

日本不妊学会雑誌

第 32 卷

第 1 号

昭和 62 年 1 月 1 日

Effects of Tokishakuyakusan and Its Components on progesterone

| | | |
|---|-----------------------|-----|
| Secretions by Corpora Lutea | Satoshi USUKI | 1 |
| 女子一流選手のスポーツ活動時の内分泌学的変動 | 佐々木純一・他 | 5 |
| LH-RH agonist (Buserelin) による子宮内膜症の治療 —血中ホルモンおよび子宮内膜に対する影響— | 田中 昭一・他 | 13 |
| Obesity in Women with Marked Hyperprolactinemia | Katsuyoshi SEKI・他 | 20 |
| A Clinical Study on 210 Patients with Galactorrhea | Yoshihito FUKAMATSU・他 | 23 |
| Endocrinological Profile and Treatment for Patients with Delayed Ovulation | Saburo YAMASHITA・他 | 30 |
| ダナゾール療法開始後より血清 CA 125 で経過観察した外性子 宮内膜症の 3 症例—CA 125 marker としての有用性に関する検討— | 高橋健太郎・他 | 38 |
| ヒト月経周期に従った末梢血および卵巣静脈血中のインヒビン濃度について | 田辺 清男・他 | 42 |
| 透過電顕を用いた透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子進入過程の観察 | 川村 良 | 48 |
| IUD の作用機序に関する研究 (IUD 装着子宮内膜組織の細胞 核 DNA 量の検討からみた作用機序の考察) | 関根 達征・他 | 55 |
| Anti-zona Pellucida Activities in Human Sera from WHO Reference Bank for Reproductive Immunology as Determi- ned by the Passive Hemagglutination reaction | Masaharu KAMADA・他 | 60 |
| Natural Family Planning (NFP) の各種技法(受精期自己認知法) 利用の現状 | 村山 茂・他 | 65 |
| 精子過少症に対する配偶者間人工授精 (AIH) の有用性に関する検討 | 中谷 一夫・他 | 72 |
| 特発性男子不妊症の Methylcobalamin による長期治療成績について | 岩本 晃明・他 | 80 |
| 精液性状に及ぼす Kallikrein-Vitamin B ₁₂ 併用療法の臨床効果について | 櫻木 範明・他 | 87 |
| 停留睾丸の遺伝性 | 角谷 秀典・他 | 91 |
| Intracellular Recording and Staining of the Rat Sertoli Cell and Phasic Change in Its Membrane Potential | Masanori YAMAMOTO・他 | 95 |
| Effects of Castration and Testosterone Enantate Replacement Therapy on the Gamma-Glutamyl Transpeptidase (α -GTP) Activity in the Rat Epididymis | Teruo KOHDAIRA・他 | 100 |
| エタノール処置によるマウス卵子の単為発生誘起と割球融合 および受精卵細胞質の注入 | 角田 幸生・他 | 105 |
| マウス卵子の生存能に及ぼす加齢の影響 | 小野寺政一・他 | 114 |
| Effect of Retinol and Taurine on Capacitation and the Acro- some Reaction of Guinea Pig Spermatozoa | Kahei SATO・他 | 118 |
| Pregnancy in Rabbits Artificially Inseminated into the Oviduct | Kiichi KANAYAMA・他 | 123 |
| TW 系ラット (精巣上体および精管欠損) における Wolff 管の 発育, 胎子精巣のテストステロン含有量および Wolff 管のテストステロン感受性 | 味沢 千代・他 | 128 |
| 犬真性両側性半陰陽の一例 | 野村 紘一・他 | 135 |
| 地方部会講演抄録 | | 142 |

会 告

第32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32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、多数の方々が御参加下さいますようお願い申し上げます。

記

期 日：昭和62年11月22日（日）役員会

23日（月・祝日）、24日（火）学術講演会

会 場：金沢市文化ホール……第1日目（23日）

（金沢市高岡町 15-1, TEL 0762-23-1221）

石川厚生年金会館……第2日目（24日）

（金沢市石引 4-17-1, TEL 0762-22-0011）

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（32巻2号、昭和62年4月発刊予定）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32回日本不妊学会会長

西 田 悦 郎

連絡先：金沢市宝町 13-1

金沢大学医学部産科婦人科学教室内

第32回日本不妊学会総会事務局

TEL 0762-62-8151 内線 3915, 3919

役 員

名 譽 会 員

| | | | |
|-------|-------|------------------|-------|
| 赤須文男 | 石川正臣 | 市川篤二 | 石塚直隆 |
| 大越正秋 | 落合京一郎 | 大内広子 | 九嶋勝司 |
| 小島秋洲 | 小林隆 | 篠田糺 | 重松俊 |
| 鈴木雅一 | 竹内三郎 | 高井修道 | 滝一郎 |
| 中條誠一郎 | 西川義正 | 野嶽幸雄 | 長谷川敏雄 |
| 藤生太郎 | 牧野佐二郎 | 松本清一 | 百瀬剛一 |
| 森山豊 | 渡辺行正 | A. Campos da Paz | |

理 事

| | | | |
|--|-------|-------|-------|
| 理 事 長 副 理 事 長 理 事 定 員 外 理 事 | 石神襄次 | 酒徳治三郎 | 木下佐 |
| | 佐久間勇次 | 石島芳郎 | 入谷明 |
| | 飯塚理八夫 | 永田行博 | 中野仁雄 |
| | 高木繁彦 | 森崇英 | 八神喜昭 |
| | 水野正哲也 | 荒井清 | 五十嵐正雄 |
| | 清水哲也 | | |
| | 西田悦郎 | | |
| | | | 島崎淳彦 |
| | | | 広井正良 |
| | | | 和久正治 |
| | | | 久住治男 |

監 事

黒田一秀 坂元正一 高嶺浩

幹 事

| | | | |
|------------------------------|-------|-------|------|
| 代 表 幹 事 幹 事 | 百瀬和夫 | 味香勝也 | 有馬直美 |
| | 赤祖父一知 | 岡田清巳 | 鎌田正晴 |
| | 内海恭文 | 佐藤孝道 | 玉田太郎 |
| | 小林俊夫 | 百目鬼郁男 | 野田洋一 |
| | 津端捷彦 | 水野金一郎 | 毛利秀雄 |
| | 穂坂正彦 | | |
| | | | 伊藤晴夫 |
| | | | 楠原浩二 |
| | | | 田中昭一 |
| | | | 平野陸男 |
| | | | 守殿貞夫 |

評 議 員

| | | | |
|--|------|-------|------|
| 北 海 道 支 部 一戸善兵衛 東 北 支 部 折笠精一 関 東 支 部 安藤弘 大地隆温 中山徹也 | 金川弘司 | 河田啓一郎 | 熊本悦明 |
| | 高橋克幸 | 平野陸男 | 正木淳二 |
| | 石田一夫 | 今村一男 | 岩崎寛和 |
| | 齐藤幹 | 高見沢裕吉 | 竹内正七 |
| | 中原達夫 | 新島端夫 | 藤井明和 |
| | | | 大島博幸 |
| | | | 寺島芳輝 |
| | | | 毛利秀雄 |

百瀬和夫
中部支
川島吉良
北陸支部
片山喬
関西支部
磯島晋三
守殿貞夫
中国・四国支部
石橋功
九州支
大井好忠
岡村均

杉山陽一
赤祖父一知
岡田弘二
森純一
竹中生昌
木川源則
迎俊彦

友田豊
館野政也
榎木勇
吉田修
関場香
古賀脩
山辺徹

野田克己
富永敏朗
杉本修
前田一雄
立山浩道

福田透
友吉唯夫
仁平寛己
中山道男

Japanese Journal of Fertility and Sterility

(Vol. 32, No. 1, 1987)

Japanese Society of Fertility and Sterility

CONTENTS

Original

- Effects of Tokishakuyakusan and Its Components on Progesterone
Secretions by Corpora Lutea.....*S. Usuki* 1
- Hormonal Changes during Athletic Activity in Female Badminton
Players.....*J. Sasaki, N. Mesaki, M. Shoji & H. Iwasaki* 5
- Intranasal Treatment with Luteinizing Hormone-releasing Hormone Agonist
(Buserelin) in Women with Pelvic Endometriosis—Endocrinological and
Histological Finding during and after Treatment—.....*S. Tanaka, M. Okawada,*
H. Watanabe, M. Mizunuma,
A. Azumaguchi & M. Hashimoto13
- Obesity in Women Marked Hyperprolactinemia.....*K. Seki & K. Kato*20
- A Clinical Study on 210 Patients with Galactorrhea.....*Y. Fukamatsu, K. Tomita,*
K. Yoshida, T. Tsukamoto & T. Fukuta23
- Endocrinological Profile and Treatment for Patients with Delayed
Ovulation.....*S. Yamashita, T. Ito, A. Yakabe & N. Kinashi*30
- Three Cases of External Endometriosis Followed Using Serum
CA 125 after Danazol-treatment—Studies on the Usefulness of
CA 125 as a Marker in Patients with External Endometriosis—.....*K. Takahashi,*
K. Yoshino, T. Shirai, A. Nishigaki,
Y. Araki & M. Kitao38
- Inhibin Levels in Peripheral and Ovarian Vein Blood throughout
the Human Menstrual Cycle.....*K. Tanabe, S. Shiraishi, Y. Kowaguchi,*
S. Kido, K. Sugimura, Y. Nakamura & R. Iizuka42
- Ultrastructural Observations of the Process of Human Sperm Penetration
into the Zona-free Hamster Eggs.....*M. Kowamura*48
- A Study on the Antifertility Effect of IUD (Consideration of Its
Antifertility Effect for the Quantitative Observation of Nuclear DNA
in the Endometrial Tissue of the IUD-inserted Uterus).....*T. Sekine,*
H. Watanabe, N. Komuro & H. Ito55
- Anti-zona Pellucida Activities in Human Sera from WHO Reference
Bank for Reproductive Immunology as Determined by the Passive
Hemagglutination Reaction.....*M. Kamada, H. Hasebe,*
M. Irahara, T. Kinoshita, O. Naka & T. Mori60
- The Present State of Utilization of NFP Techniques (Fertility

| | | |
|---|--|-----|
| Awareness Methods) | <i>S. Murayama, T. Hashimoto, T. Saito,</i> <i>K. Shimizu, K. Saito, T. Nozawa & Y. Suda</i> | 65 |
| The Efficiency of AIH (Artificial Insemination of Husband's Semen) on the Patients of the Oligospermia | <i>K. Nakatani & H. Hoshiai</i> | 72 |
| Effect of Long Term Methylcobalamin Therapy on Idiopathic Male Infertility | <i>T. Iwamoto, A. Iwasaki, M. Hirokawa,</i> <i>K. Matsushita & S. Asakura</i> | 80 |
| Effects of a Combination Therapy of Kallikrein and Methylcobalamine on Sperm Count and Its Motility in Men with Oligozoospermia and/or Asthenozoospermia | <i>N. Sakuragi, T. Tanaka, M. Oikawa,</i> <i>S. Fujimoto & K. Ichinoe</i> | 87 |
| Inheritance of Cryptorchidism | <i>H. Sumiya, M. Takahara, Z. Kataumi,</i> <i>K. Kawamura, H. Fuse, S. Yanagi, H. Ito & J. Shimazaki</i> | 91 |
| Intracellular Recording and Staining of the Rat Sertoli Cell and Phasic Change in Its Membrane Potential | <i>M. Yamamoto, K. Miyake & H. Mitsuya</i> | 95 |
| Effects of Castration and Testosterone Enantate Replacement Therapy on the Gamma-Glutamyl Transpeptidase (γ -GTP) Activity in the Rat Epididymis | <i>T. Kohdaira, Y. Kinoshita & M. Konno</i> | 100 |
| Activation of Mouse Eggs In Vitro with Ethanol Treatment, and the Effects of Blastomere Fusion and Microinjection of Cytoplasm from Fertilized Eggs on the Survival of Parthenogenetic Eggs | <i>Y. Tsunoda & T. Sugie</i> | 105 |
| Effect of Maternal Age on Viability of Ova in Mice | <i>M. Onodera & Y. Ishijima</i> | 114 |
| Effect of Retinol and Taurine on Capacitation and the Acrosome Reaction of Guinea Pig Spermatozoa | <i>K. Sato, Y. Suzuki & M. Endo</i> | 118 |
| Pregnancy in Rabbits Artificially Inseminated into the Oviduct | <i>K. Kanayama,</i> <i>T. Sankai, T. Endo & Y. Sakuma</i> | 123 |
| Pathogenesis of the Aplasia in the Epididymis and Ductus Deferens of the TW Inbred Rat | <i>C. Ajisawa, H. Ikadai, K. Taya & T. Imamichi</i> | 128 |
| True Bilateral Hermaphroditism in a Cocker Spaniel Dog | <i>K. Nomura, S. Niiya,</i> <i>M. Katsurada & K. Inoue</i> | 135 |

EFFECTS OF TOKISHAKUYAKUSAN AND ITS COMPONENTS ON PROGESTERONE SECRETIONS BY CORPORA LUTEA

Satoshi USUKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Clinical
Medicine, University of Tsukuba, Niiharigun, Ibaraki 305, Japan

(Director: Prof. H. Iwasaki)

Abstract: Twenty-seven day-old female Wistar-Imamichi rats were subcutaneously injected with 20 i.u. of PMS and followed in 56 hours by 40 i.u. of hCG. Seven days after the hCG injection, the ovaries were removed and perfused with media containing an extract of Tokishakuyakusan (TJ-23), hoelen, peony root, alisma rhizome, atractylodes lancea rhizome, Japanese angelica root, cnidium rhizome or ginseng. The perfused medium was assayed for progesterone by the radioimmunoassay. TJ-23, hoelen, peony root, alisma rhizome and Japanese angelica root increased the concentrations of progesterone, whereas atractylodes lancea rhizome, cnidium rhizome and ginseng showed no significant effect. These results suggest that TJ-23, hoelen, peony root, alisma rhizome or Japanese angelica root stimulates rat corpora lutea to secrete progesterone and that the efficacy of TJ-23 may be attributed to that of hoelen, peony root, alisma rhizome or Japanese angelica root.

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 1-4, 1987)

Introduction

Chinese herbal medicines have been used in safe for more than 2000 years and recently they have been had a better opinion of because of their efficacy. However, there are very few studies on the relationship between Chinese herbal medicines and ovarian steroidogenesis. Usuki^{3-6,8)} reported that Hachimijiogan (TJ-7), TJ-23 and Keishibukuryogan are closely related to gonadal steroidogenesis, and the previous report by Usuki⁸⁾ suggested that TJ-23 stimulates rat corpora lutea to secrete progesterone. The present study was carried out to investigate *in vitro* the effect of TJ-23 and its components on progesterone secretions by corpora lutea.

Materials and Methods

Immature female Wistar-Imamichi rats obtained from Imamichi Institute for Animal Reproduction (Saitama, Japan) were used in

all experiments and maintained in an environmentally controlled room illuminated between 8:00 and 20:00. The animals were subcutaneously injected with 20 i.u. of PMS (pregnant mare's serum gonadotropin; Teikokuzoki Co. Ltd., Tokyo, Japan) on day 27 of age and followed by 40 i.u. of hCG (human chorionic gonadotropin; Mochidaseiyaku Co. Ltd., Tokyo, Japan) 56 hours after the PMS injection. They were sacrificed by decapitation under ether anesthesia 7 days after the hCG injection. The ovaries were removed to cold saline, stripped off the periovarian bursa and cut into halves. Each half tissue was cut by a dermatone blade into slices approximately 0.5 mm thick. Five slices of ovarian tissue were placed in an incubation chamber, medium volume 0.5ml which was set in a 37°C water bath. The synthetic TC-199 medium (1% glucose, pH 7.4) was continually saturated with a mixture of 95% oxygen and 5% car-

Table 1 Main herbs and components of Tokishakuyakusan (TJ-23)

| Herbs | TJ-23 | Main components |
|-----------------------------|-------|---|
| Hoelen | 4* | eburicoic acid, dehydroeburicoic acid, ergosterol, pachyman |
| Peony root | 4 | paeoniflorin, albiflorin, procyanidin B-1, sucrose |
| Alisma rhizome | 4 | alisol A, alisol B, D-glucose, D-fructose, sucrose |
| Atractylodes lancea rhizome | 4 | hinesol, β -eudesmol, elemol |
| Japanese angelica root | 3 | ligustilide, butylidenephthalide, β -sitosterol |
| Cnidium rhizome | 3 | cnidilide, neocnidilide, ligustilide |

* Numbers represent the amount (g) of each herb.

bon dioxide and pumped through polyethylene tubing to the incubation apparatus using a multichannel infusion pump (Yoshie Science Co. Ltd., Tokyo, Japan)⁷⁾. After 20 minutes of preincubation, the experiment was performed. The perfusion was carried out with the medium for a control period of 60 minutes prior to the stimulation experiment, and then the media containing the stimulus (2-20 μ g/ml of TJ-23 and 2 μ g/ml of hoelen, peony root, alisma rhizome, atractylodes lancea rhizome, Japanese angelica root, cnidium rhizome or ginseng) were perfused for 200 minutes. The flow rate of the medium was 2.5ml/20 minutes. The effluents were collected every 20 minutes into a test tube. Chinese herbal medicines used in this experiment were TJ-23 and its components (hoelen, peony root, alisma rhizome, atractylodes lancea rhizome, Japanese angelica root and cnidium rhizome) (Table 1) and ginseng. All of these herbal preparations were extracted and they were given from Tsumura Juntendo Co. Ltd. (Tokyo, Japan). These herbal extracts were directly dissolved into the medium and utilized. The perfusion medium was frozen and kept at -20°C until assayed for progesterone by the radioimmunoassay²⁾.

Results

Figure 1 shows the dynamics and mode of progesterone secretions in the corpus luteum perfused with 2-20 μ g/ml of TJ-23. The values increased gradually after stimulation and reached their peaks 20-40 minutes after the initial stimulation, thereafter revealing a plateau. The effect of 2 μ g/ml of TJ-23 was

more remarkable than that of 20 μ g/ml of TJ-23. In a succeeding parallel experiment, the effect of each component of TJ-23 on the secretion of progesterone was detected in order to evaluate the detailed mechanism whether the augmented progesterone secretion by TJ-23 treatment is attributable to the whole combination efficacy of the components of TJ-23 or each effect of each component of TJ-23.

In the TJ-23, Hoelen, Peony root, Japanese angelica root or Alisma rhizome 2 μ g/ml group,

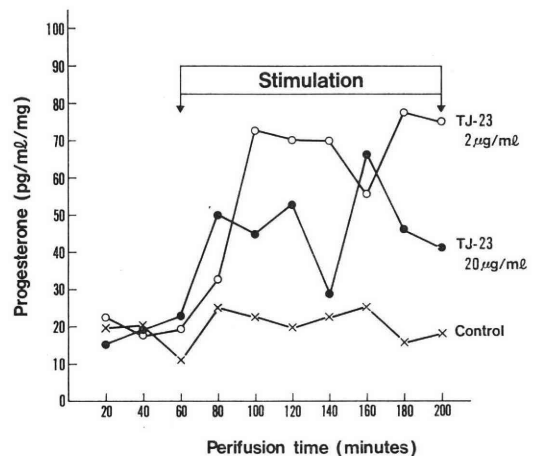


Fig. 1 Effects of Tokishakuyakusan (TJ-23) on progesterone secretion by rat corpora lutea perfused *in vitro*.

Immature rats were treated with PMS-hCG as mentioned in Materials and Methods. Data represent the mean of three determinations (pg/ml/mg).

×—×; Medium alone (control), ○—○; 2 μ g/ml of TJ-23, ●—●; 20 μ g/ml of TJ-23.

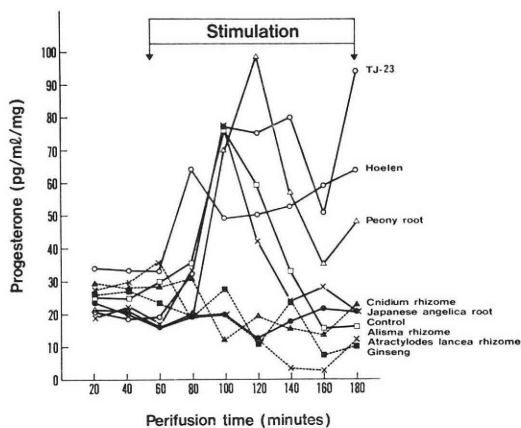


Fig. 2 Effects of TJ-23, hoelen, peony root, alisma rhizome, Japanese angelica root, cnidium rhizome, atractylodes lanceae rhizome and ginseng on progesterone secretions by rat corpora lutea perfused *in vitro*.

Immature rats were treated with PMS-hCG as described in Materials and Methods. Data represent the mean of three determinations (pg/ml/mg).

●—●; Medium alone (control), ⊙—⊙; 2μg/ml TJ-23, ○—○; 2μg/ml Hoelen, △—△; 2μg/ml Peony root, □—□; 2μg/ml Alisma rhizome, ×—×, Japanese angelica root, ▲···▲, 2μg/ml Cnidium rhizome, ×···×; 2μg/ml Atractylodes lanceae rhizome, ■···■; 2μg/ml Ginseng.

The solid lines correspond to the increased progesterone levels and the dotted lines correspond to no significant change or a slight decrease of progesterone.

the concentrations of progesterone increased approximately 20 minutes after stimulation, and then they reached their peaks in 20-60 minutes after stimulation, thereafter revealing a plateau in the TJ-23 or hoelen group, or a gradual decrease almost similar to the levels of the control group (medium alone) (Fig. 2).

In the cnidium rhizome group, the values showed a low level almost to that in the control group and revealed no significant change, while the atractylodes lancea rhizome group revealed a moderate decrease 80 minutes after stimulation as compared with the control group (Fig. 2). In the ginseng group, the levels of progesterone showed a low level almost similar to that in the control group.

Discussion

TJ-23 is known to secrete progesterone by rat preovulatory follicles³⁾, rat corpora lutea⁸⁾ and during the human luteal phase¹⁾. However, the detailed mechanism of progesterone secretions by corpora lutea by TJ-23 treatment has not been elucidated. In this study, it was again proved that TJ-23 stimulates rat corpora lutea to secrete progesterone. TJ-23 is also known to consist of six herbs of hoelen, peony root, Japanese angelica root, alisma rhizome, cnidium rhizome and atractylodes lancea rhizome (Table 1). However, the mechanism of the reason why TJ-23 stimulates the corpus luteum to secrete progesterone is not clarified.

In this experiment, hoelen, peony root, Japanese angelica root or alisma rhizome stimulated rat corpora lutea to secrete progesterone.

This suggests that the efficacy of TJ-23 on progesterone secretion by corpora lutea may be due to the effect of hoelen, peony root, Japanese angelica root and alisma rhizome. In contrast, atractylodes lancea rhizome showed a tendency to decrease the secretion of progesterone. This result also indicates that the efficacy of TJ-23 may consist of not only each effect of each component of TJ-23 but also the multiplied efficacy of the combined components because the levels of progesterone secreted do not agree with the total progesterone secretions of each herb. Ginseng is known to have some effect on spermatogenesis³⁾, but in this study it has no significant effect on progesterone secretions by corpora lutea. This suggests that ginseng may have no direct effect on progesterone secretions by corpora lutea.

These results suggest that the efficacy of TJ-23 on progesterone secretions by rat corpora lutea may be attributable to that of hoelen, peony root, Japanese angelica root and alisma rhizome which are components of TJ-23. However, the combination effect of each component may be also not ignored. Further study is in progress.

Acknowledgements

The author wishes to acknowledge the skillful technical assistance of Mmes. S. Kawamura

and M. Kusumi. The author is also grateful to Prof. H. Iwasaki, University of Tsukuba, for his helpful criticism of the manuscript. This study was partly supported by the Tsukuba University Project Research.

References

- 1) Fukushima, M.: Luteal insufficiency. World of Obstetrics and Gynecology (Japanese press), 34: 127-134, 1982.
- 2) Usuki, S.: Gonadotropic regulation of estrogen secretion by rat ovarian follicles. Acta. Obst. Gynaec. Jpn., 34: 863-872, 1982.
- 3) Usuki, S.: Effect of Chinese herbal medicine on steroidogenesis in rat ovarian follicles. In Advances in Chinese Herbal Medicine, pp. 94-109. Eds S. Takeuchi & S. Sakamoto. Tokyo: Diagnosis and Therapy, 1983.
- 4) Usuki, S.: Effects of Chinese herbal medicine on testosterone and estrogen secretions by mature rat testes. In Advances in Chinese Herbal Medicine, pp. 110-116. Eds S. Takeuchi & S. Sakamoto. Tokyo: Diagnosis and Therapy, 1983.
- 5) Usuki, S.: Hachimijiogan increases estradiol- 17β levels and stimulates spermatogenesis in oligospermic men. JAFES, 3: 139-143, 1983.
- 6) Usuki, S.: Hachimijiogan changes serum hormonal circumstance and improves spermatogenesis in oligozoospermic men. Am. J. Chin. Med., XIV: 46-50, 1986.
- 7) Usuki, S.: Gonadotropic regulation of DNA polymerase- α in rat preovulatory follicles. Jap. J. Fert. Steril., 31: 371-378 1986.

- 8) Usuki, S.: Effects of Chinese herbal medicine on progesterone secretions by corpus luteum. Jap. J. Fert. Steril., 31: 482-486 1986.

ラット黄体に於ける当帰芍薬散および構成生薬の progesterone 分泌に及ぼす影響について

筑波大学臨床医学系産婦人科

白 杵 愼

当帰芍薬散 (TJ-23) の黄体に於ける progesterone 産生分泌機序を解明する目的で、PMS-hCG 処理ラット卵巣に於ける TJ-23 の構成生薬である茯苓、芍薬、当帰、沢瀉、川芎、および蒼朮の progesterone 分泌に及ぼす影響について *in vitro* での検討を加えた。27日齢 Wistar-Imamichi 系雌ラットに PMS 20IU を皮下投与し、56時間後に hCG 40IU を投与後7日目にエーテル麻酔下で断頭・屠殺し卵巣を摘出した。

摘出卵巣を 0.5mm の切片に細切し、当帰芍薬散エキス (TJ-23)、茯苓エキス、芍薬エキス、当帰エキス、沢瀉エキス、川芎エキスおよび蒼朮エキスで perfusion (180-200分) し、medium 中の progesterone 濃度を radioimmunoassay した。Medium 中の progesterone 濃度は茯苓、芍薬、当帰および沢瀉の各群でいずれもコントロールに比べ増加した。その分泌パターンは、各群の刺激後約20分で増加し、20~60分後にピークを形成し、以後 plateau ないし減少した。一方、川芎ないし蒼朮群では progesterone 濃度に有意な変化は認められなかった。

以上の事実は、TJ-23 の黄体での progesterone 分泌増加作用は、その構成成分である茯苓、芍薬、当帰および沢瀉の作用に基づくものであることを示唆している。

(受付: 昭和61年1月14日)

女子一流選手のスポーツ活動時の内分泌学的変動

Hormonal Changes during Athletic Activity in Female Badminton Players

筑波大学臨床医学系産婦人科

佐々木 純一 目崎 登

Junichi SASAKI Noboru MESAKI

庄司 誠 岩崎 寛和

Makoto SHOJI Hirokazu IWASAKI

Department of Obstetrics and Gynecology, Institute of Clinical Medicine,
University of Tsukuba, Ibaraki, Japan

女性のスポーツ活動の積極化にともない、月経現象に及ぼす影響が注目されている。そこで、スポーツ・トレーニングに起因する各種月経異常発現機転を解明するために一流バドミントン選手を対象として、スポーツ活動時、ゲーム時およびトレッドミル運動負荷試験時の内分泌学的変動を調査し、以下の結論を得た。

1. トレッドミル運動負荷試験時の内分泌学的変動は、実際のスポーツ活動時の変動を良く反映している。
2. estrone および estradiol は運動にともない増加傾向を示した。
3. testosterone には大きな変動は認められなかったが、androstenedione は増加傾向を示した。
4. FSH および LH は運動時に明らかな一定の変動を示さなかった。
5. prolactin は運動にともない著明に増加した。

以上の成績より、スポーツ活動にともなう各種月経異常の発現機転において、運動時の一過性の著明な prolactin 上昇が大きく関与しているものと思われる。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 5-12, 1987)

緒 言

近年の国民的スポーツブームにより、老若男女を問わず、多くの人々が日常的にスポーツに親しんでいる。また、競技スポーツ領域における女子の成績の向上は目覚ましいものがあり、日々に激しいスポーツ・トレーニングが行われるようになってきた。これら、女子運動選手では、早期に開始されるトレーニングによる初経発来の遅延傾向や¹⁻³⁾、毎日の激しいトレーニングに起因すると思われる各種月経異常を呈する者が多く注目されている⁴⁻⁶⁾。

女子運動選手の月経異常発現機転としては、1) スポーツ・トレーニングによる精神的・身体的ストレス、2) コンディションの調節や身体的プロポーションの維持などを目的とした減食あるいは節食などによる体重減少、

体脂肪量の減少、3) スポーツ活動のたびごとに繰り返される内分泌学的変動などが、その発現要因として考えられている⁷⁾。

我々は、その主たる要因としてスポーツ活動時の内分泌学的変動を捉え検討しているが^{8,9)}、今回は実業団のトップレベルにある女子バドミントン選手のスポーツ活動時の内分泌学的変動について検討を行った。

対象および方法

A 対象

世界的にもトップレベルにある選手を含む、実業団の女子バドミントン部員9名を対象とした(表1)。なお、対象者9名は、月経周期および血清 progesterone 値より、卵泡期5名と黄体期4名に分類した。

B 方法

表 1 対象者の身体的特徴と月経歴

| | | |
|--------------------|--------|-----------|
| Age | (yrs) | 21.3±0.9 |
| Height | (cm) | 163.1±1.9 |
| Weight | (kg) | 58.0±1.7 |
| Menarche | (yrs) | 12.7±0.5 |
| Menstrual cycle | (days) | 31.1±1.0 |
| Menstrual duration | (days) | 5.0±0.2 |

(Mean±SE)

表 2 血清ホルモンの基礎値

| Hormone | Phase | Follicular Phase | Luteal Phase |
|-----------------|----------|------------------|--------------|
| | | | |
| FSH | (mIU/ml) | 7.9±0.3 | 5.0±0.3 |
| LH | (mIU/ml) | 13.6±0.6 | 9.1±0.9 |
| Prolactin | (ng/ml) | 11.5±2.0 | 8.8±1.0 |
| Estrone | (pg/ml) | 42.6±5.1 | 77.2±6.7 |
| Estradiol | (pg/ml) | 57.7±6.6 | 161.6±9.3 |
| Testosterone | (ng/ml) | 0.51±0.07 | 0.45±0.05 |
| Androstenedione | (ng/ml) | 1.31±0.10 | 0.95±0.14 |

(Mean±SE)

1. シングルスゲーム

実際のスポーツ活動として、バドミントンのシングルスゲームを 8 名に行わせた。

採血は、早期安静時、ゲーム終了直後および座位安静 1 時間後に行った。

2. 運動負荷試験

シングルスゲームの翌日に、トレッドミルの漸増負荷法により、呼吸・循環器系機能の連続監視のもとで、被験者が疲労困憊するまでの最大運動負荷試験を実施した。

採血は、早朝安静時、運動負荷試験終了直後および座位安静 1 時間後に行った。

3. 血清ホルモンの測定

血清は直ちに分離し、測定まで -20°C に凍結保存した。

血清中の estrone, estradiol, progesterone, testosterone, androstenedione, FSH, LH および prolactin 濃

度を radioimmunoassay 法により測定した。

成績

スポーツ活動時の血清ホルモン値の変動は、安静時の値を基準として、パーセントチェンジとして表した。

A 安静時の血清ホルモン値

早朝安静時の血清ホルモン濃度の 2 日間の平均値を、卵胞期 5 名、黄体期 4 名に分けて表 2 に示す。いずれも異常値を示すものはなく、また高 prolactin 血症の者も認められなかった。

B ゲーム時の内分泌学的変動

1. Androgen のゲーム時の変動

ゲーム中には、卵胞期および黄体期とも、testosterone にはほとんど変動は認められなかったが、androstenedione は軽度の上昇傾向を示した。しかし、両者とも

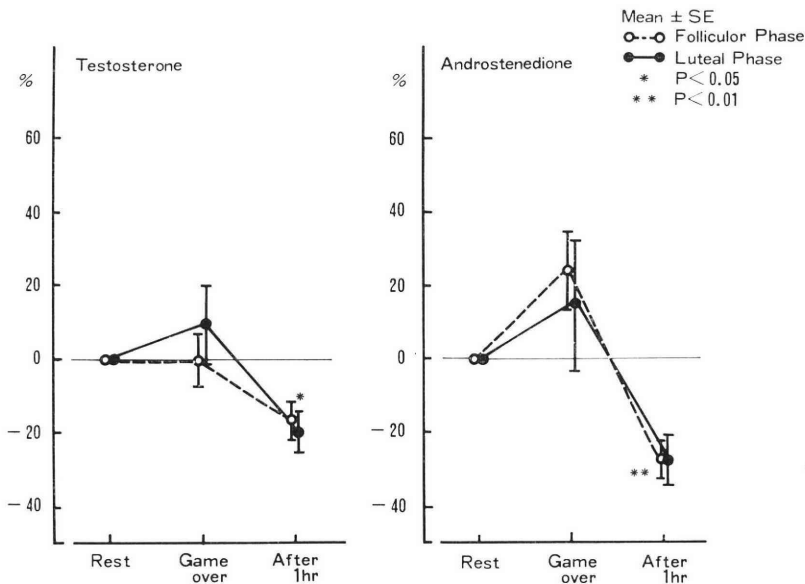


図 1 ゲーム時の Testosterone および Androstenedione の変動

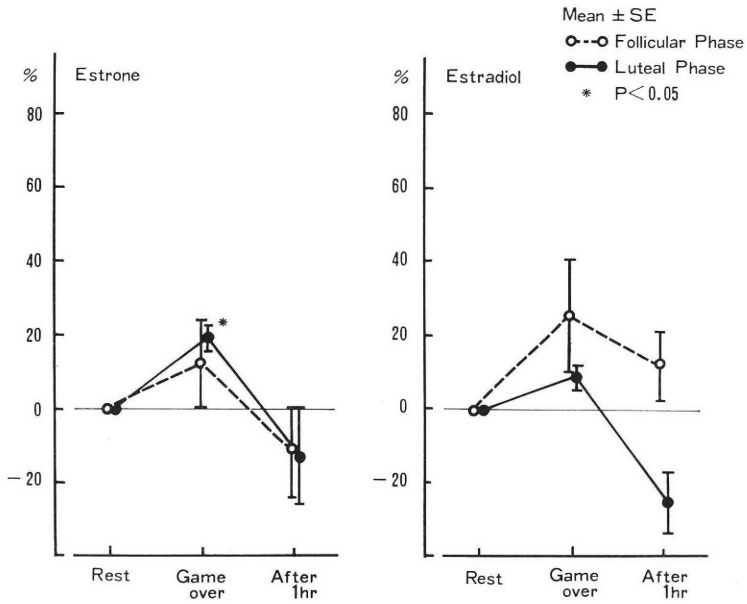


図 2 ゲーム時の Estrone および Estradiol の変動

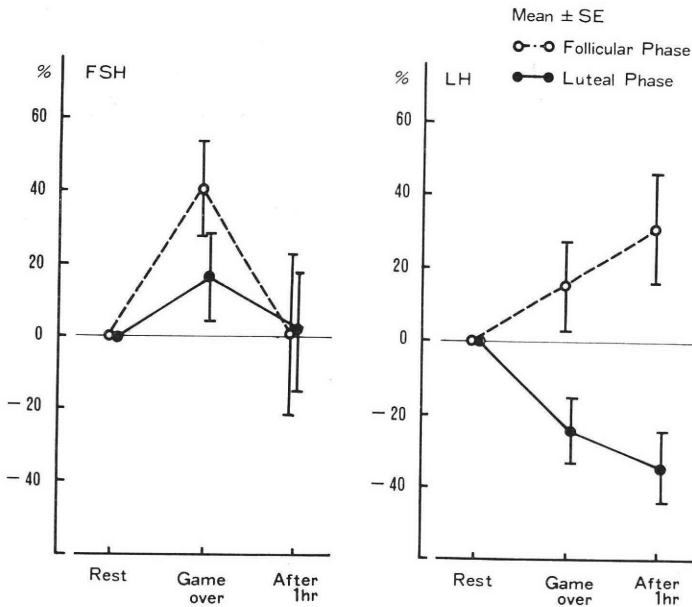


図 3 ゲーム時の FSH および LH の変動

ゲーム終了1時間後には低下していた (図1).

2. Estrogen のゲーム時の変動

estrone はゲーム中に、両期とも上昇傾向を示しており、黄体期の増加は著明であつた。しかし、estradiol には両期とも著明な変動は認められなかつた (図2).

3. Gonadotropin のゲーム時の変動

ゲーム中に、FSH は両期とも上昇傾向を示すが、そ

の変動は明らかではなかつた。LH は卵胞期では上昇傾向を、これに対し黄体期では減少傾向を示しており、一定の傾向は認められなかつた。いずれの変動も、統計学的には明らかな変化ではなかつた (図3).

4. Prolactin のゲーム時の変動

ゲーム中の prolactin の変動は著明であり、両期とも増加しており、ゲーム終了直後には約 300%増加に達

Mean \pm SE
 ○-○ Follicular Phase
 ●-● Luteal Phase
 * P < 0.05

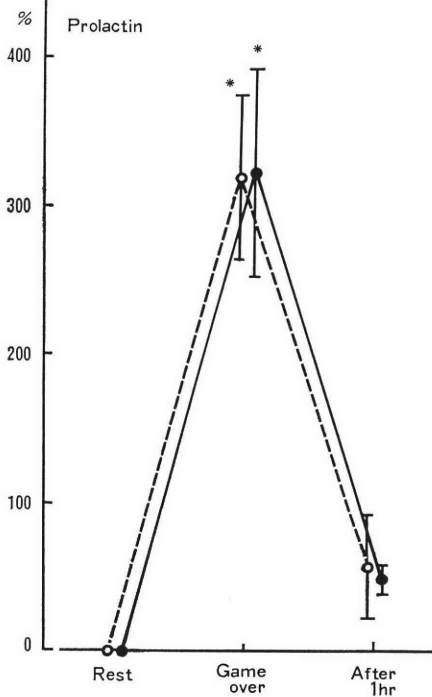


図4 ゲーム時の Prolactin の変動

している. なお, 実際の測定値は卵胞期で40ng/ml, 黄体期で42ng/ml を示していた. しかし, これらの上昇反応は, ゲーム終了1時間後には減少した(図4).

C 運動負荷試験時の内分泌学的変動

1. Androgen の運動負荷試験時の変動

トレッドミルによる運動負荷試験時において, testosterone は卵胞期に上昇傾向を示しているが, 統計学的には著明な変化ではなかった. これに対し, androstenedione は両期とも運動負荷試験終了時には著明に増加しているが, 1時間後には前値に復した(図5).

2. Estrogen の運動負荷試験時の変動

estrogen の変動は, estrone は卵胞期において著明に増加している. estradiol は両期とも増加傾向を示しているが, 黄体期における変動が著明であった(図6).

3. Gonadotropin の運動負荷試験時の変動

この時の gonadotropin の変動をみると, 図7に示すごとく, FSH には大きな変動は認められなかった. また, LH の変動は両期とも増加傾向を示しているが, 統計学的には明らかな変動ではなかった.

4. Prolactin の運動負荷試験時の変動

運動負荷試験時の prolactin の変動は, ゲーム時と同様に, 両者とも著明に増加しており, 運動終了時には安静時の約200%の増加を示している. 実際の測定値でみると, 卵胞期は40ng/ml, 黄体期でも35ng/ml に達している. しかし, これらの上昇は運動終了により減少し, 運動終了1時間後には前値に復している(図8).

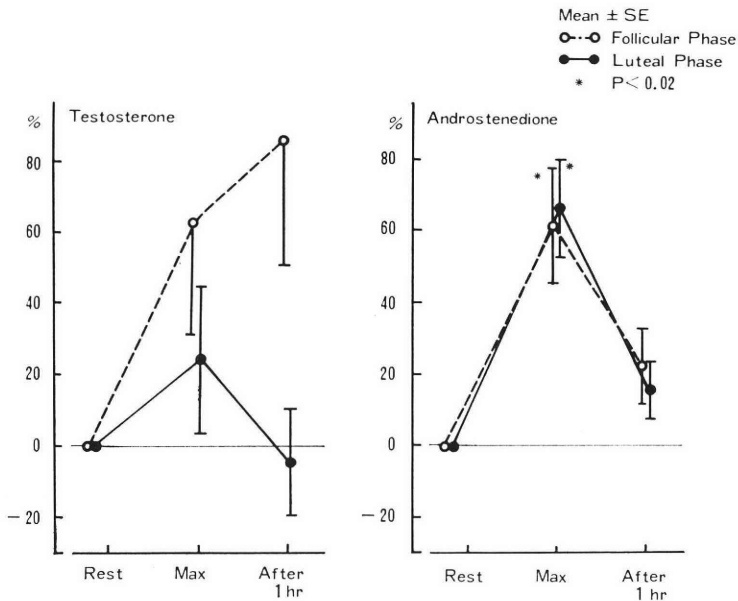


図5 運動負荷試験時の Testosterone および Androstenedione の変動

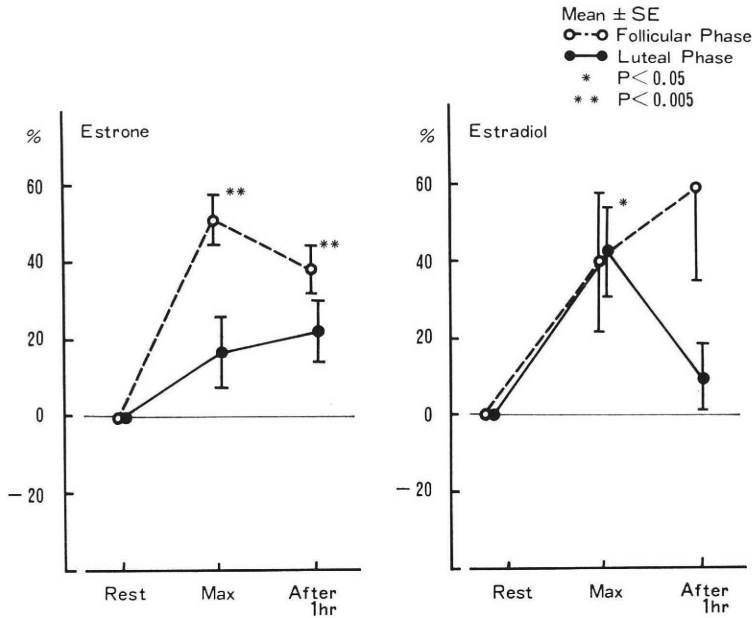


図 6 運動負荷試験時の Estrone および Estradiol の変動

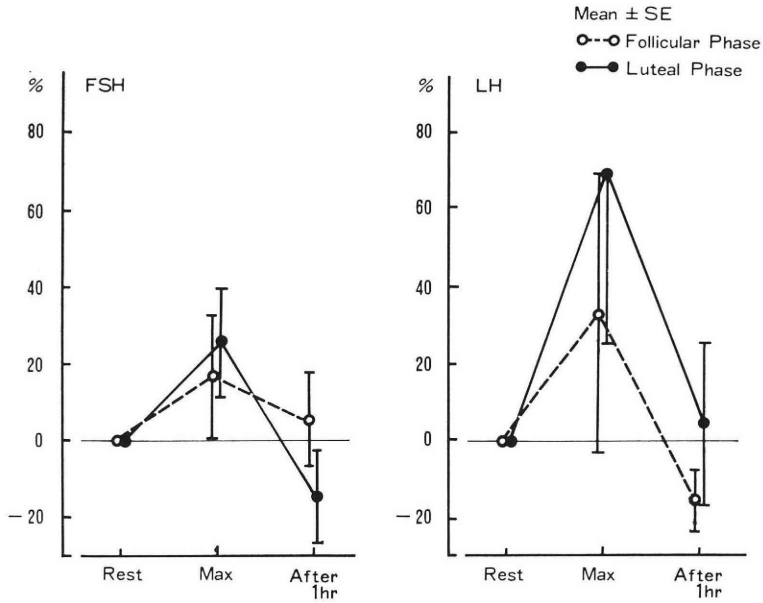


図 7 運動負荷試験時の FSH および LH の変動

考 案

本来、健康増進のために行われるスポーツ・トレーニングによって、逆に健康が害される危険性を有することは、保健学的に極めて重要な問題である。女性のスポーツ活動の積極化にともなう各種月経異常の発症は、その大部分が若い女性であることから、将来の妊孕性に及

ぼす影響などの重要な問題点を抱えている。このスポーツ活動にともなう月経異常の発症は、激しいスポーツ・トレーニングを行っている一流の競技選手ばかりでなく、一般のスポーツ愛好家においても認められる。すなわち、手軽に行えるスポーツとしてランニング（ジョギング）が大いに流行しているが、これらのジョギング愛好家においても、トレーニングによると思われる、月経異

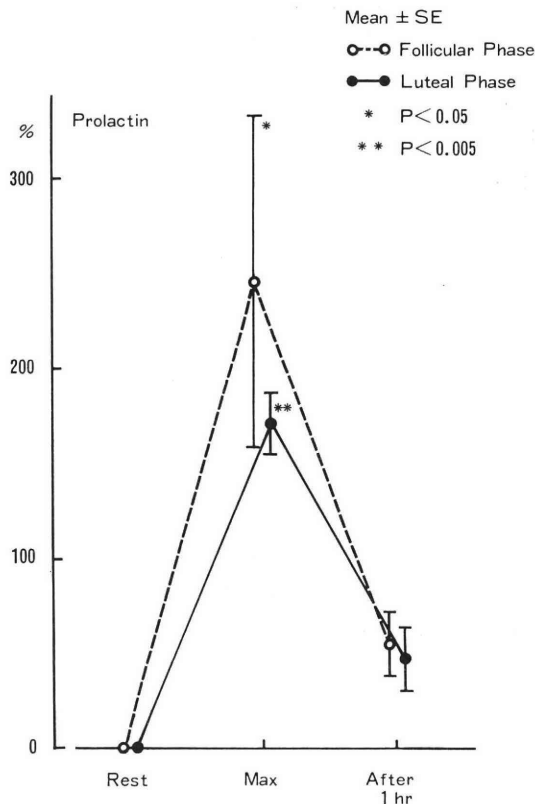


図 8 運動負荷試験時の Prolactin の変動

常や不正子宮出血を訴える者が高率である^{10,11}。このように、スポーツ活動に起因する各種月経異常の発現機転の解明は不可欠な問題である。

スポーツ活動に起因する月経異常の発現機転として、幾つかの要因が挙げられるが⁷、我々は運動時の内分泌学的変動が主要なる要因であると考えて、検討を行っている^{8,9}。

今回、一流運動選手のスポーツ活動時の内分泌学的変動について、実際のゲーム時および運動負荷試験時の変動について対比して検討したが、両者の成績は良く一致していた。すなわち、スポーツ活動時の内分泌学的変動を検索する場合、屋内で実施できる運動負荷試験で十分に信頼できる成績を得ることができる。

スポーツ活動時の estrogen の変動について、黄体期において estradiol は著明に上昇することをすでに報告したが^{8,9}、今回の検討においてもほぼ同様の傾向を示した。しかし、Baker et al.¹²は続発性無月経の陸上選手に関する検討で estradiol の減少を報告しているが、Schwartz et al.⁴は estrone/estradiol 比の上昇を報告している。この成績の差異は対象者および運動方法の違いによるものと考えられている。

さて、運動時の androgen の変動では、安静時にはいずれも正常範囲内にあつたが、testosterone には大きな変動は認められなかった。しかし、androstenedione においては運動時の上昇傾向が認められた。Baker et al.¹³は10マイル走行直後においては、testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosterone (DHA) および DHA-sulfate などは著明に増加するが、12~24時間後には前値に復したと報告している。これに対し、マラソン後に androstenedione は上昇したが、testosterone は減少したとの報告もある¹⁴。すなわち、androgen は脂肪において aromatization を受けて estrogen に転換されることから¹⁵、体脂肪の少ない運動選手ではこの転換率が低くなり、運動時の androgen 増加により androgen 過剰状態となり、月経異常を惹起するとも考えられるが、安静時の値は正常範囲内にあることから、この説は否定されるであろう。しかしながら、脂肪における steroid hormone の代謝としては、estrogen の代謝も重要である。すなわち、estradiol は脂肪組織において 16 α -hydroxylation を受け estriol となり排泄系に向かうが、脂肪が少ないときには 2-hydroxylation を受けて 2-hydroxyestron (catecholestrogen) となり¹⁶、排卵障害や続発性無月経などの各種月経異常をきたすものと考えられる。このことから、運動選手の体重減少、体脂肪量の減少は内分泌学的にみても、各種月経異常発現機転において重要な要因であると考えられる。事実、Dale et al.¹⁷は長距離ランナーでは持続的なトレーニングによる体重減少の結果として、稀発月経および続発性無月経の頻度が高くなると報告している。しかしながら、体形的には正常である陸上競技選手の続発性無月経も報告されており¹⁸、運動選手の各種月経異常の発現機転を体重減少、体脂肪量の減少のみで説明することはできない。

運動時の gonadotropin の変動に関しては、上昇、減少あるいは不変などと^{8,9,12-14}、必ずしも一定の傾向は認められていない。この事実、運動時の卵巣性 steroid hormone の変動は gonadotropin による feed back 機構による調節を受けていないことを示している。すなわち、運動時の卵巣性 steroid hormone の上昇は産生の増加によるものではなく、血流量の増加などともなう卵巣からの漏出によるものと考えられる。

これら各種 hormone の運動時の変動とは異なり、prolactin は運動により常に増加すると報告されている^{8,9,13,19}。すなわち、運動時の一過性の prolactin の上昇が女性のスポーツ活動ともなう各種月経異常発現機転において重要な要因であると考えられる。高 prolactin 血症などで周知のごとく、prolactin はヒト性機能

に対しては抑制的に作用している。近年、続発性無月経、無排卵性周期症さらに黄体機能不全症などの発症機転において prolactin の関与が注目されている。とくに、正 prolactin 血症者における夜間の一過性の prolactin 上昇の排卵障害の原因としての意義の重要性が指摘されている²⁰⁾。さらに、これらの者では TRH 負荷試験に対する血清 prolactin 値の異常分泌反応が認められている²¹⁾。我々は、大学運動選手に対する TRH 負荷試験において、月経周期異常者では血清 prolactin 値の異常分泌反応を示す者が多い事を認めた²²⁾。

これらの事実から、女性のスポーツ活動にともなう各種月経異常の発現機転において、運動時における一過性の prolactin 分泌亢進反応が大きく関与しているものと思われる。

このスポーツ活動時の prolactin 分泌亢進反応が如何なる機序によるのか、さらにそれが如何なる機序で性功能に影響を与えるのか、その詳細は不明であり、今後の検討が必要である。

女性の激しいスポーツ活動が生殖生理機能に及ぼす長期的な影響、将来の妊孕性に及ぼす影響などに関する詳細な調査が今後の重要な課題である。また、各種月経異常に悩む若いスポーツ選手が気軽に相談できるようなコンサルテーション・システムの確立が早急に必要である。

文 献

- 1) Frish, R. E., Gotz-Welbergen, A. V., McArthur, J. W., Albright, T., Witschi, J., Bullen, B., Birnholz, J., Reed, R. B. and Herman, H.: Delayed menarche and amenorrhea of college athletes in relation to age of onset of training. *J. A. M. A.*, 246: 1559, 1981.
- 2) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠, 岩崎寛和, 江田昌佑: スポーツトレーニングと初経発来. *日産婦誌*, 36: 49, 1984.
- 3) 小田原靖, 楠原浩二, 横山 敬, 松本和紀, 渡辺直生, 蜂屋祥一: 運動性無月経 (Exercise Associated Amenorrhoea) の検討: (第1報) 女子運動選手の月経異常の分析. *日不妊会誌*, 31: 29, 1986.
- 4) Schwartz, B., Cumming, D. C., Riordan, E., Selye, M., Yen, S. S. C. and Bebar, R. W.: Exercise-associated amenorrhea: A distinct entity? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 141: 662, 1981.
- 5) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠, 岩崎寛和, 江田昌佑: 大学運動選手の月経現象. *日産婦誌*, 36: 247, 1984.
- 6) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠, 岩崎寛和: 一流柔道選手の月経現象. *東日本スポーツ医学研究会会誌*, 5: 44, 1984.
- 7) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠: 女性のスポーツ活動と月経現象. *臨床スポーツ医学*, 2: 41, 1985.
- 8) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠, 岩崎寛和, 浅野勝己, 江田昌佑: 女子運動選手の運動負荷時における内分泌学的変動. *日産婦誌*, 38: 45, 1986.
- 9) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠, 岩崎寛和, 浅野勝己, 江田昌佑: 女子運動選手の長時間運動時の内分泌学的変動. *日産婦誌*, 39: 1, 1987.
- 10) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠, 岩崎寛和, 大木昭一郎, 江田昌佑: 筑波学園マラソン大会参加思春期少女の月経現象. *臨床スポーツ医学*, 3: (別刷)172, 1986.
- 11) 佐々木純一, 目崎 登, 庄司 誠, 岩崎寛和, 大木昭一郎, 江田昌佑: 筑波学園マラソン大会参加成熟期女性の月経現象. *臨床スポーツ医学*, 3: (別刷)175, 1986.
- 12) Baker, E. R., Marthur, R. S., Kirk, R. F. and Williamson, H. O.: Female runners and secondary amenorrhea: Correlation with age, parity, mileage, and plasma hormonal and sex-hormone-binding globulin concentrations. *Fertil. Steril.*, 36: 183, 1981.
- 13) Baker, E. R., Marthur, R. S., Landgrebe, S. C., Mooby, L. O. and Williamson, H. O.: Plasma gonadotropins, prolactin and steroid hormone concentrations in female runners immediately after a long-distance run. *Fertil. Steril.*, 38: 38, 1982.
- 14) Dessypris, A., Kuoppasalmi, D. E. and Adlercreutz, H.: Plasma cortisol, testosterone, androstenedione and luteinizing hormone (LH) in a non-competitive marathon run. *J. Steroid Biochem.*, 7: 33, 1976.
- 15) Richardson, G. S.: Hormonal physiology of the ovary. In *Gynecologic Endocrinology*, 2nd ed., (ed. J. J. Gold), p 55, Harper & Row, New York, Evanston, San Francisco and London, 1975.
- 16) Fishman, J., Boyar, R. M. and Hellman, L.: Influence of body weight on estradiol metabolism in young women. *J. Clin. Endocrinol.*, 41: 989, 1975.
- 17) Dale, E., Gerlach, D. H., Martin, D. E. and Alexander, C. R.: Physical fitness profile and reproductive physiology of the female distance runner. *Physician Sportsmed.*, 7: 83, 1979.
- 18) McArthur, J. W., Bullen, B. A., Beitins, T. Z., Pagano, M., Badger, T. M. and Klibanski, A.: Hypothalamic amenorrhea in runners of normal body composition. *Endocr. Res. Commun.*, 7: 13, 1980.
- 19) Brisson, G. R., Volle, M. A., DeCarufel,

- D., Desharnais, M. and Tanaka, M.: Exercise-induced dissociation of the blood prolactin response in young women according to their sports habits. *Horm. Metab. Res.*, 12: 201, 1980.
- 20) Board, J. A., Storlazzi, E. and Schneider, V.: Nocturnal prolactin levels in infertility. *Fertil. Steril.*, 36: 720, 1981.
- 21) 森 宏之, 合阪幸三, 松岡 良, 木川源則: 正プロラクチン性排卵障害婦人における Bromocriptine の排卵誘発作用の機序—いわゆる正プロラクチン血症性排卵障害における潜在性高プロラクチン血症の意義—. *日内分泌会誌*, 61: 38, 1985.
- 22) 目崎 登, 佐々木純一, 庄司 誠, 岩崎寛和, 浅野勝己: 運動選手の月経異常発来機転に関する検討. *臨床スポーツ医学*, 2: (増刊号) 18, 1985.

Hormonal changes during athletic activity in female badminton players

Junichi Sasaki, Noboru Mesaki, Makoto Shoji and Hirokazu Iwasaki

Department of Obstetrics and Gynecology,
Institute of Clinical Medicine, University
of Tsukuba, Ibaraki, Japan

Recently, causal relationship between athletic activity and increased incidence of menstrual dysfunction has led to an increased interest. However, the mechanism of the menstrual dysfunc-

tion due to endurance exercise has not been clarified yet.

We investigated hormonal changes during athletic activity in 9 female badminton players who are some of excel players in Japan.

Firstly, during badminton game, blood sample was obtained at rest, at the end of game and one hour post-game. Secondly, testing an incremental exercise test to exhaustion on treadmill, blood sample was obtained at rest, at the point of exhaustion and one hour post-exercise. Serum concentrations of estrone, estradiol, progesterone, testosterone, androstenedione, FSH, LH and prolactin were measured by radioimmunoassay.

Hormonal changes were analyzed on classified two groups (follicular phase; 5, luteal phase; 4). The hormonal changes during both treadmill exercise and badminton game showed almost same results. FSH, LH and testosterone of players who were in both groups did not show remarkable changes during athletic activity. Estradiol increased significantly in the group of luteal phase during athletic activity but there was no change in the group of follicular phase. However, estrone and androstenedione increased in both groups. Furthermore, prolactin increased significantly and reached to the mean level of 40 ng/ml in both groups.

Conclusively, it is suggested that the increment of prolactin in every day strenuous exercise may be one of a cause of menstrual dysfunction in athletic women.

(受付: 昭和61年4月1日)

LH-RH agonist (Buserelin) による子宮内膜症の治療

——血中ホルモンおよび子宮内膜に対する影響——

Intranasal Treatment with Luteinizing Hormone-releasing Hormone
Agonist (Buserelin) in Women with Pelvic Endometriosis
——Endocrinological and Histological Finding during and after Treatment——

札幌医科大学産婦人科学講座

田中 昭一 岡和田美加 渡辺 広史
Shoichi TANAKA Mika OKAWADA Hiroshi WATANABE

水沼正弘 東口篤司 橋本正淑
Masahiro MIZUNUMA Atsushi AZUMAGUCHI Masayoshi HASHIMOTO

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical College, Sapporo, Japan

LH-RH agonist (Buserelin) を経鼻投与法で、骨盤子宮内膜症7例に300~900 μ g/day, 23~35週間投与し、血中ホルモンおよび子宮内膜などを検討した。

本剤投与量は血中 E_2 値30pg/ml を目標としたが、7例中2例は30pg/ml 以下とならなかった。1例は初回投与量300 μ g であつたが、900 μ g まで増量しても30pg/ml 以上であり、1例は初回より900 μ g 投与量で、1過性に100pg/ml 以上を示した。その他の血中 T_4 , cortisol および prolactin に著変は認めなかつた。

また子宮内膜は、7例中3例が萎縮像、4例が増殖期初期像を示し、Danazol 投与時の内膜所見に類似しており、全体として、閉経期内膜を思わせる所見へ変化することが分つた。

子宮内膜所見、血中 E_2 値の変化より、本剤が子宮内膜症療法として効果が出るのには、投与量が900 μ g/day 以上、投与期間が5カ月以上必要であることが推定された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 13-19, 1987)

はじめに

子宮内膜症は古くから知られていた婦人科疾患であるが、最近再び注目されはじめてきている。これは本症の発生頻度が増加してきていること¹⁾、不妊症の原因として重要視されてきたこと²⁻⁴⁾、さらに新しい治療薬が次々と開発されてきた⁵⁻⁹⁾ などのためと思われる。

本症の治療法として、新しく使用されてきているのは Danazol 療法⁵⁻⁷⁾ であるが、さらに最近開発されたのは luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) の analogue である LH-RH agonist (Buserelin) を経鼻的に投与する方法である^{4,8,9-12)}。

LH-RH analogue (Buserelin) 投与前、投与中のホルモン動態についての報告は見られるが^{4,10-15)}、子宮内膜への影響について検討した報告は少ない⁴⁾、¹²⁾。

今回、われわれは LH-RH agonist (D-Ser (Bu)⁺)⁶⁾

des gly-NH₂ ethylamid: 図1) を経鼻的に投与し、血中ホルモンおよび子宮内膜に対する影響を検討したので報告する。

対象および方法

昭和58年1月より昭和59年10月までの間に、月経痛、不妊などの主訴で来院した患者より、内診で子宮内膜症と診断し、Beecham II期以上と診断した症例(6例)と腹腔鏡検査によりII期と診断した1例の計7例を対象とした。症例の臨床所見は表1に示した。

7例中既往に内膜症の治療を受けたものは4例 (Danazol: 3例, Gestagen: 1例) であるが、全例それら治療終了後4カ月以上経過していた。症例2は900 μ g/day を3カ月投与中に pelvic peritonitis を起こし、本人の希望により約1カ月本剤投与を中断した。

Buserelin の投与法は1回鼻腔内に150 μ g を両鼻腔に

表 1 Clinical details and duration and

| Patient | age | Para | Chief complain | previously operation | previously treatment | Stage |
|---------|-----|------|----------------|---------------------------------------|---------------------------|---------------------|
| 1 | 43 | 3(4) | dysmenorrhea | (-) | Danazol 600mg 4 months | II |
| 2 | 31 | 1(2) | sterility | 30. y.o. ectopic pregnancy | Danazol 400mg 5 months | II (laparoscopy) |
| 3 | 29 | 0(0) | sterility | 30. y.o. appendectomy | (-) | II |
| 4 | 29 | 1(2) | dysmenorrhea | 20. y.o. appendectomy | Gestagen 2 months | II |
| 5 | 32 | 0(0) | dysmenorrhea | 26. y.o. Salpingo- oophorectomy | (-) | II |
| 6 | 20 | 0(0) | dysmenorrhea | (-) | (-) | II |
| 7 | 23 | 0(0) | dysmenorrhea | (-) | Danazol 400mg 3 months | II |

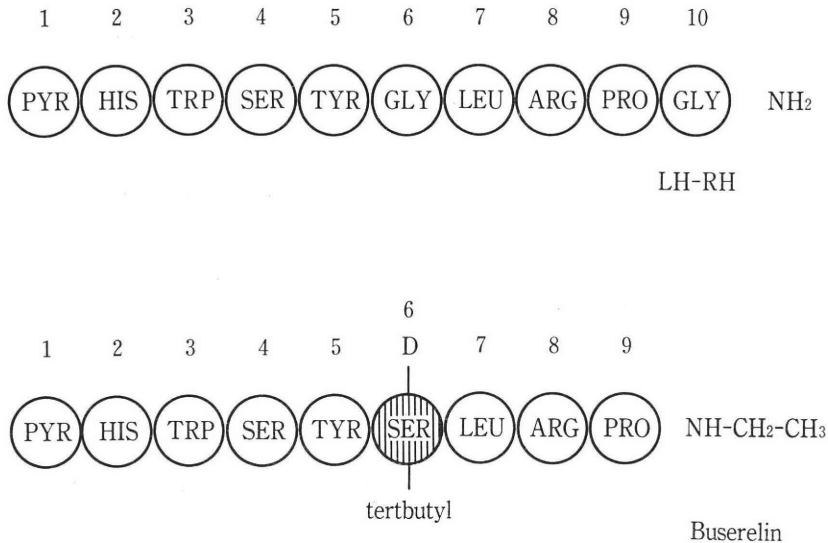


図 1

spray した. 投与開始は月経 2~3 日目とし, 2 カ月毎に血中ホルモン, 内膜検査を施行した. 初回投与量は 300 μ g/day 2 例 (症例 1, 6), 600 μ g/day: 2 例 (症例 3, 7), 900 μ g/day 3 例 (症例 2, 4, 5) である. 投与期間は 23~35 週 (平均 27 週) である. 血中 Estradiol (E₂) 値が 30pg/ml 以下を目標とし, 30pg/ml 以上のため投与量を増量したものは 2 症例 (症例 1: 300 μ g → 600 μ g → 900 μ g, 症例 3: 600 μ g → 900 μ g) であつた.

