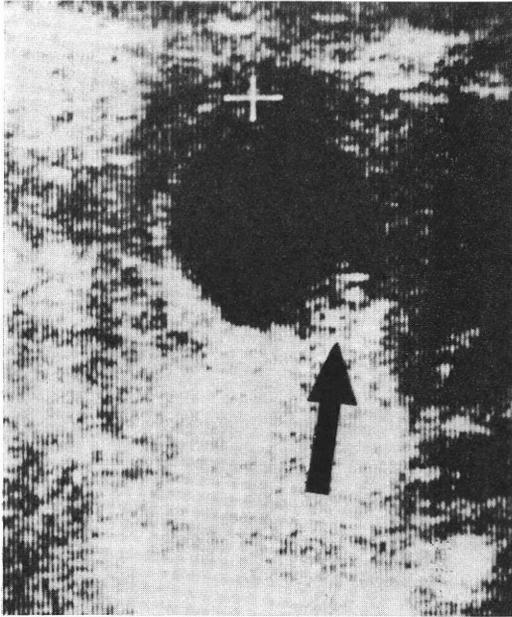


図 3 妊娠 8 週目の腹部超音波断層像 (矢印に胎児を確認)

同様の所見であった。昭和 57 年 4 月より当院への通院が可能となったため、HMG (Humegon®, 日本オルガノン) 150 IU と HCG 3000 IU の同時併用注射療法を開始したところ約 16 週後になり精子濃度  $28 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率 4% と精子濃度の著明な改善を認めた。運動率の増加を計るためカリクレイン 300 KE/日の内服療法も併用したところ、精子濃度の増加とともに運動率の改善も認めたため昭和 57 年 11 月より AIH を開始し、4 周期目で妊娠に成功した。その時の精子濃度は  $143 \times 10^6/\text{ml}$ 、運動率は 54% であった。AIH 直前の妻に対する処置として、排卵予定日の 3 日前より HMG 150 IU の連続投与を行わない AIH 当日は HMG 150 IU と HCG 10000 IU の混注を行った。その後の妊娠経過は順調で、妊娠約 8 週の腹部超音波断層検査では、図 3 に示したように胎児の発育も良好であり、昭和 58 年 12 月正常分娩にて無事 3,390 g の男児を出産した。

## II. 考 察

逆行性射精は、勝岡ら<sup>3)</sup>によれば 1862 年 Schultz が最初に記載したとされるが、この現象は男性不妊症の原因としては比較的稀なものと考えられ、布施ら<sup>4)</sup>の本邦における 1982 年までの集計でも、1958 年森らの報告した第 1 例以来 29 例にすぎない。その原因の 1 つとして、近年多数施行されるようになった TUR が問題となるが<sup>5, 6)</sup>、これらは高齢者が大部分であるため臨床にはさして問題とはならない。男性不妊症の面から問題となるのは胸腰部交感神経節切除術<sup>7)</sup>、後腹膜リンパ節郭清術<sup>8)</sup>、整形外科的手術、骨盤内手術<sup>9)</sup>、diabetic neuropathy<sup>10)</sup> などが挙げられ、これらの症例の増加に伴い今後増加することは充分予想される。

本症の特徴的な所見として木村ら<sup>11)</sup>によると内視鏡的には、精阜肥大、Schramm 現象、後部尿道の炎症所見と尿道膀胱撮影による膀胱頸部の開大がみられる。

本症の治療法としては、尿道プジー法<sup>12)</sup>、硝酸銀注入法や膀胱頸部縫縮術<sup>13)</sup>などが行なわれ、また内服療法として、内尿道口の閉鎖には、 $\alpha$ -adrenergic receptor が関与しているといわれていることから<sup>14)</sup>交感神経系賦活剤である Imipramine<sup>15)</sup> や COMT 阻害剤<sup>16)</sup>などが使用されている。

これらの内服療法や外科的処置によつて順行性射精となり、一部妊娠例が報告されているが決して成功率の高いものとはいえず、順行性射精とならなかつた例には AIH が施行されるが、尿が精子運動性に悪影響を及ぼすため精液採取や採取した精子の処理に種々工夫がなされている。その代表的なものとして、Hotchkiss 法<sup>1)</sup>があり、その方法を要約すると、1) 6 時間前より水分摂取を制限して尿量の減少を計り、2) 精液採取直前に Ringer's-glucose 液で膀胱内を洗滌し、3) 同 solution 2 ml を膀胱内に注入し、4) 直ちに masturbation を行なわせ、5) 自然排尿か導尿にて膀胱内精液を採取し、直ちに AIH を施行するという方法である。

我々はこの Hotchkiss の方法に準じたが、尿の pH を 7.0 ぐらいにするため 7 日前より重曹 6 g の服用を行なわせ、solution としては手軽に入手できる生食 (pH 6.8) を用い AIH にて妊娠に成功させ得た。また採取精液の AIH 直前の処理として Ringer's glucose solution 以外に 4% human serum albumine<sup>17)</sup> や 0.1% glucose 加 Ringer 液による精液静置法による良好運動精子回収による妊娠成功例も報告されており<sup>18)</sup>、今後 AIH による妊娠成功例も増加すると思われる。

本邦における逆行性射精の AIH による妊娠成功例は、表 1 に示したように白石ら<sup>19)</sup>の報告以来我々の症例

表 1 本邦における逆行性射精の AIH による妊娠成功例

No.	報告者	年度	年齢	発症	精子濃度	運動率	尿道膀胱鏡所見	尿道膀胱レ線所見	AIH 成功周期
1	白石ら <sup>9)</sup>	1969	30	自慰後	多数	30%	Schramm 現象(-) 後部尿道の発赤浮腫	膀胱頸部開大	4 周期目
2	勝岡ら <sup>3)</sup>	1974	34	自慰後	50×10 <sup>6</sup> /ml	50%	Schramm 現象(+) 精阜肥大	膀胱頸部開大 右精のう左側偏位	5 周期目
3	遠藤ら <sup>20)</sup>	1975	33	不明	不明	20~ 30%	精阜の浮腫 静脈の拡張	異常なし	7 周期目
4	藤原ら <sup>21)</sup>	1976	28	不明	32×10 <sup>6</sup> /ml	31%	施行せず	膀胱頸部開大	5 周期目
5	布施ら <sup>4)</sup>	1980	36	椎間板ヘルニア術後	86×10 <sup>6</sup> /ml	4%	Schramm 現象(+)	膀胱頸部開大	3 周期目
6	遠藤ら <sup>20)</sup>	1980	31	不明	不明	不明	施行せず	精阜肥大 後部尿道拡大	6 周期目
7	対木ら <sup>18)</sup>	1981	28	自慰後	34×10 <sup>6</sup> /ml	58%	施行せず	後部尿道開大 重複尿道	3 周期目
8	三浦ら <sup>22)</sup>	1983	不明	不明	111×10 <sup>6</sup> /ml	56%	不明	不明	15 周期目
9	鎌田ら <sup>23)</sup>	1983	44	糖尿病	11×10 <sup>6</sup> /ml	10~ 20%	不明	不明	1 周期目
10	自験例	1983	29	腰椎骨折術後	0.2×10 <sup>6</sup> /ml	0%	Schramm 現象(+)	膀胱頸部開大	4 周期目

が10例目であり、意外に少ないようである。さらにそのほとんどの例は、初診時より精液所見はほぼ正常値に近く、高度の乏精子症で HMG/HCG 療法<sup>24)</sup>により精液所見が著明に改善し妊娠に成功した例は我々の症例が最初であった。

### 結 語

高度の乏精子症を伴った逆行性射精の症例に対し、HMG/HCG 療法を施行し精液所見の著明な改善を認め、AIH により4周期目に挙児に成功した1例を報告した。本邦における逆行性射精の AIH による妊娠成功例は自験例が10例目であるが、高度乏精子症を伴い、治療により精液所見が著明に改善し、妊娠に成功した例は自験例が最初であった。

(本論文の要旨は第28回日本不妊学会総会において発表した。)

### 文 献

- Hotchkiss, R. S, Pinto, A. B. and Kleegman, S.: Artificial insemination with semen recovered from the bladder. *Fertil & Steril*, 6 : 37, 1955.
- 吉田英機: 分泌液検査のすすめ方—精液—,

*Medical Technology*, 9(13) : 1133, 1981.

- 勝岡洋治, 荻原正道, 藤岡俊夫, 東福寺英之, 小林俊文, 飯塚理八: AIH にて男児を得た逆行性射精の1例. *日不妊誌*, 20 : 19, 1975.
- 布施秀樹, 伊藤晴夫, 安田耕作, 島崎 淳, 真田寿彦: 逆行性射精の5例, *西日泌尿*, 44 : 1031, 1982.
- Rieser, C.: The etiology of retrograde ejaculation and a method for insemination. *Fertil & Steril*, 12 : 488, 1961.
- Ochsner, M. G, Burns, E. and Henry, H. H.: Incidence of retrograde ejaculation following bladder neck revision as a child. *J. Urol*, 104 : 596, 1976.
- Rose, S. S.: An investigation into sterility after lumbar ganglionectomy. *Brit. Med. J*, 31 : 247, 1953.
- Elliot, L. and Herbert, B.: Loss of ejaculation following bilateral retroperitoneal lymphadenectomy. *J. Urol*, 98 : 375, 1967.
- 白井将文, 松下鉛三郎, 一条貞敏, 竹内陸男, 佐々木桂一: 性生活調査成績; 第三報, 直腸, 結腸癌根治手術後の性生活, *日泌尿会誌*. 60 : 508, 1969.
- 浜崎利孝, 伊東三夫, 中野昌弘, 山本登士: 糖尿病に合併した逆行性射精の1例. *内科*. 39 : 169, 1974.
- 木村行雄, 安達国昭, 木崎 徳, 伊勢和久: 射

- 精の研究, 第7報, 射精障害症例の検討. 日泌尿会誌. 65: 218, 1974.
- 12) 小川正見: 逆行性射精の2例. 日不妊誌. 11: 67, 1966.
  - 13) Koraitum, M. and Al-Ghorab, M.: Normal ejaculation after Y-V urethrocytostoplasty. Brit. J. Urol, 42: 464, 1970.
  - 14) Abrahams, J. I, Solish, G. I, Boorjian, P. and Waterhouse, R. K.: The surgical correction of retrograde ejaculation. J. Urol, 114: 888, 1975.
  - 15) Brooks, M. E, Berezin, M. and Braf, Z.: Treatment of retrograde ejaculation with imipramine. Urology, 15: 353, 1980.
  - 16) 安達国昭, 木村行雄, 木崎 徳, 伊勢和久: trihydroxypropiophenone 投与が著効を示した射精障害の2例. 臨泌. 28: 535-537, 1974.
  - 17) Scammell, M. A, Stedronska, J. and Dempsey, A.: Successful pregnancies using human serum albumine following retrograde ejaculation: a case report. Fertil & Steril, 37: 277, 1982.
  - 18) 対木 章, 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 鈴木雅洲, 光川史郎, 大沼徹太郎: AIH にて妊娠に成功した逆行性射精の1例. 日不妊誌. 28: 172, 1983.
  - 19) 白石祐逸, 須藤 進, 高村郁世, 石川登喜治: 逆行性射精の1例—配偶者間人工授精の成功例— 臨泌. 25: 823, 1971.
  - 20) 遠藤俊明, 幡 洋, 東口篤司, 福島道夫, 岡部泰樹, 佐藤卓広, 田中昭一, 橋本正淑, 熊本悦明: AIH にて妊娠し, 生児を得た逆行性射精の2例. 産と婦. 49: 116, 1982.
  - 21) 藤原道久, 中山雅人, 小川重男, 田中啓幹: 人工授精に成功した逆行性射精例, 産と婦. 47: 884, 1980.
  - 22) 三浦一陽, 松橋 求, 高波真佐治, 藤尾幸司, 中山幸一, 白井将文, 安藤 弘, 平川 舜, 百瀬和夫, 岡田詔子: 逆行性射精例の人工授精成功例, 日本泌尿器科学会第48回東部連合総会予稿集. p. 156, 1983.
  - 23) 鎌田周作, 北田博大, 矢口輝仁, 大原基弘, 市村三紀男, 大塚晴久, 金村三樹男: AIH にて妊娠に成功した逆行性射精の1例. 日不妊誌. 28: p 582, 1983.
  - 24) 奥山明彦, 水谷修太郎: 男子不妊症の治療経験第1報, HCG/HMG 剤の併用について. 泌尿紀要. 26: 563, 1980.