結 果

1. 血中ホルモン値

i) 血中 E₂ 値

Buserelin 投前, 投与中の血中 E₂ 値の経過は図 2 に示した. 7 例中 5 例は投与 2 カ月より血中 E₂ は低下を示したが, 症例 1, 3 はむしろ上昇した. 症例 1 は 2 カ月後 124pg/ml と上昇したため, Buserelin を 600 μ g/day に増量したが, 4 カ月目の血中 E₂ は 260pg/ml とさらに上昇し, 投与量を 900 μ g/day と増加したが, 6 カ月目の E₂ 値は 91pg/ml といぜん高いまま投与を終了した. この症例は月経は不規則ながら発来していた. また, 症例 5 は初回投与量 900 μ g/day であつたが, 4 カ月目に血中 E₂ 165pg/ml と一過性に上昇したが, 投与量は増量

outcome of treatment in seven women.

| Duration of treatment (week) | Dosage of Buserelin | Menstruation during Buserelin | spotting | first menstruaion after Buserelin(days) | histology of EM |
|------------------------------|--|-------------------------------|----------|---|---------------------|
| 25 | 300 μ g13W 600 μ g 6W 900 μ g 6W | (+) | (-) | 41 | proliferative |
| 23 | 900 μ g | amenorrhea | (-) | 82 | atrophy |
| 26 | 600 μ g18W 900 μ g 8W | amenorrhea | (+) | 79 | proliferative |
| 28 | 900 μ g | amenorrhea | (-) | ameno. | atrophy |
| 25 | 900 μ g | amenorrhea | (+) | 46 | atrophy |
| 35 | 300 μ g | amenorrhea | (+) | 50 | early proliferative |
| 27 | 600 μ g | amenorrhea | (+) | 32 | early proliferative |

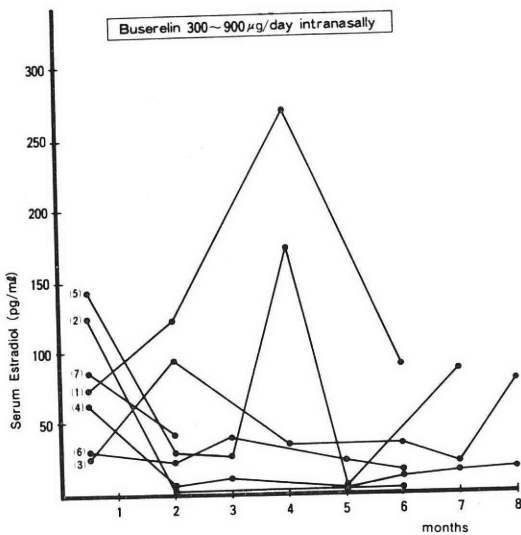


図 2 Serum Estradiol levels before and during Buserelin treatment. () Patient number

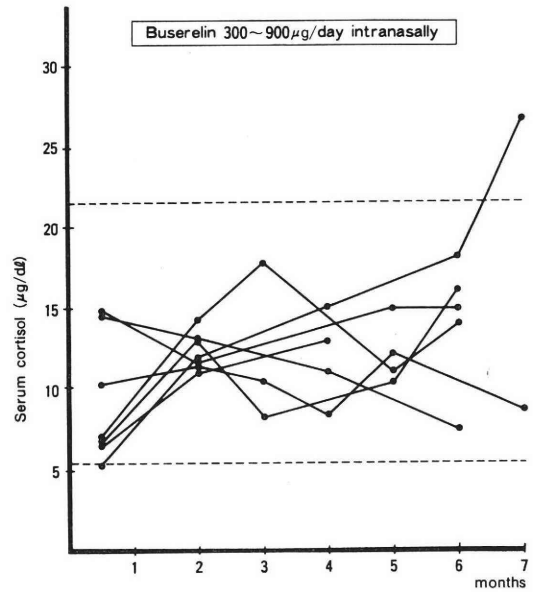


図 3 Serum cortisol levels before and during Buserelin treatment, The normal is indicated by the dotted lines

せず、900 μ g/ml であつたが、投与5カ月目には10pg/ml 以下となつた。

ii) 血中 cortisol 値

図3に示すごとく、投与前、投与中は全例正常範囲内の変動であつたが、症例3は投与終了後1カ月目の値が26.7 μ g/dl と一時上昇を示した。

iii) 血中 Prolactin, T₄ 値

血中 prolactin, T₄ 値は投与前、投与中に大きな変動を示さなかつた(図4, 5)。

2. 子宮内膜所見

本剤投与中、投与後の子宮内膜所見は、7例中3例は萎縮像、4例は増殖期像を示した(表1)。

i) 初回投与量300 μ g 例

図6は症例1の投与12週間後の内膜で、分泌期中期像を示している。この時の血中 E₂ 260pg/ml であつた。図7は投与終了時の内膜で増殖期像を示し、腺、間質とも増殖、分泌像は認められない。

図8は症例6の投与終了時の内膜で、増殖期初期像に一致する。

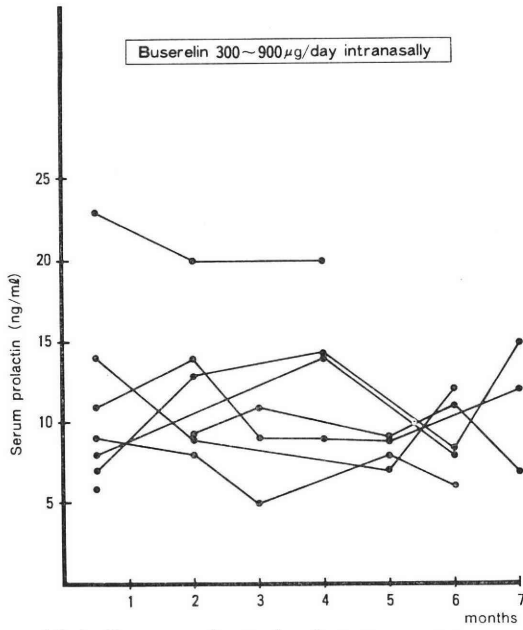


図 4 Serum prolactin levels before and during buserelin treatment.

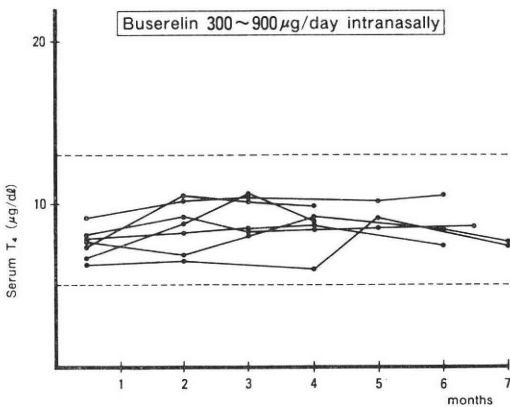


図 5 Serum T₄ levels before and during Buserelin treatment. The normal range is indicated by the dotted lines.

ii) 初回投与量600µg 例

症例 3 の投与終了時の内膜で図 8 とほぼ同じ増殖期初期像に一致する(図 9). 症例 7 もほぼ同じ所見を示した.

iii) 初回投与量900µg 例

図10は症例 4 の投与10週目の内膜であり, 閉経期内膜の組織に類似しており, 症例 2, 5 とほぼ同様の所見であった.

3. 月経再開, 妊娠

投与終了後, 無月経が続いている症例 4 を除いた 6 例の月経発来あるいは, 排卵再開日は投与終了後 28~82 日

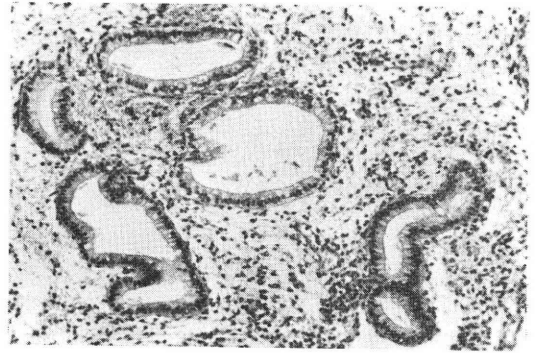


図 6 症例 1 投与12週間後 (300µg/day) 分泌期中期に相当する腺上皮の迂曲, 拡張像を示すが, 腺上皮の細胞質の空胞化が著明,

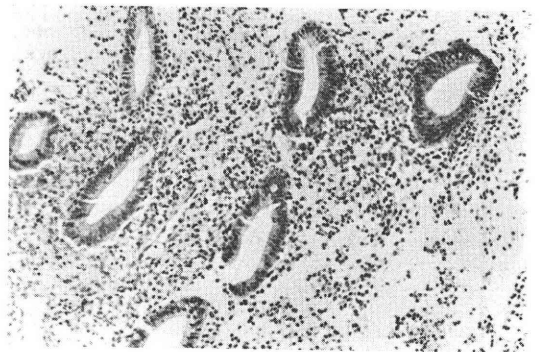


図 7 症例 1 投与終了時 増殖期像を示す

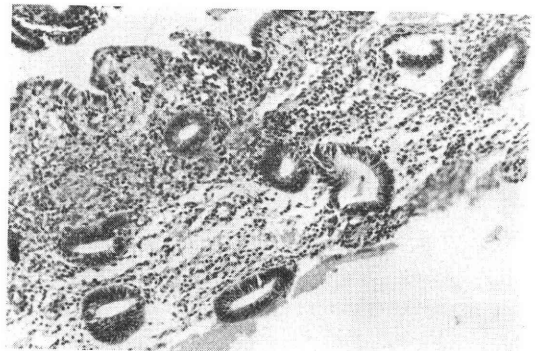


図 8 症例 6 投与終了時 (300µg/day) 増殖期初期内膜像を示す

(平均 55 日) であつた. 症例 4 は終了後 4 カ月目の血中 LH : 15.4miu/ml, FSH : 12.9miu/ml, E₂ : 14pg/ml であり, Gestagen 療法中である.

また挙児希望の症例 2 は, 投与後 6 カ月目に施行した HSG は投与前と変わらず, 卵管の疎通性が認められなかつた. また症例 3 は, 投与終了後 10 カ月が経過したが妊娠にいたっていない.

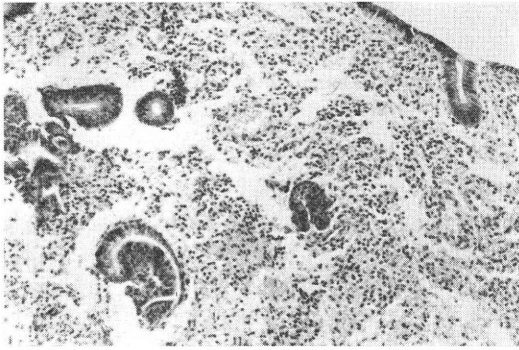


図 9 症例 3 投与終了時 (600 μ g/day) 増殖期初期内膜像を示す

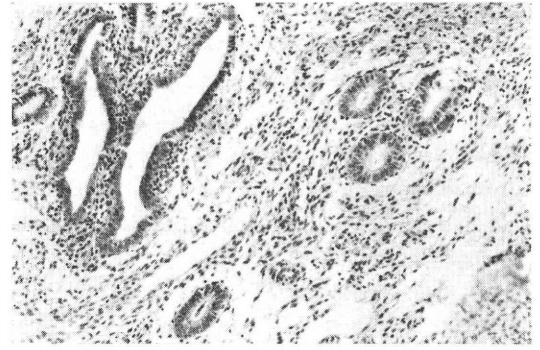


図10 症例 4 投与10週間後 (900 μ g/day), 閉経期内膜組織に類似した像を示す

Uterine Bleeding

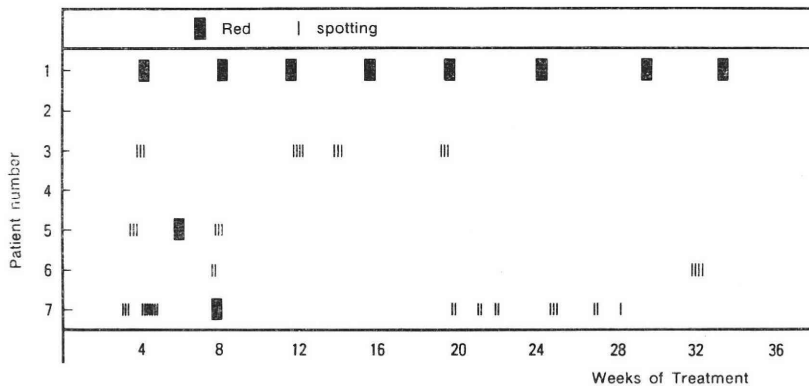


図11 Pattern of uterine bleeding during weeks of Buserelin treatment

4. 子宮出血

本剤投与中の子宮出血の状態を図11に示した。Red は月経様出血を意味している。症例 1 は月経様出血を反復し、投与量を900 μ g/day まで増量したが、無月経にならなかった。

考 案

子宮内膜症のホルモン療法の目的は、性ステロイドを用い、排卵を抑制して無月経を発生させ、またステロイドが子宮内膜へ作用し、内膜組織を脱落膜様変化を経て萎縮を図ることにある。また Danazol 療法も、LH surge を抑え、無月経とし、また病巣組織のアンドロゲンレセプター、プロゲステロンレセプターとも結合して萎縮させる作用をねらった治療法である¹⁷⁾。

LH-RH analogue を子宮内膜症に応用する試みは1975年以来検討されており、今回使用した Buserelin は LH-RH の構造誘導体であり、天然 LH-RH の10個のペプチドの6位を α -ブチル塩のついたセリンに、また10位のグリシンをエチルアミノ基に置換したものであ

る。この薬剤は下垂体前葉からの LH, FSH の分泌を促進し、その効力は LH-RH の20~40倍といわれている。しかし、大量投与あるいは連続投与により、下垂体 LH 細胞、FSH 細胞の LH-RH レセプターは過剰の LH-RH 様刺激で感受性低下を受けるため、ゴナドトロンの産生、分泌の低下をきたす。また下垂体から過剰に分泌された LH により、性腺の LH レセプターが占拠され、down regulation が生じ、LH の性ホルモン放出作用を抑制するといわれている。

本剤は可逆的に性腺機能を抑制することから contraception として使用された¹⁸⁾。1982年に Lemay and Quesnel¹⁴⁾が子宮内膜症への本剤の最初の使用症例を報告して以来、Meldrum ら¹⁰⁾、Shaw ら¹¹⁾などの報告が見られはじめた。彼ら^{10,13)}の報告では Buserelin 投与により血中 E₂ の低下をおこし、それが治療効果を発現するとしているが、血中 E₂ 低下による副作用として fot flash^{4,11,14-16)}、spotting^{10,14)} などが見られたと報告している。ただし、治療終了後に速やかに排卵性周期となり、正常月経周期に回復するという利点があり¹¹⁻¹⁴⁾、

内膜症合併の不妊患者に用いやすいといえる。

本剤投与法は主に経鼻投与法であるが、投与量、投与期間は報告者によりいろいろである。Lemay and Que-snel¹⁴⁾は300 μ g を12時間毎に173日間経鼻的に投与し、血中 E₂ が卵胞期初期のレベル以下となり、投与終了後43日目に排卵が起つた1例を報告している。また Mel-drum¹⁰⁾は、5例に皮下注射投与法で毎朝100 μ g の D-Trp⁶-Pro⁹-Net-LH-RH (Gn-RH-a) を28日間投与したところ、投与最終日に血中 E₂ 値は12 \pm 2 pg/ml と低下したが、投与終了後25~31日で月経が開始したと報告し Shaw¹⁴⁾は経鼻的投与を6例に施行し、5例に200 μ g 1日3回投与を6カ月間行ない、内膜症の改善をみたが、400 μ g 1日1回投与の1例では改善を見なかつたと報告している。さらに Lemay^{4,12)}は子宮内膜症(stage I~IV) 10例に本剤を200 μ g 1日2回皮下注5日間投与後に25~31週間さらに経鼻投与で400 μ g 1日3回投与したところ、血中 E₂ は投与3~6日目で41 \pm 7 pg/ml, 4週間目に24 \pm 7 pg/ml と低下し、血中 E₂ 値の変動に反応して10例中7例に spotting が生じたと報告している。

本剤の投与法、投与量や投与期間は血中 E₂ 値を指標として決めるのが妥当であり、われわれは血中 E₂30pg/ml 以下を目標とした。投与7例中 E₂ 値が投与中30pg/ml 以下とならなかつたのは2例(症例1, 5)であり、2例は本剤投与の中断や服用忘れなどはなかつた。症例1は投与量を900 μ g/day まで増量したが、終了時の血中 E₂ 値は91pg/ml であつた。症例5は投与4カ月目に165pg/ml と一過性に上昇した。血中 E₂ が低下しなかつた理由は明らかではないが、症例によつては LH-RH analogue が LH 刺激に強く働き、血中 E₂ が上昇した可能性も否定しえない。Buserelin 投与中に E₂ が上昇する症例を Lemay¹²⁾も報告している。彼らは本剤を月経3~6日より200 μ g 8時間毎に鼻腔投与した10例中、1例が投与6週間目の血中 E₂: 188pg/ml, 1例が10週目に202pg/ml に上昇した2例を報告しているが、この上昇の原因については述べていない。

また血中 E₂ の低下によつて、hot flash の出現が欧米の報告^{4,11-13,18)}ではかなりの症例に見られるといわれるが、今回のわれわれの7例では、本症状の出現は認められなかつた。また玉舎¹⁵⁾も、8例の経験では1例も認めなかつたとしているが、本邦187例の集計結果では38例(19.3%)に出現したとしているが、欧米の80%近い発現頻度に比べ、非常に低率である。

本剤投与中あるいは投与終了後の子宮内膜の所見についての報告は少ない。われわれの結果では表1に示したごとく、7例中3例は萎縮像を示し、4例は増殖期像を

示した。また図8~10に示したごとく萎縮像を示し、特に閉経期内膜に類似するようになる。これらの所見は、Bergquist¹²⁾、Lemay^{4,14)}も同様の所見になることを示し、いわゆるステロイド療法によつて得られる萎縮像とは異なり、本療法は偽閉経療法ともいふべき結果であつた。しかし、症例1に見られたように月経様出血があり、無月経とならない症例の子宮内膜は図6に示すごとく分泌期中期像を示した。このような症例を Bergquist¹²⁾も1例経験し、本剤投与にかかわらず排卵性周期を示したとしている。

本剤投与による laboratory data として、Lemay¹⁴⁾は hemogram, urinary analysis, serum biochemistry に異常なく、endocrine parameter (T₃, T₄, FTI, cortisol, PRL) も正常内であつたとしており、玉舎¹⁵⁾も血中 T₄, cortisol, PRL や臨床検査に異常所見がなかつたとしている。われわれの7例でも、T₄, PRL に異常は認められなかつたが、cortisol 値が本剤投与後1カ月目に26.7mmg/dl とやや高値を示した症例があつた。血中 cortisol の変化について、Lemay¹⁴⁾は本剤投与中止後8週間後に8例で cortisol が有意に低下したとしている。

投与終了後の初回月経あるいは初回排卵時までの日数は無月経の1例(症例4)を除く6例で32~82日(平均55日)であり、投与量とは関係なかつた。この日数は玉舎¹⁵⁾の平均排卵日29.5 \pm 4.8日(S.E.)、Lemay⁴⁾の43日、Shaw¹¹⁾の18~27日よりもおおそく、本邦の集計101例(300 μ g: 23.2 \pm 4.6, 600 μ g: 36.7 \pm 10.3, 900 μ g: 27.5 \pm 5.7, 1200 μ g: 38.1 \pm 4.8)よりも遅れているが、その原因は不明である。

子宮内膜が完全に萎縮し、内膜が採取されなかつたのは症例で4, 5で、投与量はいずれも900 μ g/day であり、内膜採取が採取できなくなるまでの月数は3, 3.5カ月であつた。したがつて子宮内膜症に対する効果が出るためには、本剤投与量は900 μ g/day 以上、投与期間は5カ月以上が必要と推定された。

本論文製旨は第31回不妊学会総会(1986. 仙台)で発表した。

文 献

- 1) 川島吉良: 子宮内膜症の保存療法, 日産婦誌, 35: 2019, 1983.
- 2) 内田 徹, 宇津宮隆史: 子宮内膜症の診断と治療(非手術的). 産婦治療, 51: 333, 1985.
- 3) 杉本 修: 子宮内膜症. 臨産産, 39: 465, 1985.
- 4) Lemay, E., Maheux, R., Faure, V., Jean, C. and Fazekas, A. T. A.: Efficacy and

- safty of LH-RH agonist treatment in 10 patients with endometriosis, In LH-RH and its analogues. F. Labre, A. Belanger, A. Dupont, eds. Elsevier Science Publishers, B. V., p383, 1984.
- 5) Dmowski, W. P., Scholer, H. F. L., Mahesh, V. B. and Greenblatt, R. B.: Danazol-a synthetic steroid derivative with interesting physiologic properties. *Fertil. Steril.*, 22 : 9, 1971.
 - 6) Barbieri, R. L., Canick, J. A., Makris, A., Todd, R. B., Davies, I. J. and Ryan, K. J.: Danazol inhibit steroidgenesis. *Fertil. Steril.*, 28 : 809, 1977.
 - 7) Barbier, R. L., Evans, S. and Kistner, R. W.: Danazol in the treatment of endometriosis: analysis of 100 cases with a 4 year follow up. *Fertil. Steril.*, 37 : 737, 1982.
 - 8) 熊坂高弘: LH-RH analogues. 産と婦, 53 : 31, 1986.
 - 9) 武谷雄二, 水野正彦: LH-RH アナログとその臨床応用. 産婦実際, 35 : 139, 1986.
 - 10) Meldrum, D. R., Chang, R. J., Lu, J., Vale, W., Rivier, J. and Judd, H. L.: "Medical oophorectomy" using a long-acting Gn-RH agonist: a possible new approach to the treatment of endometriosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 54 : 1081, 1982.
 - 11) Shaw, R. W., Feasev, H. M. and Boyle, H.: Intranasal treatment with luteinizing hormone-releasing hormone agonist in women with endometriosis. *Br. Med. J.*, 287 : 1667, 1983.
 - 12) Lemay, A., Maheux, R., Faure, N., Jean, C. and Fazekas, A. T. A.: Reversible hypogonadism induced by a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist (Buserelin) as a new therapeutic approach for endometriosis. *Fertil. Steril.*, 41 : 863, 1984.
 - 13) Bergquist, C., Nillius, S. T. and Wide, L.: Intranasal gonadotropin-releasing hormone agonist as a conceptive agent. *Lancet*, 1 : 215, 1979.
 - 14) Lemay, A. and Ouesnel, G.: Potential new treatment of endometriosis: reversible inhibition of pituitary-ovarian function by chronic intranasal administration of a luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) agonist. *Fertil. Steril.*, 38 : 376, 1982.
 - 15) 玉舎輝彦, 藤本次良, 岡田弘二: 骨盤子宮内膜症治療への Buserelin の試み, 日不妊会誌, 31 : 87, 1986.
 - 16) Bergquist, C., Nillius, S. J., Wide, L. and Lindgreen, A.: Endometrial patterns in women on chronic luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment for contraception. *Fertil. Steril.*, 36 : 339, 1981.
 - 17) 杉本 修: 子宮内膜症のホルモン療法. 日産婦誌, 37, 814, 1985.
 - 18) Meldrum, D.: Management of endometriosis with gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertil. Steril.*, 44 : 581, 1985.

Intranasal treatment with luteinizing hormone-releasing hormone agonist (Buserelin) in women with pelvic endometriosis

Endocrinological and histological findings during and after treatment

Shoichi Tanaka, Mika Okawada, Hiroshi Watanabe, Masahiro Mizunuma, Atsushi Azumaguchi and Masayoshi Hashimoto

Department of Obstetrics and Gynecology, Sapporo Medical College

Saven women with pelvic endmetriosis (Beecham stage II) were treated intranasally with 300-900 μ g of luteinizing hormone-releasing hormone agonist (D-Ser [TBU]⁶ des-Gly-NH¹⁰₂) LH-RH ethylamide: Buserelin) daily for a period of 23 to 35 weeks.

We observed the histologic picture of the endometrium and determined the serum estradiol levels during and after this treatment. Buserelin was started with the administration of 300, 600 or 900 μ g daily. When the serum estradiol level did not decrease to 30 pg/ml, the dosage was increased to an additional 300 μ g per day.

Serum estradiol level decreased below 30pg/ml in 5 cases, but one other case continued to be over 90 pg/ml after additional dosage. The remaining case increased over 100 pg/ml, temporarily. Serum T₄, cortisol and prolactin levels remained in the normal range in all 7 cases.

Endometrial biopsy specimens revealed either atrophy or early proliferation. The general histologic picture resembled the endometrium of menopause after the treatment of Danazol therapy.

According to the endocrine and histologic findings of this study, over 900 μ g of Buserelin administered daily during 5 months or longer by intranasal insufflation is necessary in the treatment of endometriosis.

(受付: 昭和61年4月6日)

OBESITY IN WOMEN WITH MARKED HYPERPROLACTINEMIA

Katsuyoshi SEKI and Koichi KATO

Department of Obstetrics and Gynecology, National Defense
Medical College, Saitama, Japan

Abstract: Body weight and serum prolactin (PRL) concentration were evaluated in 57 hyperprolactinemic women. Pituitary microadenoma was radiologically identified in 18 of the 57 hyperprolactinemic women, and pituitary macroadenoma in 12 of them. In the remaining 27 hyperprolactinemic women, the pituitary fossa was radiologically normal. The mean body weight expressed in percent of ideal body weight (IBW) and the incidence of obesity were significantly greater in hyperprolactinemic patients with macroadenoma, but neither in hyperprolactinemic patients with microadenoma nor in those with normal pituitary fossa when compared to normal women. Serum PRL levels were significantly higher in patients with macroadenoma than in patients with microadenoma or in patients with normal pituitary fossa. Body weights in percent of IBW correlated with the natural logarithms of PRL concentrations. These findings suggest, but do not prove, that obesity and marked hyperprolactinemia may be causatively related.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 20-22, 1987)

Introduction

The association of obesity with the amenorrhea-galactorrhea syndrome has been known for a long time¹⁾. However, comprehensive analysis of body weight and circulating prolactin (PRL) concentration has not heretofore been made in hyperprolactinemic women, though Lachelin *et al.*²⁾ reported that obesity appeared to be a common feature in hyperprolactinemic women. In order to obtain more insight into the relationship between body weight and hyperprolactinemia, we have evaluated body weight and serum PRL concentration in 57 hyperprolactinemic women.

Materials and Methods

The subjects of this study were 57 hyperprolactinemic women (PRL \geq 30ng/ml). Radiological examinations for pituitary tumor were performed with plain skull X-ray, tomography of the sella turcica and/or computed axial tomographic scan. Pituitary microadenoma was radiologically identified in 18 of the 57 hyperprolactinemic women, and pitui-

tary macroadenoma in 12 of them. In the remaining 27 women with hyperprolactinemia, the pituitary fossa was radiologically normal. Of the 27 hyperprolactinemic women with normal pituitary fossa, 14 had secondary amenorrhea, 7 oligomenorrhea, 4 luteal phase defect, 1 anovulatory cycle, and 1 primary amenorrhea. Of the 18 patients with microadenoma, 15 had secondary amenorrhea, 1 anovulatory cycle, 1 oligomenorrhea, and 1 luteal phase defect. Of the 12 patients with macroadenoma, 11 had secondary amenorrhea and 1 primary amenorrhea. All patients had normal thyroid and adrenal function, and had not taken any medication. None of them had a family history of diabetes. None of them were on a weight reduction diet or fasting at the time of study. Body weight and height, and serum PRL concentration were measured in the morning hours when they were first seen. In 91 normal pregnant women, body weight and height before pregnancy were asked, and were used as control. PRL was measured by radioimmunoassay with kits obtained from Daiichi Radioisotope Labo-

Table 1 Mean (\pm SE) ages, body weights and PRL concentrations in normal women (n=91) and hyperprolactinemic women with normal pituitary fossa (n=27), microadenoma (n=18) and macroadenoma (n=12)

| | Normal Women | Hyperprolactinemia | | |
|---|-----------------|--------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | | Normal Fossa | Microadenoma | Macroadenoma |
| Age (years) | 28.6 \pm 0.5 | 27.8 \pm 0.9 | 31.8 \pm 1.2 ^a | 28.8 \pm 1.5 |
| Body Weight (in % of IBW ^b) | 102.5 \pm 1.4 | 100.3 \pm 2.0 | 108.1 \pm 3.3 | 116.2 \pm 5.0 ^a |
| PRL (ng/ml) | | 86.7 \pm 12.4 | 159.0 \pm 25.7 | 850.3 \pm 123.2 ^c |

a P<0.01 vs normal women.

b =ideal body weight.

c P<0.001 vs hyperprolactinemic women with normal pituitary fossa or with microadenoma.

ratory, Japan. The intra- and interassay coefficients of variation were less than 10%. Statistical analyses were performed using Student's *t* test and the χ^2 test, and by calculating correlation coefficients.

Results

The mean body weight in percent of ideal body weight (IBW) was significantly greater in hyperprolactinemic patients with macroadenoma, but neither in hyperprolactinemic patients with microadenoma nor in those with radiologically normal pituitary fossa when compared to normal women (Table 1). The incidence of obesity (>120% of IBW) (33.3%) in patients with macroadenoma was significantly (P<0.05) higher when compared to normal women (7.7%). However, the incidence of obesity (3.7%) in patients with normal pituitary fossa and that (16.7%) in patients with microadenoma were not significantly different from that (7.7%) in normal women. Serum PRL concentrations were significantly higher in patients with macroadenoma than in patients with microadenoma or in patients with normal pituitary fossa (Table 1). Body weights in percent of IBW significantly correlated with the natural logarithms of PRL concentrations in hyperprolactinemic women (r=0.6271, n=57, P<0.01) (Fig. 1).

Discussion

Ovulation was known to have occurred in the 91 pregnant women. Hyperprolactinemia is rarely recognized in ovulatory and fertile women. Consequently, it is considered that the serum PRL concentration had

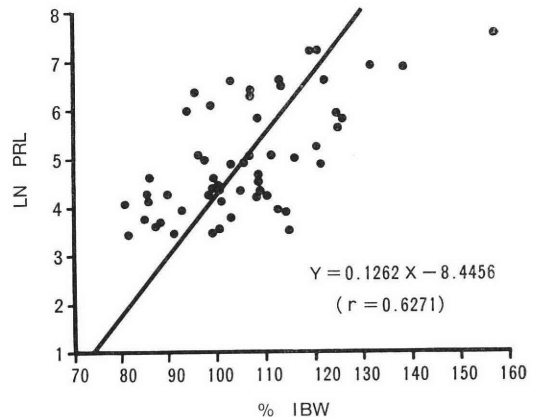


Fig. 1 Correlation between body weights in percent of ideal body weight (IBW) and the natural logarithms (LN) of PRL concentrations in 57 hyperprolactinemic women

not been elevated in most of the 91 pregnant women whose body weights and heights before pregnancy were used as control. Body weights in percent of IBW correlated with the natural logarithms of PRL concentrations in hyperprolactinemic women. The mean body weight in percent of IBW and the incidence of obesity were significantly greater in hyperprolactinemic patients with macroadenoma, though they were not in patients with microadenoma or in those with normal pituitary fossa. These findings suggest, but do not prove, that obesity and marked hyperprolactinemia may be causatively related. Hyperprolactinemic women were reported to exhibit basal hyperinsulinemia, and augmented plasma insulin responses and augmented suppression of glucagon to oral glucose administ-

ration³⁾. These changes in the secretion of hormones regulating metabolism may account for the development of obesity in women with markedly elevated PRL concentrations.

References

- 1) Forbes, A. P., Henneman, P. H., Griswold, G. C. and Albright, F.: Syndrome characterized by galactorrhea, amenorrhea and low urinary FSH: comparison with acromegaly and normal lactation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 14 : 265, 1954.
- 2) Lachelin, G. C. L., Abu-Fadil, S. and Yen, S. S. C.: Functional delineation of hyperprolactinemic amenorrhea. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 44 : 1163, 1977.
- 3) Gustafson, A. B., Banasiak, M. F., Kalkhoff, R. K., Hagen, T. C. and Kim, H.-J.: Correlation of hyperprolactinemia with altered plasma insulin and glucagon: similarity to effects of late human pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 51 : 242, 1980.

高プロラクチン血症婦人における プロラクチン濃度と体重の検討

防衛医科大学校産科婦人科学教室

関克義, 加藤宏一

57名の高プロラクチン (PRL) 血症婦人において体重と血清 PRL 値について検討した. 下垂体 microadenoma が18名に, 下垂体 macroadenoma が12名に認められた. 残り27名の高 PRL 血症患者のトルコ鞍はレ線学的に正常であった. 標準体重に対するパーセントで表現した体重の平均値および肥満の頻度(標準体重の 120 % 以上)は, macroadenoma 群で正常婦人と比較して有意に増加していたが, microadenoma 群およびトルコ鞍正常群では正常婦人と有意に異ならなかつた. macroadenoma 群の血清 PRL 濃度は microadenoma 群あるいはトルコ鞍正常群と比較して有意に高かつた. 標準体重に対するパーセントで表現した体重は PRL 濃度の自然対数と有意に相関した. したがって肥満と高度の高 PRL 血症間に因果関係が存在するものと推測される.

(受付: 昭和61年4月7日)

A CLINICAL STUDY ON 210 PATIENTS WITH GALACTORRHEA

Yoshihito FUKAMATSU, Kazuhiko TOMITA, Kyoko YOSHIDA,
Takashi TSUKAMOTO and Toru FUKUTA

Department of Obstetrics and Gynecology, Shinshu University School of
Medicine, Matsumoto, Japan

Abstract: We examined the etiology of galactorrhea, condition of menstruation, basal prolactin level and the incidence of hyperprolactinemia in galactorrhea and discussed the clinical significance of galactorrhea in 210 galactorrheic patients who visited our clinic for 6 years since 1978. Moreover, bromocriptine was administered to 69 of 100 infertile patients with galactorrhea and its effect was evaluated.

As to the etiology of galactorrhea, the incidence of idiopathic galactorrhea was highest (56.2%) and that of a pituitary tumor was 14.3%. Amenorrhea was noted in 75 patients and hyperprolactinemia was observed in 74.4% of them. The mean blood prolactin level in the amenorrheic patients was as high as 166.6ng/ml. Hyperprolactinemia was noted in 73 galactorrheic patients (34.9%) and was caused by a pituitary tumor in 42.5% of them. It was also noted in patients with the normal cycle and oligomenorrhea groups, though the incidence was low.

Bromocriptine was very effective for hyperprolactinemia regardless of its cause and the ovulation and pregnancy rates were 92.5 and 81.8%, respectively.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 23-29, 1987)

Introduction

In conjunction with the development of specific radioimmunoassay for human prolactin and the introduction of tomography¹⁾ and computed tomography (CT), attention has been drawn to the pituitary tumor, especially a microadenoma with a diameter 1 cm or less, as one of contributory causes of galactorrhea. In addition, galactorrhea is often associated with hyperprolactinemia and amenorrhea and the phenomenon is generally as the galactorrhea-amenorrhea syndrome. However, galactorrhea is caused not only by a pituitary tumor²⁾ but also by drugs³⁾, primary hypothyroidism^{4,5)}, breast disease⁶⁾ and oral contraceptives⁷⁾. Furthermore, the menstrual condition in galactorrheic patients is not necessarily amenorrhea, but varies.

In literature, however, there are fewer reports on the detailed discussion of the etiology of galactorrhea and the condition of menstruation in galactorrheic patients than we have

expected⁸⁻¹¹⁾.

Accordingly, in the present study we examined the etiology of galactorrhea, condition of menstruation, basal prolactin level and the incidence of hyperprolactinemia in galactorrhea and discussed the clinical significance of galactorrhea in 210 galactorrheic patients. Moreover, bromocriptine was administered to 69 of 100 infertile patients with galactorrhea and its effect was evaluated.

Materials and Methods

The subjects of this study consisted of 210 galactorrheic patients who visited our clinic for 6 years since 1978. These patients ranged in age from 19 to 52 years with average age of 31.2. In the present study, galactorrhea was tentatively defined as a watery or milky secretion from unilateral or bilateral breasts. The patients with galactorrhea were questioned carefully about the ingestion of drugs which might cause galactorrhea, the presence of lactation and the condition of menstrua-

tion. Women who were lactating or had experienced abortion or delivery within a year were excluded from the study.

The menstrual conditions of galactorrheic patients were divided into five groups: normal cycle, oligomenorrhea, amenorrhea, anovulatory cycle and short luteal phase¹²⁾. Oligomenorrhea was diagnosed when the basal body temperature was biphasic and the menstrual cycle was 40 days or more. The short luteal phase was diagnosed when the luteal phase was 9 days or less.

Blood PRL, LH, FSH, GH, TSH, triiodothyronine and thyroxine were determined by radioimmunoassay. Hyperprolactinemia was diagnosed when the serum prolactin level was 30ng/ml or higher. In addition, challenge tests with LH-RH (100 μ g intramuscular injection) and TRH (500 μ g intramuscular injection) were carried out in some patients and blood was obtained for LH, FSH, PRL and TSH at 0, 30, 60 and 120 minutes. Moreover, patients with hyperprolactinemia were examined for the presence of a pituitary tumor by skull X-ray, tomography and CT.

Results

1) Etiology of galactorrhea

The incidence of idiopathic galactorrhea of an unknown etiology was highest (118 patients, 56.2%), followed by drug-induced galactorrhea in 31 patients, a pituitary tumor in 30, idiopathic hyperprolactinemia in 16, Chiari-Frommel's syndrome in 8, breast disease in 6 and craniopharyngioma in 1. The incidence of a pituitary tumor was 14.3% for all patients, but 37.3% for the galactorrheic patients with amenorrhea. The incidences of

individual causes of galactorrhea and basal prolactin levels are listed in Table 1.

2) Condition of menstruation

Two hundred and ten galactorrheic patients were classified by the condition of menstruation into five groups and examined for the incidence of each contributory factor and basal prolactin levels. Ninety-six patients were classified in the normal cycle group, 75 in the amenorrhea group, 18 in the oligomenorrhea group, 12 in the anovulatory cycle group and 9 in the short luteal phase group. Of 118 patients with idiopathic galactorrhea, 83 (71.1%) showed normal cycle and 28 of 30 patients with a pituitary tumor complained of amenorrhea. When these groups were examined for basal prolactin levels, the serum prolactin levels ranged from 5 to 1200ng/ml and the mean (\pm S.E.) level was as high as 166.6 \pm 25.2ng/ml in the amenorrhea group. The mean serum prolactin levels in the anovulatory cycle and short luteal phase groups were relatively elevated, that is, 87.6 \pm 41.8 and 33.8 \pm 11.3ng/ml, respectively. In the normal cycle group, however, the serum prolactin levels ranged from 3 to 95ng/ml and the mean level was as low as 16.4 \pm 1.2ng/ml. As shown in Table 2, hyperprolactinemia was noted in 73 (34.9%) of 210 patients. It was also noted in the normal cycle group, but the incidence was as low as 5.2%. In contrast, it was as high as 74.7% in the amenorrhea group.

3) Etiology of hyperprolactinemia

When the etiology of hyperprolactinemia was examined in above mentioned 73 patients, the incidence of a pituitary tumor was highest (30 patients, 42.5%), followed by drug-induced hyperprolactinemia in 22, idiopathic hyperpr-

Table 1 Causes of galactorrhea in 210 patients

| Cause | No. of Cases | Incidence (%) | PRL (ng/ml) | |
|-------------------------------|--------------|---------------|-------------|------------------|
| | | | Range | Mean \pm SE |
| Idiopathic galactorrhea | 118 | 56.2 | 3-29 | 14.1 \pm 0.5 |
| Drug-induced | 31 | 14.8 | 9-546 | 126.8 \pm 27.0 |
| Pituitary tumor | 30 | 14.3 | 38-1200 | 290.3 \pm 50.3 |
| Idiopathic hyperprolactinemia | 16 | 7.6 | 31-150 | 71.4 \pm 8.0 |
| Chiari-Frommel's syndrome | 8 | 3.8 | 5-128 | 37.6 \pm 14.6 |
| Breast disease | 6 | 2.9 | 9-23 | 14.5 \pm 6.5 |
| Craniopharyngioma | 1 | 0.5 | 62 | |

Table 2 Menstrual situations and PRL levels in 210 patients with galactorrhea

| Menstruation | No. of Cases | PRL (ng/ml) | |
|--------------------|--------------|-------------|------------|
| | | Range | Mean±SE |
| Normal cycle | 96 (5)* | 3-95 | 16.4±1.2 |
| Amenorrhea | 75 (56) | 5-1200 | 166.6±25.2 |
| Oligomenorrhea | 18 (2) | 5-180 | 22.5±9.7 |
| Anovulatory cycle | 12 (6) | 11-493 | 87.6±41.8 |
| Short luteal phase | 9 (4) | 6-95 | 33.8±11.3 |

* Hyperprolactinemia in parenthesis

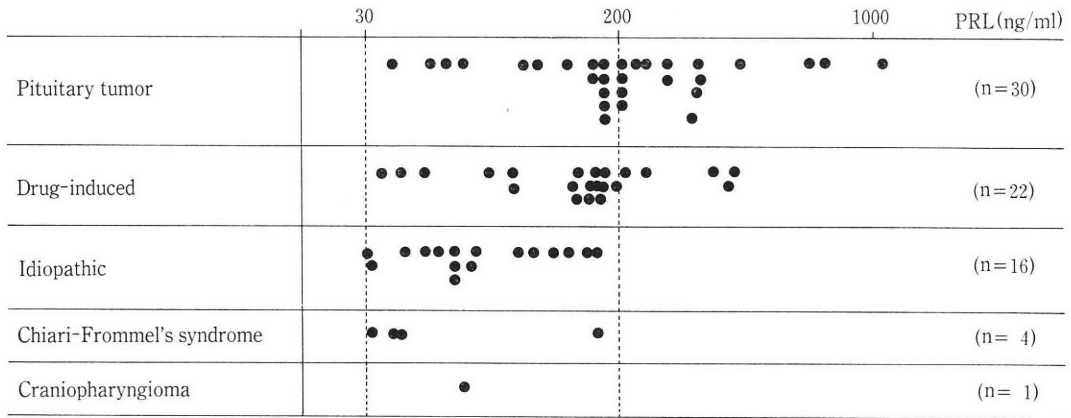


Fig. 1 Causes and PRL levels in 73 galactorrheic patients with hyperprolactinemia

olactinemia in 16, Chiari-Frommel's syndrome in 4 and craniopharyngioma in 1. When the mean prolactin level was examined for individual underlying disease of hyperprolactinemia, it was 290.3±50.3ng/ml in the pituitary tumor, 172.4±33.7ng/ml in the drug-induced hyperprolactinemia, 71.4±8.0ng/ml in the idiopathic hyperprolactinemia and 58.3±24.2ng/ml in the Chiari-Frommel's syndrome. Namely, it was elevated in the pituitary tumor group as compared with those in other groups. As shown in Fig. 1, the basal prolactin levels were less than 200ng/ml in all of these groups except the pituitary tumor and drug-induced hyperprolactinemia groups.

4) Effect of bromocriptine on infertile patients

Of 210 galactorrheic patients, 100 desired for pregnancy and 48 of them became pregnant 56 times. Of these 56 pregnancies, 36 conceived by bromocriptine, 4 as a result of clomiphene, 1 on account of HMG-HCG and 15 spontaneously as shown in Table 3. Bromocriptine was administered to 69 patients

(36 normoprolactinemia and 33 hyperprolactinemia) with 29 of them becoming pregnant (42.0%). In the hyperprolactinemia group, however, pregnancy was achieved in 27 of 33 patients (81.8%) and bromocriptine was effective regardless of the condition of menstruation as shown in Table 4. On the other hand, pregnancy was established only in 2 of 36 patients (5.6%) in the normoprolactinemia group. The effect of bromocriptine according to individual causes of hyperprolactinemia is shown in Table 5, as a whole, the ovulation rate was 92.5% and the pregnancy rate was 81.8%. Namely, this drug was effective regardless of the etiology of hyperprolactinemia.

Comment

A pituitary tumor is the most predominant cause of galactorrhea. This is because early detection and appropriate treatment are required for this tumor since patients with a pituitary tumor are often resistant to gonadotropin and clomiphene therapies and the prognosis

Table 3 Treatment methods of infertile patients with galactorrhea

| Menses | Cases | Cases of Preg. | No. of Preg. | Treatment Methods | | | |
|--------------------|-------|----------------|--------------|-------------------|------------|---------|-----|
| | | | | Br. | Clomiphene | HMG-HCG | Sp. |
| Normal cycle | 48 | 13 | 14 | 2 | 3 | 0 | 9 |
| Amenorrhea | 32 | 25 | 31 | 29 | 0 | 1 | 1 |
| Oligomenorrhea | 8 | 5 | 5 | 0 | 1 | 0 | 4 |
| Anovulatory cycle | 6 | 3 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 |
| Short luteal phase | 6 | 2 | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Total | 100 | 48 | 56 | 36 | 5 | 1 | 14 |

Preg. = Pregnancy Br. = Bromocriptine Sp. = Spontaneously

Table 4 Effect of bromocriptine on infertile patients with galactorrhea

| Menses | Cases | Incidence of Pregnancy | | Total |
|--------------------|-------|------------------------|--------------------|------------------|
| | | Normoprolactinemia | Hyperprolactinemia | |
| Normal cycle | 26 | 2/26 | 0/0 | 2/26 |
| Amenorrhea | 30 | 0/2 | 23/28 | 23/30 |
| Oligomenorrhea | 2 | 0/2 | 0/0 | 0/2 |
| Anovulatory cycle | 4 | 0/2 | 2/2 | 2/4 |
| Short luteal phase | 7 | 0/4 | 2/3 | 2/7 |
| Total | 69 | 2/36 (5.6%) | 27/33 (81.8%) | 29/69 (42.0%) |

Table 5 Effect of bromocriptine on hyperprolactinemic patients with galactorrhea

| Diagnosis | Ovulation (%) | Pregnancy (%) |
|---------------------------|---------------|---------------|
| Pituitary tumor | 92.9 | 91.7 |
| Chiari-Frommel's syndrome | 100 | 100 |
| Drug-induced | 75.0 | 100 |
| Idiopathic | 100 | 33.3 |
| Total | 92.5 | 81.8 |

after transsphenoidal surgery is mainly dependent upon the size of tumor¹³⁾. Of course, primary hypothyroidism should be ruled out at first, though its incidence is low, because replacement therapy with thyroxine is effective⁴⁾.

In the present study, the incidence of a pituitary tumor as a cause of galactorrhea was 14.3% which was lower than those reported by Kleinberg et al.⁸⁾ and Turksoy et al.¹⁰⁾. This might partially be ascribable to the increased incidence of the normal cycle (96 of 210 patients, 45.7%). In fact, the incidence of a pituitary tumor was as high as 37.1 % in the patients with amenorrhea and it was

42.5% for galactorrheic patients with hyperprolactinemia. In addition, hyperprolactinemia was noted in patients with the normal cycle or oligomenorrhea, though the incidence was low. Taking into account that (1) the incidence of hyperprolactinemia is higher in galactorrheic women than in non-galactorrheic ones¹⁴⁾, (2) it has been reported that hyperprolactinemia may be complicated by a pituitary tumor even in galactorrheic patients with the normal cycle¹⁵⁾, and (3) there are many reports that hyperprolactinemia is often complicated by a pituitary tumor as in the results of the present study^{8,10)}, a routine

examination for galactorrhea is considered useful in clinical practice even in patients with the normal cycle, because it may lead to the early detection of hyperprolactinemia or even that of a pituitary tumor.

The relationship between basal prolactin levels and a pituitary tumor has already been discussed in some papers^{8,10,16}). For example, Kleinberg et al.⁸) reported that when basal prolactin level was above 300ng/ml, all patients with galactorrhea had pituitary tumors, but 57% above 100ng/ml. However, there are many reports^{10,16,17}) in which a pituitary tumor can generally be diagnosed definitely if the basal prolactin level is 200ng/ml or higher. In the present study, the basal prolactin level was elevated above 200ng/ml even in patients placed on drugs, but the number of such patients was small. Based on the results of this study, a pituitary tumor can be strongly suspected when the basal prolactin level is 200ng/ml or higher in the absence of medication as shown Fig. 1. As experienced previously by other authors^{15,18}), however, we also noted a pituitary tumor in a patients with a low basal prolactin level (38ng/ml), and therefore, it is necessary to examine all of the patients with hyperprolactinemia, regardless of the prolactin levels, for the presence of a pituitary tumor using a skull X-ray, tomography, CT and TRH dynamic test. Even when a pituitary tumor cannot be detected, such patients should have follow-up examinations at regular intervals.

It is known that bromocriptine decreases blood prolactin to the normal limits, inhibits galactorrhea and makes the normal ovulatory cycle in patients with hyperprolactinemic galactorrhea-amenorrhea. There have been many reports¹⁹⁻²¹) on the rates of ovulation and pregnancy in bromocriptine therapy for hyperprolactinemia and very satisfactory results have been obtained in all of them. However, there still exists a diversity of opinion as to which is more appropriated: a surgical operation²²); radiation therapy^{23,24}) or bromocriptine therapy^{19-21,25,26}) for the treatment of hyperprolactinemia in patients with a pituitary tumor, because the tumor increases during pregnancy, causing various complications^{25,27,28}). Since we administered bromocriptine to patients with hyperprolactinemia and

obtained excellent results (ovulation rate 92.5%, pregnancy rate 81.8%) as in the previous reports, observing no severe complications during pregnancy even in patients with a pituitary tumor (especially microadenoma), we are of the present opinion that bromocriptine therapy is the first choice regardless of the etiology of hyperprolactinemia. In the present study bromocriptine was not so effective for normoprolactinemia. However, since it has been reported by some authors²⁹⁻³¹) that this drug is effective for normoprolactinemic amenorrhea, further studies are required to evaluate its effect on this kind of disease. It is considered that no special treatment is required when the patients is not worried about galactorrhea and does not desire to become pregnant, use of bromocriptine is preferred when galactorrhea is severe and the patients is worried.

In summary, our findings confirmed that a routine examination for galactorrhea, determination of PRL and TSH after the detection of galactorrhea and examination of all hyperprolactinemic patients for the presence of a pituitary tumor are important and bromocriptine is effective for hyperprolactinemia.

References

- 1) Vezina, J. L. and Sutton, T. J.: Prolactin-secreting pituitary microadenoma. Roentgenologic diagnosis. *Am. J. Roentgenol.*, 120 : 46, 1974.
- 2) Rorbes, A. P., Henneman, P. H., Griswold, G. C. and Albright, F.: Syndrome characterized by galactorrhea, amenorrhea and low urinary FSH: Comparison with acromegaly and normal lactation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 14 : 265, 1954.
- 3) Hooper, J. H., Welch, V. C., Point, P. and Shackelford, R. T.: Abnormal lactation associated with tranquilizing drug therapy. *J. A. M. A.*, 4 : 506, 1961.
- 4) Edwards, C. R. W., Forsyth, I. A. and Besser, G. M.: Amenorrhea, galactorrhea, and primary hypothyroidism with high circulating levels of prolactin. *Br. Med. J.*, 3 : 462, 1971.
- 5) Tolis, G., Hoyte, K., Mckenzie, J. M., Mason, B. and Robb, P.: Clinical, biochemical, and radiologic reversibility of hyperprolactinemic galactorrhea-amenorrhea and abnormal sella by thyroxine in a patient with primary hypothyroidism. *Am. J. Obstet.*

- Gynecol., 131 : 850, 1978.
- 6) Puleo, J. G. and Ory, S. G. : Nonpuerperal mastitis associated with galactorrhea. *Obstet. Gynecol.*, 61(Suppl) : 69s, 1983.
 - 7) Shearman, R. P. and Turtle, J. R. : Secondary amenorrhea with inappropriate lactation. Observation on etiology, estrogen-gonadotropin interrelationships, the behavior of human growth hormone, and the response to treatment. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 106 : 818, 1970.
 - 8) Kleinberg, D. L., Noel, G. L. and Frantz, A. G. : Galactorrhea: A study of 235 cases, including 48 with pituitary tumors. *N. Engl. J. Med.*, 296 : 589, 1977.
 - 9) Tolis, G., Somma, M., Campenhou, J. V. and Friesen, H. : Prolactin secretion in sixty-five patients with galactorrhea. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 118 : 91, 1974.
 - 10) Turksoy, R. N., Farber, M. and Mitchell, G. W. : Diagnostic and therapeutic modalities in women with galactorrhea. *Obstet. Gynecol.*, 56 : 323, 1980.
 - 11) Vetter, L., Krauer, F. and Wyss, H. : Galactorrhea. A report on 50 cases. *Arch. Gynäk.*, 216 : 81, 1974.
 - 12) Corenblum, B., Paireudeau, N. and Shewchuk, A. B. : Prolactin hypersecretion and short luteal phase defects. *Obstet. Gynecol.*, 47 : 486, 1976.
 - 13) Keye, W. R., Chang, R. J., Monroe, S. E., Wilson, C. B. and Jaffe, R. B. : Prolactin-secreting pituitary adenomas in women. II. Menstrual function, pituitary reserves, and prolactin production following microsurgical removal. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 134 : 360, 1979.
 - 14) Greer, M. E., Moraczewski, T. and Rakoff, J. S. : Prevalence of hyperprolactinemia in anovulatory women. *Obstet. Gynecol.*, 56 : 65, 1980.
 - 15) Archer, D. H., Lattanzi, D. R., Moore, E. E., Harger, J. H. and Herbert, D. L. : Bromocriptine treatment of women with suspected pituitary prolactin-secreting microadenoma. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 143 : 620, 1982.
 - 16) Davajan, V., Kletzky, O., March, C. M., Roy, S. and Mishell, D. R. : The significance of galactorrhea in patients with normal menses, oligomenorrhea, and secondary amenorrhea. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 130 : 894, 1978.
 - 17) Shewchuk, A. B., Adamson, G. D., Lessard, P. and Ezrin, C. : The effect of pregnancy on suspected pituitary adenomas after conservative management of ovulation defects associated with galactorrhea. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 136 : 659, 1980.
 - 18) Boyar, R. M., Kapen, S., Weitzman, E. D. and Hellman, L. : Pituitary microadenoma and hyperprolactinemia. A cause of unexplained secondary amenorrhea. *N. Engl. J. Med.*, 29 : 262, 1976.
 - 19) Corenblum, B. and Taylor, P. J. : A rationale for the use of bromocriptine in patients with amenorrhea and normoprolactinemia. *Fertil. Steril.*, 34 : 239, 1980.
 - 20) Hancock, K. W., Scott, J. S., Lamb, J. T., Gibson, R. M. and Chapman, C. : Conservative management of pituitary prolactinomas; Evidence for bromocriptine-induced regression. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 87 : 523, 1980.
 - 21) Mornex, R., Orgiazzi, J., Hugues, B., Gagnaire, J. C. and Claustrat, B. : Normal pregnancies after treatment of hyperprolactinemia with bromocriptine, despite suspected pituitary tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 47 : 290, 1978.
 - 22) Chang, R. J., Keye, W. R., Young, J. R., Wilson, C. B. and Jaffe, R. B. : Detection, evaluation, and treatment of pituitary microadenomas in patients with galactorrhea and amenorrhea. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 128 : 356, 1977.
 - 23) Child, D. F., Gordon, H., Mashiter, K. and Joplin, G. F. : Pregnancy, prolactin, and pituitary tumours. *Br. Med. J.*, 4 : 87, 1975.
 - 24) Kelly, W. F., Doyle, F. H., Mashiter, K., Banks, L. M. and Gordon, H. : Pregnancies in women with hyperprolactinemia: Clinical course and obstetric complications of 41 pregnancies in 27 women. *Br. J. Obstet. Gynecol.*, 86 : 698, 1979.
 - 25) Bergh, T., Nillius, S. J. and Wide, L. : Clinical course and outcome of pregnancies in amenorrhoeic women with hyperprolactinemia and pituitary tumors. *Br. Med. J.*, 1 : 875, 1978.
 - 26) Jewelewicz, R. and Wiele, R. L. V. : Clinical course and outcome of pregnancy in twenty-five patients with pituitary microadenomas. *A. J. Obstet. Gynecol.*, 136 : 339, 1980.
 - 27) Burry, K. A., Schiller, H. S., Mills, R., Harris, B. and Heinrichs, L. : Acute visual loss during pregnancy after bromocriptine-induced ovulation. The elusive tumor. *Obstet. Gynecol.*, 52(Suppl) : 19s, 1978.
 - 28) Lamberts, S. W. J., Klijjn, J. G. M., DE Lange, S. A., Singh, R., Stefanko, S. Z. and Birkenfäger, J. C. : The incidence of

complications during pregnancy after treatment of hyperprolactinemia with bromocriptine in patients with radiologically evident pituitary tumors. *Fertil. Steril.*, 31 : 614, 1979.

- 29) Seppala, M., Hirvonen, E. and Ranta, T. : Bromocriptine treatment of secondary amenorrhea. *Lancet*, 29 : 1154, 1976.
- 30) Thorner, M. O., Besser, G. M., Jones, A., Dacie, J. and Jones, A. E. : Bromocriptine treatment of female infertility : report of 13 pregnancies. *Br. Med. J.*, 4 : 694, 1975.
- 31) Tolis, G. and Naftolin, F. : Induction of menstruation with bromocriptine in patients with euprolactinemic amenorrhea. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 126 : 426, 1976.

乳汁漏出患者 210 例の臨床的検討

信州大学医学部産婦人科学教室

深松義人, 富田和彦, 吉田享子

塚本隆是, 福田透

1978年から6年間に当科を受診し、乳汁漏が認められた210例について乳汁漏の原因、月経の状態、基礎プロラクチン(PRL)値、高PRL血症の頻度ならびに不妊症患者に対するプロモクリプチンの有効性を検討した。

乳汁漏の原因では特異性が最も多く(56.2%)、下垂体腫瘍の頻度は14.3%であった。無月経は75例に認められ、無月経の74.7%は高PRL血症で、平均血中PRL値は166.6ng/mlと高値を示した。乳汁漏の73例(34.9%)は高PRL血症で、高PRL血症の42.5%は下垂体腫瘍であった。また、頻度は少ないが、正常周期、稀発月経を有する症例にも高PRL血症が認められた。

プロモクリプチンは高PRL血症に対してその原因にかかわらず非常に有効で、排卵率は92.5%、妊娠率は81.8%であった。

(受付 : 昭和61年4月10日)

ENDOCRINOLOGICAL PROFILE AND TREATMENT FOR PATIENTS WITH DELAYED OVULATION

Saburo YAMASHITA, Takehisa ITO, Akito YAKABE,
and Norio KINASHI

Section of Obstetrics and Gynecology, Tokuyama Chuo General Hospital, Tokuyama, Japan

Tadashi TORIGOE

Department of Obstetrics and Gynecology, Yamaguchi University School of Medicine, Ube, Japan

Abstract: The purpose of this study is to determine the endocrinological background and to establish an appropriate therapeutic method in cases of delayed ovulation (D-group) i. e. cases with ovulation after the 19th day of the menstrual cycle (M-19). Serial determination of circulating levels of estradiol (E_2), LH, FSH and progesterone were performed during the follicular phase in 60 cases with delayed ovulation and 60 cases with normal ovulation (C-group). Ovulation or the growth of the ovarian follicle was monitored by ultrasonography (USG). We performed LH-RH test (100 μ g, intramuscularly) on M 5-6, M 11-12 and M 17-18. All patients were treated with clomiphene therapy or hMG-hCG therapy. We obtained the following results.

(1) The changes in serum E_2 and follicular size indicated that the follicle grew slowly during the early follicular phase ("Slow growing phase"), but began to grow more rapidly at 6 or 7 days before ovulation ("Rapid growing phase").

(2) In comparison with C-group, the "Slow growing phase" was significantly prolonged in D-group ($P < 0.05$). But in the length of the "Rapid growing phase" and follicular growth rate, there were no significant differences between two groups.

(3) In the serum levels of E_2 , progesterone, LH and FSH, no significant differences were noted between the two groups.

(4) Net increases of LH by the LH-RH test on M 11-12 were significantly higher than those on M 5-6 in two groups ($P < 0.01$). On the other hand, E_2 in the blood was significantly lower in the D-group on M 11-12 compared with that of C-group ($P < 0.01$). As an etiological factor of D-group, a certain dysfunction of the ovaries rather than a dysfunction of the pituitary was suggested.

(5) Clinical data: A favorable pregnancy ratio of 17/37 (46%) with clomiphene therapy and 12/20 (60%) with hMG-hCG therapy was observed, respectively. The shortening effect on the follicular period was 5.9 ± 2.0 day ($M \pm S. D.$) by clomiphene therapy, and significantly superior to the 2.9 ± 1.7 day by hMG-hCG therapy ($P < 0.05$).

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 30-37, 1987)

Introduction

Delay of ovulation resulting from slow follicular development has been generally diagnosed as delayed ovulation¹⁻⁵⁾, and this is considered to be a light ovarian dysfunction, which may, however, develop to oligomeno-

rrhea and finally to secondary amenorrhea.

On the other hand, it has been reported that the incidence of abortion and of fetal anomaly were higher in cases with delayed ovulation than in normal pregnant women¹⁾. Our study was designed to make clear the causes of delayed ovulation, which would also

make it possible to determine the effective treatments for these cases.

Materials and Methods

The subjects for this study were 60 women who received treatment for infertility at the Section of Obstetrics and Gynecology of Tokuyama Chuo General Hospital from June 1980 to June 1983.

They showed at least 3 menstrual cycles with a follicular phase of more than 19 days in their BBT before their visit to our hospital.

The control group consisted of those subjects who showed regular menstrual cycles with a follicular phase of less than 18 days (Table 1).

Serum estradiol (E₂), progesterone, testosterone, luteinizing hormone (LH), and follicle stimulating hormone (FSH) were determined after the 5th days of the menstrual cycle. LH-RH tests with intramuscular injections of 100μg of LH-RH were carried out on the 5-6th day, the 11-12th day, and the 17-18th days of the menstrual cycle in the delayed ovulation group, but only on the 5-6th and the 11-12th day in the control group, because on the 17-18th day in the control group almost all cases were postovulation. Follicular diameters were measured as frequently as possible by ultrasonography.

All patients were treated with clomiphene citrate or hMG-hCG.

The day of ovulation was retrospectively estimated on the basis of basal body temperature, ultrasonographic examination, and sex steroid hormone levels.

The statistical analyses were performed by a student's *t* test.

Result

1. Changes in serum E₂ level in patients

Table 1 Comparison of the control group with the delayed ovulation group

| | Control group | Delayed ovulation group |
|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Length of follicular phase | 16.2 ± 1.9 (M ± SD) n = 60 | 22.3 ± 2.3 (M ± SD) n = 60 |
| Length of luteal phase | 14.4 ± 1.8 (M ± SD) n = 60 | 12.8 ± 1.5 (M ± SD) n = 60 |

(* P < 0.05)

with delayed ovulation and the control group

Fig. 1 (a) shows the changes in the serum E₂ levels in C-group and D-group. The serum E₂ levels began to rise on about the 5th-6th day before ovulation and reached the maximum level on the 2nd day before ovulation followed by a rapid decrease of E₂ level. There was no statistically significant differences between the two groups.

Fig. 1(b) shows the changes of the serum E₂ level over the course of time, where the day of ovulation is described as M16 in the control group and M22 in the delayed ovulation group based on the data from Table 1.

Mean serum E₂ levels in the control group started to rise on the 9th day, reaching a peak level on the 14th day, followed by ovulation on the 16th day. On the other hand, patients with delayed ovulation showed the same pattern of serum levels of E₂, except that it begins to rise on the 16th day.

The length of the follicular period was divided into two phases according to the manner of follicular development.

The follicle grew slowly during the early follicular phase ("Slow growing phase"), but began to grow more rapidly after the 6th or 7th day before ovulation ("Rapid growing phase"). Compared to the control group, the "Slow growing phase" was significantly

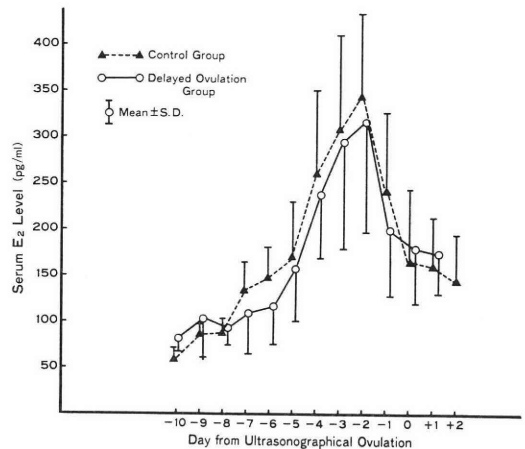


Fig. 1 (a) The variation of serum E₂ level in the control group (▲···▲) and in the delayed ovulation group (O···O). The Day 0 represents the day of ovulation. Data are synchronized to the day 0.

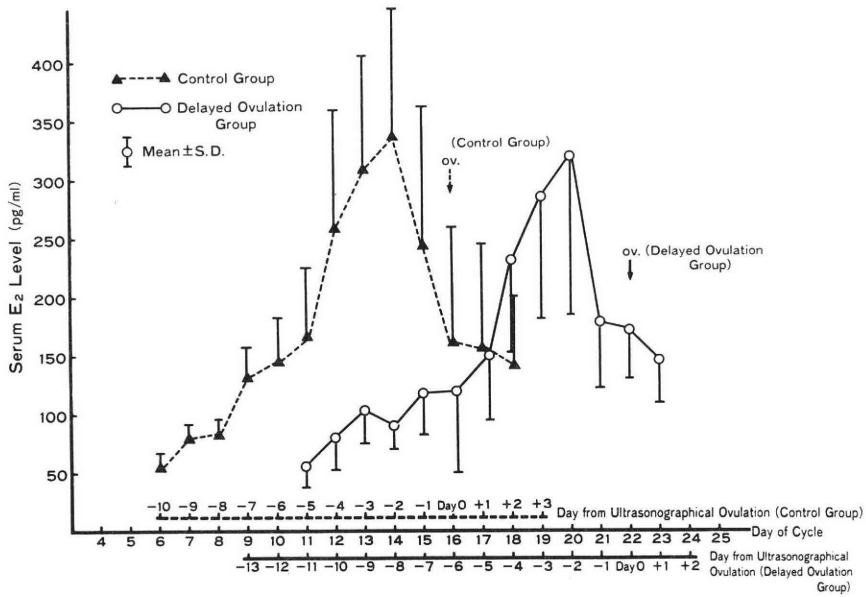


Fig. 1 (b) Changes in serum E₂ level in the control group (▲---▲) and the delayed ovulation group (○---○)
 The abscissa is constructed with three lines. The upper and lower lines show the scale of "the day from ultrasonographical ovulation" in the control group and in the delayed ovulation group, respectively. Day 0 is the day of ultrasonographical ovulation. The midline shows the scale of "the day of cycle" in the two groups.

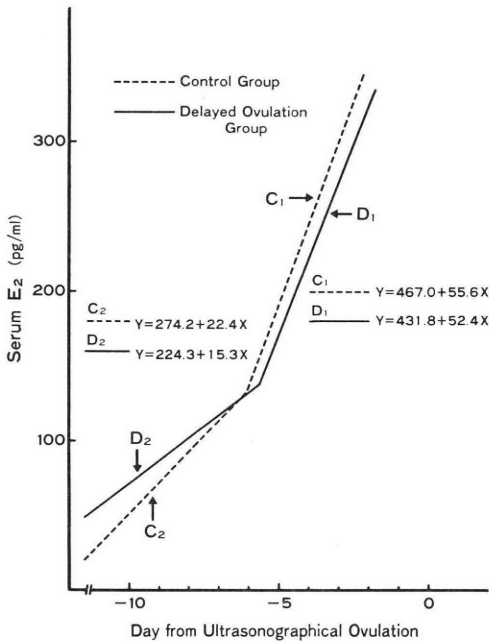


Fig. 1 (c) Analysis of the follicular growth rate by measurement of the serum E₂ in the control group (▲---▲) and the delayed ovulation group (○---○).

prolonged in the delayed ovulation group ($P < 0.01$) (Table 1).

In Fig. 1 (c), the follicular growth rate and its linearity are statistically analysed using the regression line method. The results are below.

- 1) Control group
 "Slow growing phase",
 $Y = 274.2 + 22.4X$, $\gamma = 0.8724$ ($P < 0.01$)
 "Rapid growing phase",
 $Y = 467.0 + 55.6X$, $\gamma = 0.8448$ ($P < 0.01$)
- 2) Delayed ovulation group
 "Slow growing phase",
 $Y = 224.3 + 15.3X$, $\gamma = 0.8671$ ($P < 0.01$)
 "Rapid growing phase",
 $Y = 431.8 + 52.4X$, $\gamma = 0.9421$ ($P < 0.01$)

In the data, it was elucidated that the follicular growth rate in the "Slow growing phase" was significantly slower in D-group than in C-group ($P < 0.01$), but there was not a significant difference in the "Rapid growing phase" between the two groups.