A case of retrograde ejaculation  
whose wife conceived by artificial  
insemination with husband's semen  
—Treated by HMG/HCG injection  
for severe oligozoospermia—

**Hideki Yoshida, Tohru Yoshida,  
Masanobu Watanabe, Yoshifumi Naitoh  
and Kazuo Imamura**

Department of Urology, School of Medicine,  
Showa University

(Director: Prof. Kazuo Imamura)

**Takumi Yanaihara**

Department of Obstetrics and Gynecology,  
School of Medicine, Showa University  
(Director: Prof. Tetsuya Nakayama)

A 29 year-old male visited our clinic with the complaint of orgasm without ejaculation since he had underwent a transabdominal operation for the compression fracture of 5th lumbar vertebra 4 years ago. As he was a severe oligozoospermia (sperm density: 0.2 million/ml, motility rate: 0%) in the seminal analysis collected from the bladder, he was treated with the combination therapy of HMG/HCG for about 4 months. We observed significant improvement of his seminal findings after the HMG/HCG therapy and tried the artificial insemination (AIH) to his wife. His wife conceived after the 4th trial of AIH using the semen obtained by modified Hotchkiss' method and delivered a mature boy, weighting 3,390g, by normal delivery.

In Japanese literature, this case seems to be the 10th case which was successful artificial insemination with retrograde ejaculation, and to be the first case which was a severe oligozoospermia and was successful after the treatment by HMG/HCG injection.

(受付: 昭和59年3月10日)

## AIH にて妊娠・出産に成功した逆行 性射精の一例

A Case of Retrograde Ejaculation ; His Wife  
conceived and gave birth to a baby by AIH

神戸大学医学部泌尿科学教室

浜口 毅 樹 岡本 恭 行 岡 伸 俊  
Takeki HAMAGUCHI Yasuyuki OKAMOTO Nobutoshi OKA  
岡田 弘 羽間 稔 松本 修  
Hiroshi OKADA Minoru HAZAMA Osamu MATSUMOTO  
守殿 貞夫 石神 襄次  
Sadao KAMIDONO Joji ISHIGAMI

Department of Urology, School of Medicine, Kobe University  
(Director: Prof. Joji Ishigami)

神戸市立中央市民病院産科婦人科

小野 吉行 高島 英世  
Yoshiyuki ONO Hideyo TAKASHIMA  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Chuo-Shimin Hospital, Kobe, Japan  
(Director: Dr. Hideyo Takashima)

結婚後3年の、逆行性射精が原因の不妊夫婦に、配偶者間人工授精(AIH)を試み、第23回目のAIHで妊娠・出産に成功した。精子回収は市販のラクテックリングル液を、重曹にてpH 7.4に調整の後、その50 mlを勝注し、自慰行為後の尿を遠沈回収する方法で、妊娠時の調整された精液所見は、精子濃度 $80 \times 10^6/ml$ 、運動率66%、奇形率5%及び白血球1~2/視野であった。

本症例はわが国における、逆行性射精のAIHによる妊娠・出産例の第11例目と考えられる。

(Jap. J. Fert. Ster., 30(1), 124-129, 1985)

### 緒 言

完全型逆行性射精は、Orgasmに伴つて、Emissionはあるが精液が尿道口より膀胱内へ逆行するもので、無精液症の最も一般的な原因とされる。今回我々は不妊の治療としてAIHを施行し妊娠・出産に成功した逆行性射精の1例を経験したので、若干の文献的考察を加え報告する。

### 症 例

患者：31歳男性

初診：昭和54年10月19日

主訴：不妊

家族歴：特記すべき事なし。

既往歴：糖尿病、交感神経遮断剤の使用、手術及び外傷を始め、特記すべき事なし。

現病歴：生来健康であり、昭和51年に結婚、避妊せず3年間性生活を営むにもかかわらず不妊である。18歳時自慰行為を覚えて以来オーガズムはあるが、精液の射出を経験していない。妻は31歳で月経周期がやや不整であるが、基礎体温は2相性、卵管通過性良好、頸管粘液検

査等, 産科婦人科学的に異常を認めなかつた。血清中抗精子抗体は, 夫妻ともに陰性であつた。

現症: 栄養中等度にて体格強健。女性化乳房及び外陰部奇形等認めず。陰毛は男性型で, 精巢のサイズは, 右; 20×46mm, 左; 18×38mm, 両側精巢上体正常, 精管触知可能であり, 前立腺は触診上異常を認めなかつた。精索静脈瘤も認めていない。

検査所見: 自慰行為後直ちに排尿させ, 尿検査を行ったところ尿外観は混濁し, 沈査にて運動性良好な多数の精子を認めた。尿道膀胱造影及び尿道鏡では特記すべき所見は認められなかつた。

治療法と経過: 内活約筋の閉鎖不全を疑い交感神経刺激剤(塩酸イミプラミン<sup>1)</sup>)が初回20mg/日より, 200mg/日まで順次漸増した後, 4週間投薬された。しかし順行性射精は得られなかつた。

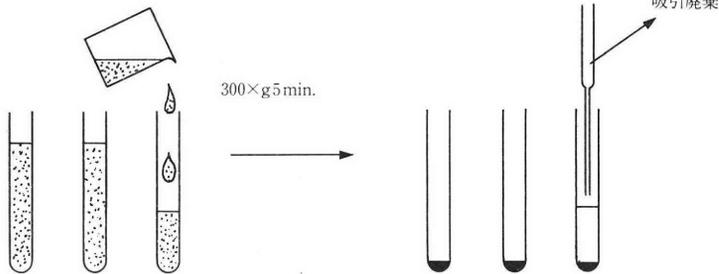
Table 1 膀胱注入液の組成

塩化カルシウム	0.2 g/l
塩化カリウム	0.3 g/l
塩化ナトリウム	6.0 g/l
乳酸ナトリウム	3.1 g/l
D-ソルビトール	50 g/l
重炭酸ナトリウム	1.5 g/l

そこで1955年 Hotchkiss により初めて報告された, 膀胱より精子を回収する方法<sup>2)</sup>に準じて精子を採取し AIH が行われた。尿の pH と浸透圧の影響を少なくする目的で, AIH 予定3日前より重曹 4 g/日, 当日朝には利尿剤を投与した。精子の回収にあたり, まず排尿させ, 直ちに pH 7.4 に調整された市販のラクテックリングル液(Table 1) 50ml を外尿道口より注入した後, 可及的速

Table 2 膀胱よりの精子回収, および AIH 用精子浮遊液の作製法

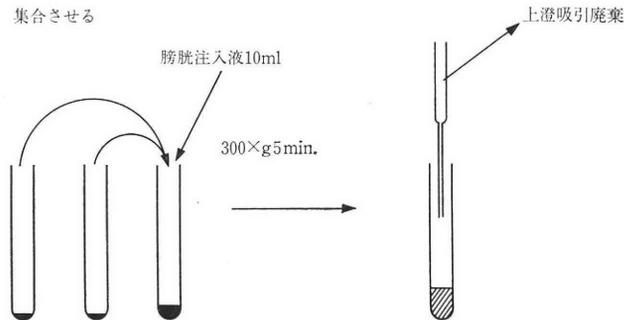
1. 前投与 (1) 重曹 4g, 2分×3日  
(2) フロセמיד 1tab 当日朝
2. 排尿后, 直ちに膀胱注入用液(別記)を膀胱する。
3. 自慰行為(用手法)后, 排尿により回収する。
- 4.
- 5.



滅菌試験管に分注する

精子 Pellet

- 6.
- 7.



精子 Pellet

管底数 ml を残し AIH へ

やかに自慰行為をさせた。Emission 後すぐに滅菌 コップに排尿させ、尿成分を取り除く目的で、それを滅菌試験管に分注後、300g×5分にて遠沈した。上澄を捨て、それぞれの管底の精子 pellet を新たな滅菌試験管 1本に集め、ラクテックリングル溶液10ml にて同様に洗浄遠沈を行った後、管底の数 ml を残し上澄を吸引廃棄、管底には精子と精漿が pellet 状に残された。次いで室温にて約20~30分放置し、精漿が十分液化し、精液所見を確認後、AIH に供された (Table 2)。

初回より第23回目 (妊娠時) までの回収精子浮遊液の所見が、Table 3 に示されている。AIH は、初回より

Table 3 AIH の経過  
N. D.; not done

周 期	精子濃度 (×10 <sup>6</sup> /ml)	運動率 (%)	奇形率 (%)	液量 (ml)
1	10	50	N. D.	5
2	20	55	N. D.	2.5
3	15	60	N. D.	2
4	18	55	N. D.	2
5	30	40	N. D.	1.5
6	28	65	N. D.	2
7	26	70	N. D.	2
8	24	55	N. D.	1.8
9	45	70	N. D.	1.5
10	7	30	N. D.	4
11	80	65	N. D.	2
12	55	40	N. D.	1.5
13	45	50	N. D.	2
14	40	30	N. D.	2
15	60	70	N. D.	1
16	60	60	N. D.	1
17	30	40	N. D.	2
18	57	55	10	0.8
19	34	38	10	1.2
20	39	44	10	0.8
21	35	65	10	1.1
22	44	66	10	1.2
23 (妊娠時)	80	66	5	1.2

第14回目までが当科、その後は神戸市立中央市民病院産科婦人科で行われた。昭和58年4月、初回より都合23回目の AIH にて妊娠に成功した。妊娠261日目、帝王切開にて4,074g の健康正常男児を出産した。妊娠時の回収精子浮遊液の所見は、液量1.2ml、精子濃度80×10<sup>6</sup>/ml、精子運動率66%、奇形率5%及び白血球1~2/視野であった。

なお、AIH 及び塩酸イミプラミン療法の他にも逆行

性射精に対する以下の治療法が試みられた。

膀胱充滿射精法 (1978年 Crich ら<sup>3)</sup>): 膀胱に尿が充滿した状態で、立位で自慰行為を行わせることにより順向性射精を誘起させる方法である。

腔内排尿法 (1976年 Schram ら<sup>4)</sup>): 排尿の後、性交し Emission にひきつづき陰茎を腔内に挿入したままの状態にて排尿する方法である。

これら両者及び尿道ブジー療法によっても期待された結果は得られなかった。

## 考 案

木村ら<sup>6)</sup>によれば、いわゆる射精とは精液の後部尿道への排出 (Emission) と精液の外尿道口からの射出 (Ejaculation) より成っており、Ejaculation の際には内尿道口は閉鎖しているとされる。逆行性射精はこの Ejaculation 時の内尿道口閉鎖不全により起り、最も一般的な、無精液症の原因で、Orgasm に伴って Emission はあるが、精液が内尿道口より膀胱内へ逆流するもので、1947年 Swaab により最初に報告された。

原因としては、①前立腺及び膀胱頸部手術 (特に経尿道的前立腺切除術及び経尿道的膀胱頸部切除術)<sup>7)</sup>、②糖尿病性神経症<sup>7,8)</sup>、③骨盤内手術<sup>7,9)</sup>、④胸腹部交感神経節切除術<sup>7,10)</sup>、⑤ chemical sympathectomy (グアネシジン等の薬物)<sup>11)</sup>、⑥後腹膜リンパ節郭清術<sup>7)</sup>、⑦尿道外傷<sup>12)</sup>、⑧脊髄の横断病変<sup>12)</sup>、⑨奇形<sup>12)</sup> (先天性重複尿道) などがあげられる。自験例は特記すべき原因はなく、特発性と考えられた。

本症では一般的には無精液症であり、尿道膀胱造影では、後部尿道の開大、膀胱底の下垂が認められ<sup>13)</sup>、膀胱鏡では、精阜肥大、後部尿道の炎症像、シュラム現象を<sup>14,15)</sup>、尿道膀胱圧測定では、最小尿意発現と共に強い尿意を覚える無抑制の傾向と、尿道圧の低下を認めることがある<sup>16)</sup>。確定診断は、マスターベーション後の中間尿が、視診にて白濁し、検鏡にて精子多数を認めることによりなされる。

内尿道口閉鎖には  $\alpha$ -adrenagic receptor が関与していることから、逆行性射精の治療法の1つとして、phenylpropanolamine<sup>17-19)</sup> などの  $\alpha$ -adrenagic stimulator や、塩酸イミプラミンなどの交感神経賦活剤<sup>10)</sup> が用いられている。一般に抗うつ剤として使用される塩酸イミプラミンは内尿道口開大が著明でないものに有効とされ、布施らは本剤の投与により5例中3例に順向性射精がおこつたとしている<sup>10)</sup>。

さらに CONT 阻害剤<sup>20)</sup>、L-DOPA<sup>21)</sup>、抗ヒスタミン、抗コリン剤である brompheniramine などが使用されている。

Table 4 逆行性射精の AIH による妊娠・出産成功例 (本邦)

No.	報告者	年度	夫の年齢	妻の年齢	不妊期間	基礎疾患	尿道・膀胱造影	尿道・膀胱鏡	AIH 周期	出生時体重・性別
1	白石	1971	30	—	5年	特記すべき事なし	頸部開大傾向	後部尿道に軽度発赤浮腫	4 周期	2350g・♀
2	勝岡	1973	34	—	3年	特記すべき事なし	頸部開大	後部尿道発赤浮腫・Schram現象	5 周期	3650g・♂
3	遠藤	1975	33	—	3.3年	特記すべき事なし	特記すべき事なし	精阜浮腫 静脈拡張	7 周期	2740g・♀
4	藤原	1978	28	—	0.8年	特記すべき事なし	頸部開大	—	5 周期	3520g・♀
5	布施	1980	36	—	—	椎間板ヘルニア手術	頸部開大傾向	Schram 現象	3 周期	3170g・♀
6	遠藤	1980	31	—	4.6年	特記すべき事なし	後部尿道拡大	—	6 周期	3310g・♀
7	対木	1983	28	—	3年	特記すべき事なし	頸部開大傾向 重複尿道	—	3 周期	1720g・♀
8	鎌田	1983	44	37	10年	糖尿病	—	—	1 周期	2365g・♂
9	内藤	1983	29	—	0.6年	腰椎前方固定術	—	Schram 現象	4 周期	—
10	兼松	1984	—	—	—	骨盤骨折後	—	—	—	—
11	自験例	1984	31	31	3年	特記すべき事なし	特記すべき事なし	特記すべき事なし	23周期	4074g・♂

機械的治療法として、尿道ブジーならびに硝酸銀の尿道内注入<sup>9)</sup>が試みられているが、自験例での尿道ブジー療法は期待された結果をもたらさなかつた。

手術治療としては、膀胱頸部縫縮術が有用とされ<sup>16,21)</sup>、本邦では順向性射精が回復した2例の報告があり、うち1例では妊娠に成功している<sup>21)</sup>。しかしながら手術の合併症として排尿障害の生ずる危険性も考えられ、適応を内尿道口開大が著明なものに限るなど、その選択は慎重であるべきとしている<sup>10)</sup>。

Full bladder 時の性交為<sup>9)</sup>や排尿後直ちに性交為を行い、Emission が起れば直ちに挿入状態のまま腔内排尿させる<sup>4)</sup>方法は簡単に行えるため、自験例でも試みたが成功しなかつた。

さて、以上の順向性射精を期待する治療法とは異なり、1954年 Hotchkiss により最初の妊娠・出産例が報告された、膀胱内より精子を回収して AIH に用いる方法がある。わが国では、1971年白石ら<sup>22)</sup>の報告が最初である。以後、諸家により、Hotchkiss 法原法やそれに準じた方法による妊娠・出産例が報告されてきた。膀胱精子回収法は精子運動率に悪影響を及ぼすとされる尿の (i) 低い pH., (ii) 高い浸透圧, (iii) 尿素チッ素、の影響をできるだけ減少させるよう注意すべきである。このためには、重曹投与による pH の調整や、利尿剤による尿の低張化等が行われるがその効果を疑問視する報告<sup>23)</sup>もみられる。また同様の目的で、Emission 後直ちに培養液を膀胱内注入し、精液を回収する方法が行われる<sup>23,24)</sup>。

また回収された精子から、精液重層静置法により、運動良好な good sperm を選別し、AIH に用いる報告も

ある<sup>12)</sup>。

尿には精子の capacitation 阻害物質が含まれていると推測されるため今後は回収精子の授精能の検討も必要であると考えられる。

自験例の AIH 法は、Hotchkiss 法に準じた方法で、膀胱内注入液には市販のラクテックリンゲル液が用いられ、Hotchkiss が水分制限により尿の影響を減少させることを考えたに対し、Mahadevan<sup>24)</sup>と同様の考えから水分摂取と利尿剤により尿浸透圧を下げ、正常精漿の浸透圧に近づける方針がとられた。

飯塚ら<sup>25)</sup>は、不妊患者における AIH による妊娠成立の平均周期は3.9周期であり、10周期までに90%以上が妊娠に成功することからそれ以上 AIH を行つても妊娠成立をみない場合は、免疫学的検査等不妊原因の再検討が必要としている。

逆行性射精症で、AIH により妊娠・出産に成功したとする報告は、本邦では10例であり<sup>26)</sup>、自験例は11例目と考えられた。これらの報告では、AIH 施行周期は、1~7回である (Table 4)。自験例は23回と著明に多いがこれは妻の月経周期不整の影響によるものと考えている。

逆行性射精に対しては前述の種々の治療法があり、特に薬物療法はまず試みるべき治療と考えられる。しかし順向性射精が得られない時は、本症の大部分が不妊のみを主訴として来院することを考えると、不妊の治療としての AIH は、簡便さと安全性の面から非常に有用と思われる。

## 結 語

膀胱より回収した精子を用いての AIH 療法により、妊娠分娩に成功した逆行性射精の 1 例を報告し、若干の文献的考察を加えた。

(尚本論文の要旨は、1984 年 6 月、第 3 回日本アンドロロジー学会に於て口演した。)

## 文 献

- 1) Brook, M. E., Berezin, M. and Braf, Z.: Treatment of retrograde ejaculation with imipramin, *Urology*, 15 : 353, 1980.
- 2) Hotchkiss, R. S., Pinto, A. B. and Kleegman, S.: Artificial insemination with semen recovered from the bladder, *Fertil & Steril*, 6 : 37, 1955.
- 3) Crich, J. P., Jequier, A. M.: Infertility in men with retrograde ejaculation; the action of urine on sperm motility, and a simple method for achieving antegrade ejaculation *Fertil & Steril*, 30 : 572, 1978.
- 4) Schram, J. D.: Retrograde ejaculation; a new approach to therapy, *Fertil & Steril*, 27 : 1216, 1976.
- 5) 小川正見 : 逆行性射精の 2 例. *日不妊会誌*, 11 : 67, 1966.
- 6) 木村行雄 : 射精のメカニズム, *臨泌*, 34 : 103, 1980.
- 7) Kragt, F. and Schellen, A.: Clinical Report about some cases with retrograde ejaculation: *Andrologia*, 10 : 381, 1978.
- 8) 浜崎利孝ら : 糖尿病に合併した逆行性射精の 1 例, *内科*, 39 : 169, 1977.
- 9) 白井将文ら : 性生活調査成績, 第 III 報, 直腸, 結腸癌根治手術後の性生活, *日泌尿会誌*. 60 : 508, 1969.
- 10) 布施秀樹, 伊藤晴夫, 安田耕作, 島崎 淳, 真田寿彦 : 逆行性射精の 5 例, *西日泌尿*. 44 : 1031, 1982.
- 11) 布施秀樹他 : AIH にて妊娠に成功した逆行性射精の 1 例, *日不妊会誌*, 26 : 280, 1981.
- 12) 対木 章, 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 京野広一, 鈴木雅洲, 光川史郎, 大沼徹太郎 : AIH にて妊娠に成功した逆行性射精の 1 例, *日不妊会誌*, 28 : 172, 1983.
- 13) 穴戸仙太郎, 木村行雄 : 射精障害の病態. *生理と臨床*, *日医新報*. (2630) : 6, 1974.
- 14) 安達国昭 : 第 6 報, 射精時における内尿道口の閉鎖の末梢機構について, *日泌会誌*, 64 : 484, 1973.
- 15) Hotchkiss, R. S. et al.: Artificial insemination with semen recovered from bladder, *Fertil & Steril*, 6 : 37, 1955.
- 16) 白井将文, 松下鉄三郎, 加賀山学, 一条貞敏, 竹内睦男, 佐々木桂一 : 射精障害による男子不

妊症, *日不妊会誌*, 13 : 84, 1968.

- 17) Virupannavar, C., Tomera, F.: An unusual case of retrograde ejaculation and a brief review of management, *Fertil & Steril*. 37 : 275, 1982.
- 18) Thiagarajah, S., Vaughan, E. D. and Kitchin, J. D.: Retrograde ejaculation: successful pregnancy following combined sympathomimetic medication and insemination, *Fertil & Steril*, 30 : 96, 1978.
- 19) Kimura, Y., Miyata, K., Adachi, K. and Matsumura, S.: The role of alpha-adrenergic receptor mechanism in ejaculation, *Tohoku, J., exp., Med.*, 108 : 337, 1972.
- 20) 安達国昭, 木村行雄, 木崎 徳, 伊勢和久 : T-rihydroxypropiophenone 投与が著効を示した射精障害の 2 例, *臨泌*. 28 : 51, 1974.
- 21) 伊勢和久他 : 膀胱頸部形成術により軽快した逆行性射精の 2 例, *臨泌*. 28 : 635, 1974.
- 22) 白石祐逸, 須藤 進, 高村郁世, 石川登喜治 : 逆行性射精の 1 例—配偶者間人工授精の成功例一. *臨泌*. 25 : 51, 1971.
- 23) 遠藤俊明, 幡 洋, 東口篤司, 福島道夫, 岡部泰樹, 佐藤卓広, 田中昭一, 橋本正淑, 熊本悦明 : AIH にて妊娠し, 生児を得た逆行性射精の 2 例, *産科と婦人科*, 49 : 117, 1982.
- 24) Mahadevan, M., Leaton, J. F. and Traunson, A. O.: Noninvasive method of semen collection for successful artificial insemination in a case of retrograde ejaculation, *Fertil. & Steril*. 36 : 243, 1981.
- 25) 飯塚理八・他 : 男子不妊症の治療—婦人科の立場から, 特に AIH について—, *臨泌*. 31 : 485, 1977.
- 26) 兼松豊和, 山野修司, 奈賀 脩, 森 崇英, 横関秀明, 黒川一男 : 逆行性射精に対し AIH を施行し妊娠に成功した 1 例, *日不妊会誌*. 29 : 254, 1984.

A case of retrograde ejaculation ;  
his wife conceived and gave  
birth to a baby by AIH

**Takeki Hamaguchi, Yasuyuki Okamoto,  
Nobutoshi Oka, Hiroshi Okada,  
Minoru Hazama, Osamu Matsumoto,  
Sadao Kamidono and Joji Ishigami**

Department of Urology, School of  
Medicine, Kobe University  
(Director : Prof. Joji Ishigami)

**Yosiyuki Ono, and Hideyo Takashima**  
Department of Obstetrics and Gynecology,  
Chuo-Shimin hospital, Kobe, Japan  
(Director : Dr. Hideyo Takashima)

A 31-year-old male whose evaluation revealed

retrograde ejaculation were successfully applied for 23th. AIH. The spermatozoa were gently obtained by means of modified Hotchkiss method. On May, 1983, his wife happily announced she was late for her period and 261 days later from AIH she gave birth to a normal healthy baby

boy.

In Japan, this birth may be the eleventh one in the case of successful artificial insemination with retrograde ejaculation.