2. Changes in the maximum follicular diameter measured by ultrasonography in

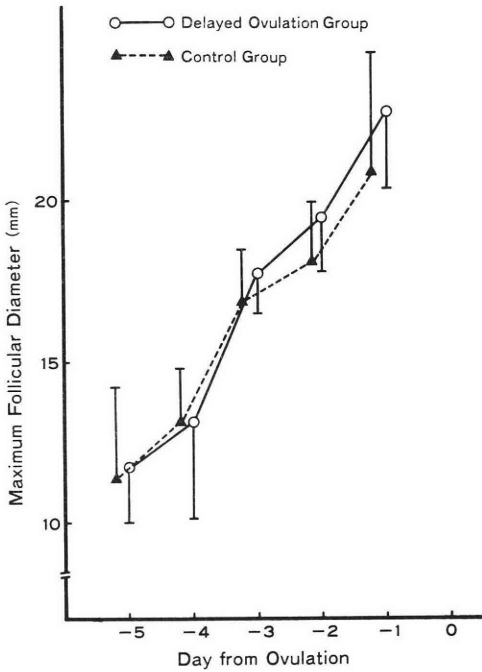


Fig. 2 The changes in the maximum follicular diameter in the "Rapid growing phase" in the control group (▲··▲) and in the delayed ovulation group (○—○). The Day 0 represents the day of ovulation.

the "Rapid growing phase" (Fig. 2)

Fig. 2 shows the changes in the maximum diameter of follicles 5 days before ovulation in C-group and D-group.

The day of ovulation determined by the ultrasonographical examination is regarded as Day 0.

There was no statistically significant difference between the two groups.

3. Changes in serum progesterone level in patients with delayed ovulation and the control group (Fig. 3)

In the control group, serum progesterone levels continued to rise, reaching a plateau at the 4th to 7th day after ovulation. Thereafter progesterone gradually declined.

On the other hand, serum progesterone level in D-group was apparently lower than that of C-group, but there were no statistically significant differences between the two groups.

4. Changes in serum LH and FSH in patients with delayed ovulation and the con-

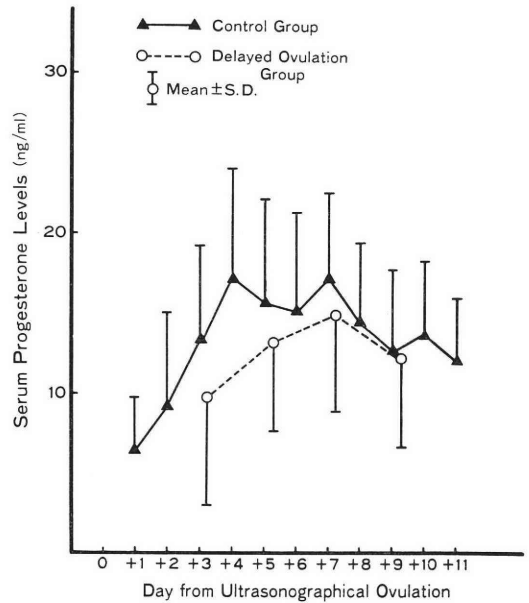


Fig. 3 Serum progesterone levels in the control group (▲··▲) and in the delayed ovulation group (○—○). Day 0 represents the day of ovulation.

trol group

Fig. 4 shows the day to day changes of serum LH and FSH levels in C-group and D-group from the 5th to 12th day (early-mid-follicular phase). From the 5th to 11th day, there were no differences in serum LH levels between the two groups, but on the 12th day serum LH in the control group was significantly higher than that in the delayed ovulation group ($P < 0.05$). In serum FSH there was no significant difference between the two groups.

Fig. 5 shows the changes of serum LH and FSH levels in the two groups, where the day of ovulation is described as the 16th day in the control group and the 22nd day in the delayed ovulation group, respectively.

The LH levels began to rise on about the 4th day before ovulation and reached the peak level on the first day before ovulation (control group: on M15 VS delayed ovulation: on M21), followed by a rapid decrease of serum LH level in the two groups.

And so, there was no statistically significant difference in the pattern of serum LH between the two groups without the retardation of the surge of LH in D-group.

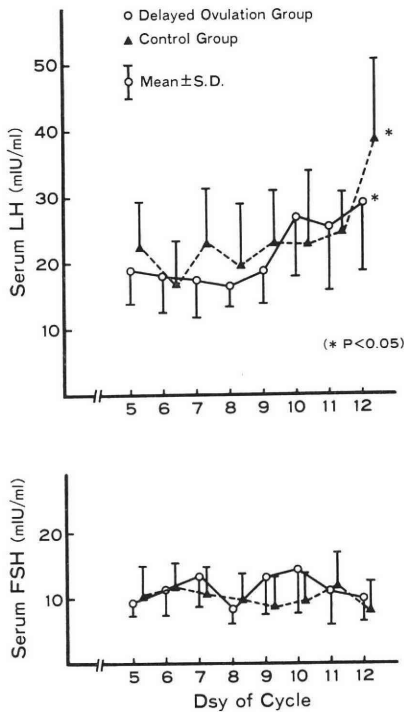


Fig. 4 The day to day variations of serum LH and FSH in the control group (▲···▲) and in the delayed ovulation group (○—○) in the early to midfollicular phase.

5. The effects of LH-RH on serum LH and FSH levels in patients with delayed ovulation and the control group

There showed the effects of LH-RH injection on the serum LH and FSH levels on the 5-6th day, the 11-12th day, and the 17-18th day (Fig. 6).

On the 11-12th day, the net increase of LH was significantly higher than that on the 5-6th day in the two groups.

The D-group showed significantly higher responses on the 17-18th day than on the 11-12th day (P < 0.01). Characteristically, on the 11-12th day D-group showed the same LH response to LH-RH as observed in C-group although the serum E₂ level in this period remained low (Table 2).

On the other hand, shown in Fig. 6, the response of FSH in the delayed ovulation group is significantly higher on the 17-18th day, but not on the 11-12th day than that on the 5-6th day (P < 0.05).

6. Effect of clomiphene or hMG-hCG treatment

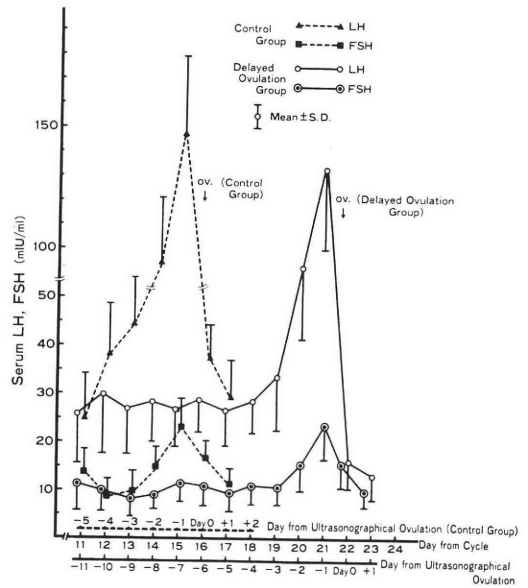


Fig. 5 Serum LH and FSH levels in the control group (▲···▲) and in the delayed ovulation group (○—○).

The abscissa is constructed with three lines. The upper and lower lines show the scale of "the day from ultrasonographical ovulation" in the control group and in the delayed ovulation group, respectively. Day 0 is the day of ultrasonographical ovulation.

The midline shows the scale of "the day of cycle" in the two groups.

Fifty-seven patients with delayed ovulation were treated with clomiphene or hMG-hCG therapy. The pregnancy rate was 46% (17/37 cases) in the clomiphene-treated patients and 60% (12/20 cases) in the hMG-treated patients. (Table 3).

Although both clomiphene-treated and hMG-treated groups showed a shorter follicular phase than the untreated group, clomiphene significantly reduced the duration of the follicular phase compared with the hMG-treated group (P < 0.05) (Table 3).

Discussion

There is no consistent definition of delayed ovulation as yet. Saeki⁴⁾ reported that in 75 percent of the cases, ovulation occurred within 22 days after the onset of menses and therefore they defined an ovulation after the 22nd day as delayed ovulation. Noguchi⁵⁾ and coworkers defined an ovulation after the

Table 2 Comparison of the effect of LH-RH on serum LH and FSH levels between the control group and the delayed ovulation group

| | M 5-6 | | M 11-12 | | M 17-18 | |
|----------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------|
| | Control | D-Group | Control | D-Group | Control | D-Group |
| E ₂ | 53.0 ± 7.0 (n=30, M ± SD) | 51.2 ± 8.9 (n=30, M ± SD) | 260.5 ± 100.3 (n=30) | 89.0 ± 12.3 (n=30) | 152.0 ± 66.1 (n=30) | |
| Δ LH | 46.7 ± 15.9 (n=10) | 65.6 ± 31.8 (n=15) | 118.9 ± 54.8 (n=10) | 137.0 ± 91.0 (n=15) | 298.7 ± 207.1 (n=15) | |
| Δ FSH | 7.9 ± 3.2 (n=10) | 10.6 ± 7.0 (n=15) | 11.5 ± 4.7 (n=10) | 12.6 ± 8.4 (n=15) | 17.5 ± 9.9 (n=15) | |

** P < 0.01

* P < 0.05

18th day of the menstrual cycle as delayed ovulation. Iffy⁶⁾ defined "Ovulation less than 14 days before the next expected period irrespective of the length of the cycle" as delayed ovulation.

According to Matsumoto⁷⁾, more than 90% of mature women had a follicular phase of less than 18 days. According to Shinada and coworkers⁸⁾, the rate of miscarriages is high in pregnant woman with a follicular phase of more than 19 days. In addition, Iffy and coworkers⁹⁻¹¹⁾ reported a higher incidence of abnormal pregnancy in women with a follicular phase of more than 18 days. In the present study, we defined the cases with a follicular phase of more than 19 days as delayed ovulation.

Many reports have dealt with delayed ovulation since Iffy⁹⁾ reported that the delay of ovulation is closely connected with abnormal pregnancy. Regarding experiments with animals, Fugo and Butcher¹²⁾, Mikamo and Hamaguchi¹³⁾, and Sato²⁾ reported that the delay of ovulation or of fertilization was associated with the high risk of morbid ovule or of abnormally fertilized ovules. Witschi and Laguens¹⁴⁾ and Mikamo¹⁵⁾ also reported similar results in *Xenopus laevis* (a kind of frog). Shinada and coworkers⁸⁾ reported that the rate of miscarriages in pregnancy following a follicular phase of more than 19 days was three

times higher than in those with a normal follicular phase. In addition, Sato²⁾ pointed out the possibility of the correlation of a higher rate of miscarriage in gonadotropin-induced pregnancy with a delayed ovulation phenomenon. These reports partly support the results observed by Iffy and coworkers⁹⁻¹¹⁾. On the other hand, Noguchi and coworkers⁵⁾ and Saeki⁴⁾ reported that there was no relationship between delayed ovulation and abnormal pregnancy. As described above, there have been many reports on the correlation of delayed ovulation with abnormal pregnancy, but only a few reports on the relationship between delayed ovulation and infertility.

In the present study, the process of follicular development to ovulation in patients with delayed ovulation was examined on the basis of variations in serum E₂ level and in the maximum diameter of the follicle. As shown in Fig. 1(a) there was no significant difference in the pattern of serum E₂ level between D-group and C-group. In addition, there was no significant difference in the growth of follicles for 5-6 days before ovulation between two groups (Fig. 2). As shown in Fig. 5 the patterns and the peak values of serum LH and FSH at the time of ovulation were almost the same in D-group as those in C-group.

We treated the patients with clomiphene or hMG preparations. Seventeen of 37 clo-

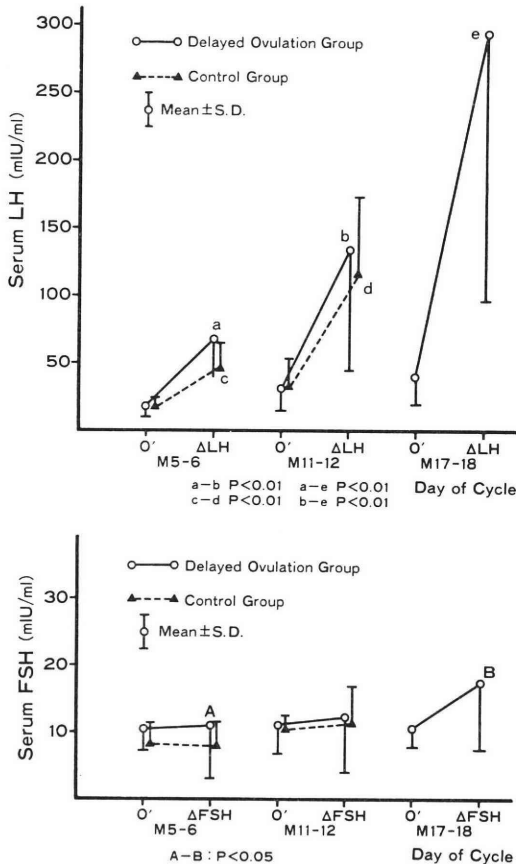


Fig. 6 The effect of LH-RH on serum LH and FSH in the control group (▲...▲) and in the delayed ovulation group (○...○) 0' shows the resting level of serum LH and FSH. ΔLH and ΔFSH show the net increase of serum LH and FSH, respectively. There are statistically significant differences between a and b (P<0.01), c and d (P<0.01), a and e (P<0.01), b and e (P<0.01), and A and B (P<0.05).

miphene-treated patients (46%) and 12 of 20 hMG-treated patients (60%) became pregnant (Table 3). Clomiphene significantly reduced the length of the follicular phase (P<0.05), (Table 3).

It is not clear how the delayed ovulation occurs. In the present study, LH responses to LH-RH injections were already high on days 11-12 in the delayed ovulation group (Fig. 6), while the basal levels of circulating estradiol, LH and FSH still remained low (Fig. 4, 5, Table 2). It is well understood

Table 3 Comparison of the effect of the clomiphene citrate or hMG treatment in the delayed ovulation group on the reduction of the follicular period and pregnancy rate

| | Reduction of Follicular Period | Pregnancy Rate |
|------------|---|----------------|
| clomiphene | 5.9±2.0 day ^a (M±SD) n=37 | 17/37 (46%) |
| hMG-hCG | 2.9±1.7 day ^b (M±SD) n=20 | 12/20 (60%) |

(a-b: P<0.05)

that the secretion of LH is regulated by LH-RH and the ovarian steroid hormones, particularly E₂. Low doses of E₂ increase the synthesis and store of LH in the pituitary cells, but inhibit the release of LH¹⁶). The delay of the onset of this "Rapid growing phase" in D-group would result in prolongation of the period with low serum E₂ levels, which would be enough to synthesize and store LH in the gonadotrophs but not high enough to stimulate the release of LH. In order to induce the midcycle LH surge, E₂ should be increased above the certain threshold for a certain period of time¹⁶). Regarding the site of action of the estrogen affect on the LH secretion, Adam¹⁷) reported that E₂ increased Gn-RH receptors of the pituitary gonadotrophs, while Nakai¹⁸) showed that estrogen acted at the hypothalamus to stimulate the release of LH-RH, which would in turn stimulate the synthesis and release of LH in the pituitary.

In any case, the rapid increase in serum E₂ levels in the preovulatory phase is always caused by the rapid growth of the follicle, which usually begins 6-7 days before the time of ovulation. Little information is available regarding the factors that initiate the rapid growth of the follicle. Since there were no significant differences in serum FSH and LH levels between the D-group and C-group on day 5-11 of the menstrual cycle (Fig. 4), the delay of the "Rapid growing phase" would not be due to the pituitary dysfunctions such as insufficient FSH secretion, but to some ovarian disorders itself. It was of interest to note in the present study that the duration of the follicular phase could be shortened by

clomiphene therapy or by hMG-hCG treatments. It remains to be studied about how the delayed ovulation occurred and how those treatments could be effective.

Acknowledgement

The authors wish to express thanks to Miss Y. Tanaka, the chemist of our hospital, for her skillful technical assistance and statistical analyses.

Reference

- 1) Arrata, W. S. and Iffy, L.: Normal and delayed ovulation in the human. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 26 : 675, 1971.
- 2) Sato, T.: Experimental studies of the causative role of delayed ovulation in reproductive wastage. *Acta. Obstet. Gynec. Jpn.*, 30 : 1647, 1978.
- 3) Sawada, T.: Steroid secretion from ovaries with delayed ovulation in rats. *Exp. Anim.*, 31 : 7, 1982.
- 4) Saeki, T.: Delayed ovulation and outcome of pregnancy. *Jap. J. Fert. & Ster.*, 25 : 122, 1980.
- 5) Noguchi, K., Saito, M. and Otsuka, H.: A clinical and statistical study on delayed ovulation. *Jap. J. Fert. & Ster.*, 23 : 35, 1978.
- 6) Iffy, L.: The time of conception in pathological gestation (The scope of the reflux theory). *Proc. Royal Society of Med.* p.p. 1098, 1963.
- 7) Matsumoto, S.: Study on menstrual disorder. *Acta. Obst. Gynec. Jpn (in Japanese)*, 14 : 523, 19, 1962.
- 8) Shinada, T., Takenaka, T., Owada, N., Morita, K., Yokota Y., Ami, K. and Shiozaki, T.: Ovarian function and pregnancy in ovulatory sterile women. *Jap. J. Fert. & Ster.*, 24 : 127, 1979.
- 9) Iffy, L.: Embryologic studies of time of conception in ectopic pregnancy and first trimester abortion. *Obstet. & Gynecol.*, 26 : 490, 1965.
- 10) Iffy, L. and Wingate, M. B.: Risks of rhythm method of birth control. *J. Reprod. Med.*, 5 : 11, 1970.
- 11) Jakovovits, A., Iffy, L., Wingate, M. B., Slate, W. M. G., Chatterton, R. T. and Kerner, P.: The rate of early fetal growth in the human subject. *Acta. anat.* 83 : 50, 1972.
- 12) Fugo, N. W. and Butcher, R. L.: Over-ripeness and the mammalian ova: 1. over-

ripeness and early embryonic development. *Fertil. Steril.*, 17 : 804, 1966.

- 13) Mikamo, K. and Hamaguchi, H.: Chromosomal disorder caused by preovulatory overripeness of oocyte, *Aging Gametes*, Ed. R. J. Blandau, p. 72, S. Karger, A.G. Basel, 1975.
- 14) Witschi, E. and Laguens, R.: Chromosomal aberrations in embryos from overripe eggs. *Develop. Biol.*, 7 : 605, 1963.
- 15) Mikamo, K.: Overripeness of the eggs in *Xenopus laevis* Daudi. D. Sci. Thesis, Hokkaido Univ., 1961.
- 16) Leyendecker, G., Ward law, S. and Nocke, W.: Experimental studies on the endocrine regulations during the periovulatory phase of the human menstrual cycle. *Acta. Endocrinol.*, 71 : 160, 1972.
- 17) Adams, T. E., Norman, R. L. and Spies, H. G.: Gonadotropin releasing hormone receptor binding and pituitary responsiveness in estradiol-primed monkeys. *Sci.*, 213 : 1388, 1981.
- 18) Nakai, Y., Plant, T. M., Hoss, D. L., Koegh, E. J. and Knobil, E.: On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinol.*, 102 : 1008, 1978.

遅延排卵症における内分泌学的検索及び臨床的有用性の検討

総合病院社会保険徳山中央病院

山下三郎, 伊東武久, 矢壁昭人, 木梨憲夫

山口大学医学部産科婦人科学教室

鳥越 正

遅延排卵症(D症)の内分泌学的背景の検索及び適切な治療法の確立を目的とした。D症60例及び正常排卵群(C群)60例につき、月経周期第5日目(M5)よりEstradiol (E₂), LH, FSH, progesterone (P)の測定及び、超音波による卵胞発育モニターを行なった。

また、M5-6, M11-12, M17-18に、LH-RHテスト(100 μ g, 筋注)を行なった。さらにClomiphene及びhMG-hCG療法について、臨床的有用性を検討した。以上より①血中E₂及びUSG所見により、D症、C群とも排卵6~7日前を境として、前半の卵胞発育緩徐期と急速期に区分された。D症では、緩徐期の延長が特徴的であった。②排卵日を基準とした血中E₂, LH, FSH及び黄体期Pの変動には、両群間で差を認めなかった。③LH-RHテストでは、両群ともM11-12で同等のLHのnet increaseを認めたが、D症では有意に低い血清E₂が持続した。以上より、ある種の卵巣機能失調が疑われた。④Clomiphene及びhMG-hCG療法は、臨床的に有効であった。(受付:昭和61年5月2日)

ダナゾール療法開始後より血清 CA 125 で 経過観察した外性子宮内膜症の3症例

—CA 125 の marker としての有用性に関する検討—

Three Cases of External Endometriosis Followed Using Serum
CA 125 after Danazol-treatment

—Studies on the Usefulness of CA 125 as a Marker
in Patients with External Endometriosis—

島根医科大学医学部産科婦人科学教室 (主任 北尾 学 教授)

高橋 健太郎 吉野 和男 白井 孝昭

Kentaro TAKAHASHI Kazuo YOSHINO Takaaki SHIRAI

西垣 新 荒木 芳美 北尾 学

Arata NISHIGAKI Yoshimi ARAKI Manabu KITAO

Department of Obstetrics and Gynecology, Shimane Medical University, Izumo 693. Japan

ダナゾール療法開始後、長期間、経時的な血清 CA 125 の測定を行った外性子宮内膜症の3症例を経験したので、治療経過に伴う、血清 CA 125 値の推移をもとに、子宮内膜症患者におけるダナゾール療法の効果判定の marker に血清 CA 125 は利用可能か否かを検討した。

その結果、ダナゾール治療中及び治療後の血清 CA 125 の変動パターンにより、再発を早期に推定出来、予後診断に利用出来るのみならず、ダナゾールの投与量及び投与期間の変更の指標となりうる事が示唆された。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 38-41, 1987)

緒 言

子宮内膜症は不妊の原因として重要な factor である。しかも、近年増加傾向を示しており、不妊症患者の約半数に本症が認められると報告されている¹⁾。子宮内膜症は、軽症症例でも妊孕性を著しく低下させる事が知られており²⁾、早期発見・早期治療が必要である事はいうまでもない。

子宮内膜症の診断方法には、問診、内診、直腸診、超音波断層法、子宮卵管造影法、腹腔鏡、CT スキャンなどがあるが、血清レベルでの腫瘍マーカー的な診断法は未だ確立されていない。我々は、上皮性卵巣癌患者の血清中に高濃度かつ高頻度に存在すると報告されている³⁾ ヒト卵巣癌関連抗原である CA 125 が、卵巣癌症例のみならず、子宮内膜症患者の血清中においても比較的高濃

度、高頻度に存在する事を報告して以来⁴⁾、子宮腺筋症と子宮筋腫との鑑別診断^{5,6)}、子宮内膜症の治療前診断及びダナゾール投与後の follow-up⁷⁾に、この血清 CA 125 を marker として利用している。

今回、治療開始後、長期間、経時的な血清 CA 125 の測定を行い、follow-up 中に再発が発見された2症例及び根治手術を余儀なくされた1症例を経験したので、血清 CA 125 値の推移を基に、子宮内膜症患者の治療開始後における血清 CA 125 の marker としての有用性について報告する。

症 例

症例 I ■■■■■ 34歳主婦、結婚後8年間不妊で、原発性不妊、下腹部腫瘤を主訴として来院。両側子宮内膜症性嚢腫の術前診断で左付属器切除術及び右嚢腫摘出術を

施行した。臨床進行期は Hoffman III 期であった。CA 125 の推移は、術前に 62U/ml であったものが、術後 1 週目で 85U/ml と一過性の上昇を示したが、その後、漸減した。術後 1 週目よりダナゾール 400mg/day を 18 週間投与した。ダナゾール投与後 7 週目に 16U/ml と正常範囲内になった。その後、術後 20 週目の時点では 15U/ml であったが、24 週時に 28U/ml、27 週時に 40U/ml と上昇傾向を示し、28 週時には 73U/ml となった。その時の超音波検査で 30×20mm の右側チョコレート嚢腫が確認出来、外性子宮内膜症の再発が強く疑われた。その後、術後 35 週時に血清 CA 125 は 91U/ml とさらに上昇を示したので、再度ダナゾール 400mg/day の連日投与を開始した。ダナゾール投与後、血清 CA 125 は激減し、投与 6 週目で 20U/ml となり、現在経過観察中である (図 1)。

症例 2 : 34 歳主婦、原発性不妊、月経困難を主訴として来院。腹腔鏡にて外性子宮内膜症 stage IV と診断し、両側嚢腫摘出術及びダグラス窩開放術を施行した。血清 CA 125 の推移は、術前の 50U/ml が治療後には漸減し、術後 1 週目で正常範囲となった。ダナゾール 400mg/day 投与中、一過性の上昇を示したが、ダナゾール 16 週間投与後は 25U/ml と正常範囲内、月経困難、腰痛などの自覚症状は全く改善した。しかし、術後 24 週時に右側に 40×30mm のチョコレート嚢腫が超音波断層法にて発見され、同時に CA 125 も 110U/ml と上昇を示したのでダナゾール 400mg/day を再び投与し、現在、再投与 12 週の時点で血清 CA 125 は 9U/ml で経過観察中である (図 2)。

症例 3 : K.Y., 31 歳, 5 回経妊 2 回経産の主婦。過多月経、月経困難、腰痛を主訴として来院、腹腔鏡にて臨床進行期 2 度の外性子宮内膜症と診断し、ダナゾール 400mg/day 投与を開始した。血清 CA 125 は、治療前 46U/ml であったが、投薬後は激減し、投与後 6 週目は 13U/ml となった。その後、正常範囲内ではあるが、上昇傾向を示し、ダナゾール 18 週間投与後の CA 125 は 26U/ml であった。しかし、臨床症状は全く改善せず、根治手術を施行した。手術は単純子宮全摘術と両側付属器切除術を行った。右卵巣に 40×45mm のチョコレート嚢腫が認められ、Hoffman II 期の臨床進行期分類であった。術後、約 1 か月の時点で臨床症状は改善し、現在、血清 CA 125 値も 8U/ml 以下と低値を持続しており、臨床症状も全くない状態である (図 3)。

考 察

子宮内膜症は不妊症と密接な関係があり、その為にも挙児希望者の治療は、ホルモン療法や保存手術療法を主

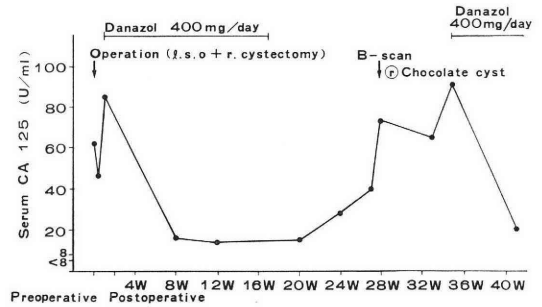


図 1 症例 1 の臨床経過

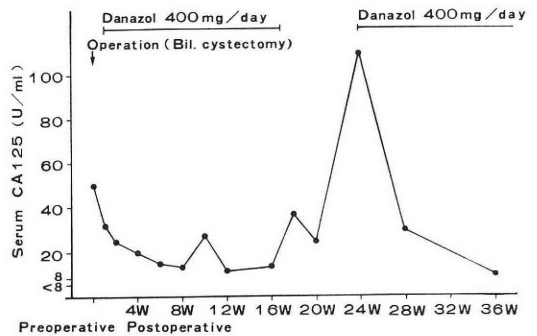


図 2 症例 2 の臨床経過

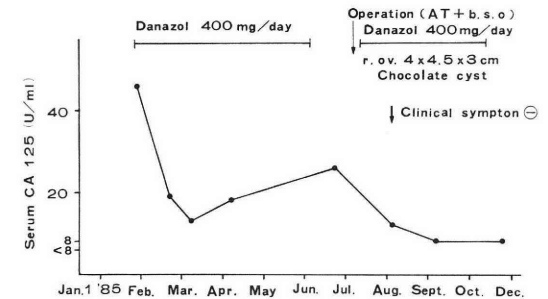


図 3 症例 3 の臨床経過

体とする保存療法が必要である。ホルモン療法で、1960 年代まではアンドロゲン療法、合成グスターゲン療法及び偽妊娠療法等が主流をなしていたが、1971 年のダナゾールの出現⁹⁾ は子宮内膜症の治療の歴史の中で一大変化を及ぼした事は言うまでもない。ダナゾールは外性子宮内膜症を原因とする不妊婦人に用いて、その妊孕性を向上させる事がよく知られており^{9,10)}、現在、我が国でもこのホルモン療法が単独または手術と併用して行われている。

ダナゾール投与中及び投与後の効果判定は自覚症状の消失や内診、直腸診による他覚所見の改善及び超音波断層法によるチョコレート嚢腫の消失などを基準にして行われているが、確実なのは、腹腔鏡で診断する事であ

る。しかし、腹腔鏡を second look, third look と何度も施行する事は、患者にとっては多大な苦しみであり、医療従事者にとつても、その設備、技術等の面で、どこでも、誰でも可能というわけにはいかない。故に、腹腔鏡施行の場所、時期、回数も必然と決まってしまうと推測される。また、超音波断層法による予後追跡も、かなりのトレーニングを要するものと思われる。そこで、誰にも、どこでも、何度でも施行でき、客観性のある血清レベルの marker が必要と推察される。我々は、この marker に CA 125 を利用しているが、臨床経過と非常によく一致するようと思われる。

ここで、今回報告した3症例の血清 CA 125 値の推移により、ダナゾール投与中及び投与後の効果判定における CA 125 の意義について述べてみる。症例1と2は保存的手術療法を施行し、手術後1週目よりダナゾール 400mg/day 投与を併用した症例であり、症例3は、腹腔鏡で外性子宮内膜症を診断した後、ダナゾール 400mg/day 投与で治療した症例である。3症例ともにダナゾール療法は16週間行つたのであるが、3症例ともに治療前の血清 CA 125 値は比較的高値(当科の基準で血清 CA 125 値は 40U/ml 以上を陽性値としている¹¹⁾)を示していたが、治療開始後は、すみやかに減少し、8週後には 20U/ml 以下の陰性値となつている。その後、症例1では、ほぼ 20U/ml 以下の一定低値を初回ダナゾール投与中止3週間後まで保つていた。しかし、ダナゾール投与中止7週後には 28U/ml に上昇し、その後、漸時上昇し続けており、ダナゾール投与中止10週後には 40U/ml と陽性値を示し、その後、超音波断層法にてチョコレート嚢腫が確認出来、再発が発見出来た症例である。症例2も、ボンゾール投与開始後9週目に正常範囲内ではあるが、一過性の上昇を示し、ボンゾール投与中止1週後には 38U/ml、3週後には 25U/ml と正常範囲内ではあるが変動を示し、その後は急激に上昇して、ボンゾール投与中止7週後に再発が発見された症例である。症例1はボンゾール投与中止11週後に、症例2はボンゾール投与中止7週後に、それぞれ再発が発見されたのであるが、このボンゾール投与中止から再発までの期間の差は、ボンゾール投与中の血清 CA 125 値の推移の違いで説明出来るかもしれない。つまり、症例1では、治療開始後、急激に減少した値が、ダナゾール投与中、そのまま持続しているが、症例2ではダナゾール投与後半からは一過性の上昇をくり返している。この血清 CA 125 の上昇傾向が、病変再発の徴候であるかもしれない。この事は症例3でも示唆出来る。つまり、ダナゾール投与後、急激に減少し、6週後に最低値となつた CA 125 は、ダナゾール投与中にもかかわらず、その後、正常範囲内

ではあるが、上昇し続けており、子宮内膜症病変は治癒しておらず、その為に自覚症状は改善しなかつたものと推測される。その後、根治手術により自覚症状は完全に改善しており、血清 CA 125 値も 10U/ml 以下の低値を維持し続けている。

以上より、ダナゾール投与後、血清 CA 125 値は確実に、いつたんは急激に減少するが、その後、その最低値が持続する症例では予後良好と推測される。しかし、ダナゾール投与中にもかかわらず、一過性の上昇を示す症例は早期の再発が示唆され、さらに長期のダナゾール投与が必要と思われる。また、ダナゾール投与により、いつたん最低値に減少したものが、そのまますぐ上昇し始める症例は、その投与量はダナゾールが無効と推測され、ダナゾールの投与量の増加あるいは他の治療法が望まれる。そして、ダナゾール投与後の予後追跡中に上昇傾向が認められ、血清 CA 125 が 40U/ml 以上の陽性値を示す症例は、再発が強く疑われ、早期の確定診断及び再治療が必要である。

文 献

- 1) Drake, T. S. and Grumert, G. M.: The unexpected pelvic factor in the infertility investigation. *Fertil. steril.*, 34: 27, 1980.
- 2) Buttram, V. C.: Conservative surgery for endometriosis in the infertile female: A study of 206 patients with implications for both medical and surgical therapy. *Fertil. Steril.*, 31: 117, 1979.
- 3) Bast, R. C. Jr., Klug, T., John, E. St., Jenison, E., Niloff, J., Lazarus, H., Berdowitz, R., Leavitt, T., Griffiths, C. T., Parker, L., Zurawski, V. and Knapp, R. C.: A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.*, 309: 883, 1983.
- 4) 高橋健太郎, 渋川敏彦, 吉野和男, 松永 功, 村尾 文規, 北尾 学: 新しい卵巣癌腫瘍マーカー CA 125 の婦人科疾患に関する研究—特に子宮平滑筋腫と子宮腺筋症との鑑別について—。産婦世界, 37: 69, 1985.
- 5) 高橋健太郎, 木島 聡, 吉野和男, 渋川敏彦, 森山政司, 岩成 治, 沢田康治, 松永 功, 村尾文規, 北尾 学: 新しい卵巣腫瘍マーカー CA 125 を利用した子宮平滑筋腫と子宮腺筋症の鑑別, 日産婦誌, 37: 591, 1985.
- 6) Takahashi, K., Kijima, S., Yoshino, K., Shibukawa, T., Murao, F. and Kitao, M.: Differential diagnosis between uterine myoma and endometriosis using CA 125 as a new tumor marker of ovarian carcinoma. *Asia-Oceania J. Obstet. Gynaecol.*, 12: 99,

- 1986.
- 7) Takahashi, K., Nagata, H., Yamane, Y., Yoshino, K., Shibukawa, T., Murao, F. and Kitao, M.: Clinical usefulness of serum CA 125 in patients with endometriosis. *Shimane J. Med. Sci.*, 9 : 82, 1986.
 - 8) Greenblatt, R. B., Dmowski, W. P., Mahesh, V. B. and Scholer H. F. L.: Clinical studies with an antigonadotropin-Danazol. *Fertil Steril.*, 22 : 102, 1071.
 - 9) Dmowski, W. P. and Cohen, M. R.: Antigonadotropin (danazol) in the treatment of endometriosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 130 : 41, 1978.
 - 10) Barbieri, R. L., Evans, S. and Kistner, R. W.: Danazol in the treatment of endometriosis: Analysis of 100 cases with a 4-year follow-up. *Fertil. Steril.*, 37 : 737, 1982.
 - 11) Takahashi, K., Yoshino, K., Shibukawa, T. and Kitao, M.: The normal level of an antigenic determinant CA 125 in healthy non-pregnant Japanese. *Sanfujinka no Sekai*, 37 : 717, 1985.

Three cases of external endometriosis followed using serum CA 125 after Danazol-treatment

—Studies on the usefulness of CA 125 as a marker in patients with external endometriosis—

**Kentaro Takahashi, Kazuo Yoshino,
Takaaki Shirai, Arata Nishigaki,
Yoshimi Araki and Manabu Kitao**

Department of Obstetrics and Gynecology,
Shimane Medical University, Izumo 693, Japan

We continually measured serum CA 125 in 3 patients with external endometriosis during a long term. Considering changes of serum CA 125 following the therapy course, we studied whether or not serum CA 125 can be utilized as a marker for assessing the effect of Danazol-treatment in patients with external endometriosis.

Consequently, serum CA 125 can serve as a pertinent marker for altering dose and term of Danazol, predicting the early relapse and prognostic diagnosis after Danazol-treatment by the alterative patterns of serum CA 125.

(受付: 昭和61年5月12日特掲)

ヒト月経周期に従った末梢血および卵巣静脈血中の インヒビン濃度について

Inhibin Levels in Peripheral and Ovarian Vein Blood throughout the Human Menstrual Cycle

慶応義塾大学医学部産婦人科学教室

田 辺 清 男 白 石 悟 強 口 芳 明
Kiyoo TANABE Satoru SHIRAISHI Yoshiaki KOWAGUCHI
木 戸 進 杉 村 和 男 中 村 幸 雄
Susumu KIDO Kazuo SUGIMURA Yukio NAKAMURA
飯 塚 理 八
Rihachi IIZUKA

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

ヒト月経周期に従ったインヒビンの変化を知る目的で、手術の際に両側卵巣静脈血および末梢血を採取し、インヒビン、ステロイドホルモンおよびゴナドトロピンを測定した。卵巣静脈血中のインヒビンは卵胞期初期より末期に向かって増加し、黄体期初期に減少し、中期で最低となり、末期で再び増加した。卵胞期末期と黄体期末期で左右差が認められた。末梢血中のインヒビンは大部分が感度以下であった。ステロイドおよびゴナドトロピン濃度はすでに報告されているものと一致した。卵巣静脈血では estradiol が高値側においてインヒビンも高値であった。以上より、インヒビンは卵巣の卵胞より分泌されて卵巣静脈に放出され、下垂体に作用して FSH 分泌を抑制する可能性が示され、インヒビンがヒトにおいても生殖生理学上重要な役割を果たしていることが示唆された。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 42-47, 1987)

緒 言

インヒビンは性腺より分泌される非ステロイド性物質であり、下垂体に作用して特異的に follicle-stimulating hormone (FSH) の分泌を抑制する物質として近年注目されている。

インヒビンは女性においては卵巣の顆粒膜細胞より分泌され¹⁾、高濃度に卵胞液中に存在することが知られている²⁾。そして、卵胞が閉鎖卵胞に陥ると卵胞液中のインヒビンが低下すること³⁾、また多嚢胞性卵巣症候群(PCO)患者においてはインヒビンが正常より多量に分泌され、PCOでLH/FSH比が異常高値を示す原因の一つとなっている可能性があること⁴⁾など、すでにわれわれより報告されている。このように、インヒビンが生

殖生理学上重要な役割を果たしていることが示唆されている^{5,6)}。

一方、インヒビンの測定は現在まだ bioassay によつていたために測定感度が低く、ヒト末梢血中のインヒビンが測定できず、そのためヒト性周期におけるインヒビンの変化は今までまだ報告されていない。

そこで、今回われわれは正常性周期を有する女性の、婦人科良性疾患患者の手術の際に卵巣静脈血を採取し、そのインヒビンとステロイドホルモンを測定したので報告する。

対 象

卵巣静脈血は子宮筋腫等の婦人科良性疾患の患者42名(32歳から49歳)の手術の際に採取した。開腹後直ちに両

側の卵巣静脈よりヘパリン加注射器を用いてゆつくりと採血した。なお子宮動静脈との吻合はクランプしなかつた。同時に末梢血も採取し、共に遠心分離後血漿を -20°C にて測定まで保存した。

性周期の時期は、月経周期と最終月経、基礎体温、子宮内膜日付診、頸管粘液、末梢血中ステロイドおよびゴナドトロピン濃度などの可能な限り多くの因子を用いて判定した。月経周期は卵胞期と黄体期に分け、それぞれを初期、中期、末期と計6期に分類した。

なお、不正性器出血等を示し本研究に適さない患者23名を除外し、手術前に正常な月経周期を有していた19例を本実験では用いた。

方 法

インヒビンの測定はすでにわれわれが報告したラット下垂体前葉細胞単層培養法によつた^{3,4)}。すなわち、成熟雌 Wistar ラット (体重約200g) を軽エーテル麻酔下に断頭し、直ちに下垂体前葉を摘出した。下垂体は Hanks-Hepes Buffer (GIBCO) (HHBS) 内で細切後、collagenase (225U/ラット, Worthington class 2, Worthington Biochemical Corp.), hyaluronidase (200U/ラット, Sigma type 1, Sigma Chemical Co.) および 3% BSA (fraction V) 加 HHBS 中にて 37°C 50分、ついで 0.25% viokase (GIBCO) 加 HHBS 中にて 20分間攪拌消化した。

細胞は Growth Medium (GM) にて 3回洗滌後、細胞数を数えた。なお、GM は Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) に 15% horse serum (GIBCO), 0.25 μg fungizone, 50 μg gentamicin, penicillin-streptomycin (各々 50U/ml, 50 μg /ml) とした。細胞を約 25万個/well になるように 0.5ml GM にて multiwell dish (Falcon Plastics) に植えた。なお、trypan blue 染色による細胞生存率は約90%であつた。

細胞は 37°C , 95% air-5% CO_2 の培養器中で 3日間培養した後、培養液を捨て、DMEM にて 2回洗滌後、われわれが標準物質としているブタ卵泡液 (pFF) を種々の濃度に希釈して加えた。一方、血漿は 1% charcoal-0.1% dextran にて 1時間処理後、GM にて希釈し、Millipore filter (pore size: 0.22 μm , Millipore Corp.) を通してから、培養細胞に加えた。標準物質ならびに検体はすべて triplicate で測定した。GM には残存するステロイドの影響を打ち消すため、および FSH の分泌を促進するために 10^{-8}M の estradiol と 10^{-6}M の progesterone を加えた。

検体を加え、約24時間培養器中で培養した後、培養液を吸引採取して、 -20°C にて保存した。

培養液中の FSH は NIADDK (NIH) 提供のラット FSH RIA キットを用いて、二抗体法にて測定した。インヒビンの解析はすでに報告した方法によつた^{3,4)}。すなわち、multiwell dish に検体を何も加えない control を必ず作製し、この培養液中の FSH 濃度を100とし、pFF および検体を加えた培養液中の FSH 濃度を%で表した (図1)。また pFF 1nl/well に相当するインヒビン活性を 1 Unit と表した。また、感度以下の場合には外挿法により一応算出し、統計処理に供した。

静脈血中の estradiol および progesterone はすでにわれわれが報告した方法によつた⁷⁾。また、血中の FSH と LH は第一ラジオアイソトープ社製の RIA キットにて測定した。

有意差の検定は、一元配置法ならびに Duncan の new multiple-range test にて行い⁸⁾、 $P < 0.05$ の場合、有意差ありと判定した。図中に示されているアルファベットは、異なっている場合は互いに有意差があることを示している。

成 績

図1に今回の標準曲線を示してある。縦軸には control well 中の FSH 濃度を100としたときの%を、横軸には pFF の Well 当たりの濃度 (nl) を示してある。本実験における測定感度は 5 Unit であつた。

卵巣静脈血中のインヒビン濃度は87% (38例中33例) が感度以上であり最高61U/100 μl (以下単にUと略) であつた。図2および図3に卵巣静脈血中のインヒビン濃

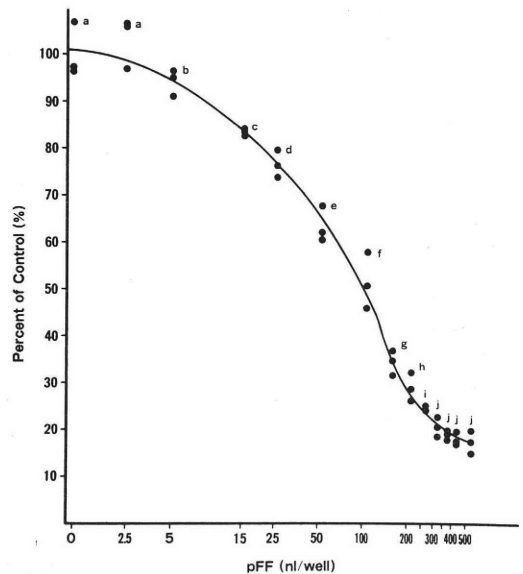


図1 pFF Dose-Response Curve

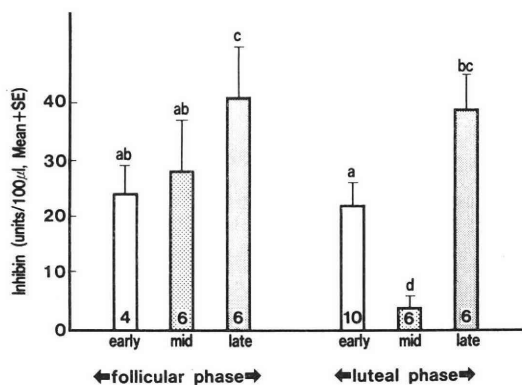


図2 Mean Inhibin Levels in Ovarian Vein Blood throughout Human Menstrual Cycle

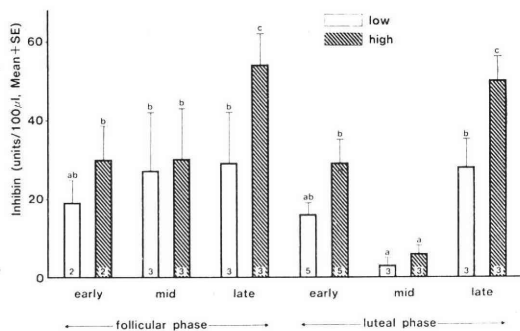


図3 Inhibin Levels in Ovarian Vein Blood throughout Human Menstrual Cycle

度を月経周期別毎にプロットしたものを示した。図2においては左右の卵巣静脈血中のインヒビンを加え、しかも各時期の症例を平均したものであり、性周期による卵巣静脈血中のインヒビンの変化をみようとしたものである。卵巣静脈血中インヒビンは卵胞期初期に 24 ± 5 U (Mean±SE, n=4) であったものが、中期には有意差はないものの 28 ± 9 U (n=6) と増加し、末期にはさらに 41 ± 9 U (n=6) と有意に増加して最高となった。黄体期初期には有意に減少して 22 ± 4 U (n=10) となり、中期には最低 (4 ± 2 U, n=6) (感度以下) となった。末期には再度増加して 39 ± 6 U (n=6) となった。

図3においては、各症例における左右の卵巣静脈血中のインヒビンのうち高い値を示したものはそれ同志で、また低い値を示したものはそれ同志で症例を通して平均したものであり、左右差 (laterality) をみようとしたものである。卵胞期においては初期より末期の低値側まで有意差は認められなかったが、末期の高値側は明らかに他の卵巣静脈血中のインヒビンより高値を示した。また、左右差は卵胞期末期において認められた。黄体期に

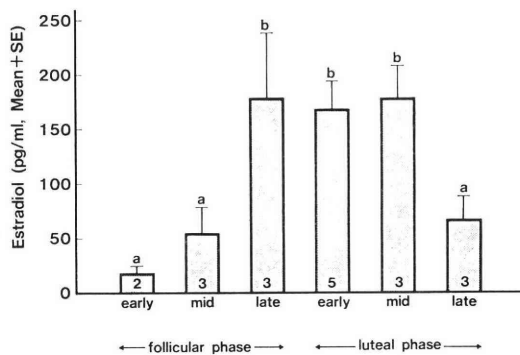


図4 Estradiol Levels in Peripheral Vein Blood throughout Human Menstrual Cycle

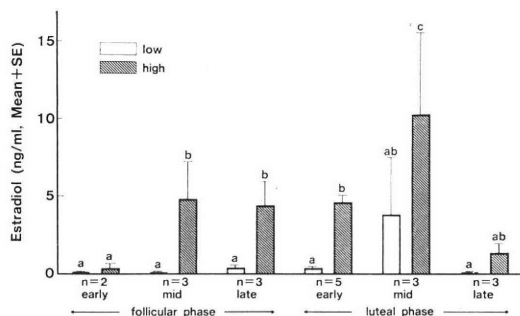


図5 Estradiol Levels in Ovarian Vein Blood throughout Human Menstrual Cycle

おいては、中期に有意に低く、末期に再び増加し、さらに左右差も認められた。

末梢血中のインヒビンは47% (19例中9例) が感度以下であり、また卵巣静脈血中のインヒビンより高い値を示したものは全くなかった。

末梢血中の estradiol を図4に示した。卵胞期には初期 (19.0 ± 5.8 pg/ml) より末期 (178.2 ± 61.4) に向かって増加し、黄体期においては初期 (168.3 ± 25.8) と中期 (178.2 ± 30.0) とは差がなく、末期において著明に減少 (65.6 ± 32.1) した。卵巣静脈血中の estradiol は図5に示す如く、卵胞期初期と黄体期末期を除く他の周期においては左右差が認められた。卵巣静脈血中の estradiol とインヒビンとの関係は、estradiol が高値を示した側においてインヒビンも高値を示し、不一致例は一例のみであった。

末梢血中の progesterone を図6に示した。卵胞期後期に有意差はないがやや増加 (1.4 ± 0.6 ng/ml) し、黄体期初期に著明に増加 (8.1 ± 1.5) し、中期に最高 (19.9 ± 5.0) となり、末期に減少 (6.5 ± 4.6) した。卵巣静脈血中の progesterone は図7に示した如く、卵胞期末期

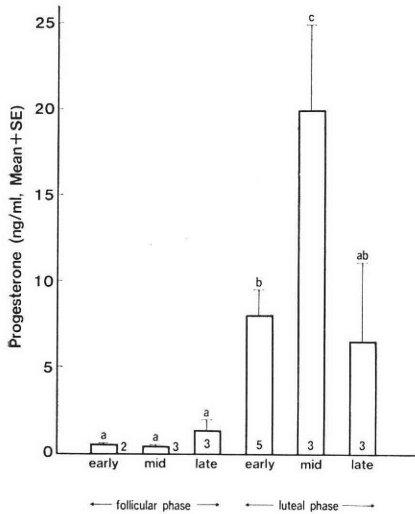


図 6 Progesterone Levels in Peripheral Vein Blood throughout Human Menstrual Cycle

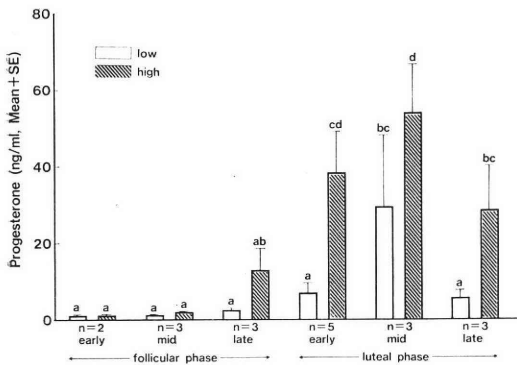


図 7 Progesterone Levels in Ovarian Vein Blood throughout Human Menstrual Cycle

に有意差はないがやや左右差を示し、黄体期においてはいずれの時期でも左右差が認められた。手術時に黄体が存在した卵巣側において、卵巣静脈血中 progesterone は高値であった。なお、卵巣静脈血中 progesterone とインヒビンの相関は認められなかった。

末梢血中のゴナドトロピンを図 8 に示した。FSH および LH 共に卵胞期末期に有意に高く (FSH : 26.3 ± 8.8 mU/ml, LH : 97.3 ± 33.0 mIU/ml), 他の時期では有意差が認められなかった。

考 察

インヒビンは 1976 年に deJong ら⁹⁾によりウシの卵胞液中にインヒビンが存在することが報告されて以来、ブ

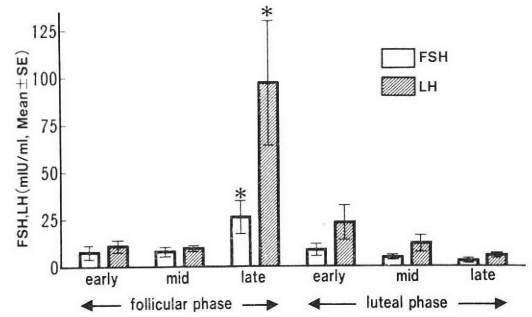


図 8 Gonadotropin Levels in Peripheral Vein Blood throughout Human Menstrual Cycle

タ¹⁰⁾やヒト²⁾の卵胞液中に多量に存在することが知られている。

われわれはヒト卵胞液を採取し、その中のインヒビンとステロイド濃度を測定することにより、(a) 卵胞期に採取された卵胞液中のインヒビンは、卵胞が閉鎖に陥るほど減少すること^{8,11)}、すなわち、インヒビン濃度は顆粒膜細胞数によること、(b) 排卵前期 (preovulatory phase) に採取された卵胞液中では estrogen や progesterone が高値であるのかかわらず、インヒビンが有意に低値であること、すなわち、顆粒膜細胞が黄体化するとインヒビンの産生は減少すること¹¹⁾、(c) 黄体期より採取された卵胞液中のインヒビンは大多数の卵胞が閉鎖卵胞であるために有意に低値であること^{8,11)}、(d) 卵胞液単位体積当りのインヒビンを比較すると、卵胞が大きくなるに従ってやや低値を示すかあるいはほとんど差がない⁶⁾が、卵胞液の増加は急速に進むため卵胞当りのインヒビンは増加すること¹²⁾、などを明らかにしてきた。また最近のわれわれの研究¹³⁾で、卵胞期に採取された最大直径を有する卵胞の卵胞液中のインヒビンと FSH を測定し比較したところ、両者は逆相関関係にあることが明らかになった。

以上の事柄より、われわれは以下のごとき推察を下してきた¹²⁾。すなわち、月経前後にやや高値を示す FSH により卵胞発育は促進されるが、その結果 estrogen およびインヒビンは増加する。そして両者の negative feedback 作用により FSH は減少する。卵胞期末期すなわち排卵前期になると estrogen の positive feedback 作用による LH/FSH surge が起こる頃には顆粒膜細胞も黄体化を始め、インヒビンも低下する。黄体期にはほとんどが閉鎖卵胞のためにインヒビンは低値を示すが、この時期に FSH も低いのはステロイドホルモンによるためではないかと考えられる。

ヒト末梢血中のインヒビンは、われわれの予備実験に

においては極めて低値であつたために、本実験においては婦人科手術の際に同一症例より両側卵巣静脈ならびに末梢血を採血し、それぞれのインヒビンを比較検討した。今回も末梢血中インヒビンは感度以下か、感度以上であつても極めて低値を示したが、卵巣静脈血中では約90%において感度以上であり、さらに卵巣静脈血中インヒビンはほとんどの例で末梢血中インヒビンより高値であつた。このことは、インヒビンが卵巣より分泌されている証拠であり、かつ今回の実験におけるインヒビンの測定が妥当であつたものと考えられる。またその性周期に伴つた変化は、上述の卵胞液中のインヒビンより推察した変化を極めて良く支持していると思われる。ただ、黄体期末期になぜ再び増加し、しかも左右差が認められたのかは不明であり、今後の検討がまたれる。

動物においては、ラット卵巣静脈血中のインヒビン活性がすでに報告¹⁴⁾され、*proestrus* から *estrus* にかけてインヒビン活性が上昇し、排卵と共に低下していることが示されている。サルにおいても卵巣静脈血中のインヒビンを測定することが試みられたがまだ成功していない⁵⁾。

以上により、インヒビンは卵胞の顆粒膜細胞より分泌され、卵胞液に貯溜されると同時に卵巣静脈血へも放出される。そして、月経周期が進み、卵胞が発育するのに伴いインヒビンの合成分泌が増加し、*estrogen* と共に下垂体(間脳にも?)に作用して *FSH* を低下させる。さらに首席卵胞が選択されると、それを有する卵巣静脈血中でインヒビンが高くなる。排卵が起こり顆粒膜細胞が黄体化すると、インヒビン合成は止み、*progesterone* を高濃度に分泌するようになる。それゆえ黄体期にはインヒビンは低値となる。黄体期末期から月経期、さらに卵胞期初期にかけて、卵胞が再び発育するに従つてインヒビンも再度上昇し始める。

末梢血および卵巣静脈血中のステロイドホルモン並びにゴナドトロピンは、すでに多くの研究者から報告されているそれぞれの値および性周期における変化とほぼ一致し、今回のわれわれが用いた検体の月経周期の時期は間違いないことを示していると思われる。

最後に、検体採取に御協力頂きました病院ならびにラット *FSH* RIA キットを提供して下さいました NIH (米国) に感謝致します。また、本研究の一部は *Rockefeller Foundation grant (RF83002)* によつたので謝意を表します。

文 献

- 1) Erickson, G. F. and Hsueh, A. J. W.: Secretion of "inhibin" by rat granulosa cells in vitro. *Endocrinol.*, 103: 1960, 1978.
- 2) Chari, S., Daume, E., Sturm, G. and Hopkinson, C. R. N.: Inhibin-like activity in human follicular fluid and its characterization. *Acta Endocrinol. (Kbh), Suppl.* 215: 87: 46, 1978.
- 3) Channing, C. P., Gagliano, P., Hoover, D. J., Tanabe, K., Batta, S. K., Sulewski, J. and Lebech, P.: Relationship between human follicular fluid inhibin-F activity and steroid content. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 52: 1193, 1981.
- 4) Tanabe, K., Gagliano, P., Channing, C. P., Nakamura, Y., Yoshimura, Y., Iizuka, R., Fortuny, A., Sulewski, J. and Rezai, N.: Levels of inhibin-F activity and steroids in human follicular fluid from normal women and women with polycystic ovarian disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 57: 24, 1983.
- 5) Channing, C. P., Anderson, L. D., Hoover, D. J., Kolena, J., Osteen, K. G., Pomerantz, S. H. and Tanabe, K.: Role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular maturation. *Recent Prog. Horm. Res.*, 38: 331, 1982.
- 6) Hoover, D. J., Tanabe, K. and Channing, C. P.: Inhibin secretion by the primate ovary. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 1: 279, 1983.
- 7) 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 (*E2*, *E3*, *P*) の測定について. *ホと臨*, 24: 411, 1976.
- 8) Steel, R. G. D. and Torrie, G. H.: Principles and procedures of statistics. McGraw-Hill Book Company, N. Y., p137, 1980.
- 9) deJong, F. H. and Sharpe, R. M.: Evidence for inhibin-like activity in bovine follicular fluid. *Nature*, 263: 71, 1976.
- 10) Marder, M. L., Channing, C. P. and Schwartz, N. B.: Suppression of serum follicle stimulating hormone in intact and acutely ovariectomized rats by porcine follicular fluid. *Endocrinol.*, 101: 1639, 1977.
- 11) Tanabe, K., Channing, C. P., Hoover, D. J., Lebech, P., Sulewski, J. and Rezai, N.: Correlation between human ovarian follicular atresia and follicular fluid (FFL) inhibin-F content. in *Nonsteroidal Regulators in Reproductive Biology and Medicine*, (Ed.) Fujii, T. and Channing, C. P., Pergamon Press, Oxford and New York, p231, 1982.
- 12) 田辺清男, 白石 悟, 中村幸雄, 飯塚理八: ヒト卵胞発育および排卵とインヒビン. *産婦の世界*, 36: 699, 1984.
- 13) 白石 悟: ヒト卵胞液中のインヒビンに関する

研究. 日産婦誌, 38 : 1986.

- 14) DePaolo, L. V., Shander, D., Wise, P. M., Barraclough, C. A. and Channing, C. P. : Identification of inhibin-like activity in ovarian venous plasma of rats during the estrous cycle. *Endocrinol.*, 105 : 644, 1979.

Inhibin levels in peripheral and ovarian vein blood throughout the human menstrual cycle

**Kiyoo Tanabe, Satoru Shiraiishi,
Yoshiaki Kowaguchi, Susumu Kido,
Kazuo Sugimura, Yukio Nakamura
and Rihachi Iizuka**

Department of Obstetrics and Gynecology,
School of Medicine, Keio University
shinjuku, Tokyo 160, Japan
(Director: Prof. Rihachi Iizuka)

In order to determine the change of plasma inhibin levels throughout the human menstrual cycle, peripheral and bilateral ovarian vein blood were sampled from 19 women at various stages of the menstrual cycle. Inhibin levels in vein blood were measured in rat anterior pituitary cell monolayer culture after stripping of steroids with dextran-coated charcoal as reported previously.

Inhibin was expressed in terms of nanoliters of standard porcine follicular fluid. Steroids and gonadotropins were determined by specific RIAs.

Inhibin levels in ovarian vein blood increased from early follicular phase (24 ± 5 units/100 μ l, Mean \pm SE, n=4) toward late follicular phase (41 ± 9 , n=6). Inhibin level at early luteal phase (22 ± 4 , n=10) was significantly lower than that of late follicular phase and was lowest at mid luteal phase (4 ± 2 , n=6). Inhibin level at late luteal phase was again high (39 ± 6 , n=6). Inhibin levels were significantly different between right and left ovarian vein blood at both late follicular and late luteal phases. About 50% of inhibin in peripheral vein blood were less than detectable level. Estradiol, progesterone and gonadotropin levels in peripheral and ovarian vein blood showed typical patterns as reported previously. Inhibin levels were higher in the ovarian vein blood which possessed higher estradiol contents than the other.

These data demonstrate the first observation of inhibin in human vein blood throughout the menstrual cycle and may suggest that inhibin is secreted by the human ovarian follicle into the ovarian vein blood. Inhibin as well as estrogen may exert their actions on the pituitary to suppress FSH secretion in women. Thus it is suggested that inhibin may play an important role in the human female reproduction.

(受付: 昭和61年7月25日特掲)

透過電顕を用いた透明帯除去ハムスター卵への ヒト精子進入過程の観察

Ultrastructural Observations of the Process of Human Sperm Penetration into the Zona-free Hamster Eggs

東邦大学医学部第2産婦人科学教室 (主任 木下 佐教授)

川 村 良

Makoto KAWAMURA

2nd Department of Obstetrics and Gynecology, Toho University,
School of Medicine, Tokyo, Japan

(Director: Tasuku Kinoshita)

透過電顕により透明帯除去ハムスター卵へのヒト精子進入過程を観察し興味ある知見を得た。

1. 精子-卵間の膜融合は精子赤道節にはじまり、その後卵細胞質突起が延びて後帽部を被う。精子 chromatin の拡散は赤道節に近い後帽部に始まり、先体部より後も帽部で早期に完了する。
2. 赤道節膜融合部には desmosome 様構造が認められ、この部は精子 chromatin の拡散がすべて終了するまで消失しない。
3. 内先体膜は先体部 chromatin の拡散にともない傘状に拡がりつつ卵内部へ陥入し、赤道節でこれと連続する卵細胞膜とともに陥凹部内面を被う。陥凹部はやがて閉鎖された小胞となり、両膜の融合により消失する。
4. 精子 middle-piece より放出された mitochondria が卵細胞質内のみならず、精子 chromatin の拡散領域内にも認められた。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 48-54, 1987)

緒 言

1976年、柳町ら¹⁾は、先体反応完了ヒト精子が透明帯除去ハムスター卵に進入して、雄性前核形成にまで至ることを報告した。これは現在ハムスターテストとして精子の受精能評価のために広く利用されているが^{2,3)}、同時に受精現象の形態的研究のための実験系としても用いられており、ヒトについても少数ではあるが、すでに走査電顕⁴⁾あるいは透過電顕⁵⁾による精子-卵初期膜融合過程の観察が行われている。しかしながら、本実験系における精子頭部の膨化過程が必ずしも一様でなく、非生理的と思われるものがかなり見られることは、生標本についての光顕レベルでの観察で川村ら⁶⁾が指摘しており、Aitken ら⁷⁾も運動性のない精子でも膨化現象が起こりうることを報告している。受精現象のある一断面を捉えているに過ぎない電顕的観察においては、それが果して

正常な受精過程にあるものか否かの判定が一つの重要な問題であると考えられる。

一方1984年、永江ら⁸⁾は位相差顕微鏡およびノマルスキー微分干渉顕微鏡を用いてヒト精子の透明帯除去ハムスター卵への進入過程を連続観察することにより、この実験系における最も普遍的かつ正常と思われる精子頭部の変化を明らかにしている(図1)。今回はこの光顕所見との対比のもとに透過電顕による精子-卵融合過程の観察を行い、若干の興味ある知見を得たので報告する。

実験方法

卵および精子の培養液としては、すべてヒト血清アルブミン (SIGMA) を添加した mBWW 液⁹⁾を使用した。

透明帯除去ハムスター卵の作製は柳町ら¹⁾に準じて行った。

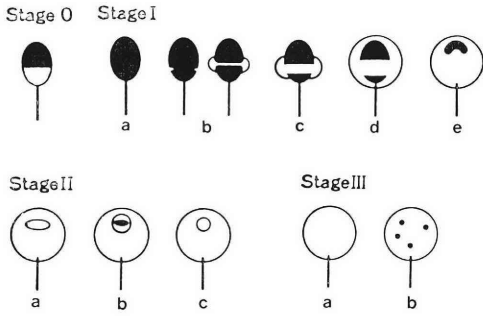


図 1 ヒト精子頭部膨化過程模式図(永江⁸⁾, 改変)

- Stage 0 : 卵接着前精子
- Stage I a : 後帽部の黒化
- I b : 後帽部の陥凹, halo 構造出現
- I c, I d : halo 構造の拡大
- I e : 後帽部の消失
- Stage II a : 楕円輪状構造の出現
- II b : 線状隆起, 周辺輪状構造の形成
- II c : 線状隆起の消失
- Stage III a : 頭部膨化の完了
- III b : 核小体の出現

精液は妊孕性の明らかな健康成人男子より用手法により採取し, 室温にて充分液化させたのち mBWW 液を用いて精液静置法¹⁰⁾を行った. その上清を300g, 5分間遠沈することにより得られた運動良好精子に mBWW 液を加え, さらに最終濃度50 μ M になるようにカルモデュリン阻害剤 W-7 (生化学工業)を添加して精子先体反応を誘起した⁸⁾. W-7 を除去後, 精子浮遊液に透明帯除去卵を加え, 37°C, 5% CO₂ in air で30~60分間培養した.

培養後の卵は2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.3) にて前固定し, 洗浄後, 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.3) にて後固定を行った. アルコール上昇脱水系列にて脱水後, propylene oxide にて置換し, Epon 812 にて包埋した. 電顕切片は Sorvall MT 5000 にて作製し, 酢酸ウラニール, クエン酸鉛にて染色後, 観察には HITACHI H-300型透過型電子顕微鏡を用いた.

結 果

1. 精子-卵の initial contact

卵周辺には先体反応完了あるいは反応進行中の精子が多数認められる(図2). その大部分のものは先体を先にして卵表面に対し垂直ないし斜めの位置をとり, 内先体膜で卵の microvilli と接触しているが, 後帽部との microvilli 接触はほとんど見られない. これに対し, 少

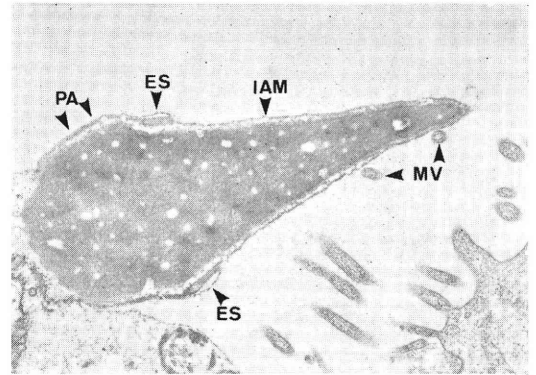


図 2 卵周辺部精子: 赤道節 (ES) を残して既に先体反応は完了し, 内先体膜 (IAM) が露出している. 卵 microvilli (MV) の接触は内先体膜にのみ見られ後帽部 (PA) には見られない. $\times 22,000$

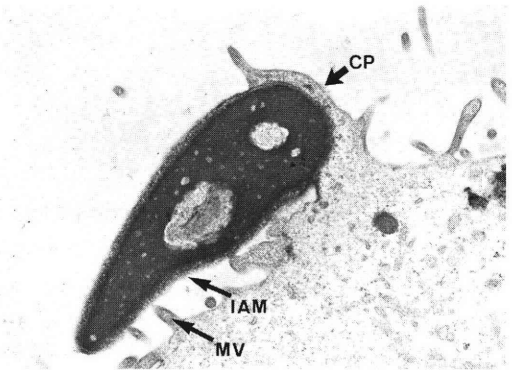


図 3 卵表面付着精子: 後帽部領域を被うように卵細胞質突起 (CP) が観察される. その一部の膜構造は不鮮明となり, chromatin 拡散開始直前のように思われる. 内先体膜 (IAM) と卵 microvilli (MV) の接触も認められるが, 卵細胞質突起は観察されない. $\times 19,000$

数の精子は卵表面とほぼ平行に位置し, 先体部のみならず後帽部にも卵 microvilli との接触が多く見られる. このような精子の一部ではさらに卵細胞質が赤道節より後帽部を被うように突起状に膨出している像が観察される(図3).

光顕連続観察では, 頭部膨化に先立つて卵に接する後帽部が光沢を失い黒化してくるが, 電顕所見における卵細胞質の後帽部被覆はこれに対応する変化と考えられる.

2. 膜融合および chromatin 拡散の開始

赤道節は突起状に膨出してきた卵細胞質に被われ, この部位では早期に膜融合を認める. この時, 同部位には desmosome-like structure がみられるが, これはかなり

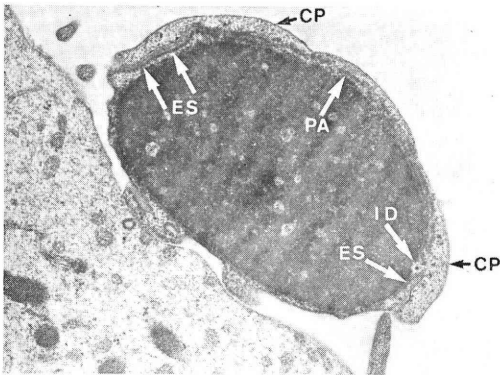


図4 卵との膜融合後の赤道節(ES)における横断面:赤道節および後帽部(PA)は卵細胞質突起(CP)に被われ、また赤道節の部位には desmosome-like structure が観察される。その直後には一部 chromatin の拡散している所が認められる(ID)。
×25,000

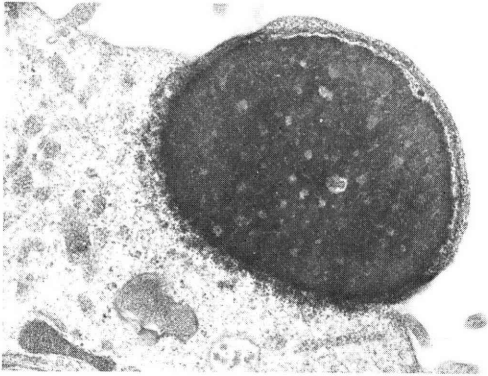


図5 図4と同一精子の後帽部横断面:卵に附着している側の精子細胞膜、核膜はすでに消失し、chromatin の拡散が開始している。
×34,000

chromatin の拡散がすすんだ段階でも認められ、赤道節の位置を確認するのに良い示標となる。また赤道節の直後には一部 chromatin の拡散している所が認められる(図4)。さらに後帽部では次第に膜構造が不明瞭となつて chromatin が細胞質内へ拡散していき(図5)、この拡散は次第に卵細胞質内に広がっていく organelle free area として認められる。

光顕連続観察では後帽部黒化に引きつづき、後帽部の前1/3あたりから細胞質内へ明るい領域(halo 構造)が広がって行くが、電顕による赤道節直後からの chromatin 拡散開始はこれに対応する所見としてよいであろう。

3. 先体部 chromatin の拡散および精子-卵融合の完了

後帽部 chromatin の拡散が開始した段階の精子では、

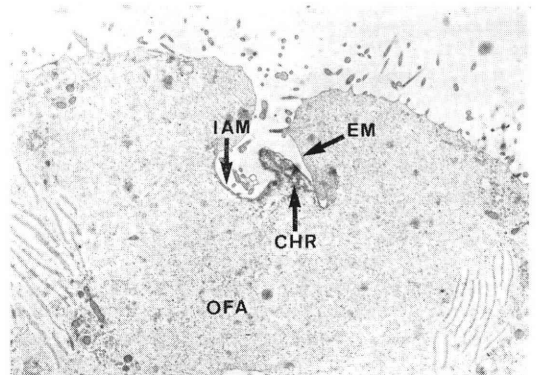


図6 精子先体部の陥入:底面に小突起状の先体部先端を有する陥凹形成と先体部 chromatin がほとんど拡散し、広い organelle free area(OFA)が観察される。
×5,000

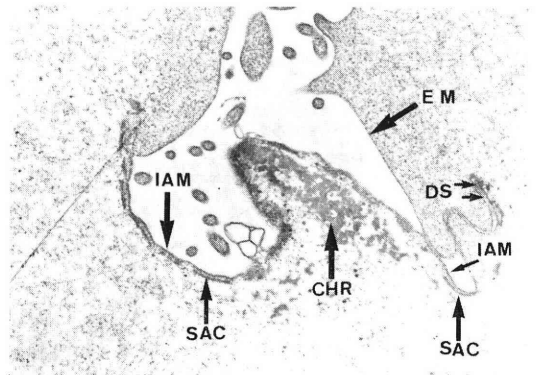


図7 図6の連続切片:陥入部底面の膜は、膜直下の subacrosomal component(SAC)の存在から内先体膜(IAM)であることがわかる。精子赤道節の部位にはなお desmosome-like structure(DS)が認められ、それによつて卵細胞膜(EM)と内先体膜が明瞭に区別できる。
×20,000

先体部はなお卵表面に突出した形をとっている。後帽部 chromatin がすべて拡散し、先体部 chromatin の拡散がはじまっているものでは、内先体膜が丁度傘を開くような形で広がるとともに、精子頭部全体が内方へ向つて陥入し、著明に拡大した organelle free area 内にポケット状の陥凹が形成されている。陥凹部の底面は内先体膜で、中央に先体部先端が小突起として残り、内先体膜の辺縁は赤道節において卵形質膜と連続している。赤道節には、この時期においてもなお、desmosome-like structure が認められる(図6, 7)。先体部 chromatin もすべて拡散した段階では、陥凹部はこれを被う卵形質膜の癒合によつて閉鎖されて小胞状となり、広い organelle free area 内に残るが、やがて内面の卵形質膜と

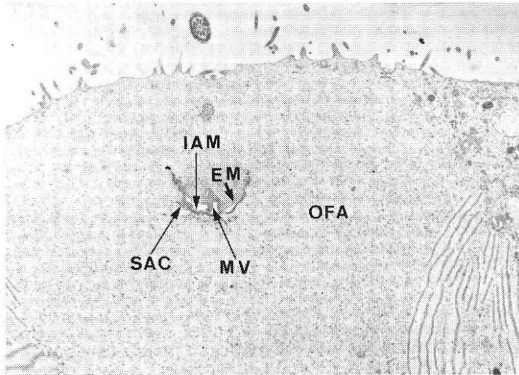


図 8 先体部 chromatin の拡散が完了した時期には, organelle free area (OFA) に内先体膜 (IAM) と卵細胞膜 (EM) とによって囲まれた間隙が認められる. 内先体膜側には subacrosomal component (SAC), 卵細胞膜側には microvilli (MV) が観察される. ×5,000

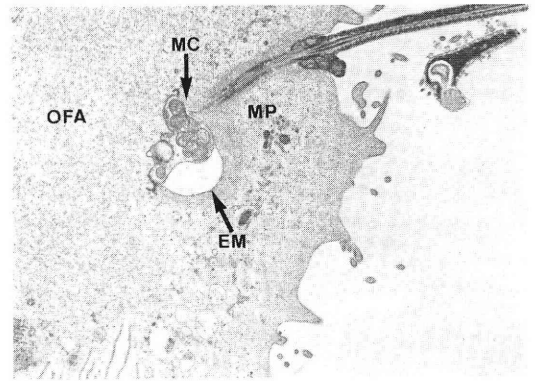


図10 middle-piece (MP) と mitochondria (MC) : 卵細胞質と organelle free area (OFA) の境界部には middle-piece の mitochondria を認める. それに接する小胞は卵細胞質突起と middle-piece の間に生じた空隙の一部であろう. ×6,000

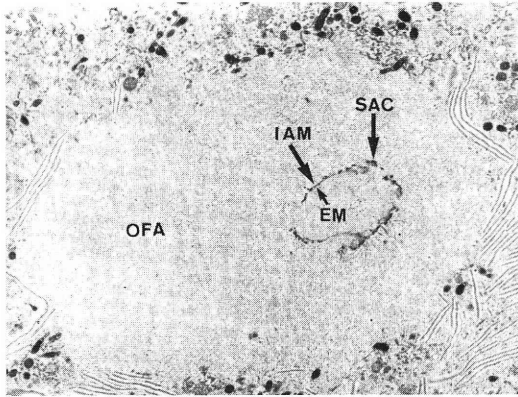


図 9 図 8 と同時期における陥入方向に対する横断面: 輪状の2重膜構造が organelle free area (OFA) に偏在して見られる. 外側には subacrosomal component (SAC) が認められることにより, 外側の膜は内先体膜 (IAM), 内側の膜は卵細胞膜 (EM) であることがわかる. ×5,000

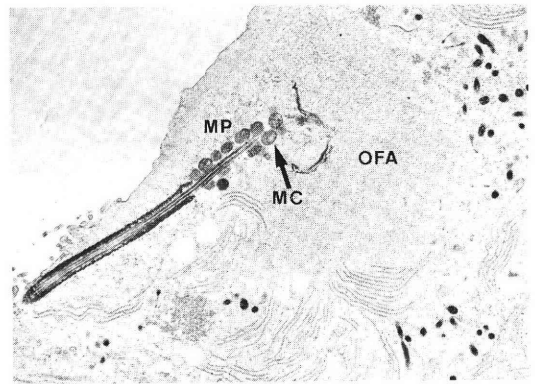


図11 Organelle free area (OFA) 内にみられる middle-piece の mitochondria ×5,000

内先体膜が融合することにより消失する (図 8, 9).

光顕連続観察によると, 後帽部の膨化後残された精子頭部遺残部は一旦楕円輪状構造をとった後, 一本の線状隆起となり, ついで速に消失するが, 線状隆起の周辺には新たに輪状の陥凹を生じており, これは頭部消失後もしばらく認められる. 今回の電顕観察では光顕の楕円輪状構造に該当する所見は見られなかったが, 図 6, 7 はほぼ線状隆起構造出現時の光顕所見に相当するものと考えられる.

4. middle-piece の変化

後帽部 chromatin 拡散の比較的初期の段階において, 卵細胞質内に進入した middle-piece は境界が不鮮明となり, その近くには卵および middle-piece の細胞質膜間に形成された小空間の一部かと思われる小胞が認められた(図10). また middle-piece 内部の mitochondria は organelle free area 内に放出されている像が観察された (図11).

考 察

各種哺乳動物の精子が透明帯除去ハムスター卵に進入し得ることを利用した受精現象の研究はすでに数多く見られるが^{11,12)}, 光顕を用いた観察¹³⁾でも多くは固定, 染色した標本について行われており, とくにヒト精子に関して生標本での観察を行つているのは永江ら⁸⁾の報告の

みである。すなわち永江らはカルモデュリン阻害剤 W-7 で先体反応を誘起したヒト精子と透明帯除去ハムスター卵を混合培養後、卵をスライドガラス上にてカバーガラスで圧迫し、位相差顕微鏡およびノマルスキー微分干涉顕微鏡を用いて連続的に観察しているが、現在の所、これがこの実験系におけるもつとも普遍的なヒト精子頭膨化の過程を示すものと考えられる(図1)。今回はこの光顕所見と対比しつつ透過電顕による観察を行ったのであるが、永江らの示す如く、ヒト精子頭膨化の全過程が10分前後という短時間であることもあつて、光顕観察でのすべての stage に対応する所見を得ることは出来なかつた。しかしながら卵細胞質突起による後帽部の被覆、赤道節に近い後帽部からの chromatin 拡散開始、chromatin 拡散の進行に伴う organelle free area の拡大、底面に先体部先端の小突起を有するポケット状陥凹の形成などは、それぞれに対応する光顕所見が見られるものであり、今回電顕にて観察された精子頭部的変化はほぼこの実験系における一般的なヒト精子の卵進入過程を示すものと考えてよいであろう。

精子と卵との initial contact について、Shalgi ら¹⁴⁾ はハムスターの生体内受精卵の観察から精子赤道節と卵表面の microvilli の間に生ずるとしている。今回の観察では、精子は先体部を先にして斜めないしは垂直に卵に近づき、まず内先体膜と卵 microvilli が接触するが、その後赤道節あるいは後帽部と microvilli の接着が起り、精子は卵表面に対しほぼ水平の位置をとる。そして膜融合による精子と卵の有機結合が起るのはおそらく赤道節と思われる所見が得られた。これは同じくヒト精子と透明帯除去ハムスター卵を用いた Koehler ら¹⁷⁾、Talbot ら⁵⁾、対木ら⁴⁾ の報告とほぼ一致するものである。Koehler ら¹⁷⁾ は Shalgi ら¹⁴⁾ の所見との相違はおそらく透明帯の有無によるものであり、透明帯の存在する場合には狭い perivitelline space が精子の垂直方向での卵への接触を妨げるのであろうと述べている。

赤道節における膜融合部に認められた desmosome-like structure に関しては、Barros ら¹⁶⁾ がハムスターにおいて同様の構造を観察しているが、ヒト精子についての報告はない。このものは精子 chromatin がすべて拡散し、精子頭部的構造が完全に消失する最後の段階まで存在しており、赤道節の位置を確認する上で極めて有用な所見であつた。

最初に卵表面に接する赤道節の部分において精子と卵の膜融合が起つたのちは、精子が卵内に陥入するというより、卵細胞質の一部が膨出するような形で後帽部を包みこみ、後帽部細胞質膜と卵細胞質膜が順次接触、融合して行くものと思われる。この卵細胞質の膨出は赤道節を

越えては膜融合しないため、精子先体部はなおしばらく卵表面に突出した状態を保つ。後帽部において融合した精子と卵の細胞質膜、および精子核膜は、赤道節後方の部分より次第に融解、消失して行き、それに伴つて chromatin の卵細胞質内拡散がはじまる。Talbot ら⁵⁾ は先体部 chromatin の方が後帽部 chromatin より急速に拡散するとしているが、今回の観察では後帽部 chromatin の拡散が明らかに早期に完了するものと思われる。chromatin 拡散部は Talbot らのいう organelle free area として卵細胞質内に拡がって行くが、これは永江ら⁸⁾ の光顕所見による halo 構造と一致するものとしてよいであろう。

精子先体部的変化に関しては、Bedford¹⁷⁾ はウサギ卵管内受精卵を用いた研究から、先体部は卵表面の細胞膜とともに卵細胞質内に引き入れられ、内先体膜と卵細胞膜に囲まれた小胞が形成されると述べているが、今回の観察によると、この先体部の陥入には赤道節がある程度積極的に関与しているのではないかと思われる。すなわち organelle free area 内に見られるポケット状陥凹の底面をなす内先体膜は単純に卵表面から引きこまれたという形ではなく、傘状に、あるいはむしろ内反状に拡がっているが、これは赤道節が周辺に向つて輪状に拡大して行くことによつて卵表面に突出していた先体部が次第に高さを減じつつ内方へ陥入して来ることを意味するものであろう。赤道節がそのような動きをするメカニズム、あるいはこれがヒト精子に特徴的な現象であるか否かについてはなお検討の余地があるが、極めて興味ある所見と考えられた。

受精時には通常精子頭部のみならず尾部も卵内部に進入するものであり、卵細胞質内にはしばしば middle piece の mitochondria が認められている^{18), 19)}。Szollosi²⁰⁾ は第1分割時のラット受精卵では細胞質中に明確な middle-piece, mitochondria が見られるが、これは2細胞期から4細胞期にかけて次第に膨化、崩壊、消失し、胎芽内の mitochondria は結局卵由来のもののみになると述べている。今回の観察では卵細胞質内のみでなく、明らかに organelle free area つまり精子 chromatin の拡散領域と思われる部位に middle-piece の mitochondria が見られた。これは middle-piece が後帽部とともに卵細胞質突起に被われ、後帽部からの chromatin がその周囲にも拡散すると考えれば当然のこととも思われるが、現在までに全く報告を見ない所見であり、この mitochondria が以後の前核形成の段階においてどう変化するのかを含めてさらに検討を要する問題であろう。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜った木下 佐教授、岩城 章教授、永江 毅助手、第 2 解剖学教室岡田詔子助教授に深く感謝いたします。また、電子顕微鏡、実験などに御協力いただいた大橋病院電顕室甘利雅雄助手に感謝いたします。

なお本論文の要旨の一部は、第 5 回国際精子シンポジウムにて発表した。

文 献

- 1) Yanagimachi, R., Yanagimachi, H. and Roger, B. J.: The use of zona-free ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 15 : 471, 1976.
- 2) Roger, B. J., Handa V. C. and Marilyn, V.: Analysis of human spermatozoal fertilizing ability using zona-free ova. *Fertil. Steril.*, 32 : 664, 1979.
- 3) Bela Z.-G., Luis B. and Don, P. W.: Zona-free hamster eggs and human sperm penetration capacity: A comparative study of proven fertile donors and infertility patients. *Fertil. Steril.*, 36 : 771, 1981.
- 4) 対木 章, 星 和彦, 斉藤 晃, 京野広一, 星合 晃, 鈴木雅洲, 堀内俊孝: 透明帯除去ハムスター卵子へのヒト精子の浸入機序—走査型電子顕微鏡による経時的観察—. *日産婦誌*, 35 : 1705, 1983.
- 5) Talbot, P. and Chacon, R. S.,: Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona pellucida-free hamster oocytes. *Fertil. Steril.*, 37 : 240, 1982.
- 6) 川村 良, 永江 毅, 勝目 宏, 武田 毅, 中込 才, 岩城 章, 木下 佐, 岡田詔子: ヒト精子と透明帯除去ハムスター卵の受精現象. *東邦医学会誌*, 32 : 214, 1985.
- 7) Aitken, R. J., Ross, A. and Lees, M. M.: Analysis of sperm function in Kartagener's syndrome. *Fertil. Steril.*, 40 : 696, 1983.
- 8) 永江 毅, 土肥保之, 岩城 章, 木下 佐, 岡田詔子: ヒト精子頭膨化現象 (光学顕微鏡を用いた連続観察). *哺乳卵研誌*, 1 : 143, 1984.
- 9) Biggers, J. D., Whitten, W. K. and Whittingham, D. G.: The culture of mouse embryos in vitro. In "Methods in Mammalian Embryology". (ed. J. C. Daniel), 86. San Francisco, Freeman, 1971.
- 10) 星 和彦, 長池文康, 桃野耕太郎, 対木 章, 斉藤 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. *日不妊会誌*, 28 : 101, 1983.
- 11) Barros, C. and Herrera, E.: Ultrastructural

observations of the incorporation of guinea-pig spermatozoa into zona-free hamster oocytes. *J. Reprod. Fert.*, 49 : 47, 1977.

- 12) Imai, H., Niwa, K. and Iritani, A.: Ultrastructural observations of boar spermatozoa penetrating zona-free hamster eggs. *Biol. Reprod.*, 23 : 481, 1980.
- 13) Barros, C. González, J., Herrera, E. and Bustos-Obregon, E.: Fertilizing capacity of human spermatozoa evaluated by actual penetration of foreign eggs. *Contraception*, 17 : 87, 1978.
- 14) Shalgi, H. R. and Phillips, H. D.: Mechanics of sperm entry in cycling hamster. *J. Ultrastruct. Res.*, 71 : 154, 1980.
- 15) Koehler, J. K., Decurtis, I., Stenchever, M. A., Smith, D.: Interaction of human sperm with zona-free hamster eggs: A freeze-fracture study. *Gamete. Res.*, 6 : 371, 1982.
- 16) Barros, C. and Franklin, L. E.: Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg. *J. Cell. Biol.*, 37 : 13, 1968.
- 17) Bedford, J. M.: An electron microscopic study of sperm penetration into the rabbit egg after natural mating. *Am. J. Ant.*, 133 : 213, 1972.
- 18) Yanagimachi, R.: Sperm-egg association in animals. *Curr. top. dev. Biol.*, 12 : 83, 1978.
- 19) Szollosi, D. and Hunter, R. H. F.: Ultrastructural aspects of fertilization in the domestic pig: sperm penetration and pronucleus formation. *Am. J. Ant.*, 116 : 181, 1973.
- 20) Szollosi, D.: The fate of sperm middle-piece mitochondria in the rat egg. *J. exp. Zool.*, 159 : 367, 1965.

Ultrastructural observations of the process of human sperm Penetration into the zona-free hamster eggs

Makoto Kawamura

2nd Department of Obstetrics and Gynecology,
Toho University, School of Medicine,
Tokyo, Japan
(Director: Tasuku Kinoshita)

In this study, it is shown ultrastructural observations of the process of human sperm penetration as compared to the sequential observations by means of phase-contrast microscope. Initial contact of sperm to the egg

took place at the acrosomal region which is covered by the inner acrosomal membrane. However, initial fusion site of sperm with the egg seems to be at the equatorial segment and/or the post acrosomal region. At this moment, desmosome-like structure appears in the equatorial segment. And this structure is a good indicator to distinguish the sperm membrane from the egg until sperm chromatin is completely dispersed. The chromatin decondensation of the post-acrosomal region is more rapidly completed than that of the acrosomal region into the egg. It is obvious because the initial dispersion of sperm chromatin takes place from the post-acrosomal region. The engulfment of the acrosomal region and the middle piece into the eggs are usually observed. The space between the inner acrosomal and the egg membranes is also observed

into the organelle-free area which will become male pronucleus. Both membranes fuse each others soon or later. A ring formation observed by phase-contrast microscope into the swollen sperm head seems to be the same structure as the membrane fusion between the inner acrosomal and the egg membranes in this moment. Mitochondria in the middle piece also seem to be involved in the organelle-free area.

Although human sperm chromatin decondensation seemed in some ways different from that of other mammals by phase-contrast microscope, these results suggest that the process of human sperm chromatin decondensation is similar to that of other mammals by electron microscopy, except a fate of mitochondria.

(受付：昭和61年9月17日)

IUD の作用機序に関する研究

IUD 装着子宮内膜組織の細胞核 DNA 量の検討からみた作用機序の考察

A Study on the Antifertility Effect of IUD

(Consideration of Its Antifertility Effect for the Quantitative Observation of Nuclear DNA in the Endometrial Tissue of the IUD-inserted Uterus)

東京慈恵会医科大学産婦人科学教室

関根 達 征 渡 辺 博

Tatsumasa SEKINE Hiroshi WATANABE

小室 順 義 伊 藤 治 英

Nobuyoshi KOMURO Haruhide ITO

Department of Obstetrics and Gynecology, The Jikei University School
of Medicine, Tokyo Japan

従来より IUD の作用機序は受精卵の着床障害にあり、それらについては多数の報告があるものの納得のいく説明がなされていない。そこで、我々はこれらの作用機序の解明の一手段として子宮内膜組織について細胞核 DNA の立場より検討を行った。検索対象は IUD 装着子宮内膜組織で対照として IUD 未装着の成熟婦人の子宮内膜組織を用いた。これらの検体について、Feulgen 染色後、schiff-combined DNA を MMSP を用いて測定した。その結果妊卵の着床に問題となる分泌期中期では、対照群の腺上皮細胞核 DNA の示す mode は diploid に位置するのに対し、IUD 装着症例の大半は hyper triploid と右方に偏位して認められ、 $M \pm SD$ も対照と比べ高値を示した。以上の結果より妊卵の着床障害の原因の一つとして、分泌期における旺盛な腺細胞の増殖状態が関与するものと考えられ、言いかえると形態と機能との間の違いが妊卵の着床を障害させているものと考えられる。

(Jap. J. Fert., Ster., 32(1), 55-59, 1987)

結 言

従来より IUD の作用機序は受精卵の着床障害にあると云われており、着床障害の理由について多数の報告があるにもかかわらず、十分な解明がなされていない。着床障害の理由についてこれまでの報告を要約すると、まず子宮運動亢進が原因となり着床が障害されるとするもの、または子宮内膜組織の形態学的変化により着床が障害されるとする報告、子宮内膜組織に於ける脱落膜形成不全により着床が障害されるとするものや、子宮内液の生化学的、細胞学的変化により着床が障害されるとするもの、非炎症性細胞浸潤あるいは phagocytosis などの子宮内の変化、すなわち異物に対する生体防衛機序のため等の種々の報告があるが、十分に納得のいく説明がなされていない、そこで我々はこの作用機序解明の一手段

として IUD 装着子宮内膜組織について細胞核 DNA の立場より検討を行った。

研究対象ならびに研究方法

検索対象は規則正しい周期で月経がくり返され、IUD 装置期間 6 カ月以上の症例で、IUD 交換時に搔爬により採取した子宮内膜組織または子宮筋腫等で剔出された子宮内膜組織を用いた。対照は IUD 未装置の健全と認められた子宮内膜組織を用いた。Table 1 は検索対象の症例の一覧である。各々の症例について最終月経初日より数えて採取した時期により表に示すごとく、増殖期後期、分泌期初期、分泌期中期に分類した。各々の症例数は対照症例 29 例、IUD 装置症例 31 例であった、これらの検体を採取後、直ちに酢酸アルコール液で 2 時間固定を行い、固定後の標本作製は法の如く paraffin 包埋後

Table 1 Number of cases

| Endometrial cycle | Control | IUD |
|--------------------------|---------|-----|
| Late proliferative phase | 10 | 10 |
| Early secretory phase | 10 | 10 |
| Late secretory phase | 9 | 11 |
| | 29 | 31 |

Table 2 Effect of IUD on the value of nucleic DNA in human endometrium

| Endometrial cycle | mode | M±SD |
|--------------------------|------------------------------|--------------------------|
| Late proliferative phase | hyper 3n (3n~hyper 3n) | 4.26±0.73 (4.51±0.94) |
| Early secretory phase | 2n~hyper 2n (2n~hyper 2n) | 2.42±0.70 (2.72±0.65) |
| Mid secretory phase | hyper 3n (2n) | 3.16±1.06 (2.21±0.70) |

() : Control

切片を作製, Feulgen 染色後 Schiff-Combined DNA を Olympus 製 M-MSP を用いて測定した. 測定細胞核数は腺上皮および間質細胞共に, 1 検体につき 100 個のについて測定を行った.

すなわち透過率をコンピューター内に in put し, 核 DNA 量の測定およびヒストグラムの作成を行った.

研究成績

Table 2, は IUD 装着群子宮内膜腺細胞と () は対照症例群の子宮内膜腺細胞核 DNA 量の測定成績の M±SD の平均値, およびその Mode である. まず両者の mode と M±SD をみると, 月経周期の増殖期後期と分泌期前期とでは月経周期による変化が認められるのみで, 両者の間には大きな差は認められなかった. しかし, 妊卵の着床に問題となる分泌期中期では, 対照例の腺細胞核 DNA の示す mode は 9 例とも 2n に位置しているのに対し, IUD 装着例では 11 例とも hyper 3n と右方に偏位して認められ, 当然ながら対照症例群の M±SD の平均値 2.21±0.70 と比べ, 3.16±1.06 と高値を示した.

以上の IUD 装着症例群と対照症例群の核 DNA 量の M±SD をまとめると図 1 に示すごとくである. すなわち, 両群の M±SD は増殖期後期, 分泌期初期では月経周期による変動を認めるのみで, 両者の間には差は認められない. しかし分泌期中期に於ては, IUD 装着症例群の M±SD の平均は対照群と比べ, 高値を示

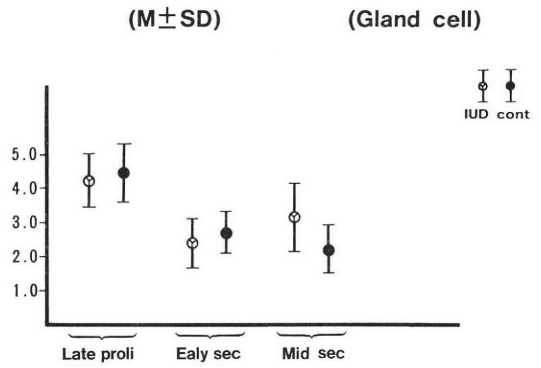


図 1 Result of nucleic DNA value of Endometrium

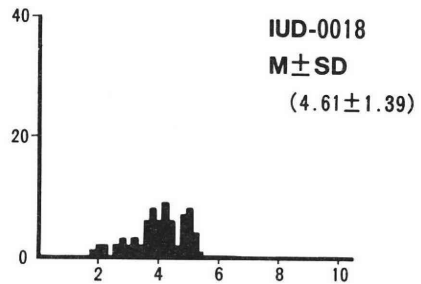
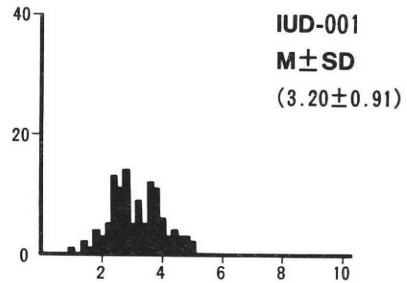
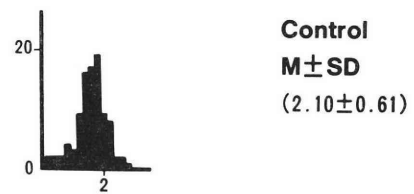


図 2 Histogram of cases of mid secretory phase

した.

次に実際の各々の症例について検討すると, 図 2 の上段は分泌期中期の対照例で, 中段および下段は同じ分泌期中期の IUD 装着症例の核 DNA の histogram および M±SD である. まず対照例の histogram の mode は 2n に認められるのに対し, IUD 装着 case NO-001,

Case NO-0018 の mode は 3n または 4n と右方に偏位して認められ、対照と比べ mode の位置に差のあることがわかり、また $M \pm SD$ も対照例の 2.10 ± 0.16 に対し、IUD 装着例では 3.20 ± 0.91 、 4.61 ± 1.39 とはるかに高値を示していた。すなわち、上段の対照例に比べ、中および下段の IUD 装着例ではむしろ正常月経周期の増殖期後期に類似する成績であると云える。

症例 0018 の病理組織学的所見は、明らかに分泌期後半の組織像を呈しているが、この症例の子宮内膜組織の腺細胞核 DNA の測定結果は図 2 の下段に示しているが、mode は 4n にあり、 $M \pm SD$ は 4.61 ± 1.39 と増殖期後期のそれに著しく類似している。なお間質細胞に於ても同様の検索を行ったが、腺細胞ほど著明でないが、ほぼ同じ傾向を認めた。

総括ならびに考案

IUD の避妊機序について、文献による考察を行い、次いで、我々の研究成績からみた IUD の着床障害の作用機序について考察を試みた。

Schiller (1925)¹⁾らは IUD の作用機序について子宮内膜に接している部分に機械的な損傷をひきおこし、その部分に脱落膜化を惹起するとのべており、これらの変化はラットを用いた動物実験に於て認められる Decidua のみならず、ヒト IUD 装置内膜に於ても認められると述べている。

Tamada (1967)²⁾、Wynn (1968)³⁾、Hall (1965)⁴⁾、Willson (1965)⁵⁾らは IUD が子宮内膜の一部を損傷すると考え、また IUD が子宮内膜間質の前脱落膜化変性を惹起させることを病理組織学的に証明している。すなわち IUD 挿入子宮内膜組織の約半数は、すでに排卵時に脱落膜化が起つており、しばしばコイル状血管の拡張と特徴的な脱落膜変化の存在を認めることが多い。

Hall (1965)⁴⁾らは IUD 装置子宮内膜において均一の Arias stella 現象が認められることを報告している。

Wynn (1967)⁶⁾ (1968) らは IUD 装着子宮内膜組織の電顕による観察の結果、早期の分泌性変化を示していることを認め、増殖期には腺上皮細胞に大きなミトコンドリアが出現すると述べている。

一方、Kwak (1965)⁷⁾らは IUD の取りまいてる周辺の広範囲の子宮内膜は影響を受けず、その組織像の変化は認められないと報告している。

Potts, Pearson (1967)⁸⁾らは IUD 装着子宮内膜組織の近接部位には多数のリンパ球の浸潤とプラズマ細胞を認め、また間質は fibrose になると述べており、また細菌を認めたことを報告している。

Borell (1966)⁹⁾らは IUD 装着子宮内膜に巨大細胞

を併った異物反応の存在を報告している。

Ober (1968)¹⁰⁾らは IUD 装着子宮内膜には少数であるが、腺と表層上皮の広範な扁平上皮化生を併った Cystic glandular Hyperplasia または Adenomatous Hyperplasia が発生すると報告している。同様に彼らは 1968 年、IUD 挿入後 57 カ月目に子宮内膜組織より Adenocarcinoma を発生した症例を報告している。

Ancla (1967)¹¹⁾らは IUD に接している子宮内膜間質組織の小血管に血小板の小血栓を認めたと報告している。

Kwak (1965)⁷⁾らは IUD 装着子宮内膜組織に於て組織化学的酵素反応、核酸、グリコーゲンの量に於て変化を認めなかつたと述べている。一方 Joshi¹²⁾らは、Baboon を使った C^{14} の子宮内膜への取り込みを調べたところ IUD 挿入側内膜が対照と比べ 3 倍も Radioactivity が高いことを報告し、この結果より IUD が子宮内膜組織を刺激し、巨細胞、大食細胞を増殖させるものと推察している。

以上の報告は IUD 装着子宮内膜組織における病理組織学的変化について検索を行い、種々の変化が妊卵の着床を障害すると推察しているが、我々の研究と類似する報告は、Ober, Joshi らの研究報告である。我々の研究成績をまとめると、IUD 装着子宮内膜腺細胞の核 DNA の測定成績は、増殖期後期、分泌期前期では月経周期による変動を認めるものの対照群との間には大きな差を認められなかつた、しかし、問題となる妊卵の着床期、すなわち分泌期中期に於ては IUD 装着症例群は対照群と比べ、 $M \pm SD$ ははるかに高値を示し、mode の右方移動も著明であつた。さらに IUD 装着症例の一部には腺細胞核 DNA の mode と $M \pm SD$ は分泌期中期であるのに増殖期後期とほぼ同じ成績を示している。すなわち子宮内膜の組織像は分泌期の変化を示しているにもかかわらず、その腺細胞の核 DNA は増殖期の値を示した。

今回、我々は IUD の作用機序解明の一手段として子宮内膜腺細胞の核 DNA の立場より検討を行ったが、従来より細胞核 DNA は細胞の分裂、増殖の中心的役割を果たすものであり、その量的変化は細胞の代謝活性の 1 つの指標となり得るものと考えられている。

IUD の作用機序について子宮内膜の増殖動態に関連した報告を挙げると、前に述べたごとく、Joshi らは baboon を使い、動物実験を行い、 C^{14} の内膜の取り込みを調べたところ、IUD 挿入側子宮内膜が対照と比べ 3 倍も radioactivity が高いことを報告しており、このことから IUD が子宮内膜を刺激し、巨細胞、大食細胞を増加させ、妊卵の着床障害を惹起するものと推論して

いる。またヒトにおいては、Ober らは IUD を挿入した子宮内膜に少数ではあるが、Cystic glandular または Adenomatous hyperplasia を発症したと報告しており、また 1 例ではあるが、IUD 挿入後 57 カ月後に Endometrial adenocarcinoma を発生した症例を報告している。以上の報告は IUD の作用機序の一つとして子宮内膜組織の増殖動態を亢進させることを示しており、我々の核 DNA の成績と合わせて考えてみると興味ある結果と思われる。

我々の研究の結果より、妊卵の着床時期とされている分泌期中期の子宮内膜腺細胞の核 DNA の増加が IUD 装着内膜に認められたが、IUD の着床障害の機序の一つとして、分泌期における旺盛な腺細胞の増殖状態が関与するものと考えられ、言い換えると、形態と機能との間のくい違いが着床を障害させているものと考えられた。

なお本稿の要旨は第 30 回日本不妊学会総会において発表した。

文 献

- 1) Schiller, W.: Über ektopische Dezidua ohne Schwangerschaft. Arch. Gynäk., 123: 219, 1925.
- 2) Tamada, T., et al.: Endometrial histology associated with an intrauterine contraceptive device. Amer. J. Obstet. Gynec., 98: 881, 1967.
- 3) Wynn, R. M.: Fine structural effects of intrauterine contraceptives on the human endometrium. Fertil. and Steril., 19: 867, 1968.
- 4) Hall, H. H., Sedlis, A., Chabon, I. and Stone, M. L.: Effect of intrauterine stainless steel rings on endometrial structure and function. Amer. J. Obstet. Gynec., 93: 1031, 1965.
- 5) Willson, J. R., Ledger, W. J. and Andros, G. J.: The effect of intrauterine contraceptive device on the histologic pattern of endometrium. Amer. J. Obstet. Gynec., 93: 802, 1965.
- 6) Wynn, R. M.: Intrauterine devices: effects on ultrastructure of human endometrium. Science, 156: 1508, 1967.
- 7) Kwak, H. M.: Studies on the effects of intra-uterine contraceptive device: with particular reference on the endometrial changes. Kor. J. Obstet. Gynec., 8: 253, 1965.
- 8) Potts, M. and Pearson, R. M.: A light and electron microscope study of cells in contact with intrauterine contraceptive de-

vices. J. Obstet. Gynec. Brit. Cwlth., 74: 129, 1967.

- 9) Borell, U.: Contraceptive method, their safety, efficacy and acceptability. Acta obstet. Gynec. scand., 45, Suppl. 1: 9-64, 1966.
- 10) Ober, W. B., et al.: Endometrial morphology and polyethylene intrauterine devices, A study of 200 endometrial biopsies. Obstet. and Gynec., 32: 782, 1968.
- 11) Ancla, M., et al.: Aneurysmal microthrombosis associated with intrauterine devices in the human endometrium. Lab. Invest., 17: 61, 1967.
- 12) Jushi, G., et al.: Effect of an intrauterine foreign body on in vivo incorporation of acetate-¹⁴C in to endometrial Macromolecules in baboons. Contraception, 3: 393-400, 1971.

A study on the antifertility effect of IUD

(consideration of its antifertility effect for the quantitative observation of nuclear DNA in the endometrial tissue of the IUD-inserted uterus)

**Tatsumasa Sekine, Hiroshi Watanabe,
Nobuyoshi Komuro and Haruhide Ito**

Department of Obstetrics and Gynecology,
The Jikei University School of
Medicine, Tokyo

The antifertility effect of IUD has so far been represented by preventing the embryo from implantation, and there are many reports there on indeed, but none of them can give satisfactory explanation there about. Therefore, with a view to elucidating the antifertility effect, we made an examination in quantitative observation of nuclear DNA in the endometrial tissue.

Materials for study were curettaged material of the uterus inserted with IUD for a period of time over 6 months or endometrial tissue removed for myoma uteri. Endometrial tissue of non-IUD-inserted uterus was used as the control. For these specimens, sliced sections were prepared, and after the Feulgen reaction Schiff-combined DNA was measured with an MMSP. The results revealed that in the late proliferative phase the mode shown by glandular epithelial cell nuclear DNA was situated at 3n-hyper 3n for the control group, while for the greater part of the IUD-inserted uterus group cell nu-

clear DNA showed almost same $M \pm SD$ and mode. In the Mid secretory phase the mode shown by glandular epithelial cell nuclear DNA was situated at $2n$ compared with hyper $3n$, i. e. shift to right for the greater part of the IUD-inserted group, with higher values of $M \pm SD$ than the control. The mode shown by the stromal cell DNA also showed a slight shift to right compared with the glandular epithelial

cell.

The above results suggested that a vigorous proliferative state of the glandular cell at the secretory phase was responsible partially for the implantation disturbance of the embryo, in other word, the discrepance between the morphology and the function made an obstacle to its implantation.

(受付 : 昭和61年3月19日)

ANTI-ZONA PELLUCIDA ACTIVITIES IN HUMAN SERA FROM WHO REFERENCE BANK FOR REPRODUCTIVE IMMUNOLOGY AS DETERMINED BY THE PASSIVE HEMAGGLUTINATION REACTION

Masaharu KAMADA, Hiroshi HASEBE, Minoru IRAHARA,
Tsuneo KINOSHITA, Osamu NAKA and Takahide MORI*

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Tokushima, School of Medicine,
Kuramoto, Tokushima 770 Japan

*Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyoto University,
Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

Abstract: The anti-zona pellucida activities in human sera from a WHO Reference Bank for Reproductive Immunology were measured in blind tests by the passive hemagglutination reaction (PHAR) with bovine erythrocytes sensitized with porcine zona substance as indicator cells.

A positive reaction was obtained with three (3.5%) of 85 serum samples from infertile women but with only two (0.9%) of 233 sera from control subjects. Although the difference in the % incidences of a positive reaction between the two groups was not significant, the % incidence in the infertile group tended to be higher than that in the control group, and no positive samples were found in 130 sera from males of different categories. Furthermore, the same results were obtained with 30 paired samples of sera.

In view of its sex specificity and reproducibility, PHAR seems to be useful for detection of anti-zona activities in human sera.

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 60-64, 1987)

Introduction

The zona pellucida has attracted much attention as a possible target of antigen for human immunocontraception since the first report by Shivers and Dunbar¹⁾ of the presence of autoantibodies in sera from infertile women as detected by indirect immunofluorescence (IF) with porcine zonae as targets.

The ready availability of large quantities of porcine zonae²⁾ has allowed development of a simplified method for detecting anti-zona pellucida activities in human sera by the passive hemagglutination reaction (PHAR)³⁾. In the present paper, we report studies on the anti-zona pellucida activities in clinically defined sera from the WHO Reference Bank for Reproductive Immunology by the PHAR

method.

Materials and Methods

Preparation of porcine zonae pellucidae

The procedures for preparation of purified zona substance from porcine ovaries reported previously²⁾ were used with the modification that Sephadex G-200 was replaced by Sephacryl S-200 for chromatographic separation. Briefly, frozen pig ovaries, purchased at a local slaughter house and kept at -20°C , were thawed and disrupted in an apparatus equipped with two multi-needle discs. Ova were recovered in a vessel placed under the lower disc together with follicular fluid and tissue debris which was completely removed by glass wool treatment⁴⁾ and then filtration through two sheets of saran net of different

pore sizes. The recovered oocytes were suspended in 20ml of phosphate buffered saline, pH 7.2 (PBS) and layered onto 30ml of 50% sucrose solution. After centrifugation at $1,600 \times g$ for 30 minutes, pure oocyte with intact zona were recovered in the interphase between the sucrose and PBS, resuspended in 10ml of PBS and homogenized gently. The homogenate was again centrifuged on 30ml of 50% sucrose solution at $1,600 \times g$ for 30 minutes and oocyte-free zonae at the bottom of the tube were lyophilized.

The lyophilized zona material was solubilized in 0.1M sodium borate buffer (pH 10.0) at 60°C for 1 hour⁵⁾ and the solution was centrifuged at $13,000 \times g$ for 1 hour at 4°C . The supernatant was concentrated through a membrane filter (Diaflo, Amicon, Lexington, Mass) and purified further on a Sephadex G-200 column ($2.6 \times 47.0\text{cm}$) that had been equilibrated with the solubilization buffer. The elution profile monitored by absorbancy at 280 nm showed a single peak. The peak fractions of eluate were collected, dialyzed against distilled water, lyophilized and stored at -20°C .

Sensitization of bovine red blood cells with purified zona substance

A method described previously was followed⁶⁾. Bovine red blood cells (BRBC) in Alsever's solution obtained commercially (Biotest, Tokyo, Japan) were washed 3 times with physiological saline, and then suspended in physiological saline at 5% (v/v). An aliquot of the cell suspension was incubated with an equal volume of 2.5% glutaraldehyde for 3 hours at room temperature with gentle shaking. The cells were washed 3 times with physiological saline, resuspended in physiological saline at a concentration of 5% (v/v), and incubated further with an equal volume of 0.01% tannic acid solution for 15 minutes at 37°C with shaking. The tanned cells were washed once with physiological saline, resuspended in physiological saline at 5% (v/v) and incubated with an equal volume of a solution containing $10\mu\text{g/ml}$ of purified porcine zona substance for 2 hours at room temperature with shaking. The sensitized cells were washed 3 times with physiological saline and suspended at 1.0% (v/v) in physiological saline containing 1.0% (w/v) bovine serum albumin (referred to as indicator cell suspension) for

use in the passive microhemagglutination test.

Microhemagglutination and indirect immunofluorescence (IF) tests

For the microhemagglutination test, human serum samples or rabbit antiserum to porcine zona were diluted serial two-fold with physiological saline and $25\mu\text{l}$ volumes of each dilution were introduced into the wells of a plastic microtiter plate (Falcon, Oxnard, CA). Then $25\mu\text{l}$ of the indicator cell suspension was added to each well with thorough mixing by shaking of the plate. The plate was then incubated at room temperature for 1 hour. Erythrocyte agglutination was judged visually and recoded as positive or negative. The titers of the anti-zona activities were expressed as the highest dilutions that gave positive hemagglutination.

For the IF, human follicular ova were incubated for 30 minutes at room temperature with the test sera, then washed seven to ten times with 0.01M phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, and incubated further for 30 minutes with the F(ab')₂ fragment of rabbit antiserum to human immunoglobulin G, M and A, and heavy and light chains labelled with fluorescent isothiocyanate (Cappel, Cochranville, PA). The ova were again washed seven to ten times with PBS and examined under a fluorescence microscope (Olympus BHS-RF-A, Tokyo, Japan).

Serum samples

A total of 348 clinically defined sera was provided from the WHO Reference Bank for Reproductive Immunology. For evaluation of the reliability and specificity of the detection method, we carried out tests in a blind manner without information on the categories of the sera and of the total samples 30 paired serum samples were mixed. We sent the data obtained by the blind tests to WHO for decoding the overall results. Table 1 shows the categories and numbers of sera collected in the WHO Reference Bank for Reproductive Immunology and supplied to our laboratory.

Results and Discussion

The overall results of tests of the different categories of sera provided from the WHO Bank at Aarhus for anti-zona activities are summarized in Table 2. Anti-zona activities

Table 1 Categories and numbers of clinically defined sera from WHO Reference Bank for Reproductive Immunology

| Category | Description | Number of sera |
|----------|--------------------------------------|----------------|
| 1 | Fertile females | 22 |
| 2 | Fertile males | 26 |
| 3 | Females with unexplained sterility | 83 |
| 4 | Males with unexplained sterility | 81 |
| 5 | Pregnant females | 35 |
| 6 | Postpartum females | 16 |
| 7 | Post-abortion females | 0 |
| 8 | Females with recurrent abortions | 10 |
| 9 | Virgins | 12 |
| 10 | Post-menopausal females | 7 |
| 11 | Females with primary amenorrhea | 2 |
| 12 | Females with genital aplasia | 0 |
| 13 | Auto-immune ovarian failure | 1 |
| 14 | Vasectomized males | 15 |
| 15 | Males with congenital absence of vas | 3 |
| 16 | Males with aspermatogenesis | 5 |
| Total | | 318 |

Table 2 Incidences of anti-zona pellucida activities in different categories of sera provided from WHO Reference Bank as measured by the passive hemagglutination reaction

| Clinical diagnosis | No. of serum samples tested | No. of positive reactions | % of positive reactions |
|--------------------|-----------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Infertile women | | | |
| Unexplained | 83 | 2 | 2.4 |
| Anovulation | 2 | 1 | 50.0 |
| Total | 85 | 3 | 3.5 |
| Control subjects | | | |
| Fertile females | 22 | 0 | 0 |
| Pregnant women | 35 | 1 | 2.9 |
| Postpartum | 16 | 1 | 6.3 |
| Other females | 30 | 0 | 0 |
| Men | 130 | 0 | 0 |
| Total | 233 | 2 | 0.9 |

were detected by the PHAR with bovine red blood cells coated with purified porcine zona substance as indicator cells.

As shown in the Table 2, a positive reaction was obtained with three (3.5%) of the 85 serum samples from infertile women, and two (0.9%) of the 233 serum samples from control subjects. Although the difference in the % incidences of a positive reaction in the two groups was not significant

($P=0.11$), the % incidence in the infertile group tended to be higher than that in the control group, consistent with the results reported by others⁹⁾. In our recent study on a separate group of control sera⁹⁾, the incidence of a positive reaction was 1.1% (1 of 90 samples), which was comparable with that observed with the present Bank Sera. It seems encouraging with respect to the specificity of the reaction that no positive

reactions were obtained with sera from males of different categories. Furthermore, the results in tests of 30 paired sera showed no discrepancies with those on the respective sera separately.

Considering the principle of the present method, the sera giving a positive PHAR should be tested for the presence of anti-zona autoantibodies by IF test with human zonae. According to our studies³⁾, four of eight serum samples from infertile women gave a positive IF reaction with human zonae, indicating some discrepancy between the PHAR and IF test on human zonae. However, recently we found that sperm penetration across the human zona *in vitro* was blocked or suppressed by exposure of matured human ova to sera giving a positive IF reaction on human zonae. The blocking effects of these human autoantibodies on fertilization may be caused by their binding to the human zona proper antigen (s), which presumably constitutes or is related to sperm receptor sites of the human zona surface⁷⁾. None of the five PHAR-positive serum samples (three from infertile women and two from control subjects) gave a positive IF reaction on human zonae in the present study.

Although false-positive reactions may be inevitable in the PHAR, another possibility is that the antibodies to human zona proper antigen (S) are destroyed or denatured during storage, because their titer in the circulation is quite low.

Acknowledgement

This work was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (No 58480340 and 59480333) from the Ministry of Education, Science and Culture of Japan.

Tables in this manuscript were reproduced with permission from van Charidorp, Rights and Permissions, Elsevier Science Publishers B. V., 1986⁹⁾.

References

- 1) Shivers, C. A. and Dunbar, B. S. : Autoantibodies to zona pellucida : a possible cause for infertility in women. *Science*, 197 : 1082, 1977.
- 2) Noda, Y., Mori, T., Takai, I., Kohda, H. and Nishimura, T. : A new method for preparation of pure zonae pellucidae in large quantities from porcine ovaries. *J. Reprod.*

Immunol., 3 : 147, 1981.

- 3) Kamada, M., Hasebe, H., Irahara, M., Kinoshita, T., Naka, O. and Mori, T. : Detection of anti-zona pellucida activities in human sera by the passive hemagglutination reaction. *Fertil. Steril.*, 41 : 901, 1984.
- 4) Oikawa, T. : A simple method for the isolation of a large number of ova from pig ovaries. *Gamete Res.*, 1 : 265, 1978.
- 5) Dunbar, B. S., Wardrip, N. J. and Hedrich, J. L. : Isolation, chemical properties and macromolecular composition of zona pellucida from porcine oocytes. *Biochemistry*, 19 : 356, 1982.
- 6) Dakhno, F. V., Hjort, T. and Grischenko, V. I. : Evaluation of immunofluorescence on pig zona pellucida for detection of anti-zona antibodies in human sera. *J. Reprod. Immunol.*, 2 : 281, 1980.
- 7) Mori, T., Noda, Y., Kanzaki, H., Irahara, M., Kamada, M., Mori, Ts. and Kano, K. : Antibodies in pregnancy and fertilization. In *Antibodies, Protective, Destructive and Regulatory Role*, Edited by F. Milgrom and J. F. Mohn : p. 382, Basel, S. Karger AG, 1985.
- 8) Nishimoto, T., Mori, T., Yamada, I. and Nishimura, T. : Autoantibodies to the zona pellucida in infertile and aged women. *Fertil. Steril.*, 34 : 552, 1980.
- 9) Proceeding of Workshop of Clinically Defined Sera from WHO Reference Bank for Reproductive Immunology. Edited by T. Mori and T. Hjort, Amsterdam, Elsevier Science Publishers B. V., in preparation.

受身赤血球凝集反応法を用いた抗透明帯抗体の検出

—WHO Reference Bank Sera for Reproductive Immunology についての検討—

徳島大学医学部産婦人科
鎌田正晴, 長谷部宏, 奇原 稔
木下恒夫, 奈賀 脩
京都大学医学部産婦人科
森 崇英

世界保健機構 (WHO) は免疫学的避妊法の標的抗原の検索を目的として、臨床記録の明瞭な血清を世界中から集め、WHO Reference Bank for Reproductive Immunology を設立している。今回われわれは、受身赤血球凝集反応法 (PHAR) を用いて、上記血清中の抗透明帯活性を検討する機会を得た。血清は 348 検体で、男女正常者、男女不妊患者、妊婦、未婚女性等 16 のカテゴリーに分けられており、30 例の同一検体も含まれている

が、実験者には知らされずに全てブラインドで行なわれた。その成績は WHO に送られ、そこで解析された結果、陽性例は対照群 233 例中 2 例 (0.9%) であったのに対し、不妊婦人群では 85 例中 3 例 (3.5%) と高率であった。さらに対照群中 130 例の男性血清が全て陰性で

あつたこと、ならびに 30 例の同一検体が全て同値を示したことから、PHAR 法の特異性、再現性が確認され、血清中の抗透明帯抗体のスクリーニング法として有用であることが認められた。

(受付: 昭和 61 年 4 月 1 日)

Natural Family Planning (NFP) の各種技法 (受精期自己認知法) 利用の現状

The Present State of Utilization of NFP Techniques
(Fertility Awareness Methods)

大田原赤十字病院

村山茂 橋本透 斉藤達郎
Shigeru MURAYAMA Toru HASHIMOTO Tatsuro SAITO
Ohtawara Redcross Hospital

練馬総合病院

清水謙一 斉藤和明
Kenichi SHIMIZU Kazuaki SAITO
野澤孝 隅田能文
Takashi NOZAWA Yoshibumi SUDA
Nerimasōgo Hospital

排卵を自覚的に判定する方法としては、粘液法、排卵痛、月経前乳房の腫脹などがある。

また自ら測定観察する方法としては、基礎体温、荻野式等がある。①荻野式：408例（以下例数同じ）の中で、聞いたことありは79%、全く知らない15%、無記入7%であったが、実際に正しく行っている者は非常に少なかった。②基礎体温：行ったことがありは58%と多い。なし40%、無記入2%であった。

継続して記入している者は殆んど見られなかった。③粘液の自覚：無記入が61%と多数あり、本法に対する関心の薄いことを示している。この症例を除外すると外陰部の変化、特に湿った感じに気附いていた者は65%あった。④月経前の乳房腫脹：あり47%、なし46%、無記入7%であった。⑤中間痛：あり37%、なし52%、無記入11%であった。また、あり37%の中ではつきり感ずる者が6%にみられた。⑥今後のNFP実施への意向は行ってみたい27%、実施出来そうにない8%、未定46%、無記入19%で実施を希望する者の方が然らざる者より遥かに多かった。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 65-71, 1987)

緒言

Natural Family Planning (NFP) とは、月経周期中の受胎期、不妊期を自ら判定して家族計画を行うことを云う。自分で判定する方法としては、「排卵並に受精期の自己認知法（予知と確認法）」を用いる。この中には排卵ならびに受精期の自覚徴候（自然に分る徴候）と、体温測定などのように自分で行うことによつて判定する方法とがある。総括するとオギノ式、基礎体温、粘液法、中間痛、乳房の腫脹などと、その併用である。NFP に対して興味もたれるようになってきたのはここ10年来の

ことであるが、その理由は、第一に従来の避妊法に不満や副作用、危険性のあること、第2に宗教的、文化的な理由から性行為にくすりや器具を使いたがらない人々がいること、そして第3にNFPを行う手法に新しい技術が導入され、その基礎的な研究、客観的な記載法が行われるようになったことである。我々は今回NFPの各種技法の利用度について調査を行ったのでその一部を報告する。

調査方法

大田原赤十字病院ならびに練馬総合病院に於て入院分

娩後に家族計画指導を行った際、質問表に記入せしめたものを集計した。総計は3000例を越えたが、今回はコンピュータ処理を終った昭和59年6月から12月迄の症例408例について報告する。

成 績

1. 症例の年齢分布：成績は表1の如くである。即ち、有効例379例の mean 28.0±0.2歳, mode 25.0±4.2歳である。25歳から30歳迄の症例が最も多い。全国年齢分布統計に比し、31~34歳の者がやや少ない、35歳以上は更に少ない。

2. オギノ式の認識度：成績は表2の如くである。記

表 1 症例の年齢分布

| 年 齢 | 例 数 | 比 率 |
|-----|-----|-------|
| 18 | 1 | 0.2 |
| 19 | 4 | 1.0 |
| 20 | 4 | 1.0 |
| 21 | 10 | 2.5 |
| 22 | 5 | 1.2 |
| 23 | 21 | 5.1 |
| 24 | 23 | 5.6 |
| 25 | 44 | 10.8 |
| 26 | 38 | 9.3 |
| 27 | 30 | 7.4 |
| 28 | 39 | 9.6 |
| 29 | 34 | 8.3 |
| 30 | 31 | 7.6 |
| 31 | 22 | 5.4 |
| 32 | 18 | 4.4 |
| 33 | 10 | 2.5 |
| 34 | 16 | 3.9 |
| 35 | 7 | 1.7 |
| 36 | 7 | 1.7 |
| 37 | 9 | 2.2 |
| 38 | 0 | 0 |
| 39 | 2 | 0.5 |
| 40 | 3 | 0.7 |
| 41 | 0 | 0 |
| 42 | 0 | 0 |
| 43 | 1 | 0.2 |
| 不詳 | 29 | 7.1 |
| | 408 | 100.0 |

Valid cases 379
 missing cases 29
 mean=28.0±0.2
 mode=25.0±4.2
 ◦25歳から30歳の症例が多い

入なしは6.9%と少ない、これを除くと85%が一応オギノ式を聞いたことがあり、オギノ式の認知は可成り行き亙つていると云える。然し反面、オギノ式の意味するところを理解していない者も見られた。それらの人を分析して見ると、a. オギノ式を行つていながら、つまり安全期を利用していながらオギノ式を行つていないと考えている人、b. 基礎体温を利用することであると考えている人、c. 全くオギノ式ということを知ることがない人などである。

3. オギノ式の実施状況：成績は表3の如くである。これを見ると、行つたことのある人は16%~20%である。つまり多くの人は前項に述べたように、オギノ式を聞いてはいるが、実際には実行していないことになる。この比率はまた、オギノ式の実施者が昔に比べて減つていることも示している。即ち毎日新聞の調査によれば、昭和30年頃には44%の者が本法を利用している。

4. 基礎体温記入の有無：成績は表4の如くである。即ち、「つけたことあり」は約60%に見られ、日本に於ては基礎体温が広く普及していることが分かる。「つけたこ

表 2 オギノ式の認識程度

| | 例数 | 比 率 | (比 率) |
|---------|-----|--------|---------|
| 聞いたことあり | 321 | 78.7% | 84.5% |
| 聞いたことなし | 59 | 14.5% | 15.5% |
| 記入なし | 28 | 6.9% | missing |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 380 missing cases 28

- オギノ式の認知は広く行きわたっている
- オギノ式を理解していない人
 - a. 安全期を利用しながらオギノ式を行っていないという人
 - b. 基礎体温の利用と同じと考えている人
 - c. 全く知らない人

表 3 オギノ式の実施状況

| | 例数 | 比 率 | (比 率) |
|----------|-----|-------|---------|
| 行なったことあり | 67 | 16.4% | 20.2% |
| 行なったことなし | 264 | 64.7% | 79.5% |
| 不 明 | 1 | 0.2% | 0.3% |
| 記入なし | 76 | 18.6% | missing |
| | 408 | 100.0 | 100.0 |

Valid cases 332 missing cases 76

- 多くの人(78%, 表2)がきいているが実行者は少ない(16%)
- 以前に比し実行者は減少している(最高時(昭和30年頃)の約半数以下)

表 4 基礎体温記入の有無

| | 例数 | 比率 | (比率) |
|---------|-----|--------|---------|
| つけたことあり | 238 | 58.3% | 59.4% |
| つけたことなし | 163 | 40.0% | 40.6% |
| 記入なし | 7 | 1.7% | missing |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 401 missing cases 7

◦ 記入もれが少ないのは多くの人が基礎体温に関心をもっていることを示す。約60%の記入率は世界的にも高い。

表 5 基礎体温記入に対する印象

| | 例数 | 比率 | (比率) |
|----------|-----|--------|---------|
| 面倒だ | 123 | 30.1% | 53.5% |
| なれば面倒でない | 107 | 26.1% | 46.5% |
| 記入なし | 178 | 43.6% | missing |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 230 missing cases 178

◦ 記入を面倒と感じた者が半数以上→これが中止につながる
◦ 体温の計測法と記入法の簡便化が必要

となし」は40%である。尚、「記入なし」が1.7%と非常に少ないが、これは基礎体温法に多くの人が関心をもっていることを示している。このように世界的にも高い記入率の由来する所のものは、日本の体温計がすぐれていること。規格が統一されていること、体温表の様式が一定していることなどによるものと思われる。

5. 基礎体温記入に対する印象：成績は表5の如くである。記入症例230例について見ると記入を面倒と感じた者は53%に及んでいる。この数値は基礎体温の記入を途中でやめる者の多いことと関連しており、今後体温の計り方やその記入法についての工夫、簡便化が望まれる所である。最近、電子体温計が一部に利用されているが、その改良、普及も今後の課題である。

6. 粘液法の認識度：成績は表6の如くである。Missingを除くと、知っている者は、27%、知らない者は73%であった。然しこの成績は「粘液法」の解説を行ったあとであるために、知っている者の比率が高くでている傾向があり、実際に粘液法についての知識を持っている者ははるかに少ないのか実情である。

7. 粘液自覚の程度：成績は表7の如くである。この表の特徴は、「記入なし」の比率が61.3%と非常に多いことである。このことは粘液徴候に対する自覚や「粘液法」というものの存在に対する関心や知識の薄いことを示し

表 6 粘液法の認識度

| | 例数 | 比率 | (比率) |
|-------|-----|--------|---------|
| 知っている | 106 | 26.0% | 27.2% |
| 知らない | 283 | 69.4% | 72.8% |
| 記入なし | 19 | 4.7% | missing |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 389 missing cases 19

◦ 説明後に記入せしめたため、それなら知っていると答えた者が可成りある。実際に粘液法としての知識をもっている者はごく少数。

ている。然しその後の全症例についての成績では、「なし」の比率は減少し、感ずる者の比率が高くなる傾向が見られた(統報参照)。記入のあつた者について見ると、粘液の存在に気付いたことのない者が34%であるのに対し、残りの66%は外陰部の変化(感じ)に既に気付いていたことが示されている。更に気付いた者の中では、外陰部の湿った感じが時々分かるという者が最も多かつた。(51%)本法に対する報告は、日本では伊東が昭和11年(1935年)と12年(1936年)に行つたものが最初であるが、その比率は今回の我々の数値(65.8%)と略等しい。

8. 月経前の乳房の腫脹：成績は表8の如くである。「記入なし」は6.9%と少なく、乳房の腫脹に対する自覚度の高いことが分かる。表に見る如く、腫脹を認める者(50.5%)と認めない者(49.5%)とは相半ばしている。本法をオギノ式、粘液法、基礎体温法等と併用することによつて、不妊期判定の精度を高めることが出来る(尚、年齢別に見た月経前の乳房の腫脹(高年齢群)については、母性衛生27号、1号に発表した。この場合、ありは73%と若年群より高い比率を示した)。

9. 中間痛の自覚：成績は表9の如くである。即ち中間痛が、「強い」6.1%、「弱い」30.6%、「なし」52.2%「記入なし」11.0%であつた。

はつきりと排卵痛を感ずる者は少ないことが分かる。

尚、この自覚徴候を自分で「排卵による痛み」と理解して、これを避妊に利用している者が少数乍らいたことは注目に値する(同様のことは粘液徴候についても認められた)。今後、排卵痛の存在とその生理を指導することにより、本徴候を利用する者は更にふえると考えられる。

排卵痛に関する日本での最初の報告は、大正12年、故安藤教授²⁾によつて行われた。また荻野博士は排卵痛によつて自己の受胎期を判定し、長期間避妊に利用していた症例を述べている。尚、初期の調査表には「乳房腫脹」

表 7 粘液自覚の程度

| | 例数 | 比率 | (比率) |
|----------|-----|--------|---------|
| 気付いたことなし | 54 | 13.2% | 34.2% |
| 乾いた感じ毎周期 | 1 | 0.2% | } 65.8% |
| 乾いた感じ時々 | 4 | 1.0% | |
| 湿った感じ毎週期 | 18 | 4.4% | |
| 湿った感じ時々 | 81 | 19.9% | |
| 記入なし | 250 | 61.3% | |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 158 missing cases 250

- 未記入例の多いことは本法に対する関心の薄いことを示す (但しその後の多数例の調査ではこの中の約半数が「気付いている」に移行している)
- 記入例では65%が外陰の変化に気付いている (◦ 伊東は60%~70%, レッツァー(オーストリア)は80%が感ずると)

表 8 月経前の乳房の腫脹

| | 例数 | 比率 | (比率) |
|------|-----|--------|---------|
| 認める | 強い | 27 | 7.1% |
| | 弱い | 165 | 43.4% |
| 認めない | 188 | 46.1% | 49.5% |
| 記入なし | 28 | 6.9% | missing |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 380 missing cases 28

- 認める者と認めないものと半々
- 他法との併用にはよい (◦ 全症例の成績では無記入例の比率が高くでている。)

表 9 中間痛の自覚

| | 例数 | 比率 | (比率) |
|------|-----|--------|---------|
| あり | 強い | 25 | 6.9% |
| | 弱い | 125 | 34.4% |
| なし | 213 | 52.2% | 58.7% |
| 記入なし | 45 | 11.0% | missing |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 363 missing cases 45

- はっきり自覚して避妊に利用しているものあり
- 排卵痛の存在することとその原因を教えること
- 月経痛との混同あり (◦ 全症例の成績では無記入例の比率高し)

と「中間痛」の項目がはいつていなかつたため、本報告例(後期の症例)を含めた全症例の成績に於ては「無記入」の比率が高くでている。

10. 自然家族計画法(NFP)の実施に対する意向:その成績は表10の如くである。即ち記入なしの79例を除く

表 10 自然家族計画法(NFP)の実施に対する意向

| | 例数 | 比率 | (比率) |
|--------|-----|--------|---------|
| 実行したい | 111 | 27.2% | 33.7% |
| 実行できない | 32 | 7.8% | 9.7% |
| わからない | 186 | 45.6% | 56.5% |
| 記入なし | 79 | 19.4% | missing |
| | 408 | 100.0% | 100.0% |