(受付：昭和59年6月30日)

## 先天性陰茎彎曲症の3例

### 3 Cases of Congenital Curvature of the Penis

名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 三矢英輔教授)

成田晴紀 三宅弘治 三矢英輔  
Harunori NARITA Koji MIYAKE Hideo MITSUYA

Department of Urology, Nagoya University  
School of Medicine, Nagoya  
(Director: Prof. Hideo Mitsuya)

先天性陰茎彎曲症の3例を経験した。1例は左方彎曲であり、他の2例は腹側彎曲であった。2例に対し Nesbit の方法に準じ手術を行ない満足ゆく結果が得られた。この手術法は、優れた外科的手段であり手技も簡便である。本邦および外国文献より43例の報告があり、このうちの23例につき検討を行なった。

(Jap. J. Fert. Ster., 30(1), 130-135, 1985)

#### 緒言

陰茎彎曲を呈する疾患は先天性と、後天性がある。先天性疾患のうち通常みられるものは尿道下裂であるが、その他、尿道上裂、陰茎捻転症、陰茎彎曲症等があるが、これらはきわめて稀な疾患である。後天性のものとしては、形成性陰茎硬結 (Peyronie 病)、尿道炎の二次的变化、陰茎外傷等が挙げられている。尿道炎、外傷等の既往もなく、陰茎に線維性索、硬結等もみられず、勃起時のみ陰茎の彎曲を呈する先天性陰茎彎曲症は1965年 Nesbit<sup>1)</sup> によりはじめて報告されているが、我が国ではもちろんのこと諸外国においてもこの症例の報告は少ない。今回、先天性陰茎彎曲症の3例を経験したので若干の考察を加え報告する。

#### 症例

##### 症例 1

患者: 26歳, 男性, 未婚。

主訴: 陰茎屈曲, 精神的不安。

既往歴: 尿道炎や陰茎外傷の既往なし。

現病歴: 高校2年生の時, 勃起時, 陰茎が左方に屈曲するのに気づいたが特に勃起時疼痛は伴わなかった。以降この勃起時の屈曲を苦にしていたが, 徐々に精神的不安が高まり, 昭和56年11月に某院を受診したが陰茎の異常もなく放置するよういわれた。しかし, 患者が強い不

安感を訴えたため当科に紹介され受診した。当科にても外陰部に異常は認められなかったが, 患者が陰茎根部左側に硬結を訴えたため, 数回その陰茎根部あたりにステロイドの局注をうけた。しかし改善はみられなかった。

現症: 体格中等度, 胸・腹部異常所見なし。外生殖器にも異常は認められず, 陰茎の触診では線維性索, 硬結等の異常を認めず, 非勃起時は彎曲もみられない。当外来で勃起状態の観察を試みたが, 不成功であったため, 患者自身に自宅で勃起時にポラロイド写真をとり持参するよう指示し, この写真より先天性陰茎彎曲症と診断し得たため, 手術目的のため入院となる。

患者自身の撮影したポラロイド写真より, 勃起状態の陰茎は陰茎根部より  $\frac{1}{4}$  の部位より左方に  $30^\circ$  屈曲し, 時計回りに  $90^\circ$  捻転を伴っていた (図1)。

陰茎海綿体撮影: 陰茎海綿体に病変の有無を確かめる目的で陰茎海綿体撮影を施行した。陰茎振子部にて右側陰茎海綿体に20Gの注射針を刺入し, 針の先端がX線透視下にて右陰茎海綿体内に入っているのを確認し, 60% ウログラフィンを約10ml 注入し造影を行なった(図2)。陰茎海綿体像からは左右不同, 欠損像等の所見は認められなかった。さらに, 陰茎根部を絞扼し, 約20ml の造影剤を注入することにより, 半勃起の状態が得られたが, 陰茎は軽度に左方屈曲し, 陰茎海綿体像からもこの所見が確認された。

手術所見: 硬膜外麻酔下にて, まず左右陰茎海綿体白

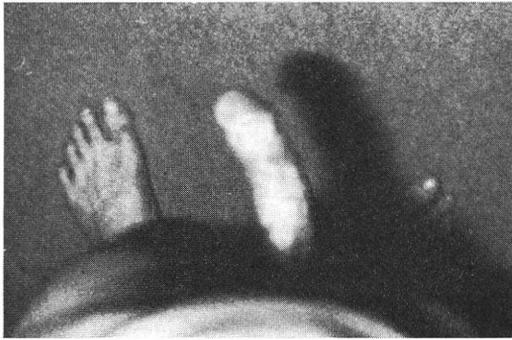


図1 症例1 術前の勃起時のポラロイド写真

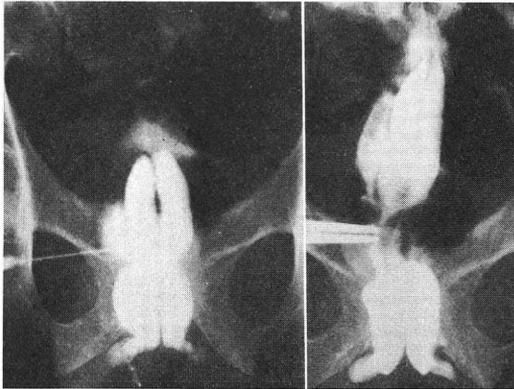


図2 症例1 術前の陰茎海綿体造影  
(左：造影剤10ml, 右：造影剤30ml)

膜の状況を観察するため陰茎根部より陰茎遠位 $1/2$ までを縦に陰茎側方で左右2ヶ所の皮膚切開を加えた。Colles' fascia を切開し、次に Buck's fascia を切開することにより陰茎海綿体白膜を触診するも、硬膜や白膜の異常等の所見はなかつた。勃起時、陰茎は左方に屈曲し、時計針進行方向に捻転することを確認するため、陰茎根部を絞扼し約50ml の生理的食塩水を陰茎海綿体に注入した。陰茎は半勃起状態となり、左方に彎曲し時計回りに軽度の捻転を呈した。そこで右陰茎海綿体の側上方でやや背側の Buck's fascia を切開して右陰茎海綿体白膜を露出し、陰茎根部やや遠位側から陰茎中央部までの間で3ヶ所に Nesbit<sup>1)</sup> の手術に準じて陰茎海綿体白膜を  $3 \times 7$

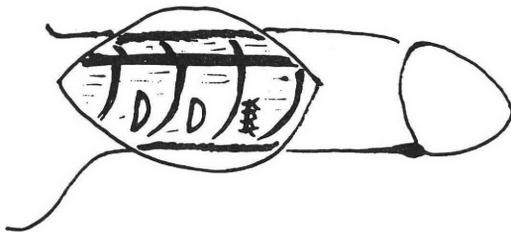


図3 症例1 左方彎曲に対する手術法の模式図

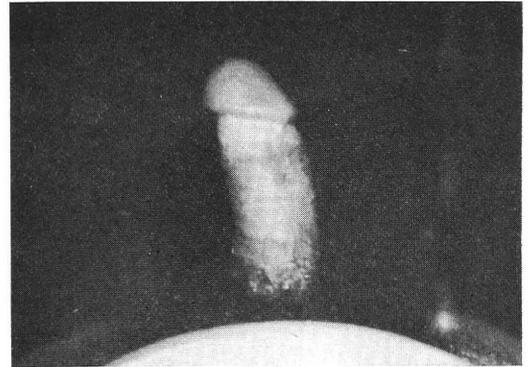


図4 症例1 術後勃起時のポラロイド写真

cm の大きさで紡錘形に切除した(図3)。白膜切除にて出血は認められるが手指圧迫で止血は十分であつた。この切除した3ヶ所ともに4-0 Dexon 糸にて3針、横に縫合し出血のないことを確かめた後、Buck's fascia, Colles' fascia を各々縫合閉鎖し皮膚を縫合して手術を終る。

術後経過：術後、陰茎の浮腫もなく手術創は順調に治癒し創部痛なく退院となる。退院後患者自身撮影した写真から勃起時の陰茎は屈曲は認められなかつた(図4)。しかし、依然として時計回りの捻転は軽度みられ、勃起時の陰茎の長さがやや短くなつたと訴えているが患者自身は十分に満足しており、性格的にも明るさを取り戻した。

症例 2

患者：31歳，男性，既婚。

既往歴・家族歴：特記すべきものなし。

主訴：勃起時の陰茎屈曲。

現病歴：結婚して7年目を迎え、子供は2人いるが、妻との性交で夫婦ともに疼痛を伴うため、性交体位などに種々工夫をしてきたが、依然として性交で局所に疼痛があり、性雑誌などからの情報で陰茎の腹側屈曲に不審を感じたため当科受診した。

現症：非勃起時の陰茎は屈曲もなく、陰茎には索など

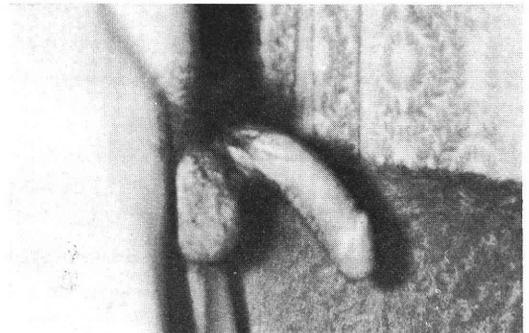


図5 症例2 勃起時のポラロイド写真

の線維性硬結等も認められなかった。又、勃起時に陰茎は強く腹側へ屈曲するも疼痛はない。

患者の持参したポラロイド写真(図5)より、腹側45°に屈曲した先天性陰茎彎曲症と診断し、手術の承認も得、入院予約までに至るも、手術に対する恐怖心とすでに子供も2人いることより患者及び妻の希望により手術中止の申し出があり、手術未施行のまま現在に至っている。

### 症例 3

患者：30歳，男性，未婚。

既往歴：中学生の時，勃起時の外陰部打撲。

家族歴：特記すべきものなし。

主訴：勃起時の陰茎屈曲。

現病歴：中学生の時，勃起時に陰部を蹴られ，疼痛は軽度で皮下出血も陰茎腫脹もなかったため放置していた。その後，勃起時に陰茎の腹側屈曲に気づいたが，勃起時疼痛はなかった。最近，性交時に疼痛を伴い陰茎が半分位しか陰内に挿入出来ないため当科を受診した。

現症：陰茎触診にて異常はなかったが，非勃起時にも陰茎は軽度腹側に屈曲がみられた。外来にて勃起時のポラロイド写真を撮影した所，陰茎は根部より1/2の部位で25°腹側への屈曲がみられ先天性陰茎彎曲症と診断した(図6)。

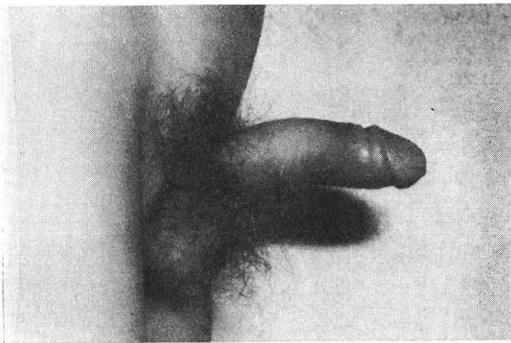


図6 症例3 術前勃起時のポラロイド写真

先天性陰茎彎曲症では，既往歴に陰茎外傷のないのが前提であるが，この症例では陰部打撲の既往がある。しかし，この際，陰茎腫脹，皮下出血等の症状もなかったことより，陰茎彎曲はこの陰茎打撲に関係するとは思われず患者の性器に対する関心がこの episode で増幅され陰茎屈曲に気づいたものと推察され，先天性陰茎彎曲症と診断した。患者も手術を強く希望した。

手術所見：第1例と異なり腹側屈曲であるため，陰茎背側の正中に縦の皮膚切開を加え，Colles' fascia を切開し，左右の Buck's fascia を切開し両側陰茎海綿体白膜の背側を露出した。陰茎背動静脈をさけ又，リンパ管

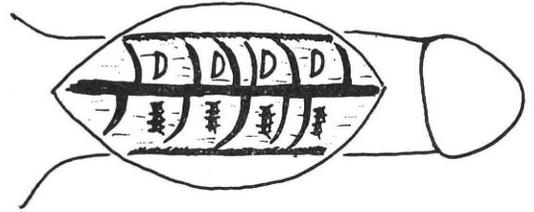


図7 症例3 腹側彎曲に対する手術法の模式図

は白膜切除術部分で切離した。図7の如く，白膜を左右4ヶ所ずつ紡錘形に切除し，4-0 Dexon 糸にて3-4針で横に縫合した。出血のないのを確かめた後，Buck's fascia, Colles' fascia を各々縫合閉鎖し，皮膚縫合を行ない手術を終了した。