Valid cases 329 missing cases 79

- 分娩終了の時点では NFP の実施をきめかねている者が半数以上である。
- NFP を実行したい意向の者は然らざる者より遙かに多い。

と、実行したい34%、むつかしくて実行できそうにない10%、分からない56%であった。NFP に対する説明が尚充分でないこともあつて、分娩終了の時点では実施に対する意向をきめかねている者が半数以上あるが、実行希望者が実行できないと答えた者よりもはるかに多い点は注目に値する。

11. 家族計画に於ける排卵並に受精期の判定法: 家族計画には周知の如く、避妊と不妊治療とが含まれる。避妊の中には自然法(NFP)と、器具、薬品を使う方法とがある。この自然法を実行する手段として、排卵ならびに受精期の自己判定法(予知と確認) Self-detection of ovulation and the fertile period=Fertility awareness method を用いる(排卵自覚徴候 Self-awareness Method of Ovulation はこの中に含まれる)。

不妊治療の中に最近問題になっている体外受精があるが、自然法(NFP)と体外受精との両者にとって、「排卵並に受精期の判定法」は不可欠のものである。その内

表 11 家族計画に於ける排卵ならびに受精期の判定法

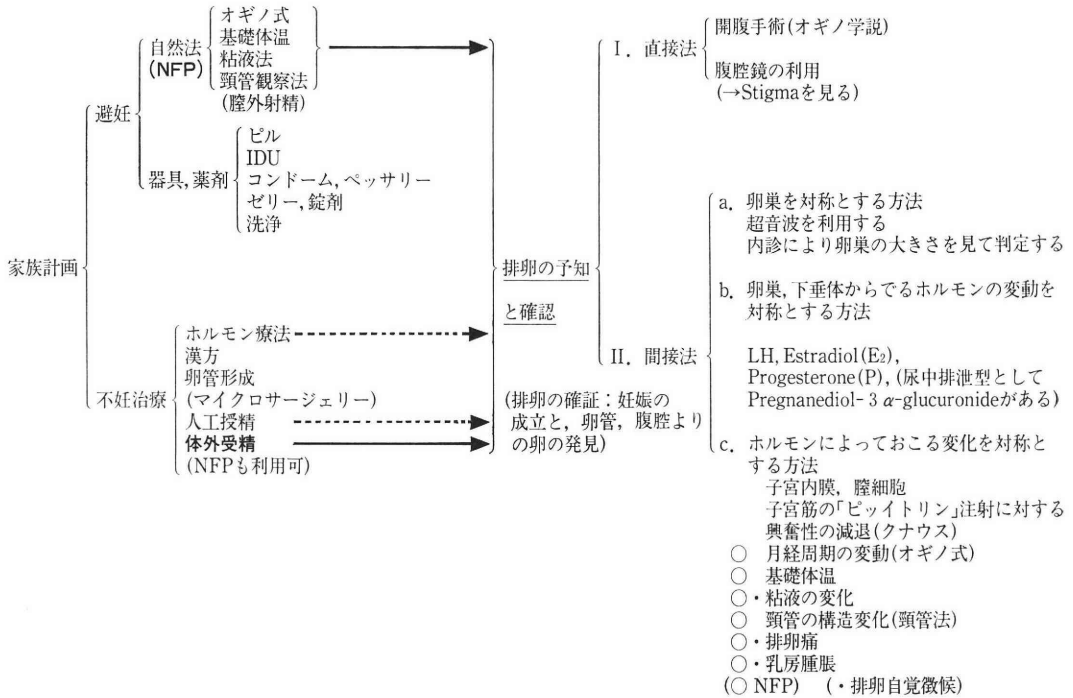


表 12 NFP と IVF に於ける排卵ならびに受精期の予知と確認

| | NFP | IVF |
|------------|----------------------------------|---------------------|
| 1. 目的 | 避妊 | 妊娠 |
| 2. 方法 | Biological (生物学的) Self Detection | Medical, 生化学的 |
| 3. 要求される精度 | + | 卅 |
| 4. 具体的な利用法 | 受精可能期間だけ排卵日からはなれる | 出来るだけ排卵日に近づいて卵を採取する |

容を表11に示した。即ち、I. 直接法とII. 間接法とに分類され、IIは更に a. b. c. の三項に分けられる。NFPに於てはII. c (ホルモンによっておこる変化を対象とする方法)の中の○印の方法が利用される。また、・印は排卵自覚徴候を示している。周知の如く、周期の変動をもとにして受精期を判定するのが、荻野学説に基づくオギノ式である。本法は1932年オランダの Smulder がこれを推奨して有名になったが、既に岡本寛雄がそれ以前に日本で発表している(婦人世界, 大正15年(1926)¹⁰参照)。基礎体温は Mary Putnam Jacobi (1875) の発表が世界で最初のものである(12)参照)。日本では、戦後の山口哲の発表(昭. 25)が最初である。

粘液の記載は外国では J. Seguy und H. Simmonet

(1933)¹⁰が行っているが、日本では前述の如く伊東¹¹の発表(1935, 1936)が最初で有名である。「排卵ならびに受精期の判定法(予知と確認)」をNFPとIVFの両者の立場から目的、方法、要求される精度、利用法について比較考察すると表12の如くなる。即ちNFPに於ては排卵からどのくらいの距離をおけば安全か、つまりなるべく排卵から短い距離をおきつつ然かもより高い安全性(避妊)を得るためにはどうしたらよいかを求め、そしてそのための最良の方法は徴候体温法(Symptothermal Method)とされている。然し、手技はそれだけ面倒になる。これに対して体外受精に於ては臨床的に利用可能な方法を用いて出来るだけ排卵の時点に近づくための方法を求めている。

考案

Natural Family Planning という言葉が専門の雑誌や単行本にのようになったのは、近々10年来のことである。著者の一人村山も数回に亘り本問題に関する知見を発表してきた⁴⁻⁷⁾が、このように関心を高めた背景には次のような事実がある。①オギノ式に於ける月経後の不妊期の利用の安全有効性が多数の臨床成績によって証明され推奨された(荻野⁸⁾, キップレー⁹⁾, レツァー^{10,11)}, 例えばレツァーによれば、180人の3542周期でパール方式で100婦人年に対し0.7の失敗率であったと

いう。さらにその後の報告でも380人, 12,323周期で7例, すなわち同じく0.7の失敗率であったとのべている。②基礎体温法は排卵日を求める手法ではないが, ある幅をもつて受胎期を判定し得る手法であるという基本理念が提示された(フォルマン¹²⁾)。またこの考えに立つて客観的に体温上昇を認定する方法が示された。更に cancel, averaging 等の概念が導入された⁷⁾。③粘液法に於ては, 受精期判定のために粘液を自分で観察するという考え方が新しく導入され, 且その際に粘液の性状を客観的に表示する方法が考案された。(Billing 等)。また Flynn Lynch¹³⁾(1976年)等によつて本法の基本である粘液の性状と LH ピークとの関係が明かにされ, これによつて受胎期判定法としての粘液法の科学的な基盤が確立された。④Davajan,¹⁴⁾ Odeblad¹⁷⁾等によつて粘液の詳細な構造, 精子進入のメカニズムが明らかにされた。⑤月経前の乳房の腫脹や排卵痛(中間痛)も重要な排卵徴候であることや, これらの徴候と基礎体温, 粘液性状とが相互に関連することが, 安藤²⁾, 荻野³⁾ヒルガー¹⁴⁾, ヘンリックソン¹⁵⁾, フォルマン¹²⁾等により明らかにされ, その結果, これらの手法が受精期判定のため, 相互に有機的に利用し得るようになった(排卵痛の命名はフェーリングによる)。尚, Hartman²⁰⁾はその著書で排卵痛の解説を行っているが, その中には Sorel, Tschirdewahn, Ando, Vollman 等先人の名が散見される。Hilger¹⁴⁾は排卵痛発現の比率は41.3%と報告しているが, この数値は我々の発表した表9の missing を除いた場合の値(6.9%+34.4%=41.3%)に等しい。尚, 排卵による中間痛自覚の比率は, 他の原因による下腹痛との混同もあるので, 「強い者の比率」6%~7%を, 本法自覚の比率と見るのが妥当であろう。これに反し, 乳房の腫脹は強, 弱を合せた50%をとつて差支えないと考える。

⑥最後に Symptho-thermal Method (徴候体温法) という手技が考案されたこと等々である。

結 論

1. 排卵ならびに受精期の自己認知法を理解することは, 避妊, 不妊治療, また婦人の健康管理上にも必要である。また, この手法を用いて家族計画を施行しようとする者の数は少なくない。

2. 然し, これらの手法に対する認識とその利用度は尚低く, 今後の指導が必要である。その具体的な方法として, i. 荻野式については以前に一度は習つたことのある者が少なくないので, 更にその内容を正しく理解させる。ii. 基礎体温記入の経験者は多いので, これを継続出来るような工夫を各人がこらすように指導する。

iii. 粘液法についてはその知識はないが, この現象の存

在には気付いている者が少なくないので, 「粘液法」というものの存在することと, その生理的な意義について積極的に解説を行つてゆく。iv. 乳房の腫脹は約半数が認めている。この現象は他法との併用によつて月経前の不妊期の利用を一層確実なものにし得ることを教える。v. 中間痛をはつきり認める者は6%と少ないが, 軽度のものを入れれば41.3%にもなるので, このような現象のあることと, その生理的意味について指導する。

かくすることによつて, NFP は今後更に普及し, 有効に利用され得ると考える。

慶応大学飯塚教授の御校閲を深謝す。

(本論文の要旨は第30回日本不妊学会総会—東京, 1985, 11-12於て発表した。)

文 献

- 1) 伊東尚生: 排卵徴候(第1回報告), 近畿婦人科学会雑誌, 17: 951, 1935. 同(第2回報告), 近畿婦人科学会雑誌, 18: 1447, 1936.
- 2) 安藤畫一: 所謂排卵痛に就きて, 治療及び処方, 4: 668, 1923.
- 3) 荻野久作: 安藤博士論文「周期的禁欲による避妊法荻野説の紹介及び批判」を読み(昭8), 最新受胎調節法(松本, 荻野), 69頁, 引用.
- 4) 村山 茂, 他: Natural Family Planning (NFP), 産婦の世界, 31: 419, 1979.
- 5) 村山 茂: 基礎体温図表と頸管粘液の表示法, 産婦の世界, 32: 101, 1980.
- 6) 村山 茂: 性と避妊(NFPからの考察), 産婦の世界, 34: 53, 1982.
- 7) 村山 茂: NFP法, 産婦人科診療 Q&A, 1680頁.
- 8) 荻野久作: 対卵子法による避妊, 臨産, 6: 651, 1952.
- 9) John and Sheila Kippley: The Art of Natural Family Planning, P. 72, The Couple to Couple League International Inc.
- 10) Roetzer, J.: Erweiterte Basaltemperaturmessung und Empfängnisregelung: Archiv für gynäkologie. 206, 195-214, 1968.
- 11) Roetzer, J.: Fine points of the sympto-thermic method of natural family planning (No. 2). Japan Human Life Foundation, 1977.
- 12) Vollman, R. F.: The Menstrual Cycle, W. B. Saunders company, Philadelphia.
- 13) Flynn, A. M. and Lynch, S. S.: Cervical mucus and Identification of the Fertile Phase of the Menstrual Cycle. British Journal of Obstetrics and Gynaecology, August 1976. Vol 83. pp 656~659.
- 14) Hilgers, T. W., Daly, K. D., Prebil, M., and Higers, S. K.: Natural Family Plan-

- ning III. Intermenstrual Symptoms and Estimated Time of Ovulation. *Obstetrics & Gynecology*, 58 : 2, 1981.
- 15) Wharton, L. R. and Henriksen, E. : Studies in Ovulation. The Operative Observation in Periodic Intermenstrual Pain. *JAMA.*, 107, 18, 1425, 1936.
- 16) Davajan, V., Nakamura, R. M. and Kharma, K. : Spermatozoan Transport in Cervical Mucus. *Obstet, Gynec. Survey*, 25 : 1, 1970.
- 17) Odeblad, E. et al : The Biophysical Properties of the Cervical-Vaginal Secretions, *IRNFP*, VII, 1, 1983.
- 18) 太田典礼 : 日本産児調節百年史, 281頁. 51, 9, 人間の科学社.
- 19) Séguy, J. und Simmonet, H. : Erforschung direkter Ovulationszeichen bei der Frau. *Gynéc etw Obstétr* 28, Nv 6 (1933)
- 20) Hartman C. G. : Science and the Safe Period, p, 176, The Williams & Wilkins Company, Baltimore, 1962.

The present state of utilization of
NFP techniques (Fertility
Awareness Methods)

**Shigeru Murayama, Toru Hashimoto
and Tatsuro saito**

Ohtawara Redcross Hospital

**Kenichi Shimizu, Kazuaki saito,
Takashi Nozawa and Yoshifumi Suda**
Nerimasōgō Hospital

As methods for self-detection of ovulation and the fertile period, cervical mucous method, reco-

gnizing of the ovulation pain, and premenstrual swelling of the breasts have been cited. The basal body temperature method and Ogino's method are also those which can be performed by the women themselves. The rate of utilization of these methods was examined in 408 women.

1) Ogino's method: Among the 408 subjects, 79% had heard of the method, 15% had known nothing about it, and 7% gave no answer. Only a few of those who performed it, however, were doing it correctly. 2) The basal body temperature method: 58% had used this method, whereas 40% had never done it. 2% made no entry. Few of the women were performing this measurement continuously. 3) Check for cervical mucous: As many as 61% of the subjects gave no answer, implying little interest in this method. When these subjects were excluded, 65% were aware of changes in the vulvar region, especially a feeling of moistness. 4) Premenstrual swelling of the breasts: Such swelling was present in 47% and absent in 46%, with no entry in 7%. 5) Ovulation pain: Such pain was present in 37% and absent in 52%, with no entry in 11%. Of the former 37%, 6% had distinct pain. 6) NFP: 27% wanted to employ NFP, 8% did not, and 46% had not decided, 19% gave no answer. The affirmative answers were much more numerous than the negative ones.

(受付: 昭和61年4月22日)

精子過少症に対する配偶者間人工授精 (AIH) の有用性に関する検討

The Efficiency of AIH (Artificial Insemination of Husband's Semen)
on the Patients of the Oligospermia

釜石市民病院, 産婦人科
中 谷 一 夫
Kazuo NAKATANI

Department of Obstetrics and Gynecology, Kamaishi City Hospital, Kamaishi, Iwate

東北大学医学部産科学婦人科学教室
星 合 晃
Hirosi HOSHIAI

Department of Obstetrics and Gynecology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

夫の精子濃度が平均 $50 \times 10^6/\text{ml}$ 以下であり, 妻に不妊の原因を認め得ず, AIH の適応と考えられた32例の不妊夫婦における経過と精液所見との関連を retrospective に検討した。

1. 21例が妊娠し, 7例 (A 群) が AIH により, 他の14例 (B 群) は AIH を行わなかつた周期に自然に妊娠した. 11例 (C 群) が不妊のまま経過している。
2. 各群に試みられた AIH 回数には差は無く, AIH 妊娠例における AIH 回数は最高6回であつた。
3. A, B 群間に結婚から, 或いは初診から最終月経の期間に差は無かつた。
4. A 群における AIH 成功時と非成功時の精液所見を比較すると, 精子濃度は成功時の方が高い傾向があり, 運動率は成功時に有意に高かつた。
5. $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の群に AIH 成功例は無かつたが, $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の群においても自然妊娠例は存在した。
6. $30 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群では自然妊娠例が多く, $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以上の群は全例妊娠した。
7. 当報告の症例の範囲では, 精子過少症における AIH の有用性を確認することは出来なかつた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 72-79, 1987)

緒 言

現在, 男性側の不妊因子, とくに精子過少症等の精液所見の異常に対する治療手段としての homologous artificial insemination (AIH) の有用性については必ずしも評価の一致をみていない。その理由として殆どの治療例が自然妊娠の機会と可能性を有しており, また何らかの補助治療を併用していることが多く, 妊娠の成立を AIH によるものと断定し得ないこと, 治療途中での比較的多い drop-out 例, 同一個人内においても存在する精液所見の変動, 卵との遭遇の確率, 治療施設による適

応, 手技の相違など variable な要素が大きいこと, さらに最大の理由は AIH に頼らなければ妊娠困難と判断した例がしばしば自然妊娠する事実であり, 精液所見異常例における AIH の有用性を客観的に評価することは必ずしも容易ではない。

今回私達は, 不妊を主訴として当科を受診し, 男性不妊と診断の上, AIH 治療の適応とされた32例について検討したので, 文献的考察を加えて報告する。

方 法

対象は1980年1月1日から1983年12月31日迄の4年間

表 1 精子減少症 (<5×10⁶/ml) に対する AIH 施行例

| Group | 例数 | 初診時年齢 | 初診迄不妊期間(月) |
|-------------|----|------------|-------------|
| (A) AIH 妊娠例 | 7 | 29.28±2.66 | 37.71±22.33 |
| (B) 自然妊娠例 | 14 | 26.35±3.58 | 33.79±25.33 |
| (C) 不妊継続例 | 11 | 28.21±2.00 | 46.67±26.65 |

No significant difference among 3 groups

表 2 精子減少症 (<5×10⁶/ml) に対する AIH 施行例各群の精液所見

| Group | 例数 | 検査数 | 精子濃度 (×10 ⁶ /ml) | 運動率(%) |
|-------------|----|-----|--------------------------------|-----------------------|
| (A) AIH 妊娠例 | 7 | 28 | 30.23± 8.27 | 44.70±12.83 |
| (B) 自然妊娠例 | 14 | 71 | 32.26±11.68 | 44.06±15.32 |
| (C) 不妊継続例 | 11 | 50 | 14.05± 8.62 (P<0.003)* | 38.46±16.30 (n.s)* |

* Group (C) versus group (A) and (B)

に当科を不妊を主訴として初診し、男性不妊と診断され、AIHの適応とされた例のうち、その後の経過を知り得た32例である。女性側には不妊症に対する一般ルチン検査、すなわち BBT 記録、子宮卵管造影（一部に卵管通気検査）、血清 PRL, FSH, LH 測定などを行い、女性側の不妊因子を除外した。現在では不妊例の相当数に腹腔鏡を施行しているが、当時は導入初期であり、この32例中2例のみが腹腔鏡を受けており正常と診断されている。

精液は病院から持ち帰った滅菌容器に、朝自宅で用手法にて採取し、妻がそれを病院に持参して AIH を行う形式をとっているが、採取から注入及び検査迄の時間は夫の職業、出勤時間、自宅からの通院所要時間などに影響され、約1～2時間を要するものと思われ、精子運動率の解釈にはそれなりの補正を要するものと考えられる。一方、精子過少症の定義にも一定の見解がない。飯塚ら¹⁾は日本人の標準精子濃度を5×10⁶/ml以上、狭義の精子過少症を20×10⁶/ml以下としており、文献的にも20×10⁶/ml以下を精子過少症とするものが多いが、Whitelaw²⁾は60×10⁶/ml以下、Moghissiら³⁾、Dixonら⁴⁾は50×10⁶/ml以下を対象としており、当報告においても境界領域を含める意味もあり、50×10⁶/ml以下を検討の対象とした。PCT (Postcoital test) に関しては、PCT 施行前の妊娠例もあり、また高度の精子過少例では頸管粘液内に精子の存在を認め得ない場合や、また指定日に種々の理由で性交不能の場合があり、結局 PCT を施行し得たのは32例中13例であった。

AIH は1周期に1回を原則とし、排卵日の予測は BBT パターン、頸管粘液性状、Hi-Estrotec による尿

中エストロゲンの半定量、Hi-Gonavis による LH-surge の同定、超音波断層法による卵胞径の計測などにより総合的に行い、AIH 当日からその翌々日迄に高温相に移行した場合、good-timing であつたと retrospective に判断している。AIH 前は3日前後の禁欲を勧めているが、施行後の性交については制約はしていない。

AIH の手技は当科では Whole ejaculate を子宮腔内、頸管内にそれぞれ約0.5ml、及び後膣円蓋に少量置き、残りを AIH の度に検査に回している。なお注入後30分間骨盤高位を保たせている。

結 果

1. 32例中21例 (65.6%) に妊娠が成立したが、そのうち AIH により妊娠したもの (A 群) は7例 (21.9%) であり、AIH を行わなかつた周期に自然に妊娠した例 (B 群) が14例 (43.8%) であつた。残りの11例 (C 群) は不妊のまま経過している。尚、この3群の初診時の年齢及び初診迄の不妊期間には有意差は無かつた。

2. 当科では原則として AIH 施行の度に精液検査を行っているが、それに検査のみの場合の結果を加えた総検査数は、A 群は28回、B 群は71回、C 群は50回であつた。A、B 両群間には精子濃度、運動率ともに差は無かつた。しかしC群の精子濃度はA、B 両群より有意に低く (P<0.003)、運動率にも低い傾向がみられた。

3. 各群に試みられた AIH 回数には有意差は無く、AIH 成功例は全て6回目迄であつた。自然妊娠群14例中には最高18回の AIH で妊娠せず、その後4年間の無治療後に妊娠した1例、及び16回の AIH 後の周期に自

表 3 各群の AIH 回数, 妊娠成立迄の期間

| Group | 例数 | AIH 回数 (最少~最多) | P value | 初診~LMP(月) (最少~最多) | P value | 結婚~LMP(月) (最少~最多) | P value |
|-------|----|---------------------|------------|---|------------|--|------------|
| (A) | 7 | 3.28±1.88 (1~6) | n.s.* | 13.43±11.22 (3~33) | n.s.* | 51.14±26.33 (~88) | n.s.* |
| (B) | 14 | 4.93±5.56 (0~18) | | 15.21±18.01 (1~73) *10.76± 8.52 (1~30) | | 49.00±37.18 (~142) *41.85±27.30 (~98) | |
| (C) | 11 | 4.82±4.72 (0~18) | n.s.** | > 58.33±14.11 (29~72) | 0.003** | >97.50±22.35 (0~139) | 0.003** |

* Group A versus group B

** Group C versus group A and B

* 初診~LMP (73カ月), 結婚~LMP (142カ月) の 1 例を除いた場合

表 4 AIH 妊娠例 (A群) における成功, 非成功時の精液所見

| AIH | 検査数 | 精子濃度 | p value | 運動率 | p value |
|------|-----|-------------|---------|-------------|---------|
| 成功時 | 7 | 30.57±12.12 | | 51.14± 8.89 | |
| 非成功時 | 16 | 23.40±11.10 | n.s. | 31.99±12.65 | 0.003 |

然妊娠した 1 例の計 2 例が含まれているが, 他の 12 例 (85.7%) は 10 回目の AIH を施行する以前の自然妊娠例であり, A, B 両群に施行された AIH 回数には差は無かった。

4. 妊娠群における初診から最終月経迄の所要月数を比較すると, A 群では最長 33 カ月, B 群では前記の 4 年間の無治療期間を有する 73 カ月の例を除くと最長 30 カ月であり, 両群間に統計的な差は無かった。また結婚から最終月経迄の期間は, A 群では最長 88 カ月, B 群ではやはり先述の 142 カ月の例を除くと最長 98 カ月であり, 両群間には有意差は無かった。C 群ではいずれも A, B 両群の期間を有意に超過している (P<0.003)。

5. A 群における AIH 成功時と非成功時の精液所見全体を比較すると, 精子濃度は成功時に高い傾向があり, 運動率は成功時に有意に高かった (P<0.003)。A 群の 7 例中 2 例は初回検査と同時に行った AIH で妊娠しているため, 非成功時の検査結果が無く, 個々の例について比較出来たのは 5 例のみであった。5 例中, 精子濃度, 運動率とも各々 3 例において, AIH 成功時の所見が非成功時の所見を上回ったが, 有意な傾向を見出すことは出来なかった。

6. 精子過少の程度を 5 段階に分けて, 妊娠に関する予後との関連性を検討した。(1) 運動率は精子濃度 10×10⁶/ml を境として, それ以下の群では有意に低かった (P<0.003)。(2) 全体としての妊娠率は 20×10⁶/ml 以

表 5 AIH 妊娠例

| 症例 | 精子濃度 (×10 ⁶ /ml) | | 運動率(%) | | 検査数 | AIH 回数 |
|----|--------------------------------|------------------------|--------|-------|-----|--------|
| | 成功時 | 非成功時 | 成功時 | 非成功時 | | |
| 1 | 39 (21.25±14.91) | 6.50 (22.50±11.88) | 43 | 15.38 | 4 | 3 |
| 2 | 38 (25.33±14.00) | 19.00 (44.00± 8.64) | 52 | 51.15 | 3 | 3 |
| 3 | 10 (24.00± 7.23) | 26.00 (46.14± 7.19) | 50 | 48.10 | 7 | 6 |
| 4 | 28 (25.50± 4.15) | 24.67 (34.40±23.94) | 41 | 42.17 | 5 | 4 |
| 5 | 17 (34.50±14.58) | 40.75 (57.33±23.07) | 64 | 66.80 | 6 | 5 |
| 6 | 35 (34.00± 1.00) | * (64.50± 0.50) | 64 | * | 2 | 1 |
| 7 | 47 (47.00± 0.00) | * (44.00± 0.00) | 44 | * | 1 | 1 |

* 初回の AIH で妊娠

下の 11 例中 3 例 (27.3%) と, それ以上の群における 21 例中 18 例 (85.7%) の間には差があり (P<0.05, $\chi^2=4.41, 1df$), 精子過少症の基準を 20×10⁶/ml 以下とすることの妥当性を示した。一方, 40×10⁶/ml 以上の 6 例は全て妊娠した。(3) 自然妊娠例についてみると, 30×10⁶/ml 以上の群での 14 例中 10 例 (71.4%) は, それ以下の群での 18 例中 4 例 (22.2%) に比べて有意に高かった

表 6 精子過少症の程度と妊娠率

| 精子濃度 ($\times 10^6/ml$) | 例 数 | 運動率 (%) | Group | | | 妊娠率 (自然妊娠率) |
|------------------------------|--------|-------------------|-------|----|---|----------------|
| | | | A | B | C | |
| 10> | 6 | 2.31 \pm 2.00* | 0 | 2 | 4 | 33.3(33.3) |
| 20~10 | 5 | 39.07 \pm 25.33 | 0 | 1* | 4 | 20.0(20.0) |
| 30~20 | 7 | 41.83 \pm 13.82 | 4 | 1* | 2 | 71.4(14.3) |
| 40~30 | 8 | 52.22 \pm 8.00 | 2 | 5 | 1 | 87.5(62.5) |
| 50~40 | 6 | 51.98 \pm 12.25 | 1 | 5 | 0 | 100.0(83.3) |

* $P < 0.003$ * $P < 0.05$ ($\chi^2 = 4.41$, 1 df)* $P < 0.05$ ($\chi^2 = 4.43$, 1 df)

($P < 0.05$, $\chi^2 = 4.43$, 1df). (4) AIH による妊娠 7 例は全て $20 \times 10^6/ml$ 以上の群においてであった。うち 1 例はその後さらに自然妊娠により 1 児を得た。(5) 精子濃度 $20 \times 10^6/ml$ 以下の 11 例に AIH 成功例は無かった

が、3 例 (7.3%) の自然妊娠例があり、さらに $10 \times 10^6/ml$ 以下の 6 例においても 2 例 (33.3%) の自然妊娠があった。(6) AIH 妊娠数が自然妊娠数を上回ったのは精子濃度 $20 \times 10^6 \sim 30 \times 10^6/ml$ の範囲においてのみであった。

考 察

1950年, Whitelaw²⁾ は精子濃度 $20 \times 10^6/ml$ 以下の 32 例中 1 例に AIH の成功を報告しているが、それから約 30 年を経ての Corson ら⁵⁾ の同じく $20 \times 10^6/ml$ 以下の例における 25 例中 2 例、或いは Dixon ら⁴⁾ の $50 \times 10^6/ml$ 以下の例における 48 例中 2 例の成功の報告を考えるとき、その間の AIH の技術上の様々な創意工夫にもかかわらず、精子過少症における成果に、はかばかしい進歩の見られていないことを示している。Barwin⁶⁾, Dia-

表 7 Review of All pregnancies in relation to sperm density and used procedures

| Authors | Year | Upper level ($\times 10^6/ml$) | AIH preg. | Total couple | Procedures |
|------------------|------|-------------------------------------|--------------|-----------------|---|
| Russel(8) | 1960 | 10 | 2 | 34 | Whole. Intracervical or cervical spary. |
| Amelar(11) | 1965 | 10 | 1 | 21 | Split. Intrauterine? |
| Barwin(6) | 1974 | 10 | 3 | 8 | Stored.* Intrauterine. |
| Diamond(7) | 1983 | 10 | 2 | 4 | Split. Home use of cervical cap. |
| Whitelaw(2) | 1950 | 20 | 1 | 32 | Whole. Cervical cap. |
| Payne(13) | 1954 | 20 | 0 | 159 | Split. Cervical cap or spray. |
| Amelar(11) | 1965 | 20 | 3 | 35 | Split. Intrauterine? |
| Barwin(6) | 1974 | 20 | 11 | 20 | Stored*. Intrauterine. |
| Steiman(14) | 1977 | 20 | 4 | 12 | Split. Intracervical. |
| Glass(10) | 1979 | 20 | 0 | 16 | Treated.** Intrauterine. |
| Corson(5) | 1981 | 20 | 2 | 25 | Whole or treated.*** Intracervical or intrauterine. |
| Diamond(7) | 1983 | 20 | 10 | 18 | Split. Home use of cervical cap. |
| Nunley(12) | 1978 | 22 | 4 | 17 | Whole or split. Intracervical or intrauterine. |
| Whitelaw(2) | 1950 | 40 | 5 | 32 | Whole. Cervical cap. |
| Kaskarelis(15) | 1959 | 40 | 0 | 44 | Whole. Intrauterine. |
| Farris(16) | 1960 | 40 | 13 | 100 | Split. Intrauterine. |
| Perez-Pelaez(17) | 1965 | 40 | 10 | 38 | Split. Intracervical or intrauterine. |
| Steiman(14) | 1977 | 40 | 4 | 17 | Split. Intracervical. |
| Dixon(4) | 1976 | 50 | 2 | 48 | Whole or split. Intracervical or in combination with cervical cap |
| Whitelaw(2) | 1950 | 60 | 14 | 32 | Whole. Cervical cap. |
| 中 谷 | 1985 | 10 | 0 | 6 | Whole. Intrauterine and intracervical. |
| | | 20 | 0 | 11 | |
| | | 40 | 6 | 26 | |

Whole: Whole ejaculate. Split: Split ejaculate. ** Frozen. *** Separation on columns of liquid albumin. *** Tyrode's solution.

表 8 Number of spontaneous pregnancy (NIH) occurred during or after failure of AIH therapy

| Authors(Year) | Indications | Pregnancy | | Comments |
|-------------------------------|-------------------------|-----------|------------|--|
| | | AIH | NIH | |
| Russel (1976) ⁸⁾ | 10×10 ⁶ /ml> | 2/34 | → 8/32* | *Failure cases of AIH. |
| van Zyl (1975) ⁹⁾ | 10×10 ⁶ /ml> |* | 14/27 | *No treatment. |
| Glass (1979) ¹⁰⁾ | 20×10 ⁶ /ml> | 0/16 | → 4/16* | *Failure cases of AIH. |
| Corson (1981) ⁵⁾ | 20×10 ⁶ /ml> | 2/25 | 1/25 | |
| Dixon (1976) ⁴⁾ | 50×10 ⁶ /ml> | 1/48 | 7/48 | |
| Swyer (1961) ²³⁾ | several | 20/114 | 10/114 | |
| Dixon (1976) ⁴⁾ | several | 15/158 | 29/158 | |
| Moghissi (1977) ³⁾ | several* | 9/28 | 4/28 | *50% of cases was below 50×10 ⁶ /ml in density and 80% was below 50% in motility. |
| Nunley (1978) ¹²⁾ | several* | 23/158 | → 20/135** | *Several were fewer than 10×10 ⁶ /ml in density. **Failure cases of AIH. |
| Pfeffer (1980) ²²⁾ | poor PCT | 12/148* | 1/178* | *Cycles of 38 patients. |
| Corson (1981) ⁵⁾ | several | 13/100 | 10/100 | |
| 中 谷 (1985) | 10×10 ⁶ /ml> | 0/6 | 2/6 | |
| | 20×10 ⁶ /ml> | 0/11 | 3/11 | |
| | 40×10 ⁶ /ml> | 6/26 | 9/26 | |

mond ら⁷⁾は10×10⁶/ml以下の例において、少数例ながら約50%に達する AIH 成功例を報告しているが、一方、Russel⁸⁾はやはり10×10⁶/ml以下の32例の AIH 不成功例中8例、van Zyl ら⁹⁾も27例中14例に自然妊娠が成立したと述べ、また Glass ら¹⁰⁾は20×10⁶/ml以下の16例中4例に自然妊娠をみており、いずれも AIH による妊娠成立の頻度との間にあまり差が認められず、むしろ報告によっては AIH によるよりも良い成功率を示している⁵⁻¹⁷⁾。当報告でも20×10⁶/ml以下の11例に AIH による妊娠例は無かったが、3例は自然に妊娠した。Russel⁸⁾は AIH が妊娠の機会を増す証拠は無く、精液に対する人為的操作は精子の quality を落とすことから、むしろ逆の効果をもたらすと述べ、Dixon ら⁴⁾も精子数或いは運動率が低下している場合、性交の方が AIH よりも妊娠のチャンスがあり、医師のなすべきことは、周期を規則的にして排卵の予測を助け、そのチャンスを増加させることであると述べている。また Nunley ら¹²⁾、Corson ら⁵⁾は AIH 不成功後の自然妊娠例の多くは男性不妊例であるとし、男性不妊例における自然妊娠率の高さを強調している。Glass ら¹⁰⁾も同一個人での検査値の変動の大きさを指摘し、多くの研究はこの“自然治癒”を考慮せず、生じた妊娠を全て AIH に帰していると批判している。当報告においても AIH 成功時の精子濃度は非成功時よりも高い傾向にあり、運動率は有意に高かった。

現在、インポテンス、尿道下裂、逆行性射精など、解剖学的或いは精神的原因による腔内への精液貯溜障害のみが不妊原因である場合は AIH の適応として広く認められており、またかなりの成績が報告されている^{3,4,6,8,12,14,18)}。また PCT 不良例を適応とした報告も Mastroianni¹⁹⁾以外は全体に高い AIH 成功率を示している^{5,8,20,21,22,23)}。しかし、先述したように精子過少症を AIH の適応とすることには必ずしも意見は一致していない。客観的評価を困難なものにしている理由に先程の自然妊娠の問題の他に、緒言でも触れた drop-out 率の高さが挙げられる。

Moghissi ら³⁾は6回の AIH で不妊例を不成功例としており、Corson ら⁵⁾は100例中51例が3周期で drop-out したと述べ、4回施行例では28%、6回施行例では41%の成功率であったとし、少なくとも6回の治療を行うように励ますことが必要であると述べている。また Nunley ら¹²⁾は、最近の妊娠例は全て6回目或いはそれ以後であったと述べ、Swyer ら²³⁾は全体としての17.5%の妊娠率は6カ月間治療を受けた例では51%に上昇したと報告している。以上の如く、成否の判定には6回の施行を前提とする意見が多いが、逆に言えば AIH による妊娠例は比較的治療の早期、特に数周期以内に多いということの意味している^{3-6,12,20)}。当報告での AIH 成功7例は全て6回目迄、平均3.28±1.88(1~6)回であった。しかし、14例の自然妊娠例のうち12例(85.7

表 9 Number of AIH pregnancy in the indication of poor PCT

| Authors(Year) | Total | AIH preg. | Procedures |
|----------------------------------|-------|-----------|--|
| Mastroianni(1957) ¹⁹⁾ | 113 | 7 | |
| | 29 | 1 | Treated (centrifuged). Intrauterine. |
| | 47 | 3 | Whole.* Cervical cap. |
| | 31 | 3 | Whole. Vaginal canula. |
| Ulstein(1973) ²⁰⁾ | 35 | 10 | Whole. Intrauterine and intracervical with cervical cap. |
| Barwin(1974) ⁶⁾ | 18 | 13 | Treated (refrigerated). Intrauterine. |
| White (1976) ²¹⁾ | 9 | 5 | Whole. Intrauterine. |
| Russel(1976) ⁵⁾ | 10 | 3 | Whole. Intracervical or cervical spray. |
| Kremer(1978) ²⁴⁾ | 22 | 7 | Treated (Centrifuged and washed). Intrauterine. |
| Corson(1981) ⁵⁾ | 18 | 5 | Treated(Tyrode's solution). Intracervical or intrauterine. |

Whole: Whole and untreated ejaculate.

表 10 The average number of AIH required for pregnancy

| Authors(Year) | Inseminations | | Preg/Total | Comment |
|------------------------------|---------------|-------|------------|---|
| | Cycle | Times | | |
| Swyer(1961) ²³⁾ | | 6> | 20/114 | More than 50% of conceptions occurred by 6th inseminations. |
| Ulstein(1973) ²⁰⁾ | | 3.4 | 10/35 | |
| Barwin(1974) ⁶⁾ | 4> | | 11/20 | 90% conceived within 4 months. |
| Dixon(1976) ⁴⁾ | 3.1 | 7.7 | 15/158 | |
| Moghissi(1977) ⁸⁾ | | 3.8 | 9/28 | |
| Steiman(1977) ¹⁴⁾ | | 3.8 | 4/12 | 52.9% by the fourth cycle and 76.4% by the fifth cycle. |
| Nunley(1978) ¹²⁾ | 4.1 | | 14/53 | 13 cased by the third trial. |
| Corson(1981) ⁵⁾ | | 3.38 | 13/100 | |
| 中谷(1985) | | 3.28 | 7/32 | All cases by the 6th trial. |

%) もまた10回目の AIH 施行迄の妊娠であり、その平均回数、 4.93 ± 5.56 (0~18) 回は AIH 成功群との間に差は無かった。その結果、AIH、自然両妊娠群の間に初診から最終月経、結婚から最終月経の期間にも差は認められなかった。一方、7回以上の AIH 施行例は6例であった。しかし、そのうち4例(8~18)回は自然妊娠例、2例(9~18回)は不妊継続例であり、AIH 妊娠例は無かった。不妊継続群における初診から最終月経の期間が妊娠群のそれよりも有意に延長しているにもかかわらず、AIH 回数は平均 4.82 ± 4.72 (0~18) 回であり、妊娠群との差が見られなかったことは drop-out によるものと考えられる。6回施行を基準とすると不妊継続群11例における drop-out 率は81.8%となるが、6カ月を基準とすると、その場合の drop-out 率は63.6%であった。不妊継続群における精子濃度 $14.05 \pm 8.62/\text{ml}$ は AIH 妊娠群の $30.23 \pm 8.27/\text{ml}$ や自然妊娠群の $32.26 \pm 11.68/\text{ml}$ に比較して明らかに低く ($P < 0.003$)、治療

当初からの医師、及び患者の両方に存在した絶望感、或いは AIH の効果に対する疑念が、高い drop-out の背景となつていると想像される。

精子過少症に対する AIH 手技としては数多くの方法が報告されているが、それぞれの手技の成績は報告により異なり、特定の手技が他に比べて常に優れた成績を示してはいない。使用する精液も種々の処理法を経たものから、split ejaculate, whole ejaculate, 注入法も intrauterine, intracervical から単なる cervical spray, intravaginal placement. に及ぶ数多くの方法をみると、自然性交との明確なる差異、或いは AIH の意義は不鮮明なものとなる。さらに、それらの方法により得られる不定の成果としばしば経験される自然妊娠を考えるとき、Dixon ら⁴⁾も AIH は精子濃度、運動率の低下を代償はしないと述べているように、精子過少症を主体とする男性不妊症における AIH の意義について再検討する余地を残していると思われる。

おわりに

当科において精子過少症が不妊原因とされ、AIHの適応とした32例について文献的考察を含めて検討したが、AIHの有用性を確認することは出来なかった。AIHが治療手段として取り入れられて以来、相当の時間を経ており、その手技にも様々の創意工夫がなされて来たが、その治療成績は必ずしも満足すべき状態には無く、精子過少症をAIHの適応とすることに、さらに検討の余地を残していると考えられた。

文 献

- 1) 飯塚理八, 己斐秀豊, 小林俊文: 不妊症学, 112頁, 金原出版, 1974.
- 2) Whitelaw, M. J.: Use of the cervical cap to increase fertility in cases of oligospermia. *Fertil. Steril.*, 1 : 33, 1950.
- 3) Moghissi, K. S., Gruber, J. S., Evans, S. and Yanez, J.: Homologous artificial insemination. A reappraisal. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 129 : 909, 1977.
- 4) Dixon, R. E., Buttram, V. C. Jr. and Schm, C. W.: Artificial insemination using homologous semen: A review of 158 cases. *Fertil. Steril.*, 27 : 647, 1976.
- 5) Corson, S. L. and Batzer, F. F.: Homologous artificial insemination. *J. Reprod. Med.*, 26 : 231, 1981.
- 6) Barwin, B. N.: Intrauterine insemination of husband's semen. *J. Reprod. Fert.*, 36 : 101, 1974.
- 7) Diamond, M. P., Christianson, C., Daniel, J. F. and Wentz, A. C.: Pregnancy following use of the cervical cup for home artificial insemination utilizing homologous semen. *Fertil. Steril.*, 39 : 480, 1983.
- 8) Russel, J. K.: Artificial insemination (husband) in the management of childlessness. *Lancet.*, 2 : 1223, 1960.
- 9) van Zyl, J. A., Menkveld, R., van Kotze, W., Retief, A. E. and Niekerk, W. A.: Oligospermia: a seven-year survey of the incidence, chromosomal aberrations, treatment and pregnancy rate. *Int. J. Fertil.*, 20 : 109, 1975.
- 10) Glass, R. H. and Ericsson, R. J.: Spontaneous cure of male infertility. *Fertil. Steril.*, 31 : 305, 1979.
- 11) Amelar, R. D. and Hotchkiss, R. S.: The split ejaculate: Its use in the management of male infertility. *Fertil. Steril.*, 16 : 46, 1965.
- 12) Nunley, W. C., Kitchin, J. D. III and Thigarajah, S.: Homologous insemination. *Fertil. Steril.*, 30 : 510, 1978.
- 13) Payne, S. and SKeels, R. F.: Fertility as evaluated by artificial insemination. *Fertil. Steril.*, 5 : 32, 1954.
- 14) Steiman, R. P. and Taymor, M. L.: Artificial insemination homologous and its role in the management of infertility. *Fertil. Steril.*, 28 : 146, 1977.
- 15) Kaskarelis, D. and Comminos, A.: A critical evaluation homologous artificial insemination. *Int. J. Fertil.*, 4 : 38, 1959.
- 16) Farris, E. J. and Murphy, D. P.: The characteristics of the two parts of the partitioned ejaculate and the advantages of its use for intrauterine insemination: a study of 100 ejaculates. *Fertil. Steril.*, 11 : 465, 1960.
- 17) Perez-Pelaez, M. and Cohen, M. R.: The split ejaculate in homologous insemination. *Int. J. Fertil.* 9 : 25, 1965.
- 18) Hotchkiss, R. C., Pinto, A. B. and Kleegman, S.: Artificial insemination with semen recovered from the bladder. *Fertil. Steril.*, 6 : 37, 1965.
- 19) Mastroianni, L. Jr., Laberge, J. L. and Rock, J.: Appraisal of the efficacy of artificial insemination with husband's sperm and evaluation of insemination technics. *Fertil. Steril.*, 8 : 260, 1957.
- 20) Ulstein, M.: Fertility of husbands at homologous insemination. *Acta Obstet. Gynec. Scand.*, 52 : 5, 1973.
- 21) White, R. M. and Glass, R. H.: Intrauterine insemination with husband's semen. *Obstet. Gynecol.* 47 : 119, 1976.
- 22) Pfeffer, W. H., Wallach, E. E., Beck, W. W., and Barrett, A. M.: Artificial insemination with husband's semen: Prognostic factors. *Fertil. Steril.*, 34 : 356, 1980.
- 23) Swyer, G. I. M.: Results of artificial insemination (husband). *J. Reprod. Fert.*, 2 : 11, 1961.
- 24) Kremer, J.: Cited from reference (No. 5)

The efficiency of AIH (Artificial
Insemination of Husband's Semen)
on the patients of the
oligospermia

Kazuo Nakatani and Hiroshi Hoshiai*

Department of Obstetrics and Gynecology,
Kamaishi City Hospital, Kamaishi, Iwate.

*Department of Obstetrics and Gynecology,
Tohoku University School of Medicine, Sendai.

The outcome of homologous artificial inseminations (AIH) carried out on 32 oligospermic couples was studied retrospectively. In them, the average of serial sperm densities was below 50 million/ml and the female fertilities had proved to be not impaired.

1. As a whole, 21 couples conceived, 7 of them (A group) by AIH and other 14 (B group) spontaneously. Eleven cases (C group) still re-

main infertile.

2. Difference among the number of AIH tried in each group was not significant and all AIH-pregnancies occurred by the 6th trial in A group.

3. There was also no significant difference in the period from marriage to LMP or from initial visit to LMP between A and B group.

4. Comparing sperm parameters of successful and unsuccessful AIH in A group, there was no particular trend in regard to sperm density and motility rate.

5. Although every sperm density in A group was above 20 million/ml, a larger number of natural pregnancies rather than by means of AIH was present when the density was above 30 million/ml.

6. Spontaneous pregnancies occurred even in the range below 20 million/ml where no AIH-pregnancy occurred in this study. We could not define the usefulness of AIH in the therapy of sterility caused by oligospermia.

(受付: 昭和61年1月9日)

特発性男子不妊症の Methylcobalamin による 長期治療成績について

Effect of Long Term Methylcobalamin Therapy on
Idiopathic Male Infertility

藤沢市民病院泌尿器科

岩本 晃明* 岩崎 皓 広川 信
Teruaki IWAMOTO Akira IWASAKI Makoto HIROKAWA
Department of Urology, Fujisawa City Hospital

同上 中検病理

松下 和彦
Kazuhiko MATSUSHITA
Department of Pathology, Fujisawa City Hospital

朝倉泌尿器科医院

朝倉 茂夫
Shigeo ASAKURA
The Private Practice of Urology

*現横浜市大医学部泌尿器科（主任：徳坂正彦教授）

特発性男子不妊症の Methylcobalamin による長期の治療成績を報告する。

対象は21例で平均33歳である。不妊期間は平均4年6カ月である。精液所見は中央値が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下、あるいは活動精子率50%以下を示した症例である。投与量は1日3000 μg で、期間は6カ月～9カ月が11例、10～12カ月が4例、13～18カ月が3例、19カ月～30カ月が3例である。なお3例に Clomiphene citrate (25 mg/日) との併用を試みた。

治療成績、広川の試案した判定基準により、正常化0、改善5.6%、精子濃度のみの改善27.8%、活動精子率のみの改善0、不変、66.7%、悪化0であった。総合判定すると有効33.3%、不変66.7%、悪化0であった。Clomiphene citrate との併用で有効例を観察した。妊娠率は16.7%であった。本剤の長期投与で精子濃度の改善ができ、何らの副作用を認めなかった。男子不妊症の治療薬の少ない現在、Methylcobalamin は有効な薬剤と考えられる。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 80-86, 1987)

はじめに

不妊外来において、特発性の造精機能障害に対して薬物療法を行い、精液所見の改善がみられて妊娠に成功する症例を経験する。

しかし、同一の薬剤を使用した多数例の検討では、かならずしも成績は良くないのが現状である。造精機能障

害の原因が解明されていない特発性男性不妊症の治療で、治療薬剤の選択に難かしさを感じる。

最近非内分泌療法剤のなかで Methylcobalamin の臨床成績が目されている。薬物療法の治療効果をみる時、従来投与後3～4カ月で判定されていることが多い。今回、私たちは、Methylcobalamin について長期投与を試みた成績を報告する。

対象と方法

対象は当科不妊外来を受診した21名の男子不妊症患者である(表1)。年齢は26歳~42歳平均33歳である。不妊期間は1年4カ月~15年で、平均4年6カ月である。症例1と症例9は精索静脈瘤術後の症例で、それぞれ術後

7年、9年を経過するも精液所見の改善および妊娠に至らなかった症例である。その他は原因不明の特異性精子形成能不全症例である。21例の精巣の大きさについて、長径、短径を測定した。21例のそれぞれの平均は、左側で37.6±3.8mm×20.5±2.5mm、右側では38.4±3.5mm×20.4±2.0mmである。長径で5mm以上の左右差を

表 1 21例の臨床所見

| 症例 | 年齢 | 不妊期間 | 精 巣 の | | 精子濃度 (×10 ⁶ /ml) 中央値 (最高~最低) | 活動精子率 (%) 中央値 (最高~最低) | 血中ホルモン | | |
|---------|----|-------|---------------------|------------------------|--|--------------------------------|----------------|--------------|-------------|
| | | | 長径×短径 左 側 右 側 | FSH (mIU/ml) | | | LH (mIU/ml) | T (ng/ml) | |
| 未 治 療 群 | | | | | | | | | |
| 4 | 34 | 3年9カ月 | 36×21 37×21 | 24.4 (31.8~19.4) | 46 (57~42) | 3.9 | 8.9 | 6.10 | |
| 7 | 35 | 3年6カ月 | 32×18 33×19 | 21.2 (26~14.6) | 84 (89~64) | 11 | 7.7 | 7.89 | |
| 10 | 33 | 3年 | 38×21 37×22 | 10 (26~9.0) | 69 (78~44) | 3.4 | 9.2 | 6.4 | |
| 11 | 28 | 2年6カ月 | 34×20 34×20 | 8.8 (8.8~4.2) | 32 (71~20) | 6 | 7.3 | 8.41 | |
| 12 | 44 | 15年 | 40×28 39×21 | 21.2 (45.2~10.2) | 14 (24~4) | 5.3 | 5.5 | 7.54 | |
| 13 | 32 | 4年 | 34×17 38×18 | 11.4 (23.6~6.4) | 54 (60~51) | 14 | 5.6 | 8.00 | |
| 15 | 34 | 3年 | 40×23 42×24 | 7.3 (42.4~3.5) | 4 (16~4) | 8.5 | 7.4 | 4.38 | |
| 17 | 32 | 1年6カ月 | 41×22 42×22 | 18.0 (26.2~17.6) | 23 (30~21) | 9 | 9.4 | 7.99 | |
| 18 | 37 | 1年4カ月 | 36×21 37×21 | 59 (148.2~4.4) | 23 (92~18) | 4.8 | 7.5 | 5.47 | |
| 既 治 療 群 | | | | | | | | | |
| 1 | 34 | 8年 | 41×22 41×20 | 150.9 (192.8~118.4) | 2 (5~2) | 3.9 | 4.6 | 6.34 | 精索静脈 瘤術後 |
| 2 | 31 | 2年4カ月 | 31×16 34×16 | 10 (17.2~8.6) | 66 (75~62) | 10.8 | 8.6 | 5.31 | |
| 3 | 33 | 1年9カ月 | 41×20 45×25 | 42 (51.4~16.8) | 36 (38~23) | 13.3 | 7.4 | 6.31 | |
| 5 | 30 | 3年7カ月 | 39×20 41×20 | 5.7 (17.6~5.4) | 30 (33~21) | 13.7 | 15.7 | 4.26 | |
| 6 | 30 | 7年 | 39×19 38×20 | 1.5 (1.8~0.5) | 2 (6~0) | 12.1 | 7.2 | 4.91 | |
| 8 | 40 | 6年 | 38×22 39×22 | 13 (16~1.6) | 32 (79~9) | 14.3 | 12.4 | 9.72 | |
| 9 | 42 | 9年 | 37×20 40×21 | 13.8 (17~5.4) | 22 (51~10) | 8.8 | 7.2 | 5.87 | 精索静脈 瘤術後 |
| 14 | 34 | 7年 | 45×23 45×22 | 73.8 (75.2~34.0) | 26 (35~22) | 4.1 | 5.8 | 5.19 | |
| 16 | 30 | 3年6カ月 | 43×20 38×18 | 23.2 (28.6~11.6) | 40 (68~36) | 3.7 | 5.8 | 3.53 | |
| 併 用 群 | | | | | | | | | |
| 19 | 22 | 1年5カ月 | 33×18 36×18 | 2.7 (3.4~2.6) | 34 (43~6) | 3.5 | 7.6 | 6.35 | |
| 20 | 26 | 4年 | 40×21 38×20 | 6.4 (8.5~2.1) | 48 (49~45) | 4.6 | 3.4 | 8.78 | |
| 21 | 32 | 9年 | 32×19 32×19 | 0.01 (0.02~0) | 0 (0~0) | 24.4 | 25.1 | 6.71 | |

認められた症例および30mm以下の症例は1例もなく、左右精巣の大きさは正常であった。

血中ホルモン値をみると、無精子症に近い症例21はFSH 24.4mIU/ml, LH 25.1mIU/mlを示し、その他の20症例はFSH 3.4~14.3, 平均7.9±4.0mIU/ml, LH 3.4~15.7, 平均7.7±2.6mIU/ml, Testosterone 3.53~14.6, 平均6.43±1.62mIU/mlと正常範囲内である。

精液検査を全例3回施行し、その中央値が精子濃度40×10⁶/ml以下、あるいは精子活動率50%以下を示した症例である。精子濃度の内訳けをみると10×10⁶/ml以下の高度乏精子症7例、10×10⁶/ml以上40×10⁶/ml以下の乏精子症10例、40×10⁶/ml以上4例であった。精子活動率の内訳けをみると20%以下5例、20~50%12例、50%以上4例であった(表2)。

投与方法はMethylcobalamin 1日3000γを分3で6カ月以上投薬した。投与期間をみると、6~9カ月が11例、10~12カ月が4例、13~18カ月が3例、19カ月以上最長30カ月までが3例である(表3)。

投与例は3群に分けられて不妊症の治療でMethylcobalaminの投与がはじめての症例(未治療群)9例、Methylcobalamin投与前にすでに他剤の薬物療法を行っている症例(既治療群)9例、MethylcobalaminにClomiphene citrate (Clomid® 25mg/日)を併用した症例(併用群)3例となっている。

効果判定基準について

最近、広川らにより考案された基準に従って治療効果の判定を行った(表4)。正常化とは投与後に精子濃度が40×10⁶/ml以上かつ活動精子率が60%以上を示した場合をいう。改善とは、活動精子率が50%以上となり、精子濃度の増加を表4にみられるように投与前の精子濃度の区分に従って改善した場合をいう。他に精子濃度の

みの増加および活動精子率のみの増加の項目も設けた。そして不変、悪化とした。

以上の基準に従って、投与前の中央値と、投与後の追跡期間の後半における精液検査の3回から5回の値をとり、その中央値との比較を行い判定した。

成 績

(1) 未治療群の治療成績(表5)

正常化した例はみられなかった。改善例を1例認めた。症例の投与前の精子濃度は8.8×10⁶/ml 活動精子率は32%ときわめて不良であったが、投与後3カ月目の精液所見は26.2×10⁶/ml, 93%, 6カ月目は28.8×10⁶/ml, 92%と著明な改善を認めた。精子濃度のみの改善を認めたものは3例あり、症例12は、投与前値21.2×10⁶/mlが13カ月で69.8×10⁶/mlに、症例15は、7.3×10⁶/mlが8カ月の投与で10.6×10⁶/mlに、症例17は、18.0×10⁶/mlが9カ月の投与で50.2×10⁶/mlと著明な改善をみた。活動精子率のみの改善例はなかった。不変は5例であった。悪化例はなかった。未治療群の治療成績は9例中4例44.4%の有効率であった。

(2) 既治療群(表5)

正常化した例はみられなかった。また改善例も認められなかった。精子濃度のみの改善した症例は2例みられ、症例5は投与前精子濃度5.7×10⁶/mlときわめて不良であったが、8カ月の投与により20×10⁶/mlと増加してきた。症例9は、投与前値13.8×10⁶/mlが15カ月目に62.2×10⁶/mlと良好な値となり、19カ月の投与を行い、30.2×10⁶/mlと改善している(図1)。活動精子

表 4 臨床効果の判定基準

正常化：精子濃度4,000万以上で活動精子率60%以上。
改善：活動精子率50%以上で精子濃度の改善度は投与前の精子濃度を区分して判定。

| 投与前の精子濃度 | 投与後の精子濃度 |
|--------------------|---------------------------|
| 1,000万以下 | 1,000万台(やや改善) 2,000万以上 |
| 1,000万 } 2,000万 | 2,000万台(やや改善) 3,000万以上 |
| 2,000万 } 4,000万 | 4,000万以上 |

精子濃度のみの増加：「改善」での精子濃度の基準で判定。

活動精子率のみの増加：活動精子率50%以上。

不変：

悪化：

表 2 対象例の精液所見*

| 精子濃度(×10 ⁶ /ml) | 症例数 | 活動精子率(%) | 症例数 |
|----------------------------|-----|----------|-----|
| >40 | 4 | >50 | 4 |
| 40-10 | 10 | 50-20 | 12 |
| 10> | 7 | 20> | 5 |

* 投与前3回の中央値で判定

表 3 Methylcobalamin の投与方法

| 投 与 量 | 1日 3000γ(分3) | |
|---------|--------------|-----|
| 投 与 期 間 | 6カ月~9カ月 | 11例 |
| | 10カ月~12カ月 | 4 |
| | 13カ月~18カ月 | 3 |
| | 19カ月~30カ月 | 3 |

表 5 21例の治療効果

| 症 例 | 投与期間(月) | 効果判定 | 妊 娠 |
|------|---------|-----------|----------|
| 未治療群 | | | |
| 4 | 10 | 不 変 | |
| 7 | 12 | 不 変 | |
| 10 | 9 | 不 変 | |
| 11 | 7 | 改 善 | |
| 12 | 13 | 精子濃度のみの改善 | |
| 13 | 8 | 不 変 | |
| 15 | 8 | 精子濃度のみの改善 | |
| 17 | 9 | 精子濃度のみの改善 | 投与後9カ月目 |
| 18 | 6 | 不 変 | 投与後5カ月目 |
| 既治療群 | | | |
| 1 | 15 | 不 変 | |
| 2 | 9 | 不 変 | |
| 3 | 24 | 不 変 | |
| 5 | 8 | 精子濃度のみの改善 | |
| 6 | 8 | 不 変 | |
| 8 | 6 | 不 変 | |
| 9 | 19 | 精子濃度のみの改善 | |
| 14 | 12 | 不 変 | |
| 16 | 16 | 不 変 | 投与後10カ月目 |
| 併用群 | | | |
| 19 | 12 | 精子濃度のみの改善 | |
| 20 | 30 | 改 善 | |
| 21 | 7 | 不 変 | |

率のみの増加例はなかつた。不変は7例であつた。悪化例はなかつた。既治療群での治療成績は9例中2例22.2%の有効率であつた。

未治療群と既治療群とを合わせて治療成績をみると、改善は18例中1例5.6%、精子濃度のみの改善は18例中5例27.8%であつた。

以上より総合判定を行うと、有効6例(33.3%)、不変12例(66.7%)、悪化0であつた(表6)。

(3) 併用群の治療成績(表5)

改善が1例にみられた。この症例は症例20で投与前の精子濃度は $6.4 \times 10^6/ml$ 、活動精子率48%で、30カ月の投与を行い、精子濃度 $24.8 \times 10^6/ml$ 、活動精子率54%と改善を示した(図2)。精子濃度のみの改善例が1例みられた。症例19で投与前 $2.7 \times 10^6/ml$ ときわめて不良であつたが、12カ月の投与で $10.2 \times 10^6/ml$ と1000万台に増加した。無精子症に近い症例21は不変であつた。

(4) 妊娠率について(表7)

未治療群は9例中2例が妊娠に成功し、妊娠率は22.2%であつた。既治療群では9例中1例が妊娠に成功し、

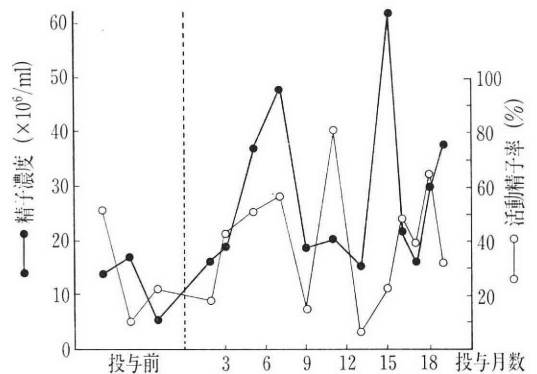


図1 Methylcobalamin 長期投与例 精液所見の推移

症例9: 42歳。9年前に精索血管高位結紮術を行った。
術後、精液所見の改善がみられず種々の薬剤を投与した。
Methylcobalaminにより精子濃度のみの改善を認めた。

表 6 治療成績

| 判 定 | Methylcobalamin 投与群 | | | 併用群 (Clomid®) |
|------------|---------------------|------|-------|---------------|
| | 未治療群 | 既治療群 | 比率 | |
| 正 常 化 | 0 | 0 | | 0 |
| 改 善 | 1 | 0 | 5.6% | 1 |
| 精子濃度のみの改善 | 3 | 2 | 27.8% | 1 |
| 活動精子率のみの増加 | 0 | 0 | | 0 |
| 不 変 | 5 | 7 | 66.6% | 1 |
| 悪 化 | 0 | 0 | | 0 |
| 計(例) | 9 | 9 | | 3 |

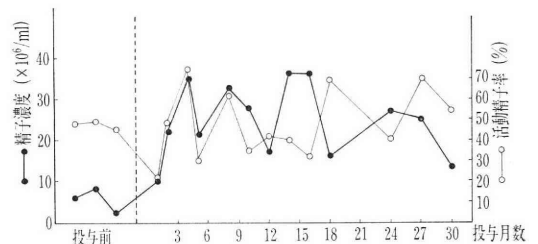


図2 Methylcobalamin と Clomiphene citrate 併用長期投与例の精液所見の推移

症例20: 26歳。精子濃度がきわめて不良なため最初から Clomiphene citrate との併用を試みた。
効果の持続がみられ、改善の症例である。

表 7 妊娠率

| | | |
|------|------|-------|
| 未治療群 | 2/9 | 22.2% |
| 既治療群 | 1/9 | 11.1% |
| 計 | 3/18 | 16.7% |

併用群の妊娠例はない。
 * 妊娠例の妊娠までの月数
 5カ月 } 各1例
 9カ月 }
 10カ月 }

妊娠率は11.1%であった。総合すると18例中3例、16.7%の妊娠率であった。なお併用群3例は妊娠に至っていない。

妊娠例の3例を紹介する

症例17は1年6カ月の不妊で来院した。精子濃度 $18.2 \times 10^6/ml$ 、精子活動率17%と不良であった。他剤の薬物療法により第1児を得た。その後1年4カ月たつても2人目が出来ないと再来院した。この時の精子濃度は $18 \times 10^6/ml$ 、精子活動率23%と不良で Methylcobalamin を開始した。投与後6カ月目に $50.2 \times 10^6/ml$ 、7カ月目に $57.8 \times 10^6/ml$ と著明に増加し、9カ月目に妊娠に成功し、第2児を得た。活動精子率の改善はみられなかった。

症例18は、投与前の精子濃度は $59 \times 10^6/ml$ と良好で、活動精子率が23%と不良であった。6カ月投与したが、活動精子率の改善はみられなかった。しかし、投与後5カ月目に妊娠に成功し、児を得た。著者らの判定は不変である。

既治療群の症例16は3年6カ月の不妊で来院した。一度流産をしている。精子濃度 $10.2 \times 10^6/ml$ 、精子活動率39%で、他剤にて約2年7カ月薬物療法を行ったが、妊娠しなかった。本剤開始時、精子濃度 $23.2 \times 10^6/ml$ 、精子活動率40%であった。投与後10カ月に妊娠に成功し、第1児を得た。本症例の投与後の精液所見の推移を図3に示す。図のごとく12カ月以降 $30 \times 10^6/ml$ 以上の精子濃度を認めて増加傾向をみるが、著者らの判定では不変とした。活動精子率についても不変と判定した。

(5) 副作用について

Methylcobalamin を6カ月以上、単独では最長24カ月間、Clomiphene citrate との併用では30カ月間の長期投与を行って、全例、何らの副作用を認めなかった。

考 案

男子不妊症のなかで原因不明のいわゆる特発性造精機能不全症が占める割合は、最近の守殿²⁾の報告によれば81.6%と高率にみられている。これらの多くの症例が薬

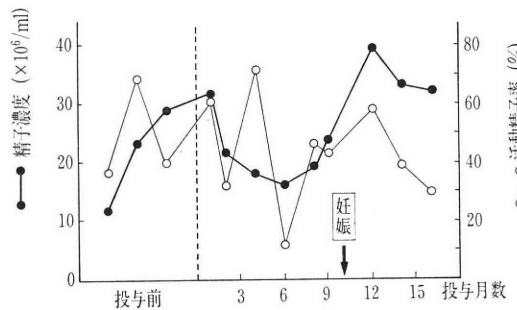


図 3 Methylcobalamin 長期投与例 精液所見の推移

症例16: 30歳。既治療群で Methylcobalamin により精子濃度の改善傾向をみるが著者らの判定基準により不変とした症例である。投与後10カ月に妊娠に成功している。

物療法の対象となる。従来、治療方針としてまず非内分泌療法より開始し、効果がみられなければ、内分泌療法を単独あるいは併用して行うことが一般的である³⁾。治療薬剤については、今のところ HCG・HMG 療法を除いてどの薬剤を選択するかは各人の経験で投与されているのが現状である。

今回、使用した Methylcobalamin の男子不妊症へ応用されたきっかけは、1962年 Sharp⁴⁾が乏精子症を有していた悪性貧血の患者に V-B₁₂ を投与したところ、貧血の改善とともに精液所見も改善したとの報告からである。Methylcobalamin の薬理作用については、中沢ら⁵⁾は、CH₃-B₁₂ が生体内のメチル基転移反応に関与し、チミンの合成から DNA 合成に関与し、蛋白合成を促進すると報告している。しかし、精巣機能への役割については解明されていない。木村ら⁶⁾は精漿内 V-B₁₂ の濃度を測定し、投与後で有意の上昇を認めたこと、そして精子濃度および精子運動率の顕著な効果が認められたことから、Methylcobalamin が精巣および副性器でも重要な役割を演じていると述べている。奥山ら⁷⁾、磯山ら⁸⁾は Methylcobalamin の投与前後で FSH, LH, Testosterone に変動がみられなかったことから下垂体精巣系の機序を介したのではなく、直接、精巣副性器へ作用したものと推定している。

Methylcobalamin の治療成績は木村ら⁶⁾によると1500γ/日を3カ月投与し、精子数の増加したものが79.5%、投与前の2倍以上の増加したものが41.1%、そして 100×10^6 未満の症例でも36%がそれ以上に増加している。運動率の改善をみると、投与前値55%未満であった症例のうち50.8%がそれ以上の改善をしている。これらの結果から、特に精子数の増加に顕著な効果を見ると強

調している。奥山ら⁷⁾は3000 γ /日の14週以上の投与で精子濃度の改善が44%、運動率の改善が43%みられたことを、また磯山ら⁸⁾は1500 γ /日の4週から24週投与で、精子濃度の有効率は19.2%であったが、精子数は30.8%、運動率は34.6%の有効率を述べている。各施設により投与量、投与期間、そして判定基準が異なるため、臨床成績を比較することはむずかしいが、精子濃度と運動率の改善が期待できる薬剤であることが一様に評価されている。

従来、不妊治療剤の効果判定は投与後3~4カ月で行われており、長期投与例の成績についての報告は少ない。寺田ら⁹⁾は、本剤の1500 γ /日を6カ月~12カ月投与し、精子濃度で12.1%、運動率15.2%の有効率を報告している。著者らは3000 γ /日を6カ月以上、最長30カ月投与し、精液所見の改善例を5.6%、精子濃度のみの改善例を27.8%にみている。総合判定すると、有効例33.4%、不変例66.6%、悪化例0%であった。少ない経験ではあるが、長期投与により一部の症例で精液所見、特に精子濃度の改善が期待できることが示唆された。一方長期投与例のなかに、投与後数カ月の早期で精液所見の改善をみたものが継続投与により徐々に投与前値と変わらない結果を示した症例がみられている。その効果判定に苦慮し、改善例のなかに含めなかつた。効果判定を行うにあたり、判定の時期、精液検査の回数、検査値の変動幅等の考慮が重要である。正常と思われる健康な男子においても精液所見の変動がかなりみられることが報告されており、Paulsen ら¹⁰⁾によると数百万/ml~1億7000万/mlの変動がみられている。この点からも効果判定の難しさが伺える。広川ら¹¹⁾は精液所見を単に平均値で示して治療前後の効果論ずることは望ましくないとし、分布型に依存しない検査法の一つである Mann-Whitney の U-Test で解析を試みている。また、守殿は Wilcoxon の順位和検定を用いて全体の傾向を考慮して有意性を検討している。

Methylcobalamin と他剤との併用した成績の報告は見当らない。私たちは Methylcobalamin の精巣および副性器への直接効果と合わせて Clomiphene citrate の投与によりゴナドトロピンの分泌亢進が造精機能を促進すること¹²⁾を期待し、精子濃度のきわめて不良な3例に併用を試みた。症例20では、図2のように4カ月目で精子濃度および精子活動率ともに著明な効果がみられ、以後変動がみられるが一定の効果が持続し、30カ月目の現在、投与を続けている。しかし、妊娠に至っていない。投与前のホルモン値は FSH 4.6mIU/ml, LH 3.4mIU/ml, T 8.78ng/ml で、投与後21カ月目は FSH 30.9mIU/ml, LH 39.1mIU/ml, T 11.1ng/ml と現在高ゴナドトロピ

ンの状態である。特に副作用を認めていない。症例19でも前述したように、投与前の精子濃度が2.7 $\times 10^6$ /ml ときわめて不良であったが、投与後10 $\times 10^6$ /ml 以上の精子濃度が得られている。精液所見の不良例に一度試みてよい併用薬剤の一つと考えている。

妊娠率をみると寺田らは33例中4例12%、木村らは73例中17例23%である。自験例は18例中3例16.7%であった。特に、未治療例の妊娠率は22.2%と、木村らと同程度の高い妊娠率を示した。

結 語

1. 藤沢市民病院において、特発性男子不妊症21例に、Methylcobalamin 3000 γ /日を6カ月以上30カ月までの投与を行った。なお3例は、Clomiphene citrate (25mg/日)との併用を行った。

2. 治療成績は、有効6例33.3%、不変12例66.7%、悪化例なしであった。妊娠率は16.7%であった。

3. 本剤の長期投与により特に精子濃度の改善が期待でき、全例に何ら副作用を認めず、安全な薬剤である例と思われた。また Clomiphene citrate との併用で有効を観察している。

本論文の要旨は第93回日本不妊学会関東地方部会にて発表した。また Methylcobalamin はエーザイ K. K. より提供された。

文 献

- 1) 広川 信, 岩本晃明: 精索靜脈瘤の治療 内精索血管群高位結紮術について, 造精障害の病態と治療, p 114-139, 医学教育出版社, 東京, 1985.
- 2) 守殿貞夫: 特発性男性不妊, 造精障害の病態と治療, p 141-157, 医学教育出版社, 東京, 1985.
- 3) 石神襄次: 男子不妊の治療, 臨泌31: 475-489, 1977.
- 4) Sharp, A. A. and Witts, L. J.: Seminal vitamin B₁₂ and sterility. Lancet, 2: 779-80, 1962.
- 5) 中沢恒幸, 吉羽喜久江, 高杉 正: 脳由来株細胞のビタミン B₁₂ 関与メチル基転移酵素の誘導について, ビタミン, 42: 193-197, 1970.
- 6) 木村正一, 光川史郎, 松田尚太郎, 石川博夫, 折笠精一: 乏精子症の精子数, 精子運動率に対する methylcobalamin の効果, 日不妊会誌, 26: 408-413, 1981.
- 7) 奥山明彦, 園田孝夫: 男子不妊症に対するメチュバル® (Methylcobalamin) 投与の経験, 基礎と臨床, 17: 1771-1774, 1983.
- 8) 磯山理一郎, 川井修一, 清水芳幸, 原田宏行, 龍原博史, 馬場良和, 酒徳治三郎: 男子不妊症

に対する Methylcobalamin (CH₃-B₁₂) の使用経験, 泌尿紀要, 30: 581-586, 1984.