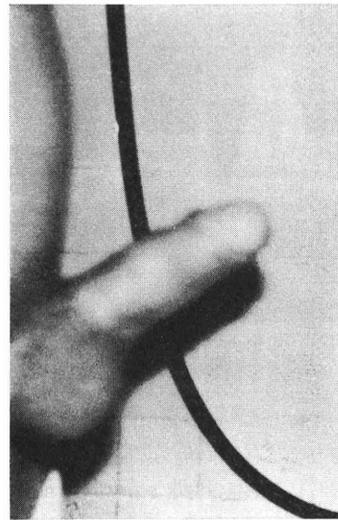


図8 症例3 術後勃起時のポラロイド写真

術後経過：術後創部は順調に経過し包皮の浮腫もなく退院となった。術後1カ月後の勃起時ポラロイド写真より，腹側屈曲は消失しており性交時の陰内への陰茎挿入は完全に患者は満足している(図8)。

### 考案

陰茎彎曲症は原因不明の先天性奇形であり，非勃起時にはほとんどの症例が正常の形を示し，勃起時のみ陰茎屈曲を呈する特徴をもち，陰茎海綿体白膜の勃起時における進展性の差異により屈曲する方向が異なってくると考えられている。

先天性陰茎彎曲症は Nesbit<sup>1)</sup> により始めて報告され，その手術法に対しても詳しく述べており，現在でも陰茎彎曲症の主な手術法の1つとなっている。その後も症例報告が散見されるが，外国では34例，本邦においても自

表 1 先天性陰茎彎曲症の報告例

No.	報告者	発表年	年齢	主 訴	彎曲方向	角度	皮切	手術法(手術側)
1	Nesbit	1965	—	陰茎屈曲・精神的不安	側方	—	輪状	Nesbit(側方)
2	Nesbit	1965	19	陰茎屈曲	腹側	—	輪状	Nesbit(背側)
3	Nesbit	1965	—	—	腹側	—	輪状	Nesbit(背側)
4	Correa	1971	26	性交困難	左側方	90°	輪状	Nesbit(右側方)
5	Saalfeld	1973	—	性交困難	腹側	60°	—	Nesbit(背側)
6	Saalfeld	1973	—	性交困難	腹側	60°	—	Nesbit(背側)+Saalfeld(腹側)
7	Saalfeld	1973	—	性交困難	腹側	60°	—	Saalfeld(背・腹側)
8	吉畑ら	1973	24	陰茎屈曲	左側方	—	—	Nesbit(右側方)
9	Pond	1974	17	精神的問題	腹側	—	縦	Nesbit(背側)
10	Pond	1974	20	精神的問題	腹側+側方	—	縦	Nesbit(背側)+Nesbit(側方)
11	Gavrell	1974	22	性交不能	左側方	90°	輪状	Nesbit(右側方)
12	Redman	1975	22	陰茎屈曲・性交困難	右側方	60°	輪状	Nesbit(左側方)
13	松村ら	1976	24	陰茎屈曲・性交時疼痛	腹側	45°	—	Nesbit(背側)+Saalfeld(腹側)
14	松村ら	1976	29	—	左側方	—	—	Nesbit(右側方)
15	松村ら	1976	33	—	側方+腹側	—	—	Nesbit
16	中島ら	1978	24	精神的不安	腹側	45°	輪状	Nesbit(背側)
17	中島ら	1978	21	性交不能	腹側	60°	輪状	Nesbit(背側)
18	Udall	1980	—	性交困難	側方	—	縦	Nesbit(側方)
19	Udall	1980	—	性交困難	腹側	—	輪状	Nesbit(背側)
20	Udall	1980	—	—	背側	—	縦	Nesbit(腹側)+Saalfeld(背側)
21	自験例	1983	26	陰茎屈曲・精神的不安	左側方	30°	縦	Nesbit(右側方)
22	自験例	1983	31	陰茎屈曲・性交時疼痛	腹側	45°	—	未施行
23	自験例	1983	30	陰茎屈曲	腹側	25°	縦	Nesbit(背側)

験例を含め9例と思つたより少ない。結局、現在まで43例<sup>1-11)</sup>の報告がされているわけであるが、Kelami<sup>11)</sup>の20例は詳細な記述がないため23例<sup>1-10)</sup>につき文献的考察を加える(表1)。

1. 年齢

17歳から33歳で平均24.5歳であつた。患者の大半は思春期後半から結婚適齢期の男性であつたが、挿入不能が主訴となるためと考えられる。

2. 主訴

もつとも多いのが挿入不全を含む挿入不能や挿入時疼痛による挿入困難で9例、次いで陰茎屈曲8例、精神的問題5例、性交時疼痛2例であつた。自験例の症例1でもあつたように、精神的問題を訴えた症例が予想外に多い。このような症例はほとんど、結婚適齢期を控えた25歳前後であり、性交時の挿入困難が原因となり神経症に陥るものと考えられ、さらに非常に稀な疾患であるため、適確な診断が得られないまま各病院を転々とし、なお一層精神的不安が増すものと思われ、我々の症例1も反省させられる症例であつた。

3. 陰茎屈曲の方向及び程度

勃起時の陰茎屈曲は生直後より出現すると Correa<sup>2)</sup>

は述べているが、報告されている大部分の症例は思春期頃に患者自身が気付いている。よつて年齢が進むにつれてこの屈曲の程度が増加してくるものか、性器に対する関心度が低く勃起時の陰茎屈曲に気付いていなかったのは定かではない。

陰茎屈曲の方向でもつとも多いのが、腹側屈曲の12例、次いで側方屈曲の8例でこのうち左方屈曲5例、右方屈曲1例、不明2例であつた。背側屈曲は1例でもつとも少なかつた。又、腹側屈曲と側方屈曲が同時にみられたのが2例あつた。自験例の症例1では左方屈曲であつたが、時計回り90°の捻転を伴つたように、陰茎彎曲症の屈曲方向はかなり変化に富んだものようである。これは陰茎海綿体の進展性の異常に差があるためと想像される。次に、陰茎屈曲の程度をみると、25°~90°に分布し、大部分は45°~60°であり平均55.8°であつた。

4. 診断

この疾患の特徴の1つとして尿道下裂、Peyronie病等のような線維性索及び硬結を陰茎に触知せず、陰茎は非勃起時に正常な形をし屈曲のないことである。しかし、Correa<sup>2)</sup>は非勃起時にもある程度の陰茎屈曲を認めた1例を報告しているが、この1例と自験例の症例3

を除きすべての症例は非勃起時には陰莖屈曲を示さない。次いで勃起すると陰莖は正常の勃起とは異なつた方向に屈曲を示すが、疼痛は伴わない。

X線学的検査で、古畑<sup>4)</sup>は尿道撮影、陰莖海綿体撮影を行ない正常であつたと報告し、我々も陰莖海綿体撮影を症例1に行ない陰莖海綿体には異常のないことを確かめたが、さらに陰莖根部を絞扼し半勃起状態の造影においては左右陰莖海綿体の長さに差がみられ左方への屈曲を確認した。陰莖海綿体自体の器質的变化はないが、白膜の進展性に差があるためこの陰莖屈曲を引き起こすものと考えられる。

なお診断に絶対必要なのは勃起時における陰莖屈曲を医師自身が確認することである。診察室にてこれを確認することは患者の羞恥心等からきわめて困難である。生理的食塩水の見綿体への急速注入(90ml/分)により人為的勃起は可能であるが、患者自身による写真撮影がもつとも有用と考えられる。撮影方法は Kelami<sup>12)</sup> の Autophotography が簡便で有用であると報告している。ただし、ポラロイド写真の場合は自験例でもあつた如く focus が問題となることがある。

#### 5. 手術法

勃起時の陰莖彎曲の方向を正確に確かめるのが前提となる。この彎曲を矯正するには、1) 陰莖海綿体白膜の短い側を長くする。2) 長い方の白膜を短くする。の2方法が考えられる。この疾患に最初に経験した Nesbit<sup>1)</sup> は陰莖海綿体白膜が勃起に重要な組織であるため、勃起障害を懸念し、長い方の筋膜のみを6ヶ所縫縮する術式を試みた。短期経過では満足のゆく結果となつたが、術後6カ月で彎曲が元に戻つてしまつた。そこで再手術を施行し、現在 Nesbit 法として知られている方法を行なつた。長い側の陰莖海綿体白膜を紡錘形に切除しこれを横に縫合し、1.5cm 間隔に行ない良好な成績を修め3例に施行している。Nesbit は2)の方法を選択したが、Saalfeld<sup>3)</sup> は1)と2)の併用を試み良好な結果を得ている。彼の3例はともに60°の腹側彎曲であり、1例に対し、長い方の背側に1.5cm 縦切開を2カ所に行ない横に縫合し、腹側には左右とも横切開し縦に縫合した。もう1例は背側に5対の Nesbit 法を施行し、腹側に4対の横切開の縦縫合で修復し、残りの1例は3対の Nesbit 法のみであつた。3例とも形態的にも成功した。松村<sup>8)</sup>、Udall<sup>10)</sup> も、Nesbit 法にこの Saalfeld の方法を併用し、満足の結果を得ている。Saalfeld の方法は陰莖長をさほど短縮させずに出来るという利点がある。しかし、海綿体の幅に差が出来、又、dog ear ができ凸凹が生ずる可能性がある。手術方法に関しては、Nesbit の方法が主体で、Saalfeld の方法は補助的なもののように思われる。

陰莖の皮膚切開はほとんどの症例は冠状溝に近い部位での輪状切開であるが、我々は縦切開を選択した。理由は、包莖、尿道下裂等で輪状切開を加えると術後包皮に浮腫が生ずることが多い。つまりリンパ系の損傷が多いと想像したからである。Pond<sup>5)</sup>、Udall<sup>10)</sup> とも縦切開で行なつている。自験例では2例とも術後の浮腫はまったくなかつた。

#### 6. 術後経過

我々の2例を含む22例とも形態的にも満足できるものであり、勃起時疼痛もなく、勃起不全、挿入不全もなく満足のゆく結果を得ている。

#### 7. 手術適応

先天性陰莖彎曲症と診断された場合、どの程度の彎曲であれば手術適応となるかに関しては詳細な報告がなく、やはり勃起時の陰莖の形態には個人差があり難しい問題ではあるが、挿入不全や陰莖彎曲などが精神的問題となつてきた症例で手術適応があると考えられる。

### 結 語

先天性陰莖彎曲症の3例を経験し、2例に対し Nesbit の方法に準じ手術を行ない満足のゆく結果が得られた。この手術法は、すぐれた外科的手段であり手技も簡便である。本邦および外国文献より43例の報告があり、このうちの23例につき検討を行なつた。

尚、本論文の要旨は第28回日本不妊学会総会(昭和58年11月16日)において発表した。

### 文 献

- 1) Nesbit, R. M.: Congenital curvature of the phallus: report of three cases with description of corrective operation. *J. Urol.*, 93: 230, 1965.
- 2) Correa, R. J., JR: Congenital curvature of the penis. *J. Urol.*, 106: 881, 1971.
- 3) Saalfeld, J., Ehrlich, R. N., Gross, J. M. and Kaufman, J. J.: Congenital curvature of the penis: successful results with variations in corporoplasty. *J. Urol.*, 109: 64, 1973.
- 4) 古畑哲彦, 佐藤卓三, 坂西晴三: 先天性陰莖側方屈曲症の治験例. *日泌尿会誌*, 65: 261, 1974.
- 5) Pond, H. S. and Brannan, W.: Correction of congenital curvature of the penis: experiences with the Nesbit operation at Ochsner Clinic. *J. Urol.*, 112: 491, 1974.
- 6) Gavrell, G. J.: Congenital curvature of the penis. *J. Urol.*, 112: 489, 1974.
- 7) Redman, J. F., Rountree, G. A. and Bissada, J. M.: Congenital curvature of the penis. *J. Urol.*, 112: 489, 1974.

N. K.: Surgical correction of lateral curvature of penis. *Urology*, 5: 508, 1975.

- 8) 松村陽右, 西 光雄, 後藤喜夫, 新島端夫: 陰莖彎曲症の手術—3例の経験—. *日泌尿会誌*. 69: 408, 1978.
- 9) 中島幹夫, 辻村玄弘, 横関秀明: 先天性陰莖彎曲症の2例. *西日泌尿*, 40: 913, 1978.
- 10) Udall, D. A.: Correction of 3 type of congenital curvatures of the penis, including the first reported case of dorsal curvature. *J. Urol.*, 124: 50, 1980.
- 11) Kelami, A.: Nesbit procedure in the treatment of congenital penile deviation. *Urol. int.*, 36: 386, 1981.
- 12) Kelami, A.: Autophotography in evaluation of functional penis disorders. *Urology*, 21: 628, 1983.