- 9) 寺田為義, 里見定信, 風間泰蔵, 石川成明, 片山 喬: 男子不妊症の治療成績, 日不妊会誌, 30: 481-488, 1985.
- 10) Paulsen C. A.: Clinical Reproductive. Endocrinology, p 64, New York, Churchill Livingstone, 1985.
- 11) 広川 信, 岩本晃明, 佐藤和彦, 松下和彦, 朝倉茂夫: 男子不妊症に対する Pentoxifylline の臨床効果—U-Test による薬剤効果の評価について—. 日不妊会誌, 26: 57-63, 1981.
- 12) 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: 177-183, 1983.

Effect of long term methylcobalamin therapy on idiopathic male infertility

**Teruaki Iwamoto, Akira Iwasaki,
Makoto Hirokawa, Kazuhiko Matsushita*
and Shigeo Asakura****

Department of Urology, Fujisawa City Hospital

*Department of Patholgy, Fujisawa City Hospital

**The Private Practice of Urology

We reported the effectiveness of Methylcoba-

lamin 3000 γ /day for 6 to 30 months in nineteen infertile men with idiopathic ologozoospermia. Clomiphene citrate (25mg/day) with this drug was administered however to three patients with severe oligozoospermia. The judgement of the effectiveness was made by comparision median sperm concentration and sperm motility of three times semen analyses before the administration with median of the latter half three to five times data after the administration.

Judging by our criteria, both sperm concentration and motility increased in 1 cases (5.6%), only sperm concentration increased 5 cases (27.8%) and 11 cases (66.7%) were unchanged. No cases were aggravated. Accordingly, the effectiveness rate was as high as 33.3%. The pregnancy was established in 16.7%.

By long term administration in Methylcobalamin, improvement of sperm concentration is expected and no patients had side effects. We experienced beneficial effect in combination drug treatment (Metylcobalamin and Clomiphene citrate) was noted.

We believe Methylcobalamin is an effective drug in infertile male with idiopathioc oligozoospermia.

(受付: 昭和61年2月21日)

精液性状に及ぼす Kallikrein-Vitamin B₁₂ 併用療法の臨床効果について

Effects of a Combination Therapy of Kallikrein and Methylcobalamine
on Sperm Count and Its Motility in Men with Oligozoospermia
and / or Asthenozoospermia

北海道大学医学部産科婦人科学教室

櫻木 範明* 田中 俊誠 及 川 衛
Noriaki SAKURAGI Toshinobu TANAKA Mamoru OIKAWA
藤本 征一郎 一戸 喜兵衛
Seiichiro FUJIMOTO Kihyoe ICHINOE

Department of Obstetrics and Gynecology Hokkaido University
School of Medicine Sapporo, Japan

乏精子症男子 (N=16) に Kallikrein (120KU/日) ならびに Vitamin B₁₂ の併用療法を施行した。治療前の精子濃度、精子運動率の平均は、それぞれ $32.5 \times 10^6/\text{ml}$, 35.8% であつた。治療後には精子濃度、精子運動率がそれぞれ $49.7 \times 10^6/\text{ml}$ ($P < 0.05$), 64.6% ($P < 0.01$) と有意に増加した。有効例についてみると、精子濃度は 2~4 カ月の服用で最高値に達し、5 カ月以上の服用では再び低下してくる傾向が認められた。精子運動率については、服用期間による増減は認められなかつた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 87-90, 1987)

緒 言

不妊の第一義的原因として、男性側因子の占める割合は 30~40% と報告されている^{1,2)}。男性不妊の病因としては特発性の造精機能障害が約 70% を占めるとされている³⁾。現在、特発性乏精子症に対して精子濃度や精子運動率の改善のために、hMG-hCG, clomiphene, Vitamin E および Vitamin B₁₂ などが使用されている。今回われわれは、精液性状の改善に有用とされている⁴⁾ Kallikrein と Vitamin B₁₂ とを併用して服用させ、精子濃度ならびに精子運動率に及ぼす効果を検討し、若干の知見をえたので報告する。

対象ならびに方法

対象は不妊を主訴に北大内分泌不妊外来を受診した夫婦のうち、精液検査にて精子濃度の低下、もしくは精子運動率の低下が認められた男子 16 症例である。本研究において女性側の不妊原因有無については考慮せずに、精

液性状改善についてのみを指標として検討した。

今回の精液検査で精子濃度が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下であつた場合には数週間後に再検し、それらの結果を総合して乏精子症を診断した。精子濃度が $40 \times 10^6/\text{ml} \sim 20 \times 10^6/\text{ml}$ を軽度、 $20 \times 10^6 \sim 10 \times 10^6/\text{ml}$ を中等度、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以下を高度乏精子症とした。精子運動率は 60% 以上を正常、50% 以下を低下、50~60% を境界値とした。精液は 7 日間の禁欲後に用手法により滅菌カップに直接全量を採取させ、2 時間以内を原則として、Makler の算定盤を用いて精子濃度、運動精子数、奇形率を算定した。

カリクレイン (Kallikrein®, バイエル)、併用薬剤のビタミン B₁₂ (Methylcobal®, エーザイ) の 1 日投与量はそれぞれ 12 錠 (120KU), 6 錠とし、1~10 カ月間 (平均 4.1 カ月) 連日服用させた。

以下の基準に従つて効果を判定した。

精子濃度 ; 精子濃度が $10 \times 10^6/\text{ml}$ 未満のものは $20 \times 10^6/\text{ml}$ 以上へ増加した場合、 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 以上のものでは 100% 以上の増加を認めた場合を有効とした。

精子運動率；精子運動率が50%以下から60%以上に増加した場合を有効とした。

なお、得られたデータの統計学的検討は paired t-test により行つた。

結 果

16例の治療開始前の精子濃度は $1 \times 10^6 \sim 100 \times 10^6$ /ml, 運動率は7.5~80%であつた。

精子濃度の治療前値は 32.5 ± 24.2 (Mean \pm SD) ($\times 10^6$ /ml) であつた。判定基準により有効と認められたのは16例中7例 (43.7%) であつた。治療後は, 49.7 ± 29.7 ($\times 10^6$ /ml) と有意 ($P < 0.05$) な増加を認めた(表1, 図1)。服用期間と精子濃度の関係を見ると, 2~4カ月間の服用で最高となり, 5カ月間以上の服用では

再び低下する傾向が認められた(図2)。精子運動率に関する有効率は16例中10例 (62.5%) であつた。治療前の 35.8 ± 17.7 (%) から服用後の 64.6 ± 26.6 (%) へと有意 ($P < 0.01$) に増加した(表1, 図3)。精子濃度とは異なり, 一定期間以上長期に服用した場合に運動率が減少するというような現象は認められなかつた(図4)。

考 察

男子不妊症の原因としては, 原発性睾丸機能不全症, 低ゴナドトロピン性性腺機能低下症, 精索静脈瘤, 逆行性射精, および炎症などを除いた特発性の精子減少症が最も多い。現在, 特発性乏精子症に対しては従来 anti-estrogen 剤 (clomiphene, tamoxifen), hMG-hCG, ATP, androgen, ビタミン B₁₂ およびビタミン E などが用いられてきたが, 有効性について一定の見解がえられているものは少ない。精液中への Kallikrein の添加により運動率が上昇することが報告されて以来⁴⁾, 精子濃度の低下や運動率の低下が認められる男子不妊症に対して盛んに Kallikrein が使用されるようになった。しかし, この薬剤についてもその効果に関して有効とするものと無効とするものに意見が分かれている。Schill^{5,6)}, Ishigami & Kamidono⁷⁾, Homonnai⁸⁾ および Sato⁹⁾ などは有効であるとし, 一方, Batterink et al.¹⁰⁾, Comhaire et al.¹¹⁾ などは無効であると報告している。

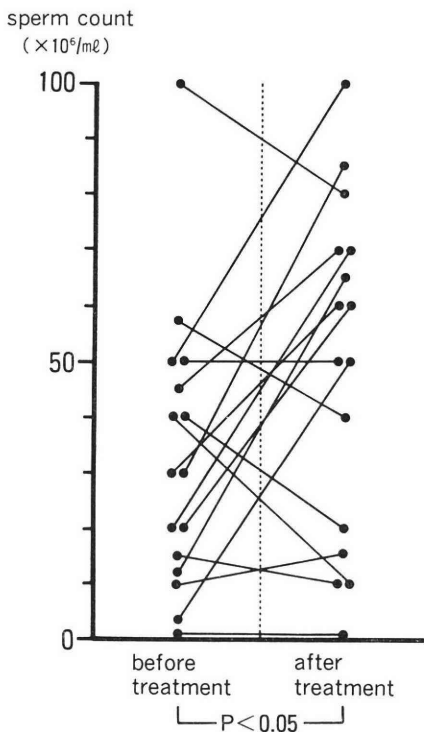


図1 Kallikrein 服用前後における精子濃度

表1 Kallikrein 服用前後における精子濃度ならびに精子運動率

| | before treatment | after treatment |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|
| sperm count ($\times 10^6$ /ml) | $32.5 \pm 24.2^*$ | $49.7 \pm 29.7^*$ |
| motility rate (%) | $35.8 \pm 17.7^{**}$ | $64.6 \pm 36.6^{**}$ |

* : $P < 0.05$

** : $P < 0.01$

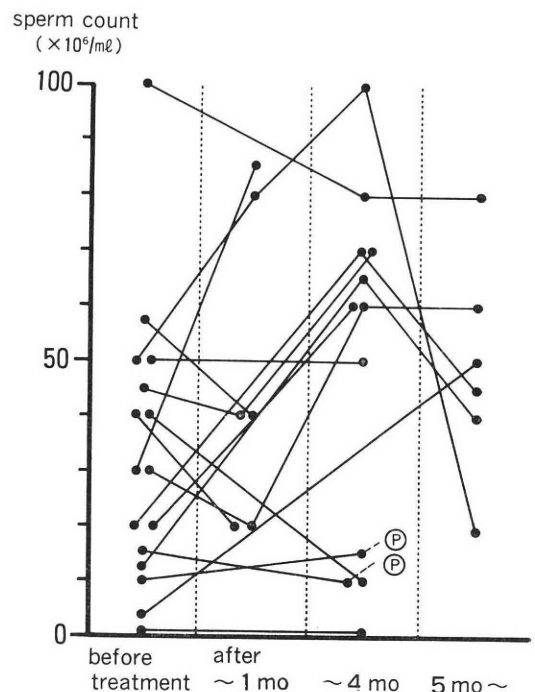


図2 Kallikrein の服用期間と精子濃度との関係

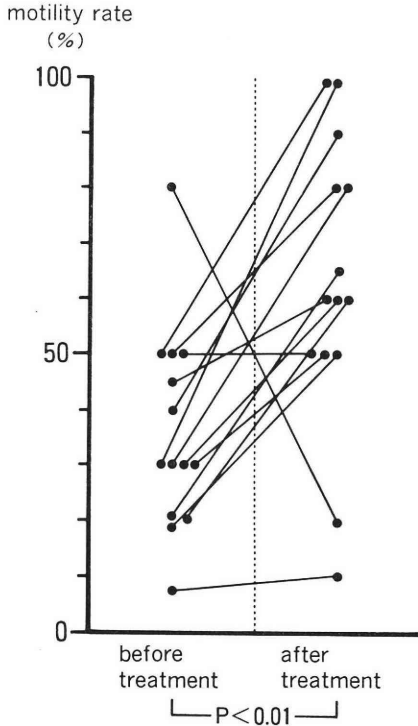


図 3 Kallikrein 服用前後における精子運動率

今回われわれが得た結果は前者の結論を支持するものであった。Schill¹²⁾は90例の特発性乏精子症に対し Kallikrein と placebo を用いた double-blind test を施行し、Kallikrein の精子濃度に対する有効性を確認している。Kallikrein が精液性状を改善するメカニズムとしては、Kallikrein が kininogen から kinin を遊離させることにより細胞膜の透過性が亢進する、血管が拡張し血流が増加することが考えられる。さらに、血中 LH, PRL, testosterone レベルへの影響も報告されており¹³⁾、これらホルモンの変動が精液性状の改善に貢献しているものと考えられる。しかし、Kallikrein は血中のそれらホルモンのレベルに何ら影響を与えないとの報告¹⁴⁾もあり今後の検討がまたれる。臨床効果としては精子濃度ならびに運動率の著明な改善があげられるが、前進運動精子が増加するとの報告が多い¹⁵⁾。

参考までに Schill による特発性乏精子症の治療スケジュールを引用する¹⁵⁾。

まず、Kallikrein を服用させる。3～6カ月間の治療によつても改善が認められなければ、tamoxifen などの抗エストロゲン剤を3～6カ月間服用させる。それでも精液性状の改善がみられなければ hMG-hCG に切り換えるとしている。

Kallikrein が無効であったとする報告の中で、Batte-

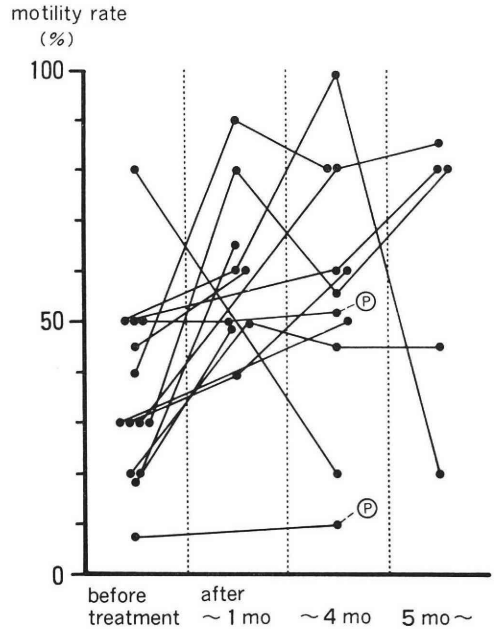


図 4 Kallikrein の服用期間と精子運動率との関係

rink et al.¹⁰⁾は Kallikrein 服用によつても精液性状の改善が認められないままに妊娠を成立させた2例の乏精子症男子を報告している。これは Kallikrein の服用終了後に効果は出現する“Late Effect”によるものとは考えにくいとしている。本研究においても2例の乏精子症患者（1例は精子濃度 $10 \times 10^6/ml$ 、運動率50%、他の1例は精子濃度 $15 \times 10^6/ml$ 、運動率12.5%）が Kallikrein を服用し、服用終了後それぞれ2カ月、3カ月後に妊娠が成立した。妊娠を成立させた時点での精液の性状は不明だが、Kallikrein 服用中の精液検査では改善は認められなかった。この妊娠成立に関して Kallikrein の果たした役割は現在のところ不明である。

今回の成績から、Kallikrein が精子濃度、運動率の改善をもたらすことが示された。しかし、Kallikrein が妊娠率を増加させるか否かについては、今後多数例による検討が必要と思われる。

文 献

- 1) Israel, S. L. and Balin, H.: Sterility, General considerations, in Diagnosis and treatment of menstrual disorders and sterility. Israel, S. L (Ed), Harper & Row, Pub., 1967.
- 2) Behrman, S. J. and Kistner, R. W.: A rational approach to the evaluation of infertility in Progress in Infertility. Behrman, S. J. and Kistner, R. W. (Eds), Little Brown & Co., Boston, 1968.

- 3) 寺田為義, 里見定信, 風間泰蔵, 石川成明, 片山 喬: 男子不妊症の治療成績, 日不妊会誌, 30: 481, 1985.
- 4) Schill, W. B., Braun-Falco, O. and Haberland, G. L.: The possible role of kinins in sperm motility. *Int. J. Fertil.*, 19: 163, 1974.
- 5) Schill, W. B.: Improvement of sperm motility in patients with asthenozoospermia by kallikrein treatment. *Int. J. Fertil.*, 20: 61, 1975.
- 6) Schill, W. B.: Kallikrein Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein. Results of a doubleblind study. *Archiv Androl.*, 2: 163, 1979.
- 7) Ishigami, J. and Kamidono, S.: Clinical experiences with Kallikrein in male infertility. In: *Kininogenases, Kallikrein* (2nd edn.), pp 155-165, Schattauer, Stuttgart-New York, 1975.
- 8) Homonnai, Z. T., Shilon, M. and Paz, G.: Evaluation of semen quality following Kallikrein treatment. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 9: 132, 1978.
- 9) Sato, H., Mochimaru, F., Kobayashi, T., Iizuka, R., Kaneko, S. and Moriwaki, C.: Kallikrein treatment of male infertility. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 120A: 529, 1979.
- 10) Batterink, G. J., Kremer, J. and Jager, S.: The effect of oral Kallikrein treatment on sperm motility in asthenozoospermia. *Int. J. Androl.*, 6: 173, 1983.
- 11) Comhaire, F. and Vermeulen, L.: Effect of high dose oral Kallikrein treatment in men with idiopathic subfertility; evaluation by means of in vitro penetration test of zona free hamster ova. *Int. J. Androl.*, 6: 168, 1983.
- 12) Schill W. B.: Kallikrein as therapeutic means in the treatment of male infertility. In: *Kininogenases, Kallikrein*, 4, pp 251-280, Schattaur, Stuttgart New York, 1977.
- 13) Schill, W. B. and Rjosk, H. K.: Serum levels of LH, FSH, prolactin and testosterone in oligo-and asthenozoospermic men during Kallikrein treatment. *Acta, Endocrinol. (Kbh.)*, Suppl 225: 96, 1979.
- 14) 田代博紹, 宮本憲治, 星野真希夫, 吉田英機,

今村一男: 男性不妊症に対する Kallikrein (TKT-100) の臨床的効果と末梢血中 LH, FSH および testosterone 値の変動について, 日不妊会誌, 30: 298, 1985.

- 15) Schill, W. B.: Medical treatment of idiopathic normogonadotropic oligozoospermia. *Int. J. Androl.*, 51 Suppl 135, 1982.

Effects of a combination therapy of Kallikrein and methylcobalamine on sperm count and its motility in men with oligozoospermia and/or asthenozoospermia

Noriaki Sakuragi, Toshinobu Tanaka, Mamoru Oikawa, Seiichiro Fujimoto and Kihyoe Ichinoe

Department of Obstetrics and Gynecology
Hokkaido University School of Medicine
Sapporo, Japan

A combination therapy of Kallikrein and methylcobalamine (Methycobal) was performed on 16 patients with oligozoospermia and/or asthenozoospermia. Sperm count and sperm motility before the therapy was $32.5 \times 10^6/\text{ml}$, 35.8%, respectively. Both the count ($P < 0.05$) and the motility ($P < 0.01$) increased significantly 1-10 months (Mean; 4.1 months) after the treatment. In men, whose sperm quality and quantity were improved after the treatment, sperm concentration tended to become highest after 2-4 months' administration of the drugs, and to decrease to basal values in patients who took the medicines for more than 5 months. However, sperm motility did not reduce even after a continuous longer administration of the drugs in patients with asthenozoospermia, whose sperm motility was once improved after short period of use of them.

From these data, it was shown that a combination therapy of Kallikrein and Metycobal was effective for patients with oligozoospermia and/or asthenozoospermia.

(受付: 昭和61年8月2日特掲)

停留辜丸の遺伝性

Inheritance of Cryptorchidism

千葉大学医学部泌尿器科 (主任: 島崎 淳教授)

角谷 秀典 高原 正信 片海 善吾
Hidenori SUMIYA Masanobu TAKAHARA Zengo KATAUMI
川村 健二 布施 秀樹 柳 重行
Kenji KAWAMURA Hideki FUSE Shigeyuki YANAGI
伊藤 晴夫 島崎 淳
Haruo ITO Jun SHIMAZAKI

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

千葉大学医学部泌尿器科で術後経過観察中の停留辜丸209例について遺伝的事項を検討した。

- 1) 停留辜丸を血族にみとめたものは、13例 (6.22%) であり、両側停留辜丸では片側停留辜丸に比べ、約2倍の頻度でみとめられた。
- 2) 千葉県柏市の1歳6カ月検診受診者20,586人中21人 (0.10%) に停留辜丸をみとめた。
- 3) 近縁係数1/2の血族における頻度、兄弟に予期される相対頻度の期待値と実測値から、本症は多因子性遺伝を示すと考えられる。
- 4) 多因子性遺伝の遺伝力は76%と推定された。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 91-94, 1987)

緒言

停留辜丸は男子性器の先天異常の中で最も多い疾患である¹⁾。しかし、本症の遺伝については不明であるが、家族内での本症の多発例は報告されている^{2,4)}。今回、我々は停留辜丸の頻度および遺伝的要素について検討した。

対象

症例は昭和58年より昭和60年までの3年間に、千葉大学医学部泌尿器科で定期的に術後経過をみている症例209例である。このうち単辜丸と判明した症例は20例である。両側停留辜丸43例、左停留辜丸75例、左単辜丸14例、右停留辜丸71例、右単辜丸6例である。

また、本邦における停留辜丸の頻度についての報告はなく、停留辜丸の遺伝性に関する考察のため、その頻度について調べた。対象は千葉県柏市で昭和53年から昭和59年までの7年間に実施した1歳6カ月検診を受診した

幼児20,586人である。

結果

停留辜丸209例のうち、家族歴に血族結婚のあるものは2例 (0.96%) であつた。母親の妊娠歴には全例とくに異常をみとめなかつた。生下時の両親の年齢は父の平均30.5歳、母の平均28.0歳と比較的高値であつた(図1)。

合併症および既往症はソ径ヘルニア手術が6例 (2.87%) と最も多く、そのうち5例は他医にてすでに同側のソ径ヘルニア手術をうけていた。尿路奇形の合併は尿道下裂3例 (1.44%)、馬蹄腎、両側膀胱尿管逆流、真性包茎各1例であつた。その他の先天異常としては、ダウン症候群、口唇・口蓋裂などの正中奇形症候群、内反足、髄膜瘤、白内障、脳性麻痺などであつた(表1)。

千葉県柏市の1歳6カ月検診受診者20,586人中21人に停留辜丸のあることが医師により確認されている。したがって、1歳6カ月児における停留辜丸の頻度 (q) は0.10%である。

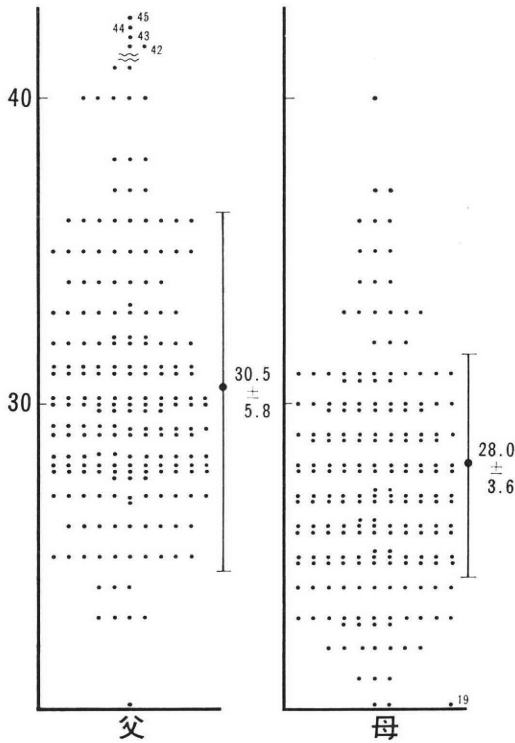


図 1 生下時の両親の年齢

表 1 合併症・既往症

| | | | |
|---------------------------|-----|-------------|-----|
| 鼠径ヘルニア手術 (患側 5 例, 健側 1 例) | 6 例 | 内 反 足 | 1 例 |
| 遺 尿 症 | 6 例 | 髄 膜 瘤 | 1 例 |
| 喘 息 | 5 例 | 白 内 障 | 1 例 |
| 尿 道 下 裂 | 3 例 | 虹 彩 後 癒 着 | 1 例 |
| 熱 性 け い れ ん | 3 例 | て ん か ん 視 | 1 例 |
| 腸 重 積 | 2 例 | 内 斜 | 1 例 |
| 馬 蹄 腎 | 1 例 | 脳 性 麻 痺 | 1 例 |
| 両側膀胱尿管逆流 | 1 例 | 手 足 口 病 | 1 例 |
| 真 性 包 茎 | 1 例 | 脳 髄 膜 炎 | 1 例 |
| 陰 茎 変 形 | 1 例 | トキソプラズマ肝炎 | 1 例 |
| 先 天 性 喘 鳴 (喉頭声門下腫瘍) | 1 例 | 直 腸 ポ リ ー プ | 1 例 |
| ダ ウ ン 症 候 群 | 1 例 | 川 崎 病 MCLS | 1 例 |
| 正 中 奇 形 症 候 群 | 1 例 | | |

当科において術後経過をみている 209 例について、本人および父母に面接により男性血縁者数とそのうちの停留率丸を有する数を調べた。この際、停留率丸の有無が不明の場合は血縁者数から除いた。父親に停留率丸をみとめたものは 209 人中 2 人 (0.96%)、兄弟にみとめたものは 124 人中 3 人 (2.42%) であり、近縁係数 1/2 の血族全体では 333 人中 5 人 (1.50%) であつた。父方のおじ 405

表 2 血縁者における停留率丸の頻度

| | | | |
|--------------|-------------|---------|--|
| 1) 近縁係数: 1/2 | | | |
| 父 | 2 人/209 人 | (0.96%) | |
| 兄弟 | 3 人/124 人 | (2.42%) | |
| | 計 5 人/333 人 | (1.50%) | |
| 2) 近縁係数: 1/4 | | | |
| 父方おじ | 4 人/405 人 | (0.99%) | |
| 母方おじ | 0 人/290 人 | (—) | |
| おい | 0 人/93 人 | (—) | |
| | 計 4 人/788 人 | (0.51%) | |
| 3) 近縁係数: 1/8 | | | |
| いとこ | 4 人/437 人 | (0.92%) | |

表 3 血縁者に停留率丸をみとめた症例

| | |
|--------|-----|
| 両側停留率丸 | 5 例 |
| 左停留率丸 | 6 例 |
| 右停留率丸 | 2 例 |

* いずれも停留率丸であり、単率丸ではみとめられなかった。

表 4

| | |
|--|--|
| 1) 近縁係数 1/2 の血族における頻度 = \sqrt{q} | |
| q: 一般集団における頻度 | |
| $q = 0.001$ $\sqrt{q} = 0.032 = 3.2\% \dots$ 自験例 1.50% | |
| 2) 兄弟に予期される相対頻度 (血族中の頻度 / 一般集団中の頻度) = $\frac{1}{\sqrt{q}}$ | |
| $q = 0.001$ $\frac{1}{\sqrt{q}} = 31.25 \dots$ 自験例 $\frac{2.42}{0.1} = 24.2$ | |

人中 4 人 (0.99%) に停留率丸をみとめたが、母方のおじ及びおいにはみとめなかつた。男のいとこ 437 人中 4 人 (0.92%) に停留率丸をみとめた (表 2)。停留率丸を血族にみとめた症例は 13 例 (6.22%) であり、両側停留率丸 5 例、左停留率丸 6 例、右停留率丸 2 例であり、単率丸症例には血縁者に停留率丸をみとめなかつた (表 3)。また、複数の血縁者にみとめた症例もなかつた。

多因子性遺伝の検定として⁵⁾、近縁係数 1/2 の血族における頻度は、集団中における頻度を q とした場合、および \sqrt{q} でもとめられる。自験例の場合、本邦における停留率丸の頻度 q は 0.001 であり、 $\sqrt{q} = 0.032 = 3.2\%$ となる。一方、自験例 209 例で調べた頻度は 1.50% であり、期待値 3.16% と近い値である。また、同じく多因子性遺伝の場合、兄弟に予期される相対頻度は $\frac{1}{\sqrt{q}}$ でもとめられる。その期待値は 31.25 であり、自験例での実測値は 24.2 で近似の値である (表 4)。

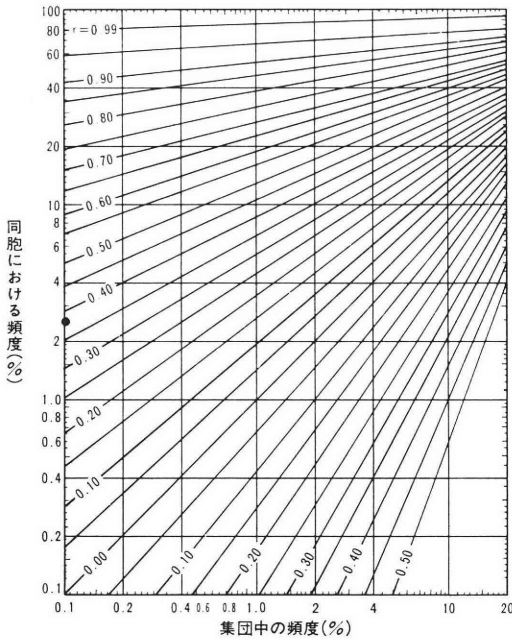


図 2 発端者とその血族の間における易病性の相関
 $r=0.38$ $h^2=2r=0.76 \dots 76\%$

発端者とその血族の間の易病性の相関は図のように示される⁹⁾。自験例では集団中の頻度0.10%、兄弟での頻度2.42%であり、図から $r=0.38$ であり、遺伝力 $h^2=2r=0.76$ となり、多因子性遺伝の遺伝力は76%といえる(図2)。

考 案

停留辜丸の家族内多発例は Familial cryptorchidism あるいは Hereditary cryptorchidism として報告されており、Klein ら⁷⁾は、これらの例は不完全な浸透性だが、常染色体優性遺伝をしめすとしている。自験例209例では、家族内多発例はなく、そのような遺伝様式のもの含まれていない。

停留辜丸の頻度については、正常男児で出生時4~10%にみとめられ、次第に下降して、1歳で1~2%、成人で約0.3%にみとめられると報告されているが⁸⁻¹⁰⁾、いずれも欧米の報告である。本邦における一般集団中での報告はなく、今回我々の調査した1歳6カ月検診では0.10%という数字が得られた。欧米での諸報告に比し、その頻度は低く人種間における差のある可能性がある。

本症の合併症としては、Marshall¹¹⁾によれば、1) Genetic syndromes, 2) Hormonal defects, 3) Intersex, 4) Mechanical gubernacular defects, 5) Inguinal hernia, 6) Renal anomalies, 7) Wilm's tumor, 8)

Torsion, 9) Vasal and epididymal abnormalities が多いとして分類している。ダウン症候群の約20%、Wilm's tumor 223例中11例に本症の合併があり、停留辜丸の12%に尿路奇形の合併があると報告している。自験例では6例(2.7%)に尿路奇形の合併をみとめたが、全例にIVPを施行してはいない。

停留辜丸を血族にみとめた症例は13例であり、そのうち両側停留辜丸5例(43例中、11.6%)、片側停留辜丸8例(146例中、5.5%)であり、両側停留辜丸では、片側停留辜丸の約2倍の頻度で血族に停留辜丸をみとめている。単辜丸では血縁者に停留辜丸をみとめていない。単辜丸の原因としては、副辜丸、精管を残して発育不全の辜丸が消失したという停留辜丸の極型であるという考え方、血行障害などの後天的な原因で消失したという考え方の2つがある¹²⁾。自験例の結果は後者の原因を支持すると考えられる。

Polygene と多くの環境要因との相互作用によつて発現するような機構を多因子性遺伝 multifactorial inheritance と呼んでいる。多因子性遺伝の検定としては、近縁係数1/2の血族における頻度および兄弟に予期される相対頻度が、一般集団における頻度から推測でき、それらを実測値と比較することで検定される。自験例では、両者の期待値と実測値の近似の値であり、多因子性遺伝を示すと考えられる。

多因子性遺伝の場合、polygene と環境要因との相互作用によつて発現するが、遺伝的要因の関与の大きさを示すものが遺伝力であり本症では76%であった。

Jones ら¹³⁾も、停留辜丸51例について遺伝性について検討し、多因子性遺伝であると報告しているが、その遺伝力についての検討はなされていない。

結 語

停留辜丸209例について、停留辜丸の血族内発生について調べた。その結果、76%の遺伝力を有する多因子性遺伝であることが判明した。

なお、本論文の要旨は、第30会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: 停留辜丸の予後, 日不妊会誌, 29:102, 1984.
- 2) Corbus, B. C. and O'conor, V. J.: The familial occurrence of undescended testes. Surg., Gyn. and Obstet., 34:237, 1922.
- 3) Perrett, L. J. and O'Rourke, D. A.: Hereditary cryptorchidism. Med. J. Aust., 25:

1289, 1969.

- 4) Pardo-Mindan, F. J., Vargas, F. T., Garcia, G. J. and Virto, M. T. R.: Familial cryptorchidism, Letter to the Editor. *Pediatrics*, 56: 616, 1975.
- 5) Edwards, J. H.: The simulation of mendelism. *Acta. Genet.*, 10: 63, 1960.
- 6) 大倉興司: 人類遺伝学入門, 第2版: 173, 医学書院, 1985.
- 7) Klein, D., Ferrier, P. and Ammann, F.: La génétique de l'ectopie testiculaire. *Pathol. Biol.* 11: 1214, 1963.
- 8) Scorer, C. G. and Farrington, G. H.: Congenital Deformities of the Testis and Epididymis. New York, Appleton-Century-Crofts, 1972.
- 9) Mitchell, R. G.: Paediatric aspects of cryptorchidism and hypogonadism. *Dev. Med. Child. Neurol.*, 19: 673, 1977.
- 10) Champbell, H. E.: The incidence of malignant growth of the undescended testicle: A reply and re-evaluation. *J. Urol.*, 81: 653, 1959.
- 11) Marshall, F. F.: Anomalies Associated with Cryptorchidism. *Urol. Clin. of North Am.*, 9: 339, 1982.
- 12) 布施秀樹, 皆川秀夫, 伊藤晴夫, 島崎 淳: 単
 13) Jones, I. R. G. and Young, I. D.: Familial incidence of cryptorchidism. *J. Urol.*, 127: 508, 1982.

Inheritance of cryptorchidism

Hidenori SUMIYA, Masanobu TAKAHARA,
Zengo Kataumi, Kenji Kawamura,
Hideki Fuse, Shigeyuki Yanagi,
Haruo Ito and Jun Shimazaki

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

Several familial cryptorchidisms have been reported. We analyzed familial occurrence of 209 patients of cryptorchidism. In 209 patients, 13 patients had cryptorchidism in their relations: siblings 3/124 (2.42%), fathers 2/209 (0.96%) paternal uncles 4/405 (0.99%), maternal uncles 0/290 (0%), nephews 0/93 (0%), cousins 4/437 (0.92%). The data are coincident with multifactorial inheritance with 76% of heritability.

(受付: 昭和61年1月7日)

INTRACELLULAR RECORDING AND STAINING OF THE RAT SERTOLI CELL AND PHASIC CHANGE IN ITS MEMBRANE POTENTIAL

Masanori YAMAMOTO, Koji MIYAKE and Hideo MITSUYA

Department of Urology, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan

Abstract: Micropuncture techniques developed for the study of renal physiology have been adapted for investigation of the male reproductive tract. In an attempt to gain more information about the cells of seminiferous tubules we have recorded intracellular potentials in isolated tubules of rats and attempted to identify the impaled cell of the seminiferous tubule histochemically employing a peroxidase-DAB (diaminobenzidine) staining method. The mean value of the membrane potential was -30.49 ± 7.41 mV (mean \pm S. E.) at 33°C. The result of the intracellular staining indicated that the cell stained was a Sertoli cell. Moreover, we observed phasic change in membrane potential during intracellular recording. A possible connection between this change and the contractive activity of the tubule is discussed.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 95-99, 1987)

Introduction

Intracellular staining are performed mainly in the electrophysiological field, but to our knowledge, such attempts in the male reproductive system have not been previously reported. Stretton and Kravitz (1968) reported intracellular staining technique with procion yellow. At present, this method is very popular in neurobiological field. But procion yellow can not be observed by electron microscope, whereas peroxidase-DAB (diaminobenzidine) staining method is useful in electron microscopic identification of physiologically identified cell. So it seems of interest to determine histochemically the cell recorded intracellularly. We show here the membrane potentials recorded from rat Sertoli cells and phasic change in intracellular potential.

Materials and Methods

All experiments were performed on seminiferous tubules taken from the testes of wistar rats weighing between 100-450gm. After sacrifice a testis was removed and several tubules were immediately transferred to Krebs

solution previously bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂. A single tubule was then tied to the cork platform (4mm in diameter) by a fine thread and placed in the tissue bath. The temperature of the bath was controlled to 33°C. Glass microelectrodes (tip diameter about 1 micron; resistance 50 to 150 megohm) filled with 3M KCl solution containing peroxidase (1mg/ml) were used. They, held in a micromanipulator, were inserted longitudinally from above into the tubules under visual control using a Nikon stereomicroscope (Nippon Kogaku K. K., Tokyo). They were connected via a chlorided silver wire to the input of a Model 707 Micro Probe System (W-P Instruments, Inc, New Haven, CN) to a pen recorder (Tokai Irika Co., Ltd., Tokyo). The potential was noted, and the negatively charged peroxidase was electrophoretically injected by passing a current of 500nA 1min. When less current was used the peroxidase did not come out of the pipette; if the current was too intense the cell was damaged and its response quickly lost. Figure 1 shows the intracellular membrane potential of the cell and the injection of peroxidase.

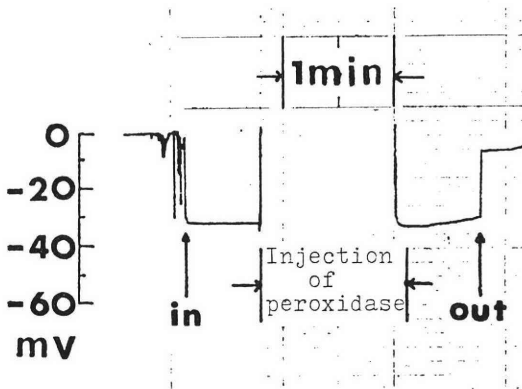


Fig. 1 Intracellular recording from the cell of seminiferous tubule which is unchanged both at the beginning and at the end of injection of peroxidase.

Peroxidase was injected into 10 cells after their electrical responses were recorded. When phasic change in membrane potential was observed a drop of oxytocin (20m-I.U./ml) was installed to the side of the tubule.

For histochemical investigation, the tubule was prefixed in 4°C, 0.15M cacodylate buffered 3% glutaraldehyde solution (pH 7.2) for 30 minutes, rinsed in the 0.1M phosphate buffer, incubated in DAB (diaminobenzidine)-H₂O₂ Tris-HCl buffer solution for 30 minutes at room temperature and then postfixed in 4°C, 0.1M phosphate buffered 2% osmium tetroxide (pH 7.2) for 45 minutes. The doubly fixed tissue was dehydrated in a graded ethanol series of ascending concentrations and embedded in Epon 812. Thin continuous sections of 3 micron intervals were cut on a ultramicrotome (Yamada and Shimizu 1976).

Results

The mean value of the membrane potentials from cells of the seminiferous tubules of rats was -30.49 ± 7.41 mV (mean \pm S. E.). Cells with potentials of from -15 to -50 mV were found (Fig. 2). These potentials were lower than those of excitable cells, such as neural cells or muscular cells. Intracellular staining using the peroxidase-DAB reaction was successful only one time. Figure 3 shows a cell stained brown. This cell is considered to be a Sertoli cell because its cytoplasm extends between germinal cells, and because it rests on the basement membrane of the semi-

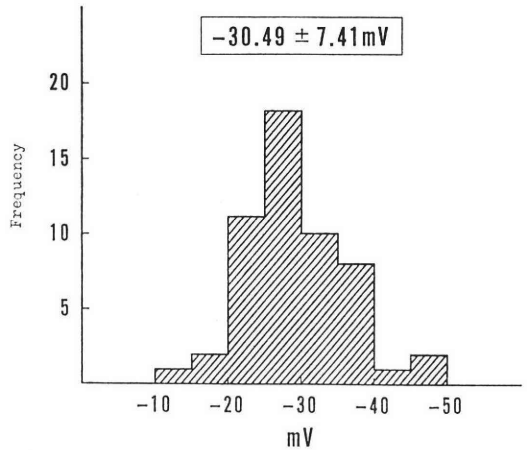


Fig. 2 Frequency distribution of intracellular potentials in seminiferous tubules. The figure represents 72 impalements made in 15 tubules from the same number of animals. The potentials were grouped in intervals of 5 mV and plotted against frequency. The mean and S.E. is -30.49 ± 7.41 mV.

niferous tubule (Fawcett and Burgos 1956).

We observed phasic change in membrane potential during intracellular recording (Fig. 4A). This frequency was of the same order as the contraction waves of seminiferous tubule reported by others (Niemi and Korman 1965). To confirm whether this phenomenon is associated with contractions of seminiferous tubule, a drop of oxytocin was installed to the side of the tubule. The phasic change occurred irregularly and frequently (Fig. 4B).

Discussion

Since the pioneering studies of Richards (1920-1921) micropuncture and microanalytic techniques have been utilized to study normal renal function and renal pathophysiology. Recently micropuncture techniques have been adapted for investigation of the male reproductive tract (Setchell et al. 1970; Levine and Marsh 1971; Cuthbert and Wong 1975; Howards et al. 1975; Wyker and Howards 1977). However, we are aware of only five studies of electrophysiology about the seminiferous tubule (Setchell et al. 1970; Levine and Marsh 1971; Cuthbert and Wong 1975; Gladwell 1977; Setchell et al. 1978). Cuthbert and Wong (1975) reported the intracellular potentials recorded from intratubular ce-

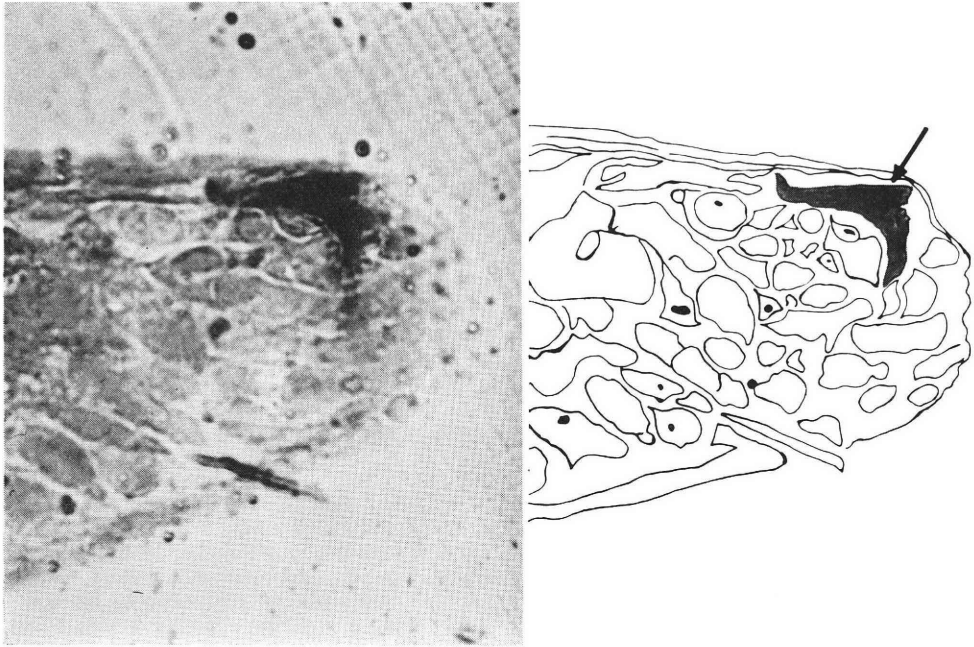


Fig. 3 Light microscopic appearance of the thin section of doubly fixed seminiferous tubule. Arrow head indicates the cell stained brown. This successfully injected cell is considered to be a Sertoli cell.

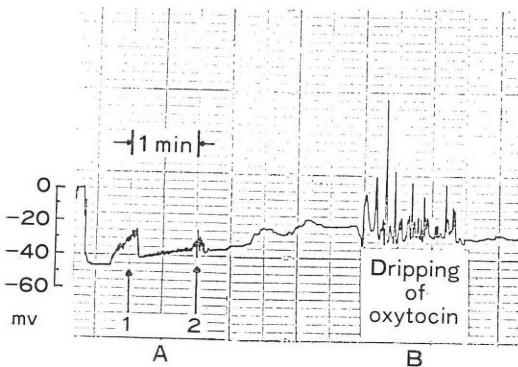


Fig. 4 Phasic change in membrane potential of a Sertoli cell and its response to oxytocin. (A) : Phasic change induced possibly by spontaneous contractions of seminiferous tubule. (B) : The effect of adding oxytocin.

lls. However, they do not determine the nature of the impaled cell. In the rat the cells of the boundary layer are so thin it is unlikely that cells could be impaled consistently. The seminiferous tubule contains large Sertoli cells which occupy most of surface of the basement membrane, the rest being

occupied by spermatogonia. Although the ultrastructural observation of the stained cells should be required, the result of the intracellular staining indicates the probability that mainly Sertoli cells were impaled. The interpretation of different intracellular potentials recorded from seminiferous tubule is difficult for the following reasons: (1) some impalements may not be in Sertoli cells; (2) the Sertoli cells are probably asymmetric; that is, the electrophysiologic properties of the serosal and luminal surfaces may be different; (3) the absence of regular zonulae occludens at either the luminal or serosal margins of the cells may mean that considerable intercellular shunting can occur; and (4) the presence of junctional specializations between adjacent Sertoli cells may mean that recordings are from a partial syncytium (Cuthbert and Wong 1975).

Phasic changes in intracellular potentials and the increase of their frequency following exposure to oxytocin are probably associated with contractions of seminiferous tubule. Using a light microscope, Niemi and Kormano (1965) observed seminiferous tubules that had

been isolated in saline and maintained in a constant temperature chamber. Contractions were measured with a calibrated grid. Aside from noting that contractions could be observed from the 10th postnatal week, these investigators found that oxytocin (0.2m-I. U./ml) stimulated contractility of the rat seminiferous tubules. Tonic contraction ensued at a level of 20m-I. U./ml of oxytocin. Therefore we consider it likely that contractions of the muscle cell layer of seminiferous tubular wall induced mechanical artifact on the electrode tip located in Sertoli cell.

The lamina propria of seminiferous tubules from all mammals that have thus far been studied, and from several nonmammalian species, contains cells that resemble smooth muscle, namely myoid cells. Contractility of these cells was first documented by Roosen-Runge (1951), who employed cinematography to record the motility of seminiferous tubules of rats and dogs. Many subsequent reports have dealt with the anatomy of these cells without attempting to record contractile events. Nevertheless, seminiferous tubules isolated from the rat and dog contract (Clermont 1958) and Buhley (1975) recently reported that such tissue isolated from rabbits, hamsters, mice and ground squirrels was also motile. We have, at present, no knowledge of physiological evidence of peristaltic movements in seminiferous tubules. It would therefore seem reasonable on the basis of our data to expect minute undulating motions of the seminiferous tubules to exist and to be partly responsible for transport of the non-motile sperm from the seminiferous tubules towards the efferent ducts leading to the epididymis.

References

- 1) Buhley, L. E., Jr: Contractions of the seminiferous tubules of the rat: effect of oxytocin, progesterone, prostaglandins, indomethacin, cyclic AMP and theophylline. Doctoral dissertation, Utah State University, 1975.
- 2) Clermont, Y.: Contractile elements in the limiting membrane of the seminiferous tubules of the rat. *Exp. Cell. Res.*, 15 : 438-440, 1958.
- 3) Cuthbert, A. W. and Wong, P. Y. D.: Intracellular potentials in cells of the semi-

- niferous tubules of rats. *J. Physiol.*, 248 : 173-191, 1975.
- 4) Fawcett, D. W. and Burgos, M. H.: The fine structure of Sertoli cells in human testis. *Anat. Rec.*, 124 : 401-402, 1956.
- 5) Gladwell, R. T.: The effect of temperature on the potential difference and input resistance of rat seminiferous tubules. *J. Physiol.*, 268 : 111-121, 1977.
- 6) Howards, S. S., Johnson, A. and Jessee, S.: Micropuncture and microanalytic studies of the rat testis and epididymis. *Fertil. Steril.*, 26 : 13-19, 1975.
- 7) Levine, N. and Marsh, D. J.: Micropuncture studies of the electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and the vas deferens in rats. *J. Physiol.*, 213 : 557-570, 1971.
- 8) Niemi, M. and Kormanio, M.: Contractility of the seminiferous tubule of the postnatal rat testis and its response to oxytocin. *Annls Med. Exp. Biol. Fenn.*, 43 : 40-42, 1965.
- 9) Richards, A. N.: Kidney function. *Harvey Lect.*, 16 : 163-165, 1920-1921.
- 10) Roosen-Runge, E. C.: Motions of the seminiferous tubules of rat and dog. *Anta. Rec.*, 109 : 413, 1951.
- 11) Setchell, B. P., Waites, G. M. H. and Young, J. A.: The composition of fluid collected by micropuncture and catheterization from the seminiferous tubules and rete testis of rats. *Pflügers. Arch.*, 318 : 225-243, 1970.
- 12) Setchell, B. P., Davis, R. V., Gladwell, R. T., Hinton, B. T., Main, S. J., Pilsworth, L. and Waites, G. M. H.: The movement of fluid in the seminiferous tubules and rete testis. *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18 : 623-635, 1978.
- 13) Stretton, A. O. W. and Kravitz, E. A.: Neuronal geometry: determination with a technique of intracellular dye injection. *Science*, 162 : 132-134, 1968.
- 14) Wyker, R. and Howards, S. S.: Micropuncture studies of the motility of rete testis and epididymal spermatozoa. *Fertil. Steril.*, 28 : 108-112, 1977.
- 15) Yamada, K. and Shimizu, S.: Concanavalin A-peroxidase-diaminobenzidine (Con A-PO-DAB)-alcian blue (AB): a reliable method for dual staining of complex carbohydrates. *Histochemistry*, 47 : 158-169, 1976.

ラットセルトリ細胞の膜電位測定と細胞染色及び膜電位における相性変化

名古屋大学医学部泌尿器科学教室
山本雅憲, 三宅弘治, 三矢英輔

腎臓生理学の分野で発達した微小穿刺法を応用し, 精細管内細胞の電気生理学的特性に関する研究を行った.

ラット精巣より分離した精細管を用い, 精細管内細胞の膜電位を測定し, さらにペロキシダーゼ・ジアミノベンチジン染色法により, 電極を刺入した細胞の組織化学的同定を試みた. 膜電位の平均値は 33°C で, $-30.49 \pm 7.41\text{mV}$ であつた. 細胞内染色の結果, 膜電位を導出した細胞はセルトリ細胞と思われた. さらにわれわれは, 膜電位測定中に, 電位の相性変化を観察した. この変化と精細管の収縮性との関連について考察を加えた.

(受付: 昭和61年4月1日)

EFFECTS OF CASTRATION AND TESTOSTERONE ENANTATE REPLACEMENT THERAPY ON THE GAMMA-GLUTAMYL TRANSPEPTIDASE (γ -GTP) ACTIVITY IN THE RAT EPIDIDYMIS

Teruo KOHDAIRA, Yuzo KINOSHITA and Minoru KONNO

Department of Urology, Yokohama City University School of Medicine

Abstract: The purpose of this experiment was to test the relationship between Gamma-GTP activity in the epididymis and androgen replacement using 27 Wistar strain rats (300-340 grams) in the following manner:

Eight cases of the 27 were used as intact control with no treatment, the other 19 were anesthetized with ether and castrated. The castrated rats were divided into 4 groups and three of those four groups were treated with testosterone enantate as an androgen replacement. From the eleventh day after surgery 4 were given testosterone enantate injections for three days, 5 cases were given testosterone enantate for 7 days, 4 cases were given testosterone enantate for 14 days and the remaining six were left untreated. After the replacement therapy the rats were sacrificed in order to remove the epididymis which was then frozen in liquid nitrogen in order to examine them for biochemical and histochemical Gamma-GTP activity in the tissue. Generally, the results showed that after castration there was a significant decrease in the weight of the the epididymis and a decrease in protein concentration as well as a decrease in Gamma-GTP activity. By androgen replacement therapy, a significant increase was observed in the three groups listed above compared with the untreated castrated control, but little difference was observed between those treated for 7 days and 14 days. But all three groups did not reach the value of the intact control group. The results indicated that androgen controls Gama-GTP in the epididymis. These results also show that exogeneous androgen could not maintain normal function.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 100-104, 1987)

Introduction

The distribution of Gamma-GTP activity is greatest in the kidneys and then the epididymis in rats (Goldbarg et al.⁶⁾, 1960). The epididymis is also known to be androgen dependent and also has high 5 Alpha-reductase activity (Kinoshita⁸⁾, 1981). It has recently been observed that the epididymis not only functions as a passage for sperm, but also serves to absorb testicular fluids (Crabo¹⁾, 1965; Setchell et al.¹²⁾, 1969) and in the maturation of sperm (Horan & Bedford⁴⁾, 1972; Lubicz-Naurocki et al.¹⁰⁾, 1973). The epididymis is an important organ in male reproduction, therefore, it is necessary to

know about it from many different physiological aspects.

The effects of castration and steroid replacement on the various enzymes in the epididymis of rats; betaglucuronidase, acid phosphatase, alkaline phosphatase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, has already been reported. The enzymes in the epididymis are not always controlled by androgen. (Rastogi et al.¹¹⁾, 1979). The effects of androgen on gamma-GTP activity in the seminal vesicles has been reported (DeLap et al.²⁾, 1975), but there appears to be no report on the effects of androgen on gamma-GTP in relation to the epididymis in our investigations.

The purpose of this article is to show whe-

ther the gamma-GTP activity in the epididymis is controlled by androgen or not. For that purpose the effects of castration and androgen replacement therapy were examined and evaluated biochemically and histochemically.

Materials and Methods

Gamma-N-L-glutamyl-Beta-naphthylamide and fast garnet GBC (0-aminoazotoluene) were purchased from Sigma Chem Co. (St. Louis, MO, USA). Glycylglycine and "Monotest a Gamma-GT new/neu" were obtained from Nakarai Chem Co. (Kyoto, Japan) and Boehringer-Mannheim (Mannheim, West Germany), respectively. Other reagents were of analytical grade.

Twenty-seven male rats (weight 300-340 gr) of the Wistar strain were used in the experiment. Eight of the 27 were designated as normal intact control. Bilateral orchietomies were performed on the remaining 19 cases under ether anesthesia using a scrotal approach. The wound then closed. Six of the nineteen cases operated on were left untreated and the thirteen remaining cases were divided into three groups. The treatment was begun on the eleventh day post operative. Four of those treated cases were given testosterone enantate for three days, five cases for seven days, and the remaining

four cases for 14 consecutive days. The injection of testosterone was given subcutaneously daily in the amount of 2.0mg/ml dissolved in sesame seed oil.

After the death of the rats by an overdose of ether, each animal was weighed. The epididymides were quickly removed and debreeded, weighed and frozen in liquid nitrogen and stored for later use.

The enzymes of the epididymal tissue were assayed as demonstrated by Szasz Method (Szasz¹³, 1974; Kohdaira⁷, 1986). Enzyme activities were expressed in mIU/mg of protein.

Histochemical staining of Gamma-GTP was carried out by means of the modified method of Glenner (Glenner⁵, 1962; Kohdaira⁷, 1986). Proteins were determined, in the homogenate, by means of the method of Lowry (Lowry et al.⁹, 1951). The results were analysed for significance by Student's test (Fisher⁸, 1954). The value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Influence of Castration

After castration the weight of the epididymis had decreased ($P < 0.05$) by about 1/3 of the weight of the intact control by the eleventh day. Gamma-GTP activity had significantly decreased ($P < 0.05$) by about 1/8 of

Table 1 Effect of castration and androgen replacement therapy on the γ -GTP activity in the rat epididymis

| Treatments | Wet weight of epididymis (g) | Protein (mg/ml) | γ -GTP (mIU/mg of Protein) |
|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Intact Control | 630 \pm 53 (N = 8) | 9.1 \pm 0.7 (N = 8) | 395.8 \pm 64.5 (N = 8) |
| Castrated untreated Control | 204 \pm 10* (N = 6) | 6.2 \pm 0.6* (N = 6) | 50.7 \pm 10.9* (N = 6) |
| Androgen replacement | | | |
| 3 days | 302 \pm 10*† (N = 4) | 8.8 \pm 0.9† (N = 4) | 147.6 \pm 4.8*† (N = 4) |
| 7 | 321 \pm 25*† (N = 5) | 6.9 \pm 0.4 (N = 5) | 251.9 \pm 51.8*† (N = 5) |
| 14 | 359 \pm 11*† (N = 4) | 8.0 \pm 0.5† (N = 4) | 229 \pm 14.3*† (N = 4) |

Value are mean \pm S.E.

Significantly different from intact control : * $P < 0.05$

from castrated untreated control : † $P < 0.05$

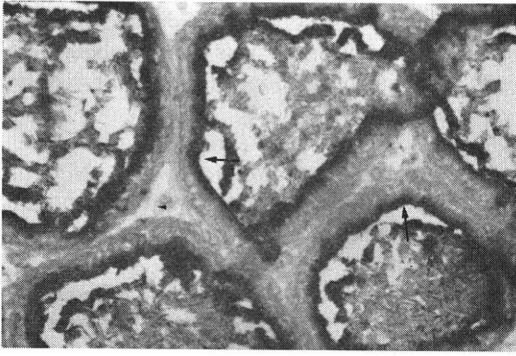


Fig. 1 Histochemical staining of γ -GTP in head portion of the epididymis in normal control rat group. Intensive precipitation of red dye was found in luminal border of glandular epithelium (arrows). Reduced from $\times 100$.

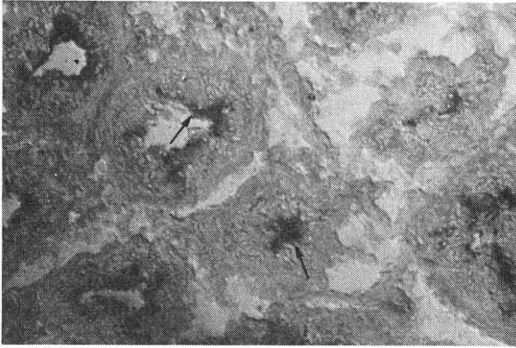


Fig. 2 Histochemical staining of γ -GTP in head portion of the epididymis, in castrated untreated rat group. Weak staining of γ -GTP was found in the atrophied glandular epithelium (arrows). Reduced from $\times 100$.

that of the intact control. Protein concentration had also decreased (Table 1). Histochemically, it was shown that there was atrophy and narrowing of the glandular spaces in the epididymis, and localization by red staining (the azocoupling reaction) expressed a marked decrease of Gamma-GTP activity (Fig. 1, 2).

Influence of Androgen Replacement Therapy

Testosterone enantate as a replacement for androgen was administered to the castrated rats from the eleventh post operative day. The group treated for three days showed a significant increase ($P < 0.05$) Gamma-GTP activity compared to the untreated castrated

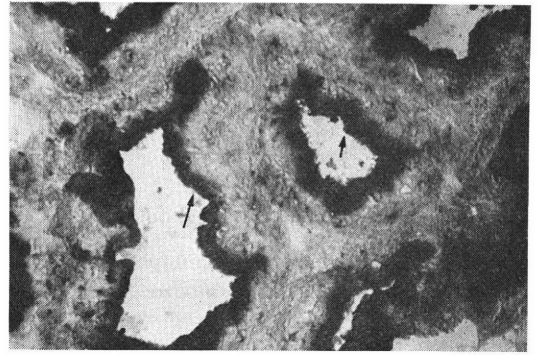


Fig. 3 Histochemical staining of γ -GTP on the head portion of the epididymis in the androgen treated group. The same intensive staining as normal control was found in the luminal border of the epithelium (arrows). Reduced from $\times 100$.

control group. But the value did not reach the level of the normal intact control group. The group treated for seven days showed a recovery in the weight of the epididymis and in Gamma-GTP activity of 1/2 of the value of the normal intact control group. Compared to the untreated group, they had a significant increase. The group treated for fourteen days showed almost the same levels as those of the seven day group in the weight of the epididymis and Gamma-GTP activity (Table 1). Histochemically the glandular epithelium recovered normally and red staining (azocoupling reaction) showed almost normal Gamma-GTP activity (Fig. 3).

Both the seven day and fourteen day groups show a significant increase in the weight of the epididymis and Gamma-GTP activity, compared with the untreated control group; but they do not reach the level of the normal intact control, and also show no significant difference when compared to each other.

Discussion

The results of this study indicated that Gamma-GTP activity in the epididymis is controlled by androgen. It is known that the epididymis is an androgen dependent organ. The histological and weight changes caused by castration and androgen replacement has proven that the epididymis is androgen dependent. However, not all of the various enzymes in the epididymis are dependent upon androgen. For example, it is

known that leucyane-aminopeptidase is not controlled by androgen and betagluconidase was found to be androgen dependent only in the cauda epididymidis whereas glucose-6-phosphate dehydrogenase was under androgenic control in the caput epididymis (Rastogi et al.¹¹, 1979). DeLap et al. performed the same experiment in the seminal vesicles as we have performed in the epididymis (DeLap et al.²), 1975). In DeLap's results, Gamma-GTP activity in the seminal vesicles decreased by orchiectomy and the effects were reversed by the administration of testosterone. DeLap et al. felt that changes in the enzymes were secondary ones. But from their data, it was observed that Gamma-GTP activity in the seminal vesicles is controlled by androgen. They also say that the changes in gammaglutamyl transpeptidase with the functional state of the seminal vesicle epithelium suggest that the enzymes may be involved in the secretory activity of the gland, perhaps in transport of amino acids or peptides. The Gamma-GTP activity in the epididymis has yet to be biologically defined. From the results of our study, Gamma-GTP activity in the epididymis is also partly responsible in the function of the epididymis in the form of transport of amino acid or peptides has been supposed.

In this experiment, androgen replacement therapy was performed with exogenous androgen (testosterone enantate). The weight of the epididymis and Gamma-GTP activity has increased in both the seven day group and the 14 day group, but failed to reach the levels of the normal intact control group. From the results, it was determined that epididymis function and Gamma-GTP activity could not be maintained at normal levels with only exogeneous androgen.

References

- 1) Crabo, B.: Studies of the Composition of epididymal content in bull and boars. *Acta. Vet. Scand.*, 6 (Suppl. 5): 1, 1965.
- 2) Delap, L. W., Tate, S. S. and Meister, A.: γ -glutanyl transpeptidase of rat seminal vesicles; effect of orchiectomy and hormone administration on the transpeptidase in relation to its possible role in secretory activity. *Life Sciences*, 16 : 691-704, 1975.

- 3) Fisher, R. A.: *Statistical Methods for Research Workers*, 12th edn. Oliver and Boyd, London, 1954.
- 4) Horan, A. H. and Bedford, J. M.: Development of the fertilizing ability of spermatozoa on the epididymis of the Syrian hamster. *J. Reprod. Fertil.*, 30 : 417, 1972.
- 5) Glenner, G. G.: The preservation of peptidase activity localization using γ -naphthylamide substrate. *J. Histochem. Cytochem.*, 10 : 217-258, 1962.
- 6) Goldbarg, J. A., Friedman, O. R., Pineda, E. P., Smith, E. E., Chatterji, R., Stein, E. H. and Rutenburg, A. M.: The Colorimetric determination of γ -glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 91 : 61-70, 1960.
- 7) Kohdaira, T., Kinoshita, Y., Konno, M. and Oshima, H.: Distribution of γ -glutamyl transpeptidase in male reproductive system of rats and its age-related changes, *andrologia*. 1986. (In print)
- 8) Kinoshita, Y.: Studies on the human Epididymis; Partial Characterization of 3α - and 3β -Hydroxysteroid Dehydrogenase, Regional Distribution of 5α -Reductase and Inhibitory Effect of 4α -3-Oxosteroids on 5α -Reductase. *Endocrinol. Japon*, 28 : 499-513, 1981.
- 9) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. T., Farr, A. L. and Randall, R. T.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 : 215-275, 1951.
- 10) Lubicz-Naurocki, C. M., Lan, N. I. F. and Chang, M. C.: The fertilizing life of Spermatozoa in the Cauda epididymis of mice and hamsters. *J. Reprod. Fertil.*, 35 : 165, 1973.
- 11) Rastogi, R. K., Milone, M., DiMeglio, M., Caliendo, M. F. and Chieffi, G.: Effects of castration; 5α -dihydrotestosterone and Cyproterone acetate on enzyme activity in the mouse epididymis. *J. Reprod. Fert.* 57 : 73-77, 1979.
- 12) Setchell, B. P., Scott, T. W., Voglmayr, T. K. and Waites, G. M.: Characteristics of testicular spermatozoa and the fluid which transports them into epididymis. *Biol. Reprod.*, (Suppl. 1): 40-66, 1969.
- 13) Szasz, G.: New substances for measuring γ -glutamyl transpeptidase activity. *Z. Chem. Klin. Biochem.*, 12 : 228, 1974.

ラット副辜丸の γ -GTP 活性におよぼす テストステロンの影響について

横浜市立大学医学部泌尿器科学教室

公平昭男, 木下裕三

同 中検生化学

今野 稔

副辜丸における γ -GTP 活性が高いことから, 同部における γ -GTP 活性に対するテストステロンの影響を検討した. 14週齢ウイスターラットを用い, I. 無処置対照群, II. 実験群として両側除辜術施行後10日目より, ①テストステロン非補充群, ②テストステロン3日間補充群, ③テストステロン7日間補充群, ④テストステロ

ン14日間補充群を作成. 摘出した副辜丸について, (1) 各組織中の γ -GTP 活性を測定, および (2) 凍結組織切片について γ -GTP を組織化学的に検討した. その結果, I. 対照群: 副辜丸重量 630 ± 53 mg (N=8), γ -GTP 活性 395.8 ± 64.5 mIU/mg protein (N=8), II. 実験群①非補充群: 197.2 ± 29.2 mg (N=8), 50.7 ± 26.8 mIU/mg Protein (N=8), ②テストステロン3日間補充群: 302 ± 10 mg (N=4), 147.6 ± 4.8 mIU/mg, Protein (N=4), ③テストステロン7日間補充群: 321 ± 25 mg (N=5), 251.9 ± 51.8 mIU/mg Protein (N=5), ④14日間補充群: 359.0 ± 11 mg (N=4), 229.0 ± 14.3 mIU/mg Protein (N=5) であり, 組織化学的結果からも副辜丸の γ -GTP は, テストステロンのコントロール下にある事が判明した.

(受付: 昭和61年4月12日)

エタノール処置によるマウス卵子の単為発生誘起と 割球融合および受精卵細胞質の注入

Activation of Mouse Eggs In Vitro with Ethanol Treatment, and
the Effects of Blastomere Fusion and Microinjection of Cytoplasm
from Fertilized Eggs on the Survival of Parthenogenetic Eggs

農林水産省畜産試験場繁殖部

角 田 幸 生

Yukio TSUNODA

Department of Reproduction, National Institute of Animal Industry

家畜改良事業団家畜改良技術センター

杉 江 侖

Tadashi SUGIE

Livestock Improvement Association

エタノール処置が、マウス卵子の単為発生誘起に有効であることが知られているが、本実験では、エタノール処置によっておこる単為発生誘起率およびその形態が用いるマウスの系統によって違いがあるかどうか、さらに半数体単為発生卵由来の2細胞卵の割球融合あるいは受精卵細胞質の微量注入などの処置を加えることにより単為発生卵の生存性を延長させることができるか否かを検討した。その結果、受精卵細胞質の注入により、単為発生卵の体外での発育および recipient に移植後の生存性が延長される傾向がみられることが明らかとなった。最も発生の進んでいた単為発生卵由来の生存胎子は、胎節数35であった。

(Jap. J. Fert. Ster., 32(1), 105-113, 1987)

緒 言

哺乳動物における発生は、受精能を獲得した精子が排卵された卵子に進入することによって開始する。第2減数分裂中期の状態では休止している卵子は、精子が進入することによって活性化され、第2極体を放出して減数分裂を完了する。卵子の活性化は、精子以外の温度、電気、浸透圧等の物理的的刺激あるいは酵素や麻酔剤等の化学的的刺激によっても生ずることが古くから知られている¹⁾。Pincus²⁾は、排卵直後に採取したウサギの卵子を単為発生誘起後 recipient に移植することによって単為発生卵由来の産子を得たことを報告したが、その後行なわれた追試³⁾ではこれらの卵子は胚盤胞期までしか発生しないことが明らかとなり、同氏の成績²⁾は疑問視されている。ついで、マウスを用いて多くの研究が行なわれた結

果、種々の刺激を用いて誘起された単為発生卵は、ウサギでの実験と同様に胚盤胞へ発生し、これらの卵子を recipient に移植すると着床前後まで生存すること、しかしながら、その後死滅退行し、産子へは発生しないことが明らかにされている¹⁾。Kaufman ら (1977)⁴⁾は、ヒアルロニダーゼ処置によつて誘起した単為発生卵を体外で胚盤胞へ発育させ、卵巣摘出後ホルモン投与によつて人為的に着床遅延の状態にしたマウスに移植して、25胎節期の生存胎子を得たことを報告している。しかし最近、Cuthbertson (1983)⁵⁾はマウス卵子をエタノールで処置すると、これまで用いられた他の刺激に比べて、より高率に単為発生が誘起されることを報告している。同氏⁵⁾はさらに、エタノール処置で得られた単為発生卵の移植試験で、Kaufman ら⁴⁾が用いた着床遅延動物を recipient として用いなくても同程度、あるいはそれ以上の胎

節をもつ生存胎子が得られることを明らかにしている。

本実験では、Cuthbertson⁵⁾の報告を追試するとともに 1) 用いるマウスの系統によつて単為発生誘起率および単為発生卵の形態に差異が生ずるか否か、2) 半数体単為発生卵由来の2細胞期卵の割球を融合させて2倍体卵を作製することによつて生存性を延長できるか否か、3) 単為発生卵に受精卵の細胞質を微量注入する処置が生存性を延長することができるか否か等をそれぞれ検討した。

材料および方法

実験は1~3の3つの段階に分けて行なつた。使用した卵は、PMSG と hCG を48時間間隔でそれぞれ5IU 腹腔内投与した成熟雌マウスより採取した。採卵は、特に記述する場合を除き、hCG 注射後17-18時間目に流動パラフィン下で卵管膨大部を切開して実施した。採卵直後に7%エタノールを含む培養液 M16⁶⁾を0.5ml 添加して、7分間37°C で培養した。ついで、卵丘細胞に包まれた卵子塊を M16に3回移しかえることによつて洗浄し、流動パラフィン下の M16 中で6時間培養した。なお、実験3の1部ではサイトカラシンBを5 μ g/ml 添加した M16 中で6時間培養した卵を用いた。培養終了後、ヒアルロニダーゼ (300IU/ml) で卵丘細胞を除去したのち、100~200倍の倒立型ノルスキー微分干渉顕微鏡下で単為発生誘起の有無およびその形態を観察した。単為発生の判定は前核形成の有無で行ない、次の3種類の形態に分類した。(1) 第2極体が存在し、前核が1個存在するもの(1前核卵、写真1)、(2) 第2極体がなく、前核が2個存在するもの(2前核卵、写真2)、(3) 均等な2細胞卵であり、各割球に核が1個ずつ存在するもの(直接分割卵、写真3)。単為発生卵はそれぞれの形態ごとに(実験1)、あるいは割球融合処置後(実験2)、または受精卵細胞質注入後(実験3)、それぞれ3~4日間体外培養してその発生能を調べた(写真4~7)。桑実胚あるいは胚盤胞へ発生した卵子の1部は、精管結紮雄と交配した偽妊娠1日目の recipient の卵管あるいは3日目の子宮に移植⁷⁾して、妊娠10.0~12.5日目にと殺して着床数を調べた。なお、recipient は精管結紮雄と交配して陰腔が発見された日の午前中を妊娠0.5日として数えた。また、着床部位は解剖顕微鏡下で切開して定法通り胎子の有無を調べ、胎子が存在する場合はその体節数を数えた。

実験1: まず、使用するマウスの系統によつて単為発生誘起率およびその形態に差異があるか否かを調べた。用いたマウスは、CDF₁(BALB/c \times DBA)、BCF₁(C57BL/6J \times CBA)、BDF₁(C57BL/6J \times DBA)の3系統の

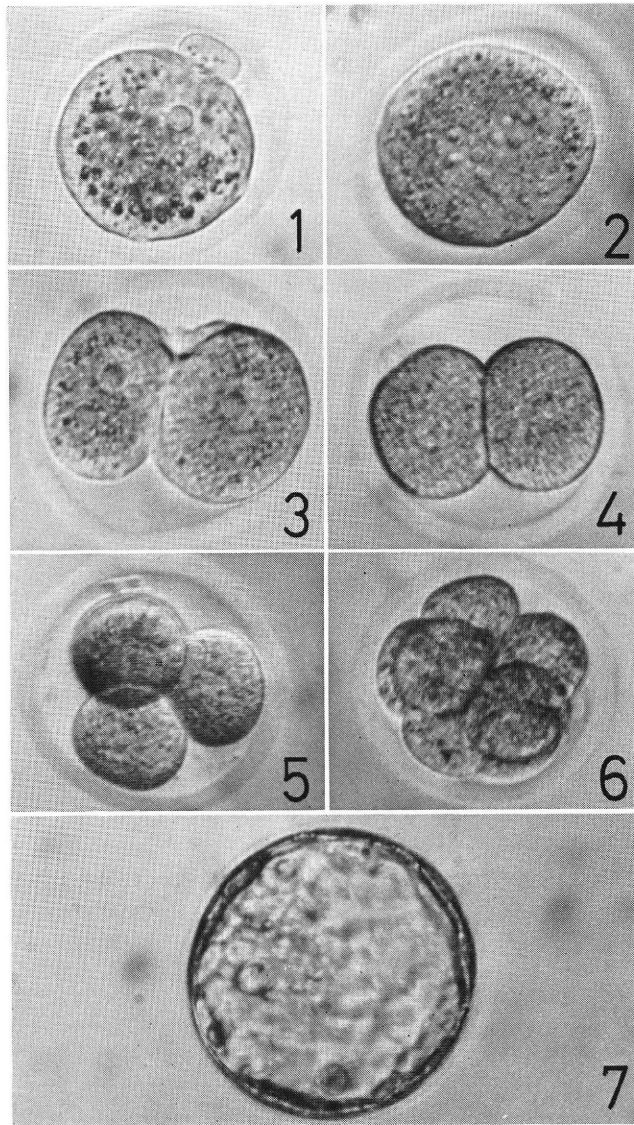
F₁ および BALB/c, C57BL/6J, CBA, DBA, C3H の5系統の純系マウスの計8系統である。BCF₁ は当研究室で自家繁殖したが、他の系統はすべて日本チャールスリバーより購入したものである。

ついで、hCG 投与後の時間によつて単為発生誘起率およびその形態に差異が生ずるか否かを調べた。CDF₁ および BCF₁ の2系統を用い、hCG 投与後14, 18, 20 および25時間目に採取した卵子に前記と同様にエタノール処置を行なつた。

実験2: エタノール処置後得られた単為発生卵のうち直接分割卵は、ポリエチレングリコール(PEG)を用いて2個の割球を融合させて2倍体の1細胞期状の卵を作製した。細胞融合処置は、前報⁸⁾に順じた。すなわち、45% PEG (Sigma 社、分子量1,000)液(pH 7.5)を牛血清アルブミンを含まない M2液⁹⁾で作製し、卵を流動パラフィン下の約0.1ml の PEG 液の中に入れて120秒間処置後、M2液で3回洗浄し、M16液に移して融合の有無を検査するまで1~2時間炭酸ガス培養器内に静置した。1前核卵は、20~24時間培養後、2細胞期に分割した時点で同様の融合処置を行なつた。

実験3: エタノール処置後サイトカラシンBを含むM16液で6時間培養した卵子のうち、前核を2個有する2倍体卵を選び、受精卵細胞質の注入を行なつた。受精卵の細胞質は2つの方法によつて採取した。なお、注入操作をせずに培養した2倍体卵を対照とした。

方法Aでは、CD1系マウスより採取した前核期受精卵よりプロナーゼ処置によつて透明帯を除去し、3回洗浄後、卵1個当たり5 μ l のリン酸緩衝液に浮遊させた。ついで、液体窒素と35°C への浸漬を交互に10回実施して凍結融解をくり返したのち、ガラスホモゲナイザーでホモゲナイズした液約20 μ l を1個の単為発生卵の細胞質内に注入した(写真8, 9)。注入は200倍の倒立型ノルスキー微分干渉顕微鏡にセットしたマイクロマニプレーターを用いて、流動パラフィンを満したガラスシャーレに入れた M2液の小滴内で行なつた。なお、一部の卵子についてはサイトカラシン B (5 μ g/ml) を含む M2液内で実施した。まず、注入すべき卵を M2液の中に入れ、ホールディングピペットをとりつけた左側のマイクロマニプレーターを操作して卵を吸引固定した。ついで、右側のマニプレーターにとりつけた直径約10 μ のインジェクションピペットに注入液を吸引し、マニプレーターを操作して卵に近づけ、透明帯につきさして前核を傷つけないように卵細胞質内にピペットを挿入後注入した。この際、インジェクションピペットが細胞質内に確実に挿入されること、および注入液が細胞質内に入ったことを注意して確認した。方法Bでは、前核期受精卵より20



Photographs 1 to 3 show the three classes of parthenogenetic eggs which can be distinguished at 6hrs after activation with 7% ethanol.

- 写真 1 Single-pronuclear haploid egg with extruded second polar body.
- 写真 2 Two-pronuclear diploid egg without second polar body.
- 写真 3 Immediate cleavage egg.

Photographs 4 to 7 show the in vitro development of activated eggs made diploid by suppressing the second polar body with cytochalasin B.

- 写真 4 Two-cell stage egg, 1 day after culture.
- 写真 5 Four-cell stage egg, 2 days after culture.
- 写真 6 Eight-cell stage egg, 3 days after culture.
- 写真 7 Blastocyst, 4 days after culture.

pl の細胞質を吸引し、方法Aと同様に単為発生卵に注入した。なお、ホールディングピペットならびにインジエクシオンピペットは前報¹⁰⁾に順じて作製した。

結 果

実験 1.

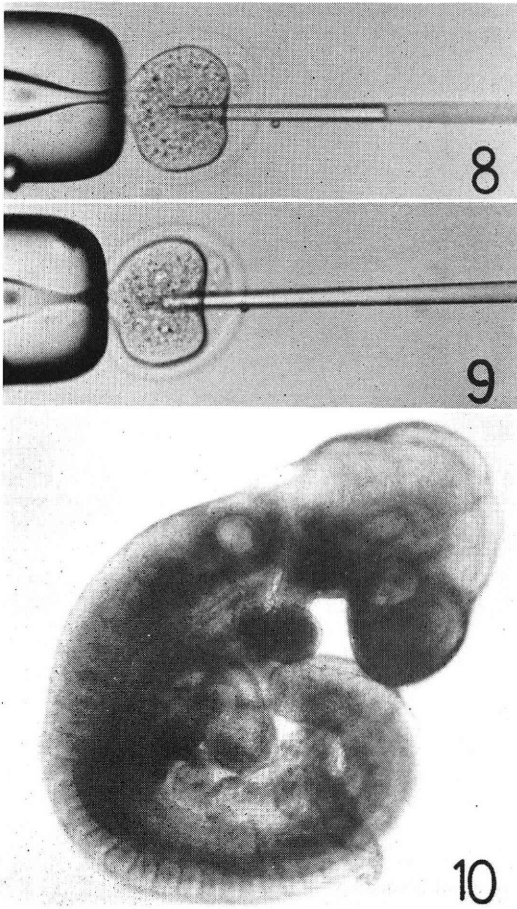


写真 8 および 9 The activated egg was held with holding pipette and about 20 pl of cytoplasm homogenate from fertilized eggs was injected into cytoplasm of activated egg.
 写真10 Parthenogenetic mouse embryo with 35 somites.

表 1 にエタノール処置後の単為発生誘起率および単為発生卵の形態を各系統別に示した。単為発生誘起率は、CDF₁, C3H および C57BL/6系で高く (93~98%), 他の系統と比べてそれぞれ有意な差がみられた。残りの 5 系統間では、単為発生誘起率に差異はなく、71~84% の範囲であった。

単為発生誘起後、前核を 2 個有する卵の割合は各系統間で大差なく、いずれも 0~18% と低い率であったが、1 前核卵および直接分割卵の出現割合は系統によつて差がみられた。すなわち、1 前核卵の割合が高く直接分割卵が少ない系統は BCF₁, C57BL/6, CBA の各系であり、逆に直接分割卵が多い系統は CDF₁, BALB/c および C3H 系であった。また、BDF₁ および DBA 系はほぼその中間であった。

図 1 に hCG 注射後の時間ともなう単為発生誘起率ならびに単為発生卵の形態の変化を示した。CDF₁ 系では、hCG 後 14 時間目に採取した卵子を用いた場合の単為発生誘起率は 47% であり、18 および 20 時間後に採取した場合に比べて有意に低かつた。また、hCG 後 14 時間目の単為発生卵のうち 62% は 1 前核卵であったが、時間とともに顕著に減少し、逆に直接分割卵が激増した。これに対して、BCF₁ 系では単為発生誘起率は hCG 後の時間によつて大差なく、またその形態の変化も CDF₁ 系の場合ほど顕著でなく、50% 以上の卵子が 1 前核卵であった。

表 2 に単為発生卵の体外での培養成績をその形態ごとに示した。表示のように、8 細胞期へはいずれの形態の卵子でも比較的高率に発生し、とりわけ直接分割卵で 99% と他の形態の卵子に比べて有意 (P<0.001) に高かつた。しかしながら、桑実胚あるいは胚盤胞への発生率は 11~22% と、いずれも低率であった。

実験 2

表 1 Incidence of the different classes of parthenogeneone induced by ethanol treatment in various strains of mouse

| Strain | No. of eggs used | No. of eggs activated (%) | No. of eggs | | |
|------------------------------|------------------|---------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|
| | | | 1 pronucleus second polar body (%) | 2 pronuclei (%) | Immediate cleavage (%) |
| CDF ₁ (BALB×DBA) | 54 | 53(98) | 9(17) | 0 | 44(81) |
| BCF ₁ (C57BL×CBA) | 84 | 66(79) | 53(80) | 12(18) | 1(2) |
| BDF ₁ (C57BL×DBA) | 117 | 98(84) | 49(50) | 12(12) | 37(38) |
| BALB/c | 59 | 42(71) | 12(29) | 3(7) | 27(64) |
| C57BL/6 | 28 | 26(93) | 20(77) | 4(15) | 2(8) |
| CBA | 39 | 31(79) | 22(71) | 4(13) | 5(16) |
| DBA | 34 | 28(82) | 17(61) | 2(7) | 9(32) |
| C3H | 46 | 44(96) | 4(9) | 5(11) | 35(80) |

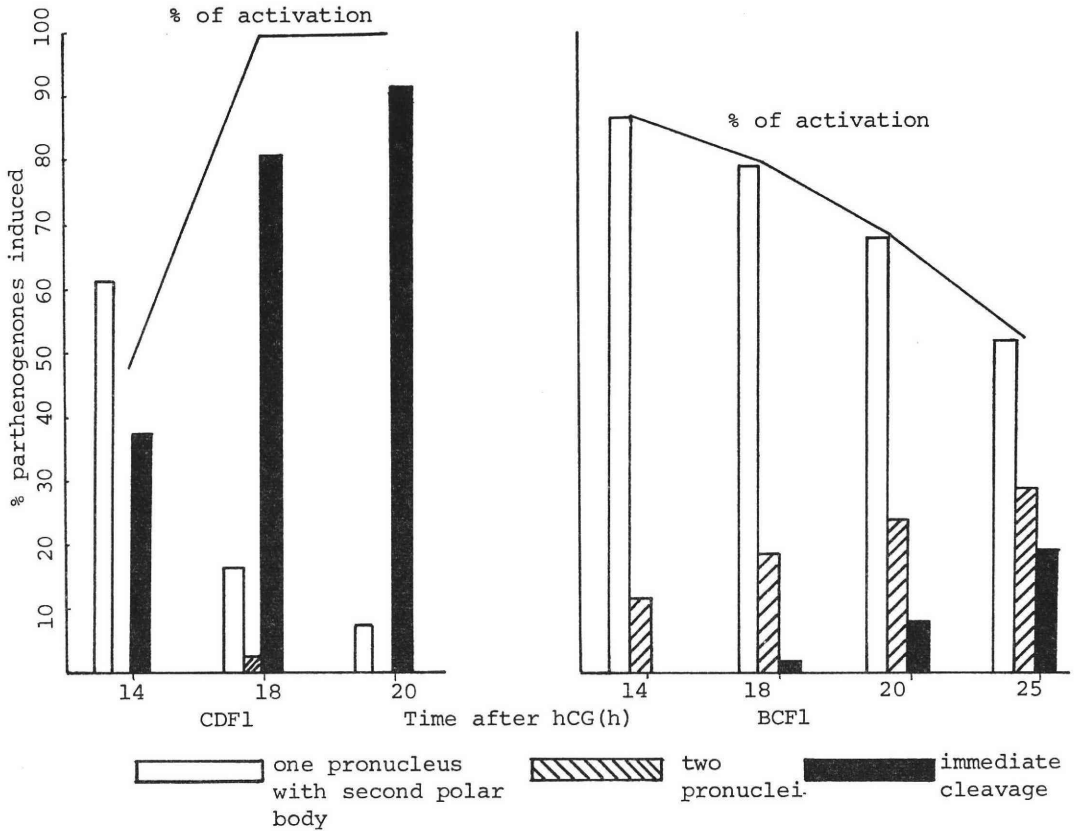


図 1 Effects of post-ovulatory aging of the oocytes and strain on the incidence of the various classes of parthenogenone induced and the activation frequency.

表 2 In vitro development of parthenogenetic eggs

| Type | No. of eggs cultured | No. of eggs developed to | |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | 2 to 8-cell (%) | morula or blastocyst (%) |
| 1 pronucleus with second polar body | 145 | 119(82) | 16(11) |
| 2 pronuclei | 54 | 40(74) | 12(22) |
| Immediate cleavage | 120 | 119(99) | 16(13) |

The eggs were obtained from superovulated BCF1 females.

表 3 に 1 前核卵を培養して得られた半数体の 2 細胞卵および直接分割卵の割球を融合させた成績を示した。BCF1 系では、160 個の 2 細胞期卵に融合処置を実施した結果、112 個 (70%) の卵で細胞の融合が観察された。これらの融合卵のうち 18 個 (16%) の卵子が桑実胚および胚盤胞へ発生したが、その発生率は融合処置を実施しなかった無処置卵の場合 (16%) と比べて差がみられなかった。BDF1 系では、1 前核卵を培養後得られた 2 細胞卵の割球融合率は 49% と BCF1 系に比べて低く、

また桑実胚あるいは胚盤胞への発生もみられなかった。直接分割卵の場合、32 個の卵子のうち 6 個 (19%) で融合が観察されたにすぎなかったが、そのうち 3 個で発生が観察された。

実験 3

表 4 に受精卵細胞質注入後の単為発生卵の培養成績を示した。注入操作後、正常な形態を保っていた卵子の割合は注入 A および B 区とも大差なく、処置卵の 61~66% であった。桑実胚および胚盤胞へ発育した卵子の割合

表 3 In vitro development of parthenogenetic eggs after blastomere fusion

| Strain | Type | No. of eggs treated | No. of eggs fused or not (%) | No. of eggs developed to morula or blastocyst (%) |
|--------|-------------------------------------|---------------------|------------------------------|---|
| BCF1 | 1 pronucleus with second polar body | 160 | Fused 112(70) Not 48(30) | 18(16) 4(8) |
| | Control | 91 | — | 15(16) |
| BDF1 | 1 pronucleus with second polar body | 35 | Fused 17(49) Not 18(51) | 0 1(6) |
| | | 32 | Fused 6(19) Not 26(81) | 3(50) 4(15) |

The eggs were treated with 45% polyethylene glycol.

表 4 In vitro development of parthenogenetic eggs after microinjection of cytoplasm from fertilized eggs

| Treatment | No. of eggs used | No. of normal eggs after injection (%) | No. of eggs cultured | No. of eggs developed to morula or blastocyst (%) |
|-------------|------------------|--|----------------------|---|
| Injection A | 96 | 59(61) | 59 | 35(59) |
| Injection B | 127 | 84(66) | 79 | 21(27) |
| Control | | | 141 | 61(43) |

表 5 The postimplantation survival of parthenogenetic eggs microinjected of cytoplasm from fertilized eggs and transferred as morulae and blastocysts

| Treatment | Days of pregnancy | No. pregnant/no. of recipients | No. of eggs transferred | No. of implantations | No. of live fetuses | No. of somites |
|-------------|-------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------|---------------------|----------------|
| Injection A | 10.0 | 1/1 | 3 | 3 | 2 | 22, 24 |
| | 10.5 | 2/2 | 6 | 6 | 2 | 25, 35 |
| | 11.5 | 3/3 | 14 | 12 | 1 | 30 |
| | 12.5 | 1/1 | 3 | 3 | 0 | — |
| Injection B | 11.0 | 1/1 | 5 | 3 | 0 | — |
| | 11.5 | 2/2 | 9 | 7 | 0 | — |
| Control | 10.0 | 1/1 | 4 | 2 | 2 | 20, 22 |
| | 10.5 | 1/2 | 9 | 5 | 1 | ? |
| | 11.0 | 1/1 | 4 | 4 | 2 | 20, 30 |
| | 11.5 | 5/5 | 16 | 12 | 2 | 21, 26 |
| | 12.5 | 1/1 | 4 | 1 | 0 | — |

は、注入A区 (35/59, 59%) で高く、対照区 (61/141, 43%) に比べて有意 ($P < 0.05$) な差がみられた。注入B区では、発生率は21/79 (27%)であり、注入の効果はみとめられなかった。

表5に受精卵細胞質を注入した単為発生卵の培養によつて得られた桑実胚および胚盤胞の移植試験の結果を示した。着床率は、注入区および対照区とも大差なく、25~100%の範囲であった。生存胎子は、対照区で妊娠11.5日目まで少数例ながら観察され、最も発生の進んでいたものは妊娠11.0日目に得られた体節数30の胎子であった。注入A区では、対照区と同様に妊娠11.5日目まで生

存胎子が観察され、最も発生の進んでいたものは体節数35 (妊娠10.5日目) の生存胎子 (写真10) であった。これに対して、注入B区では生存胎子は全く得られなかった。

考 察

Kaufman⁴⁾は、 Ca^{++} および Mg^{++} を欠く培養液でマウス卵子を処置して単為発生を誘起し、胚盤胞期へ発育させた卵子を、卵巣を摘出した recipient に移植することによつて25体節をもつ生存胎子を得たが、これはこれまで単為発生卵由来の最も進んだ胎子とされていた。

最近, Cuthbertson⁵⁾はマウス卵子をエタノールで短時間処置後, サイトカラシンによつて2倍体とした単為発生卵の移植によつて, 通常用いられている recipient に移植した場合でも Kaufman ら⁴⁾と同程度に発育した生存胎子が得られることを報告して, 単為発生誘起剤としてエタノールがすぐれていることを明らかにした。

結果から明らかなように, 本実験でもエタノール処置による単為発生誘起率はきわめて高いことが明らかとなった。単為発生誘起率は, 用いる刺激剤の種類や排卵後の時間によつて大きく異なることが知られている¹⁾が, 同一の刺激剤を用いて系統間の差違を検討した報告はきわめて少ない^{11,12)}。実験1で明らかとなったように, エタノール処置による単為発生誘起率は系統によつて異なり, CDF₁, C3H および C57BL/6系で高い傾向がみられた。また, 単為発生卵の形態も系統によつて大きく異なり, 単為発生卵の大部分が1前核卵である系統, 直接分割卵が多い系統およびその中間に位置する系統などの3種に大別できることが知られた。いずれの系統でも, 前核を2個有する2前核卵の出現割合は低く, また2次極体の放出がおさえられた2倍体の1前核卵はほとんどみられず, これは Kaufman ら¹³⁾の BCF₁ および129 SVE 系を用いた報告と一致していた。

実験3の対照区の結果で明らかなように, エタノール処置後サイトカラシンBによつて2次極体の放出をおさえ2倍体とし, 体外培養で桑実胚あるいは胚盤胞に発育させた卵子を recipient に移植して妊娠10.0~12.5日目に検査したところ, 大部分の recipient で着床が観察された。しかしながら, 生存胎子は妊娠11.5日目までしか観察されず, 最も進んだ胎子の胎節数は30であった。この結果は, 単為発生卵を recipient に移植した場合, 25~30体節期の胎子に発生した時点で死滅退行することを観察した Cuthbertson⁵⁾の報告と一致していた。

単為発生卵が妊娠中期で死滅する原因についてはなお不明な点が多いが, 1) 膜融合の欠除による異常, 2) 遺伝子がホモ型になるため致死遺伝子が発現する, 3) 精子が持ち込む核以外の物質の欠除, 4) 核と細胞質の比が受精卵に比べて異常等の理由が考えられている。通常の受精過程では, 精子と卵子の膜融合が生じ, その結果 cortical granule が放出されるが, 単為発生卵ではその放出が欠除していることが指摘されている¹⁴⁾。そこで本実験の2では, 単為発生直後あるいは培養後得られた半数体単為発生由来の2細胞卵の割球をポリエチレングリコールを用いて融合させ, その生存性の延長を試みたが, 必ずしも好結果は得られなかった。Gulyas ら¹⁵⁾は, 2個の単為発生卵同士を融合して2倍体を作製し, 胚盤胞へ体外で発生させたのち, recipient に移植してその

生存性を調べたが, 通常の単為発生卵以上に進んだ生存胎子を得られなかったことを報告している。本実験結果および同氏ら¹⁵⁾の報告を合わせて考えると, 単為発生卵が途中で死滅する主な原因は膜融合の欠除ではないと推察される。

単為発生卵と受精卵との集合胚を作製すると, 単為発生卵由来の遺伝形質が産子に現われ, キメラが生ずること^{16,17)}が報告されている。また, 単為発生卵由来の胚盤胞内部細胞塊細胞を単離し, その1個の核を雌雄両前核を除去した卵子に注入後移植することによつて, 単為発生卵由来の産子が得られたことも報告されている¹⁸⁾。これらの事実より, 単為発生卵が子宮内で妊娠中期に死滅する原因は, 遺伝的要因の欠陥よりも, 受精時に精子がもち込む核以外の物質が欠除しているためではないかと考えられている。このことを明らかとするため, 本実験3では単為発生卵への受精卵細胞質の微量注入を試みた。結果で明らかなように, 注入A区で, 受精卵細胞質注入卵子の桑実胚あるいは胚盤胞への発育が対照区に比べて有意に高く, またこれらの卵子を移植することによつて35体節を有する生存胎子が得られた。この胎子は, これまでの報告に比べ, さらに進んだものであり, 受精卵細胞質の注入が単為発生卵の生存性の延長に有効であることが示唆された。しかしながら, 35体節期以上の発生はみられず, この時期で胎子の死滅が生ずることが知られたが, 今後注入量, 注入方法および濃度を検討することによりさらに発生を継続することができる可能性も考えられる。

哺乳動物卵子における前核の置換, あるいは核移植はきわめて再現性にとぼしい技術であったが, 最近, McGrath & Solter (1983)¹⁹⁾は不活化センダイヴィールスを用いた成功率の高い核移植技術を開発した。細胞融合法を応用した同氏ら¹⁹⁾の核移植技術は再現性が高いことが確認されており, 本手法を用いて単為発生卵と受精卵の間, あるいは受精卵同士間での雌雄前核の交換移植を実施することにより, 卵子が個体に発生するためには雌雄両核が必要なことが指摘されている²⁰⁻²²⁾。今後, 核移植技術を合わせて用いることにより, 単為発生卵から産子が得られない原因をさらに検討する必要があると思われる。

最後に本報告を御校閲いただいた当場繁殖部長中原達夫博士に感謝の意を表す。

文 献

- 1) Kaufman, M. H.: Early Mammalian Development, parthenogenetic studies. Cambri-

- dge, Cambridge University Press, 1983.
- 2) Pincus, G.: The breeding of some rabbits produced by recipients of artificially activated ova. *Proc. Nat. Aca. Sci.*, 25 : 557, 1939.
 - 3) Chang, M. C.: Development of parthenogenetic rabbit blastocysts induced by low temperature storage of unfertilized ova. *J. Exp. Zool.*, 125 : 127, 1954.
 - 4) Kaufman, M. H., Barton, S. C. and Surani, M. A. H.: Normal postimplantation development of mouse parthenogenetic embryos to the forelimb bud stage. *Nature*, 265 : 53, 1977.
 - 5) Cuthbertson, K. S.: Parthenogenetic activation of mouse oocytes in vitro with ethanol and benzyl alcohol. *J. Exp. Zool.*, 226 : 311, 1983.
 - 6) Whittingham, D. G.: Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. (suppl.)*, 14 : 7, 1971.
 - 7) Tsunoda, Y., Wakasu, M. and Sugie, T.: Viability of blastocysts and morulae cultured from 1-cell stage and transferred to recipients in the mouse. *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 56 : 417, 1985.
 - 8) 角田幸生, 若州政彦, 杉江 信: ポリエチレングリコールによるマウス2細胞期胚の割球融合, *家畜繁殖誌*, 30 : 98, 1984.
 - 9) Fulton, B. P. and Whittingham, D. G.: Activation of mammalian oocytes by intracellular injection of calcium. *Nature*, 273 : 149, 1978.
 - 10) 角田幸生, 安井 司, 徳永智之, 内田 驍, 杉江 信: マウス前核の置換と置換卵の移植による産子の生産, *家畜繁殖誌*, 31 : 130, 1985.
 - 11) Graham, C. F. and Deussen, Z. A.: In vitro activation of mouse eggs. *J. Embryol. exp. Morph.*, 31 : 497, 1974.
 - 12) Iles, S. A., McBurney, M. W., Bramwell, S. R., Deussen, Z. A. and Graham, C. F.: Development of parthenogenetic and fertilized mouse embryos in the uterus and in extrauterine sites. *J. Embryol. exp. Morph.*, 34 : 387, 1975.
 - 13) Kaufman, M. H.: The chromosome complement of single-pronuclear haploid mouse embryos following activation by ethanol treatment. *J. Embryol. exp. Morph.*, 71 : 139, 1982.
 - 14) Soupart, P.: Initiation of mouse embryonic development by oocyte fusion. In: *In vitro Fertilization and Embryo Transfer* (eds. Hafez, E. S. E. and Semm, K.): p51, MTP press, 1982.
 - 15) Gulyas, B. J., Wood, M. and Whittingham, D. G.: Fusion of oocytes and development of oocytes fusion products in the mouse. *Develop. Biol.*, 101 : 246, 1984.
 - 16) Stevens, L. C., Varnum, D. S. and Eicher, E. M.: Viable chimaeras produced from normal and parthenogenetic mouse embryos. *Nature*, 269 : 515, 1977.
 - 17) Surani, M. A. H., Barton, S. C. and Kaufman, M. H.: Development to term of chimaeras between diploid parthenogenetic and fertilized embryos. *Nature*, 270 : 601, 1977.
 - 18) Hoppe, P. C. and Illmensee, K.: Full-term development after transplantation of parthenogenetic embryonic nuclei into fertilized mouse eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79 : 1912, 1982.
 - 19) McGrath, J. and Solter, D.: Nuclear transplantation in the mouse embryos by microsurgery and cell fusion. *Nature*, 220 : 1300, 1983.
 - 20) Surani, M. A. H. and Barton, S. C.: Development of gynogenetic eggs in the mouse: implications for parthenogenetic embryos. *Science*, 222 : 1034, 1983.
 - 21) Barton, S. C., Surani, M. A. H. and Norris, M. L.: Role of paternal and maternal genomes in mouse development. *Nature*, 311, 374, 1984.
 - 22) McGrath, J. and Solter, D.: Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37 : 179, 1984.

Activation of mouse eggs in vitro with ethanol treatment, and the effects of blastomere fusion and microinjection of cytoplasm from fertilized eggs on the survival of parthenogenetic eggs

Yukio Tsunoda and Tadashi Sugie

Department of Reproduction, National Institute of Animal Industry and Livestock Improvement Assoc., Japan

It has been known that a brief treatment of ovulated mouse eggs with ethanol induces parthenogenetic activation. The present study was undertaken to determine (1) the effect of strain variation on the incidence of the various classes of parthenogenone induced and the activation frequency, (2) the effect of blastomere fusion and (3) microinjection of cytoplasm from fertilized eggs on the viability of parthenogenetic eggs in vitro and in vivo. The results obtained are as follows.

(1) The proportion of eggs activated was high (79-98%) in all eight strains tested, especially in CDF1, C57BL/6 and C3H strains. The class of parthenogenone was different among strains. The proportion of one pronucleus with second polar body was high in BCF1, C57BL/6 and CBA. On the contrary, the proportion of immediate cleavage was high in CDF1, BALB/c and C3H.

(2) The blastomere fusion of haploid parthenogenetic eggs did not improve the development of activated eggs in vitro.

3) Microinjection of cytoplasm from fertilized eggs improved the development of activated eggs in vitro and after transfer to recipients. The most advanced stage of live fetus (35-somite stage) was obtained in microinjected group.

(受付: 昭和61年4月3日)

マウス卵子の生存能に及ぼす加齢の影響

Effect of Maternal Age on Viability of Ova in Mice

東京農業大学畜産学科

小野 寺 政 一 石 島 芳 郎

Masakazu ONODERA Yoshiro ISHIJIMA

Department of Zootechnical Science, Tokyo University of Agriculture

マウス卵子の生存能に及ぼす加齢の影響を知る目的で、2, 4, 7~9および10~12カ月齢のCF#1系の未経産雌マウスから過排卵処理により得られた排卵後36~38時間の卵子の2細胞期以上に発達した割合(分割率)、異常卵の出現率および2細胞期胚の体外での発育能について比較検討した。

その結果、2, 4, 7~9および10~12カ月齢の卵子の分割率は、それぞれ87.4, 82.5, 83.5および62.3%で、母体の加齢とともに低下し、特に10~12カ月齢では2および4カ月齢に比べ有意に低い値を示した。また異常卵の出現率は、それぞれ8.2, 6.8, 14.7および28.3%で、7~9および10~12カ月齢で有意に高い率を示した。

次に、それぞれの月齢から回収した2細胞期胚を体外培養したところ、拡張胚盤胞への発生率は、それぞれ90.1, 91.3, 85.7および75.8%で、10~12カ月齢のもので有意にその率が低下した。これに伴い退行卵の割合は10~12カ月が有意に高い値を示した。

以上のことから、母体の加齢がすすむと分割しない卵子および異常卵の割合の増加、さらに形態的に正常と判断される卵子でも発育能力の低いものが含まれることが明らかとなった。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 114-117, 1987)

緒 言

母体の加齢に伴い生殖能力が衰退することは、一般に良く知られている事実であり、具体的に実験動物では排卵数の減少^{2,14,20}、妊娠率の低下^{3,10,14}、着床後の胚死亡率の増加^{6,14}およびこれらに起因する産子数の減少などが指摘されている^{1,7,8,14}。

また一方では、これらの衰退現象が卵巣自身の老化によるものなのか、あるいは母体の加齢に付随する生理状態の変化の影響なのかを探る目的で、染色体異常の検索や卵巣移植の技術などを用いた実験が行われてきている^{3,15,17,19}。また同様な目的で、老齢動物から得られた胚の生存性を直接検討した報告も、胚移植技術を用いて行われてきている^{2,4,5,9,16,20}。しかしながら、ごく初期の発生過程における胚の発育能を観察した報告は極めて少ない¹⁰。

今回著者らは、加齢に伴う排卵から着床前期までの胚の損失について模索する目的で、2, 4, 7~9および10~12カ月齢から得られた卵子の形態的観察を行い、さ

らにこれらの卵子の体外での発育能について検討したので報告する。

材料および方法

本実験には、当研究室で閉鎖集団として維持しているCF#1系の2~12カ月齢の未経産雌マウスを供試した。交配には同系統の成熟雄マウス(3~4カ月齢)を用いた。

過排卵誘起は、PMSG (PMS ゼンヤク、日本全薬) 5IUを皮下注射し、その48時間後にHCG (HCG モチダ、持田製薬) 5IUを皮下注射する方法を採用した。雌マウスはHCG投与後、雄と一晚同居させ、翌朝膣栓あるいはスメア中に精子が存在するもののみを検査の対象とした。処理したマウスは、HCG投与後48~50時間(推定排卵後36~38時間)に開腹し、卵管を摘出した。

採卵は卵管を灌流することにより行い、直ちに実体顕微鏡下で回収した卵子の数を算定すると共に、形態的観察を行った。

また、形態的に正常な2細胞期胚を、37°C、5%炭酸

ガス, 95% 空気の培養器内で72時間培養した. なお, 灌流液および培養液には, M16液²⁾からペニシリンを除いたものを用いた.

結 果

各月齢のマウスから回収された卵子の形態観察の結果は表1に示す通りである.

表1から明らかなように, 卵子が2細胞期以上に発達した割合(分割率)は, 2, 4, 7~9および10~12カ月齢において, それぞれ87.4% (278/318), 82.5% (170/206), 83.5% (232/278) および62.3% (66/106) で, その値は母体の加齢に伴い低下する傾向にあり, 特に10~12カ月齢では2月齢に比べ有意に低い値を示した. また異常卵の出現率は, それぞれ8.2% (26/318), 6.8% (14/206), 14.7% (41/278) および28.3% (30/106) で, 7~9 および10~12カ月齢で有意に高い値を示した.

次に, それぞれの月齢から回収した2細胞期胚の体外培養の成績を示すと表2の通りである.

表2から明らかなように, 拡張胚盤胞期まで発達した胚の割合は, 2, 4, 7~9 および10~12カ月齢のもので, それぞれ90.1% (237/263), 91.3% (105/115), 87.5% (192/224) および75.8% (50/66) であり, 10~12カ月齢から得られた胚の発生率が2および4カ月齢のものに比べ有意に低下した. また, 発育能の判定を桑実期以上に発達したものにして見ても, やはり10~12カ月齢か

ら得られた卵子の発生率は有意に低いものであった. 一方, 培養中に退行した卵子の割合は, 2, 4, 7~9 および10~12カ月齢で, それぞれ4.6% (12/263), 3.5% (4/115), 5.8% (13/224) および12.1% (8/66) で, 10~12カ月齢で有意に高い値を示した.

考 察

本実験では, マウス初期発生胚の生存能に及ぼす加齢の影響を知るため, 2, 4, 7~9 および10~12カ月齢の CF#1 系の未経産雌マウスから得られた卵子を対象に, 正常分割卵の割合(分割率)および異常卵の出現率, さらに体外培養による発育能などの点から検討を行った.

その結果, 排卵後36~38時間に回収した卵子の2細胞期以上に発達した割合は, 7~9カ月齢までは83.5%と, 2および4カ月齢に比べて大差がみられなかったが, 10~12カ月齢から得られた卵子では62.3%と有意な分割率の低下が認められた. 従来, 本実験と同条件の成熟マウスから得られる卵子の分割率は80~90%であることが知られているので^{11,12)}, 今回の10~12カ月齢の成績は明らかに加齢の影響があつたためと考えられる. また, 異常卵の出現率は, 7~9カ月齢で14.7%, 10~12カ月齢で28.3%と, 2および4カ月齢のもの(8.2および6.8%)に比べ有意に高い値を示し, 特に10~12カ月齢で顕著に高い傾向を示した. 一般に成熟マウスに PMSG 5

表 1 Effect of maternal age on percentage of ova cleavaged and abnormal ova in the mouse

| Maternal age (months) | No. of females | No. of ova recoverd | No. of ova cleavaged | % | No. of abnormal ova | % |
|-----------------------|----------------|---------------------|----------------------|-------|---------------------|-------|
| 2 | 17 | 318 | 278 | 87.4 | 26 | 8.2 |
| 4 | 11 | 206 | 170 | 82.5 | 14 | 6.8 |
| 7-9 | 19 | 278 | 232 | 83.5 | 41 | 14.7a |
| 10-12 | 10 | 106 | 66 | 62.3b | 30 | 28.3b |

a: Significantly different from 2 months old (P<0.05).

b: Significantly different from 2 months old (P<0.001).

表 2 Effect of maternal age on in vitro development of embryos from 2-cell to blastocyst in the mouse.

| Materna age (months) | No. of ova cultured | Developmental stages | | | | No. of ova degenerated |
|----------------------|---------------------|----------------------|------------|----------------------|------------|------------------------|
| | | morulae | blastocyst | expanding blastocyst | total | |
| 2 | 263 | 2(0.7%) | 12(4.6%) | 237(90.1%) | 251(95.4%) | 12(4.6%) |
| 4 | 115 | 0(0) | 6(5.2) | 105(91.3) | 111(96.5) | 4(3.5) |
| 7-9 | 224 | 0(0) | 19(8.5) | 192(85.7) | 211(94.2) | 13(5.8) |
| 10-12 | 66 | 2(3.0) | 6(9.1) | 50(75.8)a | 58(87.9)b | 8(12.1)b |

a: Significantly different from 2 months old (P<0.001).

b: Significantly different from 2 months old (P<0.05).

IU と HCG 5IU の組み合わせで過排卵誘起した場合、異常卵の出現率は、高くても10%程度にあることが知られている¹²⁾。このことを考えれば、今回の7~9カ月齢以降の異常卵の出現率は明らかに高いとみられる。このような加齢による異常卵の高率化が上記の分割率の低下の一因と思われる。伊藤ら¹³⁾は、2~16カ月齢の ddY/F 系マウスに過排卵処理を行い、異常卵の出現率を調べたところ、やはり加齢によりその率が著しく高まることを報告している。

このような、加齢マウス胚の初期発生の異常は、異常卵が多く排卵されることが一義的な原因と考えられるが、この他、正常な卵母細胞の受精率の低下や異常受精、さらには遅延排卵や遅延受精も考えられる。

この点に関して動物は異なるが、Mizoguchi and Dunkel¹⁷⁾ は老齢ハムスターと若齢ハムスターの卵子の受精率、退行卵の割合および染色体異常率を比較し、老齢ハムスターが劣ることを指摘している。

次に、それぞれの月齢で回収した形態的に正常な2細胞期胚を、体外培養して発育能を比較した。その結果、10~12カ月齢における2細胞期から拡張胚盤胞への発生率は75.8%、また途中で退行した胚の割合は12.1%で、いずれも2あるいは4カ月齢のマウスに比べ有意に劣る成績を示した。このことは、加齢動物の場合に形態が正常にみえる胚にも発育能が低いものが含まれることを示唆している。

一般に、交配後3.5~4日の老齢マウスやラットから得られる胚盤胞の割合が若齢のものに比べ有意に低く、異常胚の出現率が高い傾向が指摘されている^{3,4,5,9,20)}、こうした原因は、本実験の体外培養で示された加齢動物胚の発生率の低さがひとつの要因と考えられる。

このように、胚盤胞への発生率が低いのは、老齢マウスの第1卵割期における異数体の出現率が若齢マウスに比べ高いこと¹⁵⁾、異数体の一部が桑実胚までの時期に淘汰される事実¹⁹⁾から考え合わせると、染色体異常やその他何らかの機能的異常を持つ受精卵を持つ受精卵が発生途中で退行しているためと推察される。

いずれにせよ、今回の実験から母体の加齢に伴い、マウス卵子の生存能が著しく低下している事実が明らかとなった。

本論文の要旨は第93回日本不妊学会関東地方部会において発表した。なお、この研究は文部省科学研究費補助金(総合研究(A) No. 58370036)によった。

文 献

1) Biggers, J. D., Finn, C. A. and McLaren,

- A.: Long-term reproductive performance of female mice. II. Variation of litter size with parity. *J. Reprod. Fert.*, 3: 313, 1962.
- 2) Blaha, G. C.: Effect of age of the donor and recipient on the development of transferred golden hamster ova. *Anat. Rec.*, 150: 413, 1964.
- 3) 出口信幸: 脾内卵巣移植からみた老齢動物の間脳一下垂体一卵巣系機能, *日産婦誌*, 29: 611, 1977.
- 4) 岩城 章, 野沢あき子: 高年令妊娠による心身障害発生に関する研究—高年令卵の異常と先天異常, 心身障害発生防止に関する胎児環境的研究報告書, 97, 1976.
- 5) 岩城 章, 清水工経, 野沢あき子: 高年令妊娠による心身障害発生に関する研究—高年令卵の異常と先天異常, 心身障害発生防止に関する胎児環境的研究報告書, 91, 1975.
- 6) Finn, C. A.: Embryonic death in aged mice. *Nature*, 194: 499, 1962.
- 7) Finn, C. A.: Reproductive capacity and litter size in mice: Effect of age and environment. *J. Reprod. Fert.*, 6: 205, 1963.
- 8) Franks, L. M. and Payne, J.: The influence of age on reproductive capacity in C57BL mice. *J. Reprod. Fert.*, 21: 563, 1970.
- 9) Gosden, R. G.: Survival of transferred C57BL mouse embryos: Effect of age of donor and recipient. *Fertil. Steril.*, 25: 348, 1974.
- 10) Harman, S. M. and Talbert, G. B.: The effect of maternal age on ovulation, corpora lutea of pregnancy and implantation failure in mice. *J. Reprod. Fert.*, 23: 33, 1970.
- 11) Ishijima, Y. and Watanabe, A.: Effect of estradiol on superovulation in adult mice. *Jour. Agri. Sci., Tokyo Nogyo Daigaku*, 15: 17, 1970.
- 12) 伊藤雅夫: 誘起排卵の異常, 産婦人科M OOK, 19 (着床): 234, 1982.
- 13) 伊藤雅夫, 相知正己, 野口 晟, 宮原 昭, 神田 晋, 斉藤正法, 谷 茂, 丸瑠璃子: PMS と HCG の投与によるマウス過排卵反応の加齢による変化について, *日大医誌*, 38: 1331, 1979.
- 14) 北 徳, 猪 貴義: 高齢未経産マウスの繁殖能力, *日不妊会誌*, 18: 216, 1973.
- 15) Maudlin, I. and Fraser, L. R.: Maternal age and the incidence of aneuploidy in first-cleavage mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 54: 423, 1978.
- 16) Maurer, R. R. and Foote, R. H.: Maternal aging and embryonic mortality in the rabbit. I. Repeated superovulation, embryo culture and transfer. *J. Reprod. Fert.*, 25: 329,

- 1971.
- 17) Mizoguchi, H. and Dukelow, W. R.: Fertilizability of ova from young or old hamsters after spontaneous or induced ovulation. *Fertil. Steril.*, 35: 79, 1981.
- 18) 水野正彦, 佐藤孝道: 卵の発育淘汰, 受精・着床, 84 (飯塚理八, 坂元正一, 鈴木雅州, 高木繁夫編), 171, 学会出版センター, 1985.
- 19) Parkening, T. A., Collins, T. J. and Elder, F. F. B.: Orthotopic ovarian transplantation in young and aged C57BL/6J mice. *Biol. Reprod.*, 32: 989, 1985.
- 20) Talbert, G. B. and Krohn, P. L.: Effect of maternal age on viability of ova and uterine support of pregnancy in mice. *J. Reprod. Fert.*, 11: 399, 1966.
- 21) Whittingham, D. G.: Culture of mouse ova. *J. Reprod. Fert. (Suppl.)*, 14: 7, 1971.

Effect of maternal age on viability of ova in mice

Masakazu Onodera and Yoshiro Ishijima

Department of Zootechnical Science, Tokyo
University of Agriculture

The effect of maternal age on viability of ova was investigated in adult mice. Young (2 or 4 months old) and aged (7 to 9 and 10 to 12 months old) female mice of CF#1 strain were used in this study. Superovulation was induced by subcutaneous injection of 5 IU PMSG and

5 IU HCG 48 hours later, and then mated. The females were killed by cervical dislocation at 48 to 50 hours after HCG injection (about 36 to 38 hours after ovulation). The ova were flushed from oviduct under a microscope and then observed. The morphologically normal 2-cell embryos were cultured with M16 medium without penicillin at 37°C under 5% CO₂ and 95% air for 72 hours.

In the 2, 4, 7 to 9 and 10 to 12 months old groups, the percentages of ova cleaved were 87.4, 82.5, 83.5 and 62.8%, respectively. The cleavage rate in the 10 to 12 group was significantly lower than that in the young group. The percentages of morphologically abnormal ova in the four groups were 8.2, 6.8, 14.7 and 28.3%, respectively. The percentage of abnormal ova in aged group (7 to 9 and 10 to 12 months old) was significantly higher than that in the young group. In culture, the percentages of embryos reached the expanding blastocyst stage in the 2, 4, 7 to 9 and 10 to 12 months old groups were 90.1, 91.3, 85.7 and 75.8%, respectively. The development rate in the aged group (10 to 12 months old) was significantly lower than that in the young group. In the four groups, the ova degenerated in culture were 4.6, 3.5, 5.8 and 12.1%, respectively. The percentage of ova degenerated in the aged group (10 to 12 months old) was significantly higher than that in the young group. These results suggested that the viability of ova in old females mice is lower than that of ova obtained from young adult females.

(受付: 昭和61年2月28日)

EFFECT OF RETINOL AND TAURINE ON CAPACITATION AND THE ACROSOME REACTION OF GUINEA PIG SPERMATOZOA

Kahei SATO, Yoshie SUZUKI and Masahiro ENDO

Laboratory of Animal Reproduction, College of Agriculture and Veterinary
Medicine, Nihon University

Abstract: Effects of retinol and taurine on capacitation and acrosome reaction of guinea pig spermatozoa were examined. Capacitation of guinea pig spermatozoa *in vitro* was enhanced by retinol and taurine. In the presence of retinol, also, capacitated spermatozoa were undergo the acrosome reaction under Ca^{2+} -free. While, taurine could not induce the acrosome reaction under same conditions. These results indicated that taurine and retinol involved in the change of sperm surface or sperm cell membranes in the acrosome in the physiology and function of spermatozoa preliminarily to and in the process of fertilization.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 118-122 1987)

Introduction

Mammalian spermatozoa must undergo the acrosome reaction before they can penetrate egg investments. It is well known that the acrosome reaction is necessary not only for enabling spermatozoa to pass the zona pellucida but also rendering the spermatozoa capable of fusing with the egg plasma membrane (Meizel, 1978¹⁾; Yanagimachi, 1981²⁾).

Extracellular Ca^{2+} is known to be essential for initiation of the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa (Meizel, 1978¹⁾; Yanagimachi and Usui, 1974³⁾; Yanagimachi, 1981²⁾, 1982⁴⁾). Yanagimachi and Usui (1974)³⁾ succeeded the separation of capacitation from the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa. According to them, when guinea pig spermatozoa were incubated in Ca^{2+} -free modified Tyrode's solution (mT) for 16-17 hours at 37°C, they were fully capacitated, but none of them underwent the acrosome reaction, upon addition of Ca^{2+} (2 mM) the majority sperm showed the acrosome reaction. These results indicate that extracellular Ca^{2+} is essential for initiation of the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa,

not for progress and completion of capacitation. This experimental procedure is useful analytical tool for the study in sperm physiology.

Taurine, hypotaurine, epinephrine and retinol, recently, have been reported to facilitate capacitation, the acrosome reaction or fertilization (Lui et al., 1977⁵⁾; Meizel, 1978¹⁾; Bavister and Yanagimachi, 1977⁶⁾; Sato and Suzuki, 1985⁷⁾).

Thus, using guinea pig spermatozoa it is of interest to examine the effect of these biological active components on capacitation and the acrosome reaction. In the present study we examined effects of taurine and retinol on capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa.

Materials and Methods

Medium: The regular medium used in the present study was a modified Tyrode's solution (Fleming and Yanagimachi, 1981⁸⁾) with following composition; 108.76mM NaCl, 2.70mM KCl, 2.00mM CaCl_2 , 0.49 mM MgCl_2 , 25.07mM NaHCO_3 , 5.56mM D-glucose, 10.0mM Na-lactate, 0.10mM oxalacetic acid, 1.0mM Na-pyruvate, 100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamycin

(Sigma Co.) and 3mg/ml bovine serum albumin (Sigma Co.). The pH was adjusted to 7.6 prior to incubation and the osmolarity was about 308 mOsm. When CaCl_2 was deleted from the medium or when excess CaCl_2 was included in the medium, the concentration of NaCl was adjusted to maintain the osmolarity of the medium constant.

Preparation and examination of spermatozoa: To know the ability of used reagents (taurine and retinol) for inducing the acrosome reaction of spermatozoa the experimental system reported by Fleming and Yanagimachi (1981)⁸⁾ was used. Spermatozoa were obtained from the distal cauda epididymis of fully grown Hartley guinea pig males (500–700g, body weight) and suspended, at the concentration of $6-8 \times 10^6$ sperm/ml, in Ca^{2+} -free medium containing 80 μg /ml lysophosphatidyl choline (LC; Sigma Co.). One and a half ml of the sperm suspension was placed in a Petri dish (Falcon Co.) covered with mineral oil, and incubated at 37°C under 5% CO_2 -air for 1 hour. At the end of 1 hour's incubation, the sperm suspension was mixed with an equal volume of the medium with CaCl_2 (4mM) or used reagents (see in the text). It is reported that the acute addition of Ca^{2+} in an equal volume induce the synchronous acrosome reaction of 80–90% of the entire population of spermatozoa within 15–20 minutes (Fleming and Yanagimachi, 1981⁸⁾). In this study, spermatozoa were examined within 45 minutes after Ca^{2+} addition, using the phasecontrast and dark-field microscope. Another series of experiments was carried out to determine the effect of reagents used on capacitation of spermatozoa. Spermatozoa were incubated in Ca^{2+} -free medium containing LC (80 μg /ml) or reagents used for 1

hour. At the end of 1 hour's incubation, Ca^{2+} in an equal volume of the medium was added into the preincubated medium. Spermatozoa of this series were incubated after addition of the medium containing Ca^{2+} for 30 minutes. At various intervals after the start of incubation drops of the sperm suspension were placed onto a slide glass so that the percentages of motile spermatozoa and of spermatozoa displaying "hyperactivation" was determined. About 100 motile spermatozoa were examined for determination.

Results

Promotion of capacitation of guinea pig spermatozoa by retinol: In order to determine effect of retinol on capacitation of guinea pig spermatozoa, which were incubated for 1 hr in Ca^{2+} -free medium in the presence of various concentrations (10, 20, 40 μg /ml) of retinol and then exposed to Ca^{2+} . The percentages of acrosome reacted spermatozoa were determined 15 and 45 minutes after Ca^{2+} addition. Results were shown in Table 1. The percentages of spermatozoa that underwent the acrosome reaction increased with increasing retinol concentration. In contrast, control spermatozoa which were incubated in Ca^{2+} -free medium added dimethyl sulfoxide (DMSO) for 1 hr then exposed to Ca^{2+} addition and after 45 min the acrosome reaction was 3.2%.

Effect of taurine on capacitation and motility of guinea pig spermatozoa: Table 2 summarizes the results of experiments in which spermatozoa were incubated in Ca^{2+} -free medium containing taurine at concentration of 10^{-4} , 10^{-5} and 10^{-6} M/ml. Results clearly indicated stimulating effect of taurine at concentration of 10^{-5} and 10^{-6} M/ml for capaci-

Table 1 Effect of retinol on the induction of capacitation of guinea pig spermatozoa

| Ca^{2+} added after 1 hr preincubation in Ca^{2+} -free medium | After 1 hr preincubation | | Examination at 15 minutes after addition of Ca^{2+} | | Examination at 45 minutes after addition of Ca^{2+} | |
|---|--------------------------|------------------------------|---|------------------------------|---|------------------------------|
| | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm |
| Control (I) | 78.3±1.7 | 0.7±0.4 | 73.3±3.3 | 2.0±0.9 | 70.0±0.0 | 3.2±0.9 |
| LC (85 μg /ml) | 81.4±1.4 | 1.1±0.5 | 79.2±1.7 | 88.1±1.4* | 76.0±1.3 | 95.9±0.8* |
| Retinol (40 μg /ml) | 80.0±0.0 | 0.3±0.2 | 66.7±5.0 | 78.8±4.7* | 55.7±3.0 | 86.2±1.3* |
| Retinol (20 μg) | 90.0±0.0 | 2.0±1.2 | 74.0±2.4 | 87.3±2.5* | 68.3±4.8 | 93.3±0.8* |
| Retinol (10 μg /ml) | 87.5±1.7 | 0.0±0.0 | 78.3±3.1 | 58.3±2.3* | 70.0±5.8 | 68.4±2.1* |

*P<0.01 Compared to Control

Table 2 Effect of taurine on the induction of capacitation of guinea pig spermatozoa

| Ca ²⁺ added after 1 hr preincubation in Ca ²⁺ -free medium | After 1 hr preincubation | | Examination at 15 minutes after addition of Ca ²⁺ | | Examination at 45 minutes after addition of Ca ²⁺ | |
|---|--------------------------|------------------------------|---|------------------------------|---|------------------------------|
| | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm |
| Control (2) | 79.2±2.0 | 0.3±0.3 | 60.0±4.0 | 3.3±2.5 | 56.7±5.0 | 15.3±2.7 |
| Taurine (10 ⁻⁴ M/ml) | 87.5±3.6 | 0.0±0.0 | 74.0±2.5 | 2.4±1.0 | 51.7±5.0 | 8.0±2.1 |
| Taurine (10 ⁻⁵ M/ml) | 84.2±2.0 | 0.3±0.3 | 68.0±2.0 | 25.6±4.2* | 53.3±3.3 | 26.7±6.3 |
| Taurine (10 ⁻⁶ M/ml) | 84.2±2.0 | 0.0±0.0 | 65.0±5.0 | 20.5±3.8* | 46.7±3.3 | 28.0±6.9 |

*P<0.01 Compared to Control

Table 3 Effect of Retinol on the induction of the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa

| Reagent (s) added into medium after preincubation 1 hr in Ca ²⁺ -free medi- um containing LC (85µg/ml) | After 1 hr preincubation | | Examination at 15 minutes after addition of reagen (s) | | Examination at 45 minutes after addition of reagent (s) | |
|--|--------------------------|------------------------------|---|------------------------------|--|------------------------------|
| | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm |
| Control | 82.5±1.7 | 0 | 75.0±3.1 | 4.0±0.9 | 70.5±3.5 | 5.2±1.4 |
| Retinol (40 µg/ml) | 81.0±1.8 | 1.6±0.7 | 64.0±3.7 | 16.9±5.2* | 51.3±7.4 | 29.1±7.4* |
| Retinol (20 µg/ml) | 80.7±0.7 | 0.9±0.6 | 58.9±4.8 | 26.4±4.1* | 50.0±5.6 | 29.1±7.1* |
| Retinol (10 µg/ml) | 80.8±0.8 | 0 | 70.0±2.7 | 21.0±4.8* | 62.5±3.7 | 27.8±6.2* |

*P<0.05 Compared to Control

Table 4 Effect of taurine on the induction of the acrosome reaction

| Reagent (s) added into medium after preincubation 1 hr in Ca ²⁺ -free medi- um containing LC (85µg/ml) | After 1 hr preincubation | | Examination at 15 minutes after addition of reagent(s) | | Examination at 45 minutes after addition of reagent (s) | |
|--|--------------------------|------------------------------|---|------------------------------|--|------------------------------|
| | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm | % Motile sperm | % Acrosome- reacted sperm |
| Control | 83.3±3.3 | 0 | 76.7±3.3 | 0 | 70.0±2.8 | 1.3±0.3 |
| Taurine (10 ⁻⁴ M/ml) | 86.7±3.3 | 0 | 76.7±3.3 | 0 | 73.3±3.3 | 0.7±0.7 |
| Taurine (10 ⁻⁵ M/ml) | 86.7±3.3 | 0 | 80.0±0.0 | 0 | 73.3±3.3 | 0 |
| Taurine (10 ⁻⁶ M/ml) | 86.1±3.2 | 0 | 76.7±3.3 | 0 | 66.7±3.3 | 0 |

tation of guinea pig spermatozoa. Incubation for 1 hr in Ca²⁺-free medium let to about 20-25% of spermatozoa being capable of undergoing the acrosome reaction (capacitation) upon the addition of Ca²⁺ after 15 min and 26.7-28.0% of spermatozoa capacitated after 45 min of Ca²⁺ addition. The acrosome reaction of control spermatozoa was 2.0 and 3.2% at 15 and 45 min after Ca²⁺ addition, respectively. High concentration of taurine(10⁻⁴M/ml) was obviously no effect on sperm capacitation. The sperm motility was not affected.