### 3 Cases of congenital curvature of the penis

**Harunori Narita, Koji Miyake  
and Hideo Mitsuya**

Department of Urology, Nagoya University  
School of Medicine, Nagoya  
(Director: Prof. Hideo Mitsuya)

Three cases of congenital curvature of the penis are presented. 1 case was left lateral curvature and the other 2 cases were ventral curvature. The deformities of two cases were successfully treated by the Nesbit procedure. The operation is more satisfactory surgical approach and is simple to perform. 43 cases of congenital curvature of the penis from the Japanese and foreign literatures were collected, and 23 cases of those were reviewed.

(受付: 昭和59年4月17日)

## 地方部会講演抄録

### 第90回不妊学会関東地方部会

日時 昭和59年6月2日(土)午後2時~5時30分  
場所 群馬大学医学部基礎大講堂

#### 1. 当院における精索静脈瘤患者の診断および治療

相川 厚 (防衛医科大学校泌尿器)

男子不妊症患者のうち精索静脈瘤を合併している乏精子症患者は外科的治療により改善が望めることは良く知られている。当院では精索静脈瘤の客観的診断法として、ドップラーおよびサーモグラフィーを活用し総合的に診断を下している。ドップラーは患者の陰嚢部に直接プローブをあて、ドップラーグラムとして、安静呼吸時立位にて、またバルサルバの手技にて記録するとともに音、リズムにより静脈内の逆流を確認している。サーモグラフィーは精索静脈瘤の部位が高温域となつて描出され、同一レベルにおける温度が表示され、診断のみならず術後の効果も判定できる。当院の高位結紮術は、ドップラーを用いて動脈と静脈を鑑別し、静脈のみ結紮している。現在まで手術した7例全例とも内精動脈を確認し温存し得た。術後8か月現在まで7例中(うち1例は独身者)2例は妊娠が成立し、その他の症例にても精子数と運動率が改善している。

#### 2. 乏精子症に対する漢方薬剤—補中益気湯—内服療法の効果と血中ホルモン値の変動について

吉田英機・田代博紹・渡辺政信  
今村一男 (昭和大泌尿器)

49例の特発性乏精子症に対し、漢方薬剤であるカネボウ補中益気湯1日6gの内服療法を試み、9例(20.0%)で妻の妊娠に成功し、精液所見の著明な改善を示した例は、妊娠成功例を含め23例(51.5%)であつた。この臨床的効果は、以前に演者らが試みたツムラ八味地黄丸の妊娠率20.0%、臨床的有効率54.5%とほぼ同様であつた。

また補中益気湯投与前後における末梢血中各種ホルモン値の変動について検討したところ、FSH値は著変を認めなかつたが、LH値とPRL値は正常値範囲内での変動ではあるが、補中益気湯投与後有意な増加を認めた。テストステロン値とエストロダイオール値について

は著変を認めなかつた。

以上より補中益気湯は比較的軽度の乏精子症に有効であり、ホルモン値の変動から、直接精巣に作用すると同時に下垂体への作用も示唆された。

#### 3. 最近1年間の男子不妊症患者の臨床統計的観察

武島 仁・吉井慎一・石川博通  
小磯謙吉 (筑波大泌尿器)

1983年4月から84年3月までの1年間に筑波大学泌尿器科を受診した男子不妊症患者97例の臨床統計学的検討を行なつた。

(1) 患者の年齢分布は30~34歳にピークがあり、結婚期間は3~4年のものが最も多かつた。

(2) 配偶者の年齢分布では、30~34歳にピークがあり、16例に産婦人科的異常があつた。

(3) 既往歴として最も多かつたのは、流行性耳下腺炎であり、理学的所見としては、精索静脈瘤が多かつた。

(4) 精液所見および睾丸生検所見から第1群(正精子症群)から第5群(原発性無精子症群)に分類した。睾丸容積は第5群が最小で、第4群が最大であつた。FSHおよびLH値は第4群が最低で、第5群が最高値を示した。テストステロン値は第5群が最低で、第1群が最高値を示した。またプロラクチン値は第2群が最低で、第4群が最高値を示した。

#### 4. 不妊婦人におけるラパロスコピーの新しい手技の考案

関 守利・塚越俊夫・宇井万津男  
本庄滋一郎・山下 努・依田 裕子  
五十嵐正雄 (群馬大・産婦)

(未着)

#### 5. 芍薬甘草湯のラット子宮および卵巣重量に対する影響

竹内 亨・岡村 隆・柳沼 恣  
小林拓郎 (東京大産院婦)  
坂本賢二・油田正樹  
(津村薬理研究所)

(目的): 高 testosterone (T) 血症 (T ≥ 70ng/dl) の

女性では、稀発月経や無月経等の排卵障害や不妊症を起すことが知られている。以前、われわれはこのような排卵障害を有する婦人に対する芍薬甘草湯の血中T低下作用を報告してきた。今回は、この漢方薬の血中T低下作用の機構を解明するために動物実験を行なった。

(方法) : Wistar- 今道系メスラットの生後2日目に testosterone propionate 500 $\mu$ g を皮下注射し, androgen-sterilized Rat (ARS) を作った。持続発情を示す ASR に、生後56日目より人間の $1/2$ , 1, 2, 4, 8 倍量の芍薬甘草湯を14日間連日経口投与し、生後70日目に断頭屠殺した。

(成績) : 下垂体、副腎、子宮の重量は対照群と有意な差は認められなかった。卵巢重量は、有意に低下し、それは dose dependent に逆相関を示した ( $r = -0.87$ ,  $P < 0.01$ )。

(結論) : 以上より、芍薬甘草湯の血中T低下作用は、卵巢への直接作用による卵巣性T分泌抑制によることが示唆された。

## 6. hCG のエンザイムイムノアッセイ (MS-3001 使用) による測定経験

西井 修・気賀沢和子・柳沼 恣  
小林拓郎 (東大分院産婦)

hCG の測定は、絨毛性疾患の管理において必要不可欠である。そこで、今回われわれは、最近開発されたエンザイムイムノアッセイのキット (MS-3001) を使用して hCG を測定したので、基礎的および臨床的検討を加えて報告する。

本法は、単クローン性抗 hCG 抗体と酵素標識した単クローン性抗 hCG 抗体を用いるサンドイッチ法である。感度は、hCG 5mIU/ml からであり、測定可能域は80mIU/ml である。下垂体性 LH、FSH と交叉率は0%である。

Intra-assay および Inter-assay variance は、いずれも変動係数10%以下であり、ラジオイムノアッセイ値との比較では高い相関関係を示した。正常妊娠初期の尿中 hCG は7~8週がピークであった。また、分娩後尿中 hCG は、分娩後1日、 $2926 \pm 1551$  IU/l、分娩後3日、 $512 \pm 291$  IU/l、分娩後5日、 $98 \pm 65$  IU/l であった。

絨毛性疾患の follow up では、LH の存在下でその干渉を受けなかった。

## 7. 不妊症12例の着床期内膜ステロイドレセプター

落合和徳・磯西成治・横山 敬  
楠原浩二・蜂尾祥一

(慈恵医大産婦)

目的 : 不妊症の原因の一つに着床側の子宮内膜異常があるが、性ステロイドホルモンに対する感受性異常も病態の一面であると考えられるため、内膜のエストロゲンレセプター (ER) およびプロゲステロンレセプター (PR) について検討した。

対象・方法 : 排卵性不妊患者12名に、高温相5~10日目で子宮内膜バイオプシーを施行、一部で組織診を行ない、一部でサイトゾールを調整した。ER、PR の測定は DCC 法で行ない、スカッチャードプロットで最大結合部位数 (NBS) と解離定数 (kd) を求めた。

結果 : 12例中6例が日付診一致内膜で、6例が不一致内膜であった。これらの血中エストロゲン、プロゲステロン値に一定の傾向はなかった。ER の NBS は一致例で23.5fmol/mg P、一方不一致例では14.9fmol/mg P 低値傾向であった。PR には一定の傾向はみられなかった。レセプター異常が不妊の一原因と断定するには、なお今後の検討が必要である。

## 8. 不妊患者における着床期子宮内膜の形態と卵巣ステロイドホルモンとの関連について

楠原浩二・村江正始・小田原靖  
松本和紀・蜂尾祥一

(慈恵医大産婦)

不妊患者の着床期子宮内膜形態と黄体機能の関連について検討をした。

方法は排卵性不妊患者126名に対し、周期を通し経日的に LH、FSH、E<sub>2</sub>、P<sub>4</sub> を測定し、その周期の排卵後6~8日目に内膜の日付診を行なった。また正常月経周期を有する非不妊婦人のホルモン値をコントロールとした。その結果、異常内膜の3遅延型例は43例で、うち23例は黄体機能不全を示した。その内訳は黄体初一中一後期とも P<sub>4</sub> 低値な type A を示すもの8例、P<sub>4</sub> の立ち上がりや黄体初期に不良な type B 11例、さらに黄体期中期に P<sub>4</sub> が速やかに低下する type C の4例に分類し得た。しかし遅延型の残り20例は黄体初一中一後期を通しコントロールと殆んど同一の良好なレベルを維持し、黄体機能正常と判定された例であった。これらの結果より従来黄体機能を正しく反映すると考えられていた内膜はさまざまな型での反応性の異常を示すことが明らかとなり、着床環境を正しく把握するにはホルモンの動態から

とらえた黄体機能の判定と、着床期内膜形態の分析という両者からの検討が必要と考えられた。

## 9. LHRH の律動的 (pulsatile) 投与による各種性腺機能低下症の治療

正岡 薫・北沢正文・熊坂高弘  
(獨協医大産婦)

LHRH は 1~2 時間間隔で視床下部から下垂体門脈中へ放出されており、その結果 LH 分泌に pulsatile なパターンが観察される。外因性に LHRH を投与し、性腺機能を刺激するためにはこの原則に従った投与方法でなければ有効ではない。われわれは現在までに視床下部性無月経 8 例、高プロラクチン血症性無月経 4 例、多嚢胞性卵巣 6 例、稀発月経 1 例の 19 例 22 周期中、16 例 19 周期に平均 11.5 日間の LHRH 投与で排卵を誘発することに成功している。LHRH の投与は携帯用の輸液ポンプを用い、2~20 $\mu$ g を 60~120 分毎に静注しているが、5 $\mu$ g 90 分周期が最も適当のようである。また産褥初期にみられる無排卵状態と同様な LHRH 投与を行なつても有効であることが判明した。これらの事実からみて、われわれが日常遭遇する無排卵、無月経症の大部分は結局、LHRH の分泌不全ないし分泌異常を根本的病因としたものであると考えられる。

## 第90回日本不妊学会関東地方部会 シンポジウム (第 1 席) 抄録

### I. 精子形成細胞の分化

河 和 義 (群馬大・薬理)

精子の分化成熟過程で細胞膜の性質、特に膜に組込まれているイオンチャネルの種類と量がどのように変化するかをラットを用いて調べた。精細管より精子に分化しつつある細胞を遊離し、位相差顕微鏡下に吸引電極により膜電位固定を行なつた。脱分極により一過性の  $Ca^{2+}$  内向き電流と遅れて生じる  $K^{+}$  外向き電流が見出された。初期の精祖細胞と思われる群では  $Ca^{2+}$  電流は小さく、 $K^{+}$  電流が大きいが、精母細胞初期では  $Ca^{2+}$  電流は増し  $K^{+}$  電流は減る。後期の精母細胞と減数分裂を経た精子細胞では  $Ca^{2+}$  電流はより大きく、 $K^{+}$  電流はより小さくなる。結局この分化過程で Ca チャネル密度は約 30 倍に K チャネル密度は逆に約 1/30 になる事がわかった。おそらく完成した精子にも Ca チャネルが高密度に存在して精子の遊走能や受精能を制御しているものと思われる。

## II. 実験動物の体外受精とその応用

横山 峯 介 (実験動物中央研究所)

実験動物における体外受精は、ウサギで最初の成功が得られて以来、ゴールデンハムスター、マウス、ラット等の動物種では再現性の高い安定した成績が得られるようになった。いままでこの体外受精の技術は、卵と精子の相互作用や受精機構の解析等の研究手段として多く用いられてきた。しかし最近では、精子侵入時期の明確な受精卵や発生段階の揃つた胚を得るための手法として、さらに繁殖障害を伴うような疾患モデル動物の繁殖・生産に応用する試みもなされている。

ここでは、われわれの研究室で得られたマウスでの若干の知見と現在おこなっている仕事を中心に概説したい。

## 昭和59年度日本不妊学会中部支部

日時 昭和59年6月2日(土)

会場 名古屋大学医学部構内鶴友会館2階

### 1. 尿中ホルモン測定法と超音波画像法を利用した卵胞成熟のモニタリング

○竹内一郎・花田征治・水野金一郎  
八神 喜昭 (名市大産婦)

新しく開発された高感度尿中エストロゲン測定キット (Hiestrotec) の卵胞成熟モニタリングへの応用を検討する目的で、以下の検討を行なつた。

(対象) 正常月経周期婦人 6 例 6 周期、第 1 度無月経でクロミッドによる排卵誘発成功例 4 例 4 周期。

(方法) 月経周期 10 日目より連日、尿中エストロゲンを Hiestrotec で、尿中 LH を Higonavis で、血中エストラジオールおよび LH を RIA で測定した。一方、卵胞発育をセクター型電子スキャンで観察し、最大径および体積を計測した。

(結果) 1. 合計 10 周期 75 検体について、血中エストラジオール値と尿中エストロゲン値とは  $r=0.739$  で有意の相関を認めた。2. 卵胞計測値と血中エストラジオール値および尿中エストロゲン値との間には一定の相関はなかつた。3. 尿中エストロゲンの preanulatory peak 値は 40 $\mu$ g/ml 以上であつた。

(結論) Hiestrotec による尿中エストロゲン測定は卵胞成熟モニタリング法として充分応用可能であり、電子スキャンによる卵胞の観察との併用で、より正確かつ合理的な卵胞成熟および排卵の診断が可能であると思われる。

た。

## 2. Monoclonal 抗体を利用した EIA 法による human LH の迅速測定法

○松澤克治・古橋義人・紀平正道  
鈴木正利・後藤節子・友田 豊  
(名大産婦)

近年、不妊症治療の画期的手段として、体外受精・胚移植法が脚光を浴び、その臨床的応用も普及し、現在世界で 300 例以上、本邦でも 8 例の出産が報告されるに到っている。しかし、その成功率は 10~20% と低く、未だ改善すべき多くの問題点を残している。その大きな問題点の 1 つは、如何にして至適成熟卵を採取するかという点にあり、いいかえれば、如何に正確に排卵時間を推定し、その直前の成熟卵を採取するかという点にある。そのためには LH surge 開始時間を正確に判定する事が不可欠であり、LH の正確かつ迅速な定量が必要となる。

今回、われわれは、Monoclonal 抗体を利用した EIA 法による human LH の迅速測定法を開発し、RIA 法との比較検討を行ない、さらに、2 症例での排卵周辺期の LH の推移を本法にて測定し、hi-gonavis にて尿中 LH を、高感度 Estrogen 測定キット (MS-8301) にて尿中 Estrogen を測定し、臨床での有用性を検討し、以下の結果を得た。

1. 採血より約 3 時間で測定可能であった。
2. RIA 法による測定値との間に、 $Y=1.36 \times -18.14$  の回帰式を得、相関係数  $R=0.94$  と良好な相関が得られた。また最低感度は 5 ng/ml であった。
3. hi-gonavis による尿中 LH 測定では、LH の peak は明確にとらえられたが、LH surge 開始をとらえる事は困難であった。これに対し、本法による血中 LH 測定で、LH surge 開始を明確にとらえる事が可能であった。

以上より、本法は、LH surge 開始時間の判定・排卵時間の正確な推定の有力な手段となると考えられた。

## 3. 唾液中エストラジオール測定の意味

高橋正明・千原 啓・蛭原照男  
米谷国男・浅野智子  
(藤田学園保健衛生大  
第 2 教育病院産婦)

唾液内に存在するステロイドホルモンの生物学的作用に関してはなお不明であると思われるが、今回われわれは唾液中  $E_2$  濃度の性差、月経周期における変動について検討した。測定には第 1 アイソトープ、 $E_2$  RIA Kit

を用いたが、試料作製上困難だったことは唾液はトリクロル酢酸、過塩素酸等、通常の除タンパク試薬で除タンパクを行なつても、多量の唾液を一度にエーテル抽出しようとする凝固してしまうことである。そこで今回は唾液を 1 ml づつ抽出し  $N_2$  ガスで留去して試料とした。この方法での標準 160pg/ml における回収率は 93.0% と良好であった。性差に関しては、男子 3 名における唾液中  $E_2$  は 1.7~3.0pg/ml、女子 5 名におけるそれは 2.8~5.2pg/ml であった。月経周期 (2 名、3 周期) における唾液中  $E_2$  は血中  $E_2$  とほぼ同様な変動を示し、排卵前期に極値に達することがわかった。わずかではあるが今回得られた data と、いくつかの文献を参考とし、唾液中  $E_2$  測定の有用性について考察してみた。

## 4. ヒト精子中の DNA 量についての検討

中川恵彰・辻 幸三・山田昌夫  
伊藤祐正・中西正美・石原 実  
(愛知医大産婦)

今回、われわれは Becton-Dickinson 社の FACS-440 を使用して、精子の DNA を測定し、精子数と運動率、奇形率について比較検討した。また、Kremer の検査を応用し、capillary tube 内を上昇した精子についてもその DNA を測定し、若干の知見を得たので、報告する。

53 例の不妊症患者夫の精子を Ethidiumbromide で染色し、FACS にて Histogram を作成した。その際、末梢血リンパ球の Histogram も同様に作成しそのピークを 2C と決め、精子の DNA 量を C, 2C, 3C, 4C の割合に分けた。

精子の DNA 量と精子数、奇形率には相関は認められなかったが、運動率の高い精子には C の割合が多い傾向がみられた。また capillary tube 内を上昇した精子では C の割合が高く、精子数、運動率、奇形率にかかわらず、capillary tube を上昇した精子においては、C の割合が増加することがわかった。

## 5. Bromocriptine 肛門坐薬の産褥止乳効果

○戸谷良造・三輪 是・黒木尚之  
鈴置洋三 (国立名古屋病院産婦)

産褥止乳にはテストステロン、エストロゲン、プロゲステロン等の性ステロイド剤を単独に、もしくはこれらを同時投薬する方法が長く用いられてきた。プロモクリプチンの開発以来、プロラクチンを直接抑制する止乳法がより生理的であり、かつ止乳効果が高いことが明らかにされてきた。プロモクリプチンは強力なプロラクチン

抑制作用を有する一方、副作用である吐気、嘔吐、ふらつき等の副作用も強い。われわれが開発した本剤の肛門坐薬は主作用であるプロラクチン抑制効果を失うことなく、副作用の著明な減少効果を得た。死産後、もしくは母体合併症のため止乳を必要とする患者に本剤を使用し、至適投与量、投与期間を検討した。また、乳汁分泌過多症への減乳効果も調べた。

## 6. Bromocriptine 肛門坐薬にて治癒しえた子宮頸部上皮内癌に合併した下垂体 macroadenoma の 1 例

○山田隆祥・戸谷良造・三輪 是  
黒木尚之・鈴置洋三  
(国立名古屋病院産婦)

プロラクチン産生腫瘍の治療法は内科的、外科的療法と議論の分かれるところである。最近、われわれは子宮頸部上皮内癌の手術後、一般的に外科適応とされている視力障害をきたしたマクロアデノマを経験し、プロモクリプチン肛門坐薬にて軽快しえた症例を得た。

症例は37歳の女性、27歳を最後に3回妊娠し、28歳より10年来無月経である。近医産婦人科にて細胞診施行し class V を指摘され、当院産婦人科受診し、精検の結果 CIS と診断された。なお4カ月前より、羞明を訴えていた。CIS の術後、眼科受診し視力および視野検査を施行したところ、視力低下および視野欠損を認め、頭部単純レ線、頭部 CT スキャン施行、鞍上部に進展する径3 cm 程の辺縁不規則な下垂体腫瘍を認めた。われわれは下垂体プロラクチノーマと判断し、プロモクリプチン肛門坐薬10mg より投与を開始したところ、治療前8280ng/ml であった血中 PRL 値は激減し、視力および視野も著明に改善した。その後プロモクリプチン肛門坐薬を1日50mg まで漸増し、血中 PRL 値を正常値に復すると共に頭部 CT にても、著明な腫瘍の縮小を認めた。

通常プロモクリプチン療法は、手術療法に比べ内分泌的改善率に優れるが、mass effect に対する改善率は劣るとされている。しかし、本療法によるマクロアデノマの腫瘍縮小の報告は、多数認められる。また、われわれはプロモクリプチン肛門坐薬を使用することにより、副作用発現を減少させ、1日50mg という大量投与を可能にさせた。以上より、今回の症例は、内服治療では不可能とされる投与量を、坐薬によつて可能にし、視力障害をきたしている下垂体マクロアデノマを手術せずに劇的に改善しえた。

## 7. Premature menopause と診断され、Kaufmann 療法により妊娠した興味ある 1 例

大沢政巳・市川弥生・菅沼信彦  
呉 明超・正橋鉄夫・浅井光興  
成田 収 (名古屋大分院産婦)  
徳橋弥三郎 (安城更生病院産婦)

Premature menopause は hypergonadotropic hypogonadism の1つであり、その発症機構について内分泌学・免疫学的に興味をもたれている。しかしその難治性ゆえに、妊娠・出産にまで至る症例は比較的稀である。われわれは premature menopause と診断されたが、その後の hormone 療法により妊娠に成功した1例を経験したので報告する。症例は19歳の女性で、続発性無月経と挙児希望を主訴として来院した。初経は15歳で、18歳までは月経は整順であつた。18歳に一度妊娠したが未婚を理由として人工妊娠中絶術を受けた。その後無月経となり約2年間近医により hormone 療法を施行されていたが、精査を希望して安城更生病院産婦人科を受診した。来院時の所見は、体格、乳房、陰毛の発育は、ほぼ正常で子宮、膣の発育は軽度低下していた。一般的血液、生化学、尿検査は異常なく、末梢白血球の Karyotype は46,XX と正常女性型を示していた。また無月経の程度は第II度無月経であつた。血中 LH は143mIU/ml, FSH は75mIU/ml と高値を示し、LH-RH に対する反応性は良好であつた。血中 estradiol は19pg/ml と低値であつた。腹腔鏡による卵巢生検の組織所見では、白帯と石灰化巣を認めるのみで卵胞の存在は認められなかつた。以上より、premature menopause と診断し、estrogen-gestagen による cyclic therapy を施行したところ9 course 終了後、妊娠反応陽性となり妊娠が確認された。以上の症例の経過を報告するとともに premature menopause の診断、原因、治療について文献的な考察を加える。

## 8. 有茎皮膚弁を利用した造膣術

藤城 卓・西口富三・能登裕志  
寺尾俊彦 (浜松医大産婦)

先天性膣欠損症は、体型的に、外陰・恥毛・乳房の発育は正常で、内分泌的にも異常はない。しかし、子宮は痕跡程度であり、妊孕性はない。本疾患は約5000例に1例の発生頻度があるといわれるが、そのうち、Rokitansky-Küstner-Hauser syndrome は代表的な疾患である。

われわれは、過去5年間に5例の膣欠損症と1例の造膣術後の膣狭窄症を経験し、うち、4例の膣欠損症例に

造脛術（2例：腸管利用法，2例：有茎皮弁利用法）を脛狭窄症例に観血的脛拡張術を施行した。

腸管利用法の1例は，先天性鎖肛に対する手術既往がある．初診時所見は，脛欠損，肛門異所開口，直腸脛瘻，肛門括約筋欠損が認められた．本症例は，肛門異所開口部を利用して，S状結腸曠置術を施行したが，肛門括約筋造設術および，本来の肛門部への腸管開口術を併せ行なった．このような症例には，腸管利用法が適している．

従来，有茎皮弁を用いた造脛術は，皮弁の先端が遊離するために失敗に終わる事が多かった．われわれは，その問題を解決すべき方法として，皮弁の先端の固定部として子宮腔部を選び，皮弁の固定を行なった．術式としては，まず経腹的に膀胱を剥離しておき，脛入口側より子宮腔部に向かつて切開を加え，脛腔を形成する．続いて，両側腎部から有茎皮弁を作成し，子宮腔部に相当する部分に固定し，脛壁に続いて固定する．従来の McIndoe 法，Williams' 法に比べ，本法は，美容外観上秀れており，手術の安全性，確実性の意味からも秀れた手術法と考える．なお，2症例のうち1例は，現在機能的にも障害はなく，他の1例は，現在，self-dilatation 中である．

## 第97回日本不妊学会関西支部集談会

期 日：昭和59年6月2日（土）午後2時より

場 所：京大会館（京都市左京区吉田河原町15-9）

### 1. Parlodel 投与妊娠例の検討

中村隆一・久保潔士・田中 熟  
太田道隆・曾 士家・南部吉彦  
（国立京都病院産婦）

昭和55年10月より59年3月の間に Parlodel 投与によって治療を行ない妊娠の成立をみた6例について検討した。

症例1は pituitary microadenoma の手術後 parlodel 投与例で4年間 clomid との併用で昭和58年8月8日の最終月経以後全く予期しない妊娠であったため人工妊娠中絶を施行して11週相当単胎児をみた。

症例2は原発性無月経を伴う Anorexia nervosa 治療後1年間の parlodel・clomid 併用療法によつて，その間の結婚を挿んで妊娠し，昭和59年2月25日に39週4日で体重3420g の正常男児を分娩した。

症例3，4，5は黄体機能不全で clomid，HMG などとの併用により現在それぞれ妊娠19，15，15週の単胎児である。

症例6は月経不順の挙児希望で parlodel 投与周期の排卵で妊娠したが GS のみで FHB が出現せず流産に終わった。

以上6例の PRL，FSH，LH の推移についても報告する。

### 2. 排卵日の決定

#### 一血中ホルモン値と超音波断層法との比較一

富岡 恵・山元貴雄・辻 雅路  
大野洋介・岡田弘二

（京都府立医大産婦）

超音波装置を用いた排卵の確認は確実な手段として確立されており，更にわれわれは超音波による黄体の観察も行ない黄体機能評価に役立てるべく検討している．この黄体期検査の一環として排卵現象を正確に捕える必要性を痛感し，今回排卵日の他の指標として基礎体温の変化，血中  $E_2$ ，LH ピークおよび超音波による排卵確認日の三者における日数のずれを検討した．対象は正常排卵群48周期，clomiphene 誘発群16周期の連日観察にて確認できたものである．その結果，基礎体温陥落日より基礎体温高温相第1日目の方が，さらに基礎体温よりは超音波排卵日の方が血中 LH ピークとの関連が強く，血中 LH ピークの翌日に超音波上排卵を認めるものが81%と高率であつた．clomiphene 誘発群では正常群に比べ， $E_2$ ，LH ピークが同日に認められるものが多く超音波排卵日に近づく傾向があつた．超音波による排卵日の決定はホルモン測定に代用し得る検査法であることが確認された。

### 3. 排卵障害における血中ゴナドトロピンとステロイドホルモンの関係

和田圭介・東山秀声・岡田弘二  
（京都府立医大産婦）

近年，微量測定法の進歩により血中ホルモンの測定は常時行なえるようになった．そこで軽症無月経例における各種血中ホルモンと，clomiphene の有効性ととの関連について検討した．また clomiphene 無効例に有効な prednisolone-clomiphene 療法における prednisolone の効果についても検索した。

正常プロラクチン血症の第一度無月経では，LH が高値になると testosterone も高値となる傾向があつた．clomiphene の有効性と LH あるいは testosterone，さらに LH/FSH 比の間には関連性はなかつた．したがつて，これらを指標として clomiphene の有効・無効の判定はできないと考えられた．clomiphene 無効例の an-

drostenedione 値は高値をとるものが多く、この際 prednisolone の少量 (5 mg/日) を負荷すると androstenedione 値の減少、 $E_2$  の上昇及び androstenedione/ $E_2$  比と  $E_1/E_2$  比の著明な減少が認められた。このことから prednisolone は卵胞発育促進と共に androstenedione から  $E_2$  への転換を促進させると結論された。

#### 4. XYY 症候群の 1 例

羽間 稔・岡 伸俊・浜口毅樹  
岡田 弘・松本 修・守殿貞夫  
石神襄次 (神戸大泌尿器)

不妊を主訴とする36歳男性、工員。父41歳、母38歳時の第4子。犯罪および非行歴はない。身長179cm、体重75kg、指極184cm。女性化乳房を認めない。陰毛、陰茎の発育は正常であるが仮性包茎。睾丸は両側とも8ml。精液量1.8ml、精子濃度 $0.8 \times 10^6/ml$ 、精子運動率0%、奇形率40%。精囊造影は石神、森の分類によるII型、成人型で精管末端異常拡張症がみられた。睾丸組織所見は一部精子形成の認められる部分もあったが、大部分は spermatogenic arrest の像で基底膜の肥厚を示した。また硝子化した精細管がみられる部分もあり、間質では Leydig 細胞の増生を認めた。末梢白血球培養による染色体分析で47,XYY と同定され、培養リンパ球において2個のY-クロマチンを認めた。血中 gonadotropin 値は高値であつたが testosterone, estradiol, TSH, PRL, T3, T4 は正常域にあつた。GH も正常域にあり高身長を引き起こす要因とは考えにくいと思われた。間脳-下垂体-性腺系および下垂体-甲状腺系の axis には異常はなかつた。

#### 5. 排卵過程における卵巢中 cytochrome oxidase 活性の変動と生体酸化阻害剤 rotenone の排卵におよぼす影響

越田光伸・竹中 章・神崎秀陽  
竹森和正・岡崎武志・岡村 均  
森 崇英 (京成大産婦)

排卵過程における energy 産生系の役割を検討するため、NADH dehydrogenase の特異的阻害剤である rotenone を PMS-hCG 処理をした幼若 rats に投与し、排卵におよぼす影響ならびに卵巢中 cytochrome C oxidase 活性 (CYO 活性) におよぼす影響を検討した。また hCG を投与した成熟家兔に rotenone を投与し、排卵におよぼす影響および、CYO 活性、 $3\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase 活性 ( $3\beta$ -HSD 活性) におよぼす影響を組織化学的に観察した。rats において rotenone

は用量反応的に排卵を抑制した。また排卵過程における卵巢中 CYO 活性は、hCG 投与後6時間をピークとして有意に上昇したが、この活性は rotenone 投与により有意に抑制された。家兔においても同様の排卵阻害効果が観察され、また、排卵過程において顆粒膜細胞で急速に出現する CYO、 $3\beta$ -HSD 活性は rotenone 投与により著明に低下した。Energy 産生系の排卵への関与ならびに、排卵期顆粒膜細胞における steroid 産生能への関与が示唆された。

#### 6. Thromboxane A<sub>2</sub> 合成阻害剤 OKY-046 (ONO) による排卵阻害効果

竹中 章・越田光伸・奥田雄二  
竹森和正・神崎秀陽・岡村 均  
森 崇英 (京成大産婦)

排卵直前の卵胞壁周囲毛細血管に見られる微小血栓の排卵現象における役割を検討するために、Thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) の特異的合成阻害剤 OKY-046 (ONO) を用いてラットおよび家兔で排卵阻害実験を行なった。24日齢の末熟ラットに PMS 10 iu、48時間後に hCG 5 iu および10~800mg/kg の OKY-046 を腹腔内投与し、20時間後に卵管内の排卵数を算定したところ、対照群に比して全ての OKY-046投与群で有意な平均排卵数の減少を見た。家兔では hCG 100 iu と同時に OKY-046 を100mg および200mg 腹腔内投与し15時間後に開腹したが、全例で排卵は抑制されていた。動脈内樹脂注入による血管鑄型を SEM 観察すると、卵胞壁周囲血管の構築は stigma に到るまで良く保たれていた。TEM 観察でも卵胞壁周囲血管に血栓は認められず、卵胞壁周囲血管の微小血栓が排卵に重要な意味を持つと共に、TXA<sub>2</sub> の増加ないしは PGI<sub>2</sub> の減少が排卵に重要な役割を果たすことが示唆された。

#### 7. 卵胞破裂および卵成熟におよぼすインドメサシンの効果

林 清士・野田洋一・森 崇英  
(京成大産婦)

プロスタグランディン生合成阻害剤であるインドメサシン (Id) は、排卵抑制はするが卵成熟には影響を与えないことがウサギで報告されている。しかしその際得られた成熟卵の受精能に関しては検討されていない。今回排卵が阻害されたマウス成熟卵の受精能を体外受精系を用いて検討した。

(方法) 過排卵処理後排卵を完全に抑制する Id の最少有効量 (2 mg/mouse) を投与し、排卵前の時期の卵

胞卵を回収し、その成熟段階について検討した。次に排卵が抑制され卵胞内に保持された卵のうち成熟卵と思われる卵のみを体外受精し、受精能について対照群と比較検討した。

(結果) 排卵抑制する Id 量を投与しても卵の成熟率には対照群との間に有意差は認められず、また卵胞内に保持された成熟卵の受精能は成熟排卵卵子との間に有意差は認められなかった。

(考察) Id による卵胞破裂抑制と受精能を含めた卵成熟過程とは本実験条件下では解離した現象としてとらえることが可能と思われた。

#### 8. 糖代謝と卵巣機能

幸村信行・片山 和明・大谷徹郎  
丸尾 猛・望月眞人 (神戸大産婦)

糖代謝と卵巣機能の関連について、以下三つの観点か

ら検討した。1) インスリン抵抗性糖尿病患者における PCO の発症、2) 各種無月経患者における糖代謝異常の有無、3) 顆粒膜細胞におけるインスリンの作用、われわれは 1 例のインスリン抵抗性糖尿病患者を経験したが、開腹時所見より PCO と診断した。各種無月経患者において 75g 糖負荷試験を行ったところ、Amenorrhea I° 中でも PCO 患者に耐糖能の異常が存在する事が明らかとなった。また *in vitro* におけるブタ顆粒膜細胞を用いた培養実験では、インスリンの添加により、progesterone の産生の促進、FSH による LH/hCG レセプターの induction の促進、ブドウ糖取り込みの増加が認められる事が明らかとなった。以上の所見より糖代謝特にインスリン作用と卵巣の機能に密接な関連があり、卵巣機能異常の成因の一つとして糖代謝異常が関与している可能性が示唆された。

## 国際学会のお知らせ

### XII World Congress on Fertility & Sterility

会 期 1986年10月26日～31日

開催地 シンガポール



### IV World Conference on In Vitro Fertilization

会 期 1985年11月19日～22日

開催地 メルボルン (オーストラリア)

上記の学会の Announcement を御覧になりたい方は学会事務所にお  
問合わせ下さい。

## 投 稿 規 定

1. 本誌掲載の論文は、特別の場合を除き、会員のものに限る。
2. 原稿は、本会の目的に関連のある綜説、原著、論説、臨床報告、内外文献紹介、学会記事、その他で、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入れて括弧で囲む、すなわち  
著者名：題名、誌名、巻数(号数)：頁数、年次
- 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、東京都中央区日本橋2丁目14番9号加商ビル (株)国際会議事務局内  
社団法人 日本不妊学会 事務所宛とする、

### 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。なお、校正は字句の訂正にとどめる。
5. 受付年月日を論文の末尾に掲載する。

編 集 委 員

飯 塚 理 八 (委員長)

味 香 勝 也	百 目 鬼 郁 男	石 島 芳 郎
小 林 俊 文	百 瀬 和 夫	西 村 隆 一
佐 久 間 勇 次	和 久 正 良	

EDITORIAL BOARD

Rihachi IIZUKA (Editor-in-Chief)

Katsuya AJIKA	Ikuo DOMEKI	Yoshiro ISHIJIMA
Toshihumi KOBAYASHI	Kazuo MOMOSE	Ryuichi NISHIMURA
Yuzi SAKUMA	Masayoshi WAKU	

日本不妊学会雑誌 30 卷 1 号

昭和 59 年 12 月 25 日 印 刷  
昭和 60 年 1 月 1 日 発 行

編集兼発行者	飯 塚 理 八
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 東京都中央区日本橋二丁目 14-9 加商ビル (株)国際会議事務局内 Tel (03) 272-7077

振替口座番号 東京 7-93207