Effect of retinol on the acrosome reaction: The majority of spermatozoa of guinea pig incubated for 1 hr in Ca²⁺-free medium with LC are capacitated as evidenced by a rapid synchronous acrosome reaction (Fle-

ming and Yanagimachi, 1981⁸⁾). Another experimental series in the present study was performed to determine whether retinol are capable of the acrosome reaction of spermatozoa. When spermatozoa were incubated for 1 hr and then Ca²⁺ was added, 27.8-29.1% spermatozoa underwent the acrosome reaction 45 min after retinol at various concentrations.

Effect of taurine on the acrosome reaction: When spermatozoa were incubated in Ca²⁺-free medium with LC (85µg/ml) for 1 hr and Ca²⁺ was added, the acrosome reaction was examined. Results were shown in Table 4. Taurine used in this experiment could not induced the acrosome reaction. Taurine also had no effect on sperm motility under this experimental conditions.

Discussion

In the present study, we showed that capacitation and the acrosome reaction of guinea pig spermatozoa were stimulated by the presence of retinol or taurine.

Retinol is reported to be present in mammalian spermatozoa and seminal plasma (Swarup and Johnson, 1974⁹⁾; Swarup and Sekhan, 1975¹⁰⁾) and the acrosome (Gambhir and Ahluwalia, 1975¹¹⁾). Recently, a report from our laboratory has indicated that retinol facilitates capacitation of hamster spermatozoa under *in vitro* conditions, not the acrosome reaction (Sato and Suzuki, 1985⁷⁾). These results suggest clearly that retinol has important functional roles in capacitation process.

Taurine also has been known to be potential for the maintenance of sperm motility (Mrsny et al., 1979¹²⁾; Leibfried and Bavister, 1981¹³⁾) and the induction of sperm capacitation (Mrsny et al., 1979¹²⁾; Sato and Suzuki, 1985⁷⁾). In the present study, capacitation of guinea pig spermatozoa were induced by taurine. This result indicates the biological roles of taurine in capacitation processes.

On the other hand, although taurine is known to have a stimulatory effect of sperm motility mentioned above, retinol or taurine at concentrations used did not show the stimulatory effect on sperm motility. These differences between guinea pig and hamster spermatozoa could not be explained clearly from the present study.

References

- 1) Meizel, S.: The mammalian sperm acrosome reaction: A biochemical approach. in Development in mammals., 3: 1-62. edited Johnson, M. H., North-Holland, 1978.
- 2) Yanagimachi, R.: Mechanisms of fertilization in mammals. in Fertilization and embryonic development *in vitro*., 81-182. edited Mastroianni, L. and Biggers, J. D., NY, Plenum Press, 1981.
- 3) Yanagimachi, R. and Usui, N.: Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. Exp. Cell Res., 89: 161, 1974.
- 4) Yanagimachi, R.: *In vitro* sperm capacitation and fertilization of golden hamster eggs in a chemically defined medium. In *in vitro* fertilization and embryo transfer.,

65-76. edited Hafetz, E. S. E. and Semm, K., NY, Alan R. Liss, 1982.

- 5) Lui, C. W., Cornett, L. E. and Meizel, S.: Identification of the bovine follicular fluid protein involved in the *in vitro* induction of the hamster sperm acrosome reaction. Biol. Reprod., 17: 31, 1977.
- 6) Bavister, B. D. and Yanagimachi, R.: The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reaction of hamster spermatozoa *in vitro*. Biol. Reprod., 16: 228, 1977.
- 7) Sato, K. and Suzuki, Y.: Effects of epinephrine, Taurine and retinol on *in vitro* fertilization in the hamster. Jap. J. Fert. Ster., 30(4): 489, 1985.
- 8) Fleming, A. D. and Yanagimachi, R.: Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipids in the acrosome reaction. Gamete Res., 4: 253, 1981.
- 9) Swarup, D. and Johnson, N. P.: Incorporation of labelled retinol and retionic acid in bovine spermatozoa: Effect of zinc on the rate of incorporation. Internat. J. Vitm. Nutr. Res., 44: 370, 1974.
- 10) Swarup, D. and Sekhon, H.: Incorporation of labelled spermatozoa: III. Effect of zinc, fructose, and pH on the incorporation. Nutrition report international, 12: 255, 1975.
- 11) Gambhir, K. K. and Ahluwalia, B. S.: Vitamin A in bovine sperm acrosomes. J. Reprod. Fert., 43: 129, 1975.
- 12) Mrsny, R. J., Waxman, L. and Meizel, S.: Taurine maintains and stimulates motility of hamster sperm during capacitation *in vitro*. J. Exp. Zool., 210: 123, 1979.
- 13) Leibfried, M. L. and Bavister, B. D.: The effects of taurine and hypotaurine on *in vitro* fertilization in the golden hamster. Gamete Res., 4: 57, 1981.

モルモット精子の capacitation 及び 先体反応に及ぼす retinol 並びに taurine の影響

日本大学農獣医学部家畜繁殖学教室
佐藤嘉兵, 鈴木淑恵, 遠藤真弘

モルモットの精巢上体尾部精子を用いて, その capacitation 並びに先体反応誘起に対する retinol 及び taurine の影響について調べた. モルモット精子の capacitation は Ca^{2+} -free の medium 中で retinol あるいは taurine の存在下において促進された. 一方, Ca^{2+} -free

medium 中で lysophosphatidyl choline (80 μ g/ml) の存在下において capacitate された精子は Ca^{2+} -free の条件下で retinol により先体反応が誘起された。しかし, taurine には先体反応誘起が認められなかった。本実験に使用した retinol の用量下において, 精子の運動

性は影響を受けなかった。一方, taurine がハムスター精子の運動促進効果を有することが報告されているが, 本実験条件下においては, taurine のモルモット精子の運動促進効果を認めることはできなかった。

(受付: 昭和61年3月17日)

PREGNANCY IN RABBITS ARTIFICIALLY INSEMINATED INTO THE OVIDUCT

Kiichi KANAYAMA, Tadashi SANKAI, Tuyoshi ENDO
and Yuzi SAKUMA

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

Abstract: Pregnancy rate of artificial insemination into the oviduct through the tubal fimbria was studied on rabbits.

The animals were laparotomized under general anesthesia and 0.05 ml of diluted semen was injected with a capillary from the tubal fimbria into the oviduct. The semen was obtained from mature male rabbits by means of the artificial vagina method and diluted with modified Tyrode's solution to 1:100. The recipients were given hCG one hour after the insemination to induce ovulation. They had no superovulation treatment.

Four out of the five thus treated gave birth to young. The average number of babies was 3.5 per mother. The length of gestation was 31 days in three cases and 32 days in the remaining one. The fourteen newborn rabbits were morphologically and functionally normal. It was thus demonstrated that artificial insemination into the oviduct did not seriously affect the oviduct movement and the descent of fertilized ova.

It was therefore suggested that artificial insemination into the oviduct could be applied to the treatment of sterility due to oligospermia.

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 123-127, 1987)

Introduction

It is known that, for spermatozoa to be capacitated, they do not have to pass all the female reproductive tracts i.e., the vagina, uterus, and oviduct¹⁻⁵⁾. Also known is the fact that it takes rabbit spermatozoa 10 to 11 hours to be capacitated within the oviduct alone^{2,6)}. The number of spermatozoa reaching the ampulla of uterine tube to be fertilized is estimated to be less than a few hundred⁷⁾.

Several workers have attempted to fertilize rabbits by injecting a small amount of semen from the tubal fimbria into the oviduct⁸⁻¹¹⁾. This technique has brought about a number of fundamental findings concerning fertilization. Chang⁸⁾, in particular, found a clue to sperm capacitation. None of these workers, however, has reported the delivery of young as the result of artificial insemination into the

oviduct. Their experiments, therefore, do not seem to provide the crucial evidence that normal fertilization was performed.

In view of the above situation, we have attempted to fertilize rabbits by injecting a small amount of diluted semen from the tubal fimbria into the oviduct. As a result, we could obtain many cleaved ova and, by transferring them to recipients, succeeded in producing normal litters¹²⁾. We could thus undisputably demonstrate that artificial insemination into the oviduct resulted in normal fertilization. Based on these results, we suggested one possibility for treating human sterility resulting from oligospermia by applying this technique¹²⁾. However, this may cause a physical irritation to the oviduct of the recipient and affect the intratubal movement of the embryo. In other words, the question still remains whether or not artificial insemination into the oviduct can lead to normal

gestation.

In the present investigation, we could obtain young in a high proportion of the female rabbits by injecting semen from their tubal fimbria into the oviduct. In this paper, we intend to report the results of our experiment.

Materials and Methods

The subjects were mature female Japanese white rabbits weighing 2.8 to 3.5kg. The animals were laparotomized by midline abdominal incision under general anesthesia with a pentobarbiturate derivative. When it was confirmed that mature follicles existed in the ovary, 0.05ml of diluted semen was injected from the tubal fimbria into the oviduct by means of a glass capillary. The semen had been collected from mature male rabbits by artificial vagina method and diluted to 1 : 100 with the modified Tyrode's solution (Brackett and Oliphant)¹³⁾. The procedure, schematically illustrated in Fig. 1, was always carried out aseptically. Care was taken so as not to cause bleeding from the fimbria in injecting the diluted semen. To induce ovulation, 75iu of hCG was administered into the auricular vein an hour later.

Five rabbits thus treated were kept under observation for delivery, number of young and gestation period. The rabbits were not subjected to superovulation treatment.

Results

The results of the present experiment are summarized in Table 1. Four out of the five subjects bore litters, which consisted of 2 babies in two cases and 5 in the other two. The newborn rabbits gave no evidence of morphological or functional abnormalities and were growing normally. The average num-

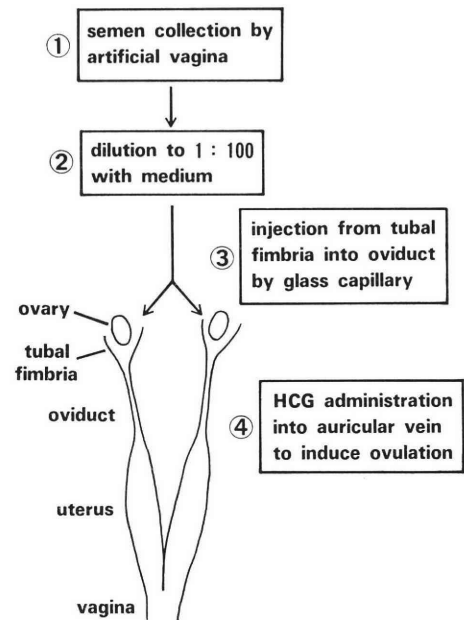


Fig. 1 Procedure of the experiment

ber of babies was 3.5 per mother. With the day of semen injection regarded as Day 0, the length of gestation was 31 days in three cases and 32 in the remaining case. These were within the normal range of gestation period for rabbits.

The average number of young in the present study was smaller than that in normal gestation. We confirmed the existence of mature follicles in the ovary, but did not count their number to minimize the physical irritation involved in the surgical procedure. The relation between the numbers of follicles and babies is thus uncertain. What we could safely say was that the litter size in this experiment tended to be smaller than that for normally fertilized Japanese white rabbits.

The number of live spermatozoa injected

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

| Anim. No. | Semen dilution | Volume deposited (ml) | Sperm counts | Parturition | Litter size | Gestation period (days) |
|-----------|----------------|-----------------------|--------------------|-------------|-------------|-------------------------|
| 1 | $\times 10^2$ | 0.05 | — | (+) | 2 | 31 |
| 2 | $\times 10^2$ | 0.05 | 1.52×10^5 | (+) | 2 | 31 |
| 3 | $\times 10^2$ | 0.05 | — | (+) | 5 | 31 |
| 4 | $\times 10^2$ | 0.05 | — | (-) | | |
| 5 | $\times 10^2$ | 0.05 | — | (+) | 5 | 32 |

into the oviduct was 1.52×10^5 in Case 2, which was the only case in which we could estimate the number of spermatozoa due to the experimental difficulties.

It was demonstrated therefore that a very small number of sperms could fertilize ova in the artificial insemination in the oviduct through the tubal fimbria and that delivery could be expected of the female rabbits thus treated at a high probability.

Discussion

The number of young delivered by the four rabbits fertilized by the present experimental method tended to be smaller than the mean in normal delivery. One of the reasons for this may have been attributable to the fact that ova were not adequately taken into the tubal fimbria. A larger litter will be expected if the physical stimulus to the tubal fimbria can be minimized.

The artificial insemination technique of injecting semen from the tubal fimbria into the oviduct has been attempted with a view to elucidating fertilization⁸⁻¹¹. Yet no other worker has reported the delivery of young resulting from the implementation of this method. It is known that an unfertilized ovum may sometimes show cleavage, just like an embryo, in its course of fragmentation. This implies that, in artificial insemination into the oviduct, normal fertilization is proved only when normal babies are delivered. In this sense, our previous¹² and present reports are significant since they suggest the clinical usefulness of this method of artificial insemination. That is, a very small number of spermatozoa can sufficiently serve the purpose. So we think that this method will be an effective therapy for sterility due to oligospermia. In animal production, too, this type of fertilization looks promising. Artificial insemination is now a common practice with many domestic animals. If this is done by the technique of insemination into the oviduct, the amount of semen to be injected can be greatly reduced. This means a substantial cut in the expense for an excellent bull's frozen semen. Thus the technique will also offer ample possibilities for veterinary application.

In the present experiment a glass capillary was inserted into the oviduct from the tubal fimbria. This operation must have been an artificial physical stimulation of the oviduct. It has already been established that this technique can yield embryos¹², yet it was still feared that the accompanying physical stimulation of the oviduct might result in its abnormal movement, either in acceleration or in deceleration. This could pose a serious problem in the application of artificial intra-oviduct insemination to the treatment of sterility.

The high ratio of successful deliveries in the present study, however, precluded the possibility of an unfavorable effect which a glass capillary might have on the descent of the embryos through the oviduct. Our results therefore confirmed that the artificial insemination into the oviduct was not only a useful technique to obtain embryos but also a clinically effective means to induce pregnancy in oligospermia.

In many mammals, spermatozoa can be seen in the upper part of the oviduct soon after copulation¹⁴⁻¹⁸. This rapid transit of spermatozoa may be attributed to various factors. For instance, it was reported with sheep¹⁹ and rabbit²⁰ that the adrenergic nerve caused a transient contraction of the uterus immediately after copulation. The contractive action of seminal prostagrandin on smooth muscles may play a significant role, too.

In our present experiment, the semen was diluted to 1 : 100, and in this condition, the seminal prostagrandin did not seem to have affected the movement of oviduct and uterus as much as to interfere with the implantation of embryos.

The absence of stimulation induced by copulation in our study indicates that there was no contraction of uterine muscles¹⁹ to facilitate the transit of spermatozoa. Overstreet¹⁷ reported that the rapid sperm transit phase began directly after the copulation and that spermatozoa were found in the oviduct within one minute after the copulation. The physiological significance of these "vanguard sperms" in the rapid transit phase has not yet been elucidated. Our results suggest that the rapid transit of spermatozoa may not be a prerequisite to fertilization *in vivo*.

The IVF and ET have been attempted as a

therapeutic means to obtain a baby in oligospermia which has been unresponsive to hormone therapy by urologists. There still are much room, however, for improvement of IVF and ET in terms of technique and gestation rate. The artificial insemination into the oviduct we studied proved to be an effective method because of the small amount of semen needed and the high gestation rate. Our results thus seem to have sufficiently indicated the possible therapeutic value of this technique for oligospermia to replace the IVF and ET.

References

- 1) Chang, M. C.: Development of fertilizing capacity of rabbit spermatozoa in the uterus. *Nature*, 175 : 1036, 1955.
- 2) Adams, C. E. and Chang, M. C.: Capacitation of rabbit spermatozoa in fallopian tube and in the uterus. *J. Exp. Zool.*, 151 : 159, 1962.
- 3) Bedford, J. M. and Chang, M. C.: Fertilization of rabbit ova in vitro. *Nature*, 193 : 898, 1962.
- 4) Brackett, B. G. and Server, J. B.: Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus. *Fertil. Steril.*, 21 : 687, 1970.
- 5) Seitz, H. M. Jr., Rocha, G., Brackett, B. G. and Mastroianni, L. Jr.: Influence of the oviduct on sperm capacitation in the rabbit. *Fertil. Steril.*, 21 : 325, 1970.
- 6) Chang, M. C.: Fertilization and normal development of follicular oocytes in the rabbit. *Science*, 121 : 867, 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) Chang, M. C.: Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, 168 : 697, 1951.
- 9) Chang, M. C.: Capacitation of rabbit spermatozoa in the uterus with special reference to the reproductive phases of the female. *Endocrinology*, 63 : 619, 1958.
- 10) Overstreet, J. W.: Sperm numbers and fertilization in the rabbit. *J. Reprod. Fert.*, 21 : 279, 1970.
- 11) Adams, C. E.: Loss of eggs associated with tubal insemination in the rabbit. *J. Reprod. Fert.*, 35 : 405, 1973.
- 12) Kanayama, K., Endo, T., Kobayashi, G. and Sakuma, Y.: Studies on artificial insemination into the oviduct through the tubal fimbria in rabbits. *Jap. J. Fert. Ster.*, 30 : 65, 1985.
- 13) Brackett, B. G. and Oliphant, G.: Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. *Biol. Reprod.*, 12 : 260, 1975.
- 14) Yamanaka, H. S. and Soderwall, A. L.: Transport of spermatozoa through the female genital tract of hamsters. *Fert. Ster.*, 11 : 470, 1960.
- 15) First, N. L., Short, R. E., Peters, J. B. and Stratman, F. W.: Transport of spermatozoa in estrual and luteal sows. *J. Anim. Sci.*, 24 : 917, 1965.
- 16) Settlege, D. S. F., Motoshima, M. and Tredway, D. R.: Sperm transport from the external cervical os to the fallopian tubes in women: A time and quantitation Study. *Fert. Ster.*, 24 : 655, 1973.
- 17) Overstreet, J. W. and Cooper, G. W.: Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: I. The rapid transit phase of transport. *Biol. Reprod.*, 19 : 101, 1978.
- 18) Overstreet, J. W., Cooper, G. W. and Katz, D. F.: Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit: II. The sustained phase of transport. *Biol. Reprod.*, 19 : 115, 1978.
- 19) Rexroad, C. E. Jr. and Barb, C. R.: Contractile response of the uterus of the estrous ewe to adrenergic stimulation. *Biol. Reprod.*, 19 : 297, 1978.
- 20) Fuchs, A. R.: Uterine activity during and after mating in the rabbit. *Fert. Ster.*, 23 : 915, 1972.

卵管内人工授精を試みた家兎の妊娠成績

日本大学農獣医学部獣医生理学教室

金山喜一, 山海直, 遠藤克, 佐久間勇次

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を施した家兎の妊娠成績について検討した。供試家兎を全身麻酔下で開腹して、稀釈精液を卵管采から卵管内にキャピラリーで注入した。精液は、成熟雄から人工陰法で採取したもので、修正タイロッド液で 10^2 倍に稀釈し、その0.05mlを卵管内に注入した。精液注入後1時間目に、hCG 75iuを耳静脈内に投与して排卵を誘起した。なお、供試家兎に過排卵処理は行っていない。

供試家兎5例のうち、4例において産子が得られた。分娩個体における平均産子数は3.5胎であった。妊娠期間は3例が31日、他の1例は32日であった。本実験で得られた14胎の産子については、形態的かつ機能的な異常は認めていない。

卵管内人工授精においては、卵管采および卵管に物理的的刺激を加える結果、受精卵子の卵管内移動に変調をきたすことが懸念されていた。しかし、本研究において、卵管内人工授精を施した家兎において高率の妊娠・分娩

成績を得ることができ、卵管内人工授精は卵管運動に著しい変調をきたすものではないことが示された。

以上の成績より、卵管内人工授精が乏精子症に起因す

る不妊症の治療手段として応用できるものと考えられる。

(受付：昭和61年5月2日)

TW 系ラット (精巣上体および精管欠損) における Wolff 管の発育, 胎子精巣のテストステロン含 有量および Wolff 管のテストステロン感受性

Pathogenesis of the Aplasia in the Epididymis and Ductus
Deferens of the TW Inbred Rat

動物繁殖研究所・*東京農工大学

味 沢 千 代 篠 井 洋

Chiyo AJISAWA Hiroshi IKADAI

田 谷 一 善* 今 道 友 則

Kazuyoshi TAYA Tomonori IMAMICHI

Imamichi Institute for Animal Reproduction

*Tokyo University of Agriculture and Technology

TW 系ラットにおいて約40%の雄に認められる精巣上体および精管欠損の原因解明のために, ①胎生期における Wolff 管の分化過程, ②胎子精巣テストステロン (T) 含有量および③TW 系妊娠ラットへのメチルテストステロン (MT) 投与後の胎子の Wolff 管退行の有無を検索した。

胎令16~20日の TW 系ラットの副生殖器官を連続切片により形態学的に検索したところ, 胎令18日以後, 雌および雄の一部で Wolff 管の退行が認められた。胎令18および19日の, 同側の Wolff 管に退行が認められた精巣と, 退行が認められない精巣の T 含有量を測定した結果, 両群に差は認められなかった。妊娠14~20日のラットに MT 1, 10, 20mg/day を連日投与した結果, MT10mg/day 以上の投与により, 雄胎子の Wolff 管の退行は阻止された。また TW 系雌胎子では, 正常対照群に比べ, Wolff 管形成のために多量の MT が必要であった。これらの事実から, TW 系では胎生後期より Wolff 管の退行が認められることが明らかになったが, 胎子精巣よりの T 分泌低下が退行の原因ではなく, 胎子 Wolff 管のアンドロゲン感受性が低下している可能性が考えられた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 128-134, 1987)

緒 言

雄の表現型が正常に発現するためには, 精巣からのホルモンの分泌と, 副生殖器官の受容器におけるホルモン作用の発現が必要である^{6,15)}。この過程に障害があると, 雄の表現型に異常が発現する。雄性副生殖器官の形成に異常を発現する例として, 5 α -還元酵素欠損症⁵⁾, 精巣性女性化症の完全型と不完全型¹⁵⁾および Reifenstein 症候群¹⁶⁾等が報告されている。ヒトで精巣上体および精管の一部が欠損する症例報告は多数あり^{9,13,17,18)}, その一部は Reifenstein 症候群に分類されているが, これらの症

例の病因は不明である。Reifenstein 症候群の病因は, アンドロゲンレセプター異常であると考えられているが¹⁵⁾, レセプターの病態, その遺伝様式および Wolff 管分化時における精巣ホルモンの分泌状態などについては十分に解明されているとは言えない。

著者らは, Wolff 管由来の雄性副生殖器官である精巣上体および精管に先天的な欠損を発現する近交系ラット TW を育成した^{1,3,4)}。欠損は雄個体の約40%に片側性または両側性に発現し, 精巣上体および精管の全てが欠損する例が最も多いが, これらの臓器が部分的に形成される個体もある⁴⁾。欠損側の精巣は精細管内液排出不全に

より二次的に萎縮するため、両側異常個体は不妊であるが、片側異常個体には妊産能がある¹⁾。腎臓・尿管等の泌尿器および雌の生殖器に異常は認められない。この異常は、複数の遺伝子により支配され、遺伝様式には不完全浸透と閾効果が作用している²⁾。これらの特性から TW 系ラットは、Wolff 管発育の調節機構解明等の研究用モデル動物として有用であると考えられる。

本論文では、TW 系ラットにおける精巣上体および精管の欠損の原因を究明するため、Wolff 管の欠損発現時期の検索、TW 系胎子精巣のテストステロン含有量の測定、および TW 系胎子 Wolff 管のアンドロゲン感受性を調べた成績について報告する。

材料および方法

動物：動物繁殖研究所において育成された TW 系ラットを用いた。動物を、コンベンショナル環境、温度 $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 、自然採光の動物室で飼育し、市販固型飼料(オリエンタル酵母社製 EF) および水を自由摂取させた。交配には成熟した片側異常雄個体と雌個体を同居させ、膈内に精子が観察された日を妊娠 0 日とし、妊娠日齢を算出した。正常対照群には、Wistar-Imamichi (WI) 系ラットを用いた。

実験 1.

TW 系ラットの Wolff 管の発育：TW 系妊娠雌ラットを、妊娠 16, 17, 18, 19 および 20 日の午前 10 時～午後 2 時の間に、各々 1, 4, 5, 4 および 2 匹屠殺し、胎子を摘出した。胎子をブア液にて固定後、 $14\mu\text{m}$ で下腹部の輪状断連続切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、Wolff 管の形成または退行の過程を観察した。Wolff 管の形成または退行の有無については、管上皮細胞および管内腔が共に認められた場合に形成有り、管内腔もしくは管上皮細胞が消失した場合に退行有りとして判定した。

実験 2.

TW 系胎子精巣のテストステロン含有量の測定：妊娠 18 および 19 日の TW 系ラットを、実験 1 と同時刻に屠殺して胎子を摘出した。雄胎子の精巣を、周囲組織に損

傷を与えない様に採取し、1 個ずつ 99% エタノール 1 ml 中に入れ、測定時まで -20°C にて保存した。精巣を摘出した胎子を、実験 1 と同じ方法で組織学的に検索し、Wolff 管の退行の有無を判定した。同側の Wolff 管に退行が認められなかつた精巣(正常側精巣)および同側の Wolff 管に退行が認められた精巣(異常側精巣)を、各群 8～15 個ずつ選び、ラジオイムノアッセイ法にてテストステロン含有量を測定した。

テストステロンの測定：エタノール 1 ml 中に保存した胎子精巣に蒸留水 1 ml を加えて 3 分間ホモジナイズした後、36,000g で 30 分間遠心し、上清を採取して精巣抽出液とした。精巣抽出液中のテストステロン量は、 ^{125}I 標識ホルモンを用いた 2 抗体法によるラジオイムノアッセイ法¹²⁾にて測定した。テストステロンに対する抗血清には Dr. G.D. Niswender (Colorado State Univ.) から配布された抗血清 (GDN250) を用いた。

実験 3.

アンドロゲン投与試験：1 mg/0.1 ml の割合でゴマ油に溶解したメチルトテストステロン (MT) 1, 10 および 20 mg を、各々 3, 3 および 2 匹の TW 系妊娠ラットの鼠蹊部皮下に、妊娠 14～20 日の間、連日投与した。妊娠 21 日目に、実験 1 と同様の方法で胎子を摘出し、雌雄の Wolff 管の形成を組織学的に検索した。対照として、Wolff 管の発育が正常な妊娠 Wistar-Imamichi ラット各 2 匹に、MT1 または 10 mg を同様な方法で投与し、雌胎子の Wolff 管の形成の有無を検索した。

結 果

〔TW 系ラットの Wolff 管〕

胎齢 16～20 日の雌雄 TW 系ラットにおける Wolff 管の発育と退行過程を表 1 および図 1 に示した。

胎齢 16 日では雌雄の生殖輸管に差は認められず、いずれにおいても Wolff 管および Müller 管が明瞭に観察された(図 1-A, B)。

胎齢 17 日の雄胎子では全例で Wolff 管は明瞭に認められたが、Müller 管は管の内腔が消失するか、もしくは

表 1 Onset and frequency of the Wolffian duct regression in the TW rat foetus.

| Sex | Fetal age (day) | | | | |
|--------|-----------------|----------|-------------|-------------|-------------|
| | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| Male | *0/4(0%) | 0/11(0%) | 7/19(37%) | 2/13(15%) | 5/10(50%) |
| Female | 0/3(0%) | 0/20(0%) | 12/12(100%) | 16/16(100%) | 10/10(100%) |

* No. of foetuses with the regressed Wolffian duct/No. of foetuses investigated.

The number in parentheses indicates percent of the foetuses with the regressed Wolffian duct.

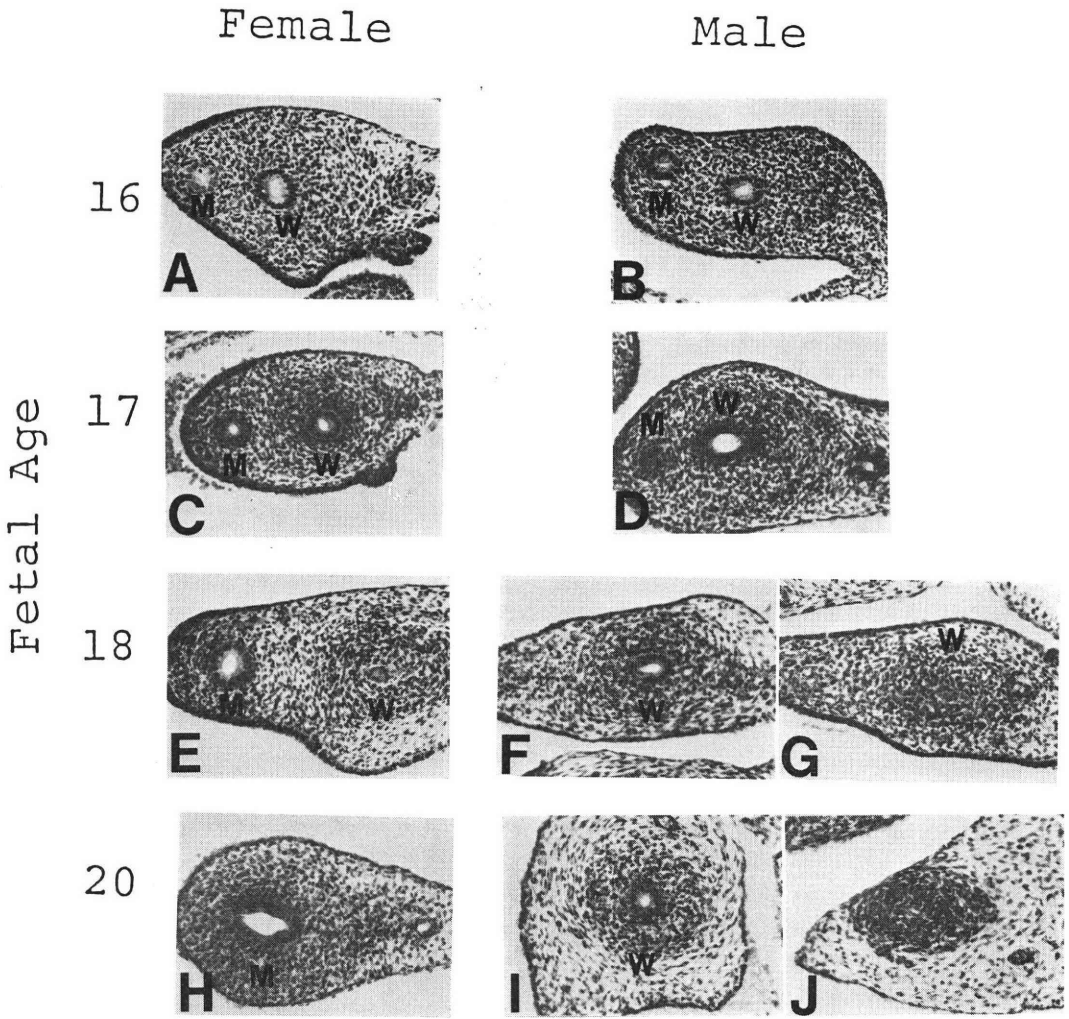


図 1 Regression of the Wolffian duct in the TW rat fetuses from day 16 to 20 of age in utero.

W : the Wolffian duct. M : the Müllerian duct.

The gonoducts of the male and female foetus were examined in serial sections.

In some male foetuses over day 18 (G and J), regression of the Wolffian duct was observed as in the female foetuses (E and H).

は管上皮細胞が消失し、明瞭に認められなかった(図1-D)。一方雌胎子では、Wolff管とMüller管がともに明瞭に認められた(図1-C)。

胎齢18日の雄胎子では全例でMüller管は認められず、Wolff管のみが認められた(図1-F)。しかし、雄胎子19個体中7個体で、部分的にWolff管内腔の消失もしくは管上皮細胞の消失が認められた(図1-G)。一方雌胎子では、12個体全例でMüller管は明瞭に認められたが、Wolff管は管内腔が消失した(図1-E)。

胎齢19および20日の雄胎子では、Müller管は退行し、

Wolff管のみが認められた(図1-I)。しかし、胎齢19日では13個体中2個体に、胎齢20日では10個体中5個体に、部分的に、Wolff管上皮細胞の消失もしくは管内腔の消失が認められた(図1-J)。雌胎子では、全個体でWolff管は退行し、Müller管のみが認められた(図1-H)。

[TW系胎子精巢のテストステロン含有量]

TW系胎子精巢のテストステロン含有量(平均値±SE)は、胎齢18日の正常側精巢では 311.8 ± 35.2 pg/testisであり、異常側精巢では 307.7 ± 33.7 であった。胎齢

表 2 Effect of Methyl-testosterone (MT) on the development of the Wolffian duct in the TW and WI rat fetuses.

| Strain | Sex | Dose of MT (mg) | | | |
|--------|--------|-----------------|-------------|------------|---------|
| | | 0 | 1 | 10 | 20 |
| TW | Male | *15/37(41%) | 6/20(30%) | 0/22(0%) | 0/6(0%) |
| TW | Female | 7/7 (100%) | 13/13(100%) | 10/19(53%) | 0/8(0%) |
| **WI | Female | 4/4 (100%) | 8/16(50%) | 1/12(8%) | — |

MT was injected subcutaneously to the pregnant rat from 14 to 20 of pregnancy.

Foetuses were removed on day 21 and the Wolffian duct was examined histologically in serial sections.

* No. of foetuses with the regressed Wolffian duct/No. of the examined. The number in parentheses indicates percent of the foetuses with the regressed Wolffian duct

** Wistar-Imamichi rat strain which dose not show the regression of the Wolffian duct in the male.

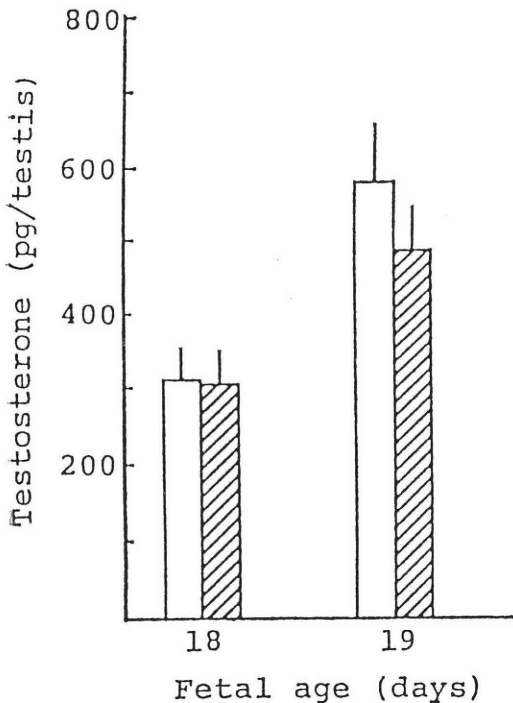


図 2 Testosterone contents of the TW rat testes at day 18 and 19 of age in utero. Each bar shows the mean±SE of 8~15 testes. □: normal side testes. ▨: testes with the regression in the ipsilateral Wolffian duct.

19日の正常側精巣では 584.9±73.4, 異常側精巣では 486.3±65.1であり, これらの日齢の胎子の正常側精巣と異常側精巣のテストステロン含有量の間に差は認められなかった(図2).

[TW 系妊娠ラットへの MT 投与成績]

妊娠14~20日の妊娠ラットに MT 1, 10 または 20mg を連日投与した後の, TW 系胎子における Wolff 管の

退行の有無を表2に示した. TW 系雄胎子では, 無処置群で37個体中15個体(41%)に, MT1mg 投与群で20個体中6個体(30%)に Wolff 管の部分的退行が認められたが, MT10および20mg 投与群では, Wolff 管の退行は認められなかった.

TW 系雌胎子では, 無処置群および MT 1mg 投与群で全個体の Wolff 管に退行が認められた. このうち無処置群および MT 1mg 投与群の13個体中12個体では, Wolff 管は完全に退行していたが, 残り1個体ではわずかな部分に Wolff 管の形成が認められた. MT 10mg 投与群では, 19個体中10個体(53%)で Wolff 管の退行が認められ, 残り9個体では Wolff 管が完全に形成された. 退行の認められた10個体のうち Wolff 管が全く形成されなかったのは1個体のみで, 9個体では大部分の Wolff 管は形成され退行は部分的であった. MT 20mg 投与群では, 8個体全例に Wolff 管が完全に形成され, 退行は認められなかった.

これに対し, 雄の Wolff 管由来副性器に欠損が認められない系統である Wistar-Imamichi 系の雌胎子においては, MT 1mg 投与群では16個体中8個体で Wolff 管が完全に形成され, 残り8個体で Wolff 管の退行が認められた. この8個体中 Wolff 管が完全に退行していたのは4個体で, 残り4個体では退行は部分的であった. MT 10mg 投与群では12個体中11個体で Wolff 管が完全に形成され, 1個体のみで部分的な Wolff 管の退行が認められた(表2).

考 察

生殖器は, 発生の初期段階においては未分化の状態にあり, 雌雄に差が観られない. しかし, 生殖腺の分化後, 精巣から2種ホルモン(テストステロンおよび Müller 管抑制ホルモン)が分泌されると, 副生殖器の雌雄の分化が誘起される⁶⁾. 雄の副生殖器の原基である

Wolff 管は、テストステロンにより分化する。ラット胎子精巣のテストステロン分泌は、胎齢15日ごろより上昇し始め、胎齢18日に最高に達する¹⁴⁾。また、Wolff 管のテストステロンに対する感受性は、胎齢15~19日に一過性に高まる⁸⁾。この様に、精巣のホルモン分泌活動と、標的臓器である副生殖器のホルモン感受性が時期を同じくして亢進し、臨界期における副生殖器の分化が誘導促進されるものと解されている。テストステロン分泌もしくは Wolff 管のアンドロゲン感受性のどちらかに異常があると、正常な雄の副生殖器は形成されない⁶⁾。雌ではテストステロン分泌がないため Wolff 管は退行するが、アンドロゲンを臨界期に投与すると Wolff 管は退行せずに残る²⁾。

成熟 TW 系ラットでは、精巣上体・精管等の Wolff 管由来臓器のみに欠損が認められる。今回、胎生期 TW 系ラットの Wolff 管の形成を形態的に検索したところ、胎齢16および17日では、雌雄いずれにおいても Wolff 管は形成されており、胎齢18日以後に雌および雄の一部で Wolff 管の退行が認められた。つぎに TW 系ラット胎子精巣のテストステロン分泌および Wolff 管のアンドロゲン感受性について検討した結果、胎齢18および19日齢における TW 系ラットの正常側精巣と異常側精巣のテストステロン含有量に差は認められなかった。一般に、ラットの精巣のテストステロン含有量は、胎齢18日より20日まで高値を示し、同時期のテストステロンが Wolff 管の形成に必要である事が報告されている¹⁴⁾。さらにまた、精巣から分泌されたテストステロンは旁分泌により同側の Wolff 管に直接作用すると考えられている⁷⁾。従つて異常側精巣と正常側精巣のテストステロン含有量に差が認められなかったことは、TW 系ラットにおける Wolff 管の退行は胎子精巣のテストステロン分泌低下によるものではないことを示すと考えられる。

TW 系雄胎子では、MT 10もしくは20mg/day 投与により Wolff 管の退行は認められなくなり、また雌胎子においても MT 20mg/day 投与により Wolff 管が完全に形成された。アンドロゲンレセプターが欠損している Tfm 動物では、臓器はアンドロゲンに反応できないので、妊娠動物にアンドロゲンを投与しても胎子の Wolff 管は退行する¹¹⁾。TW 系ラットでは MT 投与により Wolff 管が形成される事から、本系統の Wolff 管の退行の原因は、Wolff 管のアンドロゲンレセプターが完全に欠損しているためではないと考えられる。また胎齢18~20日の無処置 TW 系雄胎子に認められた Wolff 管の退行が部分的であり、成熟期 TW 系ラットにも精巣上体や精管の部分的欠損例が認められる事は、本系統のアンドロゲンレセプターが完全には欠損してい

ないことを裏付けている。

しかし、ここで興味深いのは、雌胎子における Wolff 管の形成に必要な MT の量が、TW 系と WI 系ラットで異なっていた事である。約50%の雌胎子に完全な Wolff 管を形成させるのに必要な MT 量は、WI 系では1mg/day であつたのに対し、TW 系では10mg/day であつた。ほぼ全例の雌に Wolff 管を形成させるのに必要な MT 量は、WI 系では10mg/day であるのに対し、TW 系では20mg/day であつた。今回の実験では MT を妊娠ラットに皮下投与しているため、妊娠ラットの MT 代謝および MT の胎盤通過性の系統差についても検討せねばならないが、TW 系胎子では Wolff 管のテストステロン感受性が低く、それが Wolff 管の退行の原因である可能性が考えられる。

テストステロン感受性低下の例としては、不完全なレセプター欠損症¹⁵⁾とレセプター陽性アンドロゲン不応症^{10,15)}が報告されている。ヒトの不完全型 Tfm および Reifenstein 症候群はアンドロゲンレセプター異常症であると考えられており、様々な程度の雄性化異常が認められるが、その中には TW 系ラットと同様の精巣上体もしくは精管に局限した欠損例がある。不完全型 Tfm のアンドロゲンレセプターには、単に量的な異常のみがある場合と、質的異常がある場合が報告されている¹⁵⁾。また、レセプター陽性アンドロゲン不応症では、アンドロゲンに不応であるにもかかわらずレセプターに異常は認められず、ホルモン・レセプター結合体とクロマチンアクセプターとの結合に異常がある可能性が考えられている。Wolff 管の分化の遺伝的調節機序について明らかにするには、今後さらに TW 系ラットの Wolff 管のアンドロゲンレセプターに関する詳細な研究が必要であらう。

謝 辞

終わりに、テストステロンの抗血清を提供された Dr. G. D. Niswender (Colorado State Univ.) に深謝する。

文 献

- 1) 味沢千代, 筏井 洋, 今道友則: Wolff 氏管由来臓器の欠損を伴う精巣異常系ラット(TW)の精巣組織像の変化, 実験動物, 34: 189-195, 1985.
- 2) Elger, W., Steinbeck, H., Cupceanu, B. and Newmann, F.: Influence of methyltestosterone and cyproterone acetate on Wolffian duct differentiation in female rat foetus. J. Endoc., 47: 471-422, 1970.
- 3) 藤田博文, 筏井 洋, 上松嘉男, 鈴木勝士, 今

- 道友則：異常小精巢ラットの育成と形態学的観察，実験動物，32：85-92，1983.
- 4) Ikadai, H., Sakuma, M., Suzuki, K. and Imamichi, T.: Congenital abnormalities of the male genital organs in the newly established TW rat strain. *Cong. Anom.*, 25: 65-71, 1985.
 - 5) Imperato-McGinly, J., Peterson, R. and Gautier, T.: Primary and secondary 5 α -reductase deficiency. In *Sexual Differentiation*, pp 233-245, Serio, M., Motta, M., Zanisi, M. and Martini, L. (ed.), Raven Press, New York, 1984.
 - 6) Jost, A. and Magre, S.: Testicular development phases and dual hormonal control of sexual organogenesis. In *Sexual Differentiation*, pp 1-15, Serio, M., Motta, M., Zanisi, M., and Martini, L. (ed.), Raven Press, New York, 1984.
 - 7) Jost, A.: In *Organogenesis*, pp 611-628, Haan, R. L., and Ursprung, H. (ed.), Holt, Rinehard and Winston Inc., New York, 1955.
 - 8) 木川源則，大島博幸：性の分化と異常，医歯薬出版，1983.
 - 9) 岡 伸俊，浜口毅樹，岡田 弘，羽間 稔，松本 修，守殿貞夫，石神譲次：先天性精管欠損症の臨床的検討，日不妊誌，30：173-179，1985.
 - 10) Peterson, R. E. and Imperato- McGinley, J.: Male pseudohermaphroditism due to inherited deficiencies of testosterone biosynthesis. In *Sexual Differentiation*, pp 301-319, Serio, M., Motta, M., Zanisi, M., and Martini, L. (ed.), Raven Press, New York, 1984.
 - 11) Perez-Palacios, G., Ulloa-Aguirre, A. and Kofman-Alfaro, S.: Inherited male pseudohermaphroditism. In *Sexual Differentiation*, pp 287-299, Serio, M., Motta, M., Zanisi, M., and Martini, L. (ed.), Raven Press, New York, 1984.
 - 12) 田谷一善，渡辺 元，笹本修司：¹²⁵I 標識ホルモンを用いたプロジェステロン，テストステロンおよびエストラジオール17 β のラジオイムノアッセイについて，家畜繁殖誌，31：186-197，1985.
 - 13) 内島 豊，中目康彦，平賀聖悟，岡田耕市，根岸壮治，吉田謙一郎，大島博幸：精管欠損症の3例，日不妊誌，27：377-384，1982.
 - 14) Warren, D. W., HaItmeyer, G. C. and Eik-nes, K. B.: Testosterone in the fetal rat testis. *Biol. Reprod.*, 8: 560-565, 1973.
 - 15) Wilson, J. D., Griffin, J. E., George, F. W. and Leshin, M.: Recent studies on the endocrine control of male phenotypic development. In *Sexual Differentiation*, pp 223-232, Serio, M., Motta, M., Zanisi, M., and Martini, L. (ed.), Raven Press, New York, 1984.
 - 16) Wilson, J. D.: Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type I: evidence for androgen resistance and variable clinical manifestations in a family with the Reifnestein syndrome. *N. Engl. J. Med.*, 290: 1097-1103, 1974.
 - 17) Wingerden, J. J. and Franz, I.: The presence of a capt epididymidis in congenital absence of the vas deferens. *J. Urol.*, 131: 764-766, 1984.
 - 18) Wortsman, J., Hansen, M., Kousseff, B. G. and Hamidinia, A.: Incomplete differentiation of Wolffian structures: a form of Kallmann's syndrome? *Fertil. Steril.*, 37: 123-125, 1982.

Pathogenesis of the aplasia in the
epididymis and ductus deferens
of the TW inbred rat.

**Chiyo Ajisawa, Hiroshi Ikadai, *Kazuyoshi
Taya and Tomonori Imamichi.**

Imamichi Institute for Animal Reproduction
*Tokyo University of Agriculture and Technology

The TW male rat shows congenital aplasia of the epididymis and ductus deferens unilaterally or bilaterally at about 40% incidence. To elucidate the pathogenesis, the regressing process of the Wolffian duct of the TW male foetus, the testosterone contents of the fetal testes, and the sensitivity of the Wolffian duct to the androgen injected to the pregnant rat were investigated.

Serial sections of the gonoduct from day 16 to 20 of age in utero revealed that the Wolffian duct regressed after day 18 in a part of the male foetuses as in the female. There were no significant differences between the average testosterone contents of the normal side testes and the testes with the regressed Wolffian duct at day 18 and 19 of age in utero, which are the critical period of the Wolffian duct stabilization. By treatments of methyl-testosterone in a dose of 10mg to the pregnant TW rats from the 14th to the 20th day of pregnancy, the Wolffian duct of the males was stabilized. However, the female TW foetuses required higher doses of methyl-testosterone (≥ 20 mg) to stabilize the Wolffian duct in most of animals as compared to the normal control strain (>10 mg).

These results indicate that decreased sensitivity of the Wolffian duct to androgen is one possible explanation for the pathogenesis of the defect. The TW rat may provide the useful animal

model to make clear the mechanism of the Wolffian duct differentiation.

(受付: 昭和61年5月8日)

犬真性両側性半陰陽の一例

True Bilateral Hermaphroditism in a Cocker Spaniel Dog

大阪府立大学農学部獣医学科家畜外科学研究室

野村 紘一

Koichi NOMURA

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture

国立循環器病センター研究所実験動物管理室

新谷 聡

Satoshi NIIYA

National Cardiovascular Center Research Institute

滋賀県開業獣医師

桂田 守

Mamoru KATSURADA

Veterinary Practitioner in Shiga Prefecture

大阪府立公衆衛生研究所食品細菌課

井上 清

Kiyoshi INOUE

Osaka Prefectural Institute of Public Health

患犬は11か月齢のコッカスパニエル種で、外貌並びに外性器系は雌型で陰唇もよく発達していたが、陰核が長さ3.6cmに肥大していた。肥大陰核内には発育不全の陰茎骨が存在していたが、外尿道口は正常雌と同様に陰前庭に開口していた。

本犬の末梢血中白血球培養法による染色体分析の結果は $2n=78$, XX型を示し、口腔粘膜上皮による性染色質試験の結果も雌型であった。更に、末梢血中のテストステロン及びエストロジェン並びにプロジェステロン量はそれぞれ正常雄および雌成犬量より低く、性腺摘除によりその値は必ずしも低下しなかった。

本犬は両性腺が卵精巣で、卵管、子宮並びに膈を有しているほか、精巣上体並びに精管を有していたが、前立腺は存在しなかった。

以上から、本犬は $2n=78$, XX型を示す真性両側性半陰陽と診断され、性腺からは有意な性ホルモン産生はなかったものと考えられた。

(*Jap. J. Fert. Ster.*, 32(1), 135-141, 1987)

はじめに

犬真性半陰陽の報告は比較的少ない。筆者らは先にバグ種の両側性真性半陰陽について報告したが⁹⁾、今回更に、コッカスパニエル犬の一例を得たので、生殖器の肉眼的並びに組織学的検索を行うとともに染色体の核型分析および末梢血中性ステロイドホルモンの測定をあわせ

て行ったので報告する。

材料と方法

患犬は11か月齢のコッカスパニエル種で、開業獣医師によつて重度の疥癬症の治療中に外陰部の異常が発見され、その後研究材料として大阪府立大学附属家畜病院に寄贈されたものである。

本犬について、外貌並びに外陰部の状況を肉眼的に詳細に観察するとともにレントゲン検査を実施した。更に、口腔粘膜による性染色質試験^{7,9)}を行い、あわせて末梢血中白血球培養法⁴⁾による染色体分析を行った。その後、全身麻酔下で試験的開腹を行い、内部生殖器の状態を精査した上で性腺と子宮の全摘出を行った。更に、異常に大きく発達した陰核の切除もあわせて実施した。これらの摘出された生殖器を肉眼的に詳細に観察したのち、通常の方法で組織標本を作成し鏡検した。

なお、摘出手術の前後において末梢血を採取し、ラジオイムノアッセイによつてエストロジェン、プロジェステロン及びテストステロンの測定^{2,15)}を行った。

成 績

1) 臨床事項

全身皮膚炎で来院。体重は6.7kgで同月齢のものに比べて特に発育が遅れているとは思われなかった。元気、食欲及び排尿排便などの一般的状態には異常がなく、外貌並びに外生殖器系は雌型で陰唇もよく発達していた。両側陰唇に挟まれて赤色肉柱様の突起物の一部が外陰部から露出していた(写真1)。陰唇を頭側へ圧排すると突起物は陰核部に位置しており、その基部に龟头球様構造物が認められた(写真2)。突起物の大きさは長さ3.6cm、幅0.9~1.9cm、厚さ1.2~1.5cmで把握すると内部に骨様構造物の存在が触知できたのでX線撮影を行ったところ発育不全の陰茎骨陰影像を得た(写真3)。そこで、半陰陽の疑いがあると考え、試験的開腹手術を行うことにした。なお、外尿道口は陰前庭に開口しており正常雌犬と同位置であった。

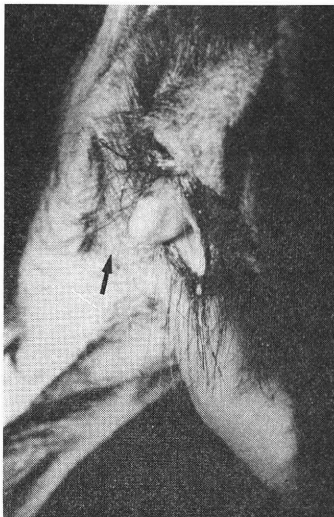


写真1 よく発達した陰唇から突出している肥大陰核(↑印)を示す。

2) 染色体核型分析並びに性染色質試験

本例の末梢血白血球培養法による核型分析の結果は $2n=78, XX$ 型を示した(表1, 写真4, 5)。また、口腔粘膜上皮による性染色質試験の結果は雌型であった。

3) 末梢血中の性ホルモン量

本例の末梢血中の性ホルモン量は表2に示したように、Testosterone (T), Progesterone (P), Estrone (E₁)及び Estradiol-17-β (E₂)の値は性腺摘除前後において有意な差は示さなかった。

4) 試験的開腹所見

左右両性腺は卵巣様で、正常雌の場合と同様に腎後縁に位置していた。この両側の性腺はよく発達した卵巣囊様の組織体によつて包まれ、この囊状物の上には細い卵



写真2 陰唇を頭側へ圧排し露出させた陰核。外形は発育不全の陰茎様を示し、基部は膨大して龟头球様構造物を呈する。



写真3 レントゲン検査で発育不全の陰茎骨陰影像(↑印)が認められた。



写真 4 末梢血白血球培養による染色体。↑印はX染色体を示す。



写真 5 染色体核型分析図。2n=78, XX型を示し、核型は正常雌型である。

表 1 染色体分析

| | 染色体数 | | | | | | 性染色体 | |
|-------|------|----|----|----|----|------|------|----|
| | 75以下 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80以上 | XX | XY |
| 92細胞中 | 32 | 4 | 11 | 42 | 1 | 2 | 92 | 0 |

管様組織が性腺外側遊離縁から性腺後縁に附着している子宮角様組織の先端に向って斜走していた。この卵巣嚢様構造物の腎側端は肥厚して性腺と癒合し血管に富んだ組織体を形成していた。この傾向はとくに左側性腺において著明に認められた。また、性腺後縁から後走する一対の子宮角様管状組織は膀胱頸部付近の背面で左右が融

表 2 末梢血中の性ホルモン量 (pg/ml plasma)

| | T | P | E ₁ | E ₂ |
|---------|-----|----|----------------|----------------|
| 手術* 前 | 158 | 15 | 71 | 14 |
| 術後 1 週 | 192 | 37 | 3 | 3 |
| 術後 1 か月 | 211 | 3 | 45 | 58 |

* 性腺摘除

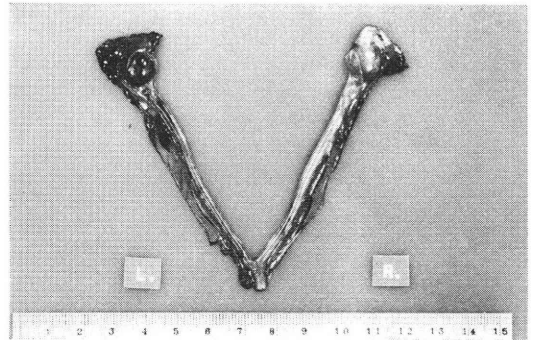


写真 6 摘出された内生殖器。両性腺、やや小さく發育不全を示す両子宮角様組織並びに子宮広間膜様組織などが明らかで、外見上は雌の形態を示す。

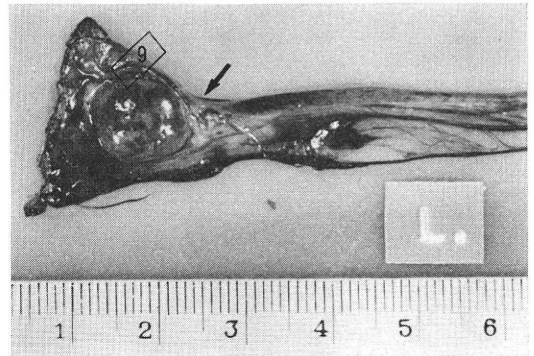


写真 7 左性腺。表面に凹凸のある卵円形の性腺とその頭側には血管のよく発達した厚味のある組織が附着し、この組織体から管状組織 (↑印) が子宮角様組織の先端に向かって斜走しているのが見られる (⑨印は写真 9 の組織片切り出し部位を示す)。

合して体部様の構造を形成していた。なお、この膀胱頸部付近には前立腺と思われる組織の存在は肉眼的には証明できなかった。このように本例の内部生殖器は、性腺前縁の卵巣嚢様組織の肥厚並びに同部位の血管叢の増殖所見を除いて、ほぼ正常雌犬の外形を呈し、また、それら相互の位置関係も正常雌犬のものとほぼ同様であった (写真 6)。

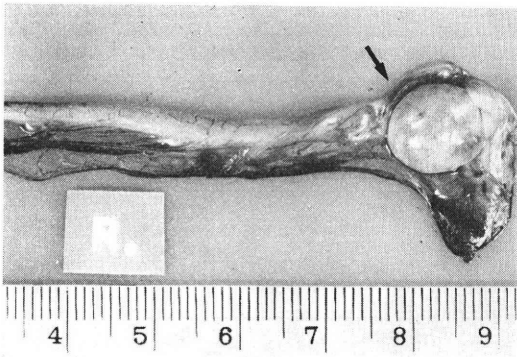


写真 8 右性腺. 性腺表面が平滑であるほかは左性腺 (写真7) とほとんど同所見を示す. ↑印は卵管様管状組織を示す.

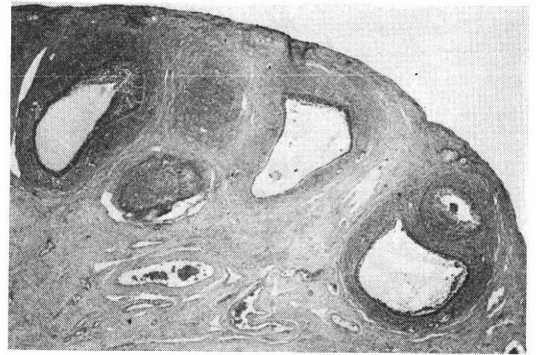


写真11 左性腺 (写真10) 皮質部分の弱拡大. HE 染色. 卵胞様組織が認められるが, 変性所見が強い.

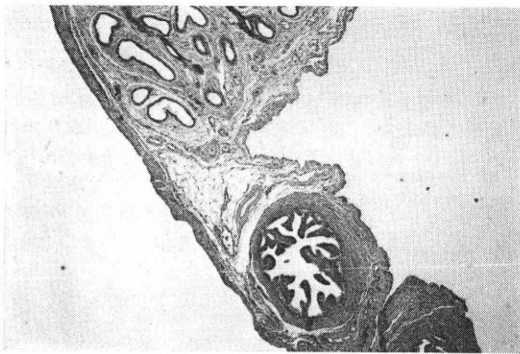


写真 9 写真7の図部分の弱拡大. ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色. 写真の上方には萎縮傾向を示す精巣上体組織が, 下部には卵管組織が認められる.

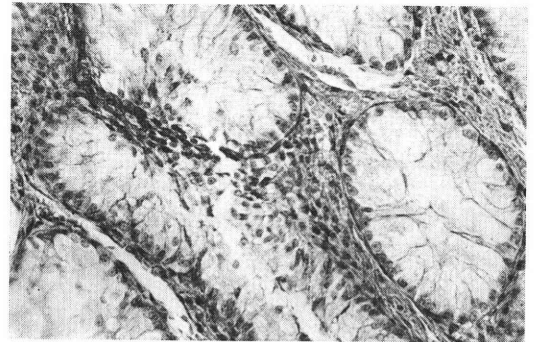


写真12 左性腺 (写真10) 髄質部分の強拡大. HE 染色. 精細管構造はよく発達しているが, 精細胞はほとんどなく基底膜に沿ってセルトリー細胞が一行に並んでいる. 間質はやや増殖し, 間細胞も増数している. 全体に萎縮精巣所見に酷似している.

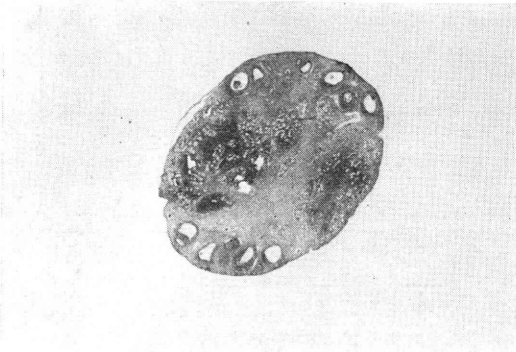


写真10 左性腺ルーペ拡大. 皮質には卵巣様構造を示す組織が存在し, 髄質には精巣様組織が認められる. 右性腺もほぼ同様所見で, 両側ともに卵精巣であった.

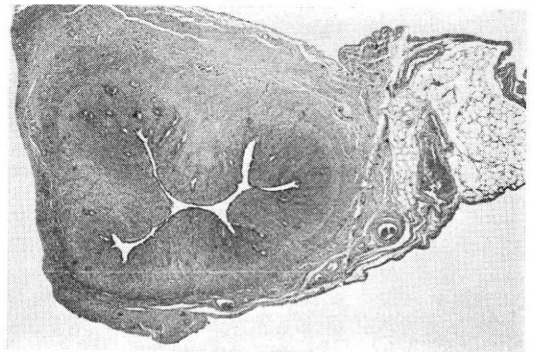


写真13 子宮角様組織の弱拡大. 粘膜, 筋層の発育も良好で正常雌犬の無発情子宮組織像に酷似している.

5) 内生殖器の肉眼及び組織所見

(1) 性腺

左性腺は大きさ縦1.2cm×横0.9cm×幅0.6cm で重さ

2.25g であつた. 性腺表面には粗大な凹凸が見られたが, 肉眼的には卵胞様組織や黄体様組織の存在は明らかでなかつた (写真7). 一方, 右性腺は大きさ縦1.3cm×

横1.0cm×幅0.6cm, 重さ2.20g で性腺表面は左と比べて平滑であった。肉眼的には左性腺と同様に卵胞様組織や黄体様組織の存在は認められなかった(写真8)。組織学的には左右両性腺はほとんど同様の所見を呈していた。すなわち、左右性腺はともに髄質部に位置する精巣部分と皮質部分に限局する小範囲の卵巣部分から成る卵精巣であった(写真10)。精巣部分は卵巣部分より広範囲を占め、よく発達した間質結合織と間細胞で取りかこまれていた。精細管は萎縮を示し、肥厚した基底膜に沿って一層のセルトリ細胞が存在するだけで、精細胞は全く認められなかった(写真12)。一方、卵巣部分には一次卵胞や中ないし小型の二次卵胞が数個ずつ存在していたが、原始卵胞は比較的少なかった。また、これらの卵胞の中には卵子が変性したり、顆粒膜細胞が基底膜から離解したり、あるいは基底膜や莢膜の著しい硝子化が見られたり、更に卵胞腔内に出血の認められるものなどが存在していた(写真10, 11)。なお、精巣部分は右側の方が左側より発育が良好で広範囲を占めていた。

(2) 卵管および精巣上体

左右両性腺にはともに卵管および精巣上体が付着していた。卵管は左右とも同程度によく発達し、卵管嚢の形成も明瞭であった(写真9)。卵管上皮は単層の線毛を持った円柱細胞でできており、その中には少数の背の低いヘマトキシリン・エオジン染色で細胞質が淡明に染む線毛のない細胞が介在していた。また、筋層の発達も良好であった。精巣上体は左側が右側より発達が悪い傾向にあったが、これは前述の性腺の精巣部分が左側が右側より発達が悪かった所見と一致していた。精巣上体の大部分は内腔の空虚な不整形を示す多数の上体管の集まりから成っていたが、上体管の一部分には内腔に少量の液体成分を入れているものも認められた。上体管上皮は立方ないし扁平形を呈し、一般に線毛の発達はよくなかった。一方、間質結合織はよく発達して毛細血管も豊富に認められた。このように、精巣上体は萎縮傾向を呈していた(写真9)。

(3) 子宮

子宮の大きさは左右がほとんど同じであった。すなわち、長さ左6.95cm, 右6.99cm 及び幅が左右とも0.18~0.34cm で肉眼的には発達が悪く小さかった。これらの子宮は表面が平滑で、屈曲や蛇行は認められなかったが、漿膜や広間膜の血管はよく発達していた(写真6~8)。組織学的には、子宮内腔はH字型を呈し狭小であった。陰窩や子宮腺の数も少なかった。内膜上皮は立方形で細胞質に乏しく、クロマチンに富んだ大きな核が細胞質の大部分を占めていた。子宮腺上皮も同様に立方ないし円柱形を呈し核はよく発達して厚い基底膜に面して存

在していた。子宮腺内腔には分泌物は認められなかった。間質はよく発達した間質細胞と線維組織で占められ、その間に充・うつ血を示す拡張した毛細血管が多数存在し、これらの血管をとりまいて広範囲なび慢性の赤血球浸潤が認められた。この血管の拡張、充・うつ血像は、子宮摘出手術時の血管系の永久結紮のためであろうと考えられた。また、内外両筋層の発達も良好で、血管層もよく発達し、血管の充・うつ血が著明に認められた。間質の広範囲な出血や毛細管の拡張充血像を除いては子宮は正常無発情期像に酷似していた(写真13)。

考 察

Phillips ら (1939)¹²⁾によると、犬真性半陰陽は、1. 両側性半陰陽：両性腺が卵精巣であるもの、2. 一側性半陰陽：一側性腺が卵精巣であるもの、3. 片側性半陰陽：一側が精巣で他側が卵巣であるもの、以上の3型に分類されている。

この分類に従うと本例は真性両側性半陰陽に属する。King ら (1964)⁹⁾, Murti ら (1966)⁹⁾, Pullen (1970)¹³⁾ 及び Allen ら (1981)¹⁾ も両側性半陰陽例を、また Lee ら (1952)⁶⁾, Walker (1961)¹²⁾ 及び Vandeveld (1965)¹⁶⁾ は一側性の例を、更に Lawrence ら (1952)⁹⁾ は片側性の極めて稀な例についてそれぞれ報告している。これらは筆者らの症例と同様にいずれも肉眼的に雌性外陰部を有しており雌性とみなされてきたが、陰核が異常に大きく発達し、開腹所見では精巣様組織、精巣上体様組織や精管状組織の存在が指摘され、組織所見でも雄性化傾向の存在が認められている。

これらの報告の内、性染色体分析を行っていないものは少ないが、Pullen (1970)¹³⁾ は両側性半陰陽の4歳のビーグル犬について白血球培養法による分析を行い、その結果、78%の細胞が78, XX 型を、2%が78, XXY 型を示したと報告している。一般に半陰陽では性染色体中にXがどれほど多く存在していても、Yが1つでもあれば雄性化傾向が出現すると言われている¹⁴⁾。しかし、筆者らの例では92細胞すべてがXX型であり、Yの存在は証明できなかつた。Selden ら (1978)¹⁴⁾ によると、XX型半陰陽でH-Y抗原が検出された一例からXX型雄性の仔犬が生まれたことが報告されている。このように、Yが実際に存在しなくても、どこかにH-Y抗原が潜んでおれば雄性化が起る可能性があるものと考えられる。筆者らも実際に78, XX型雄性の1例に遭遇し、既に報告した¹⁰⁾。

一方、本例の性腺の組織所見から、精巣部分の間細胞が若干増数している傾向が観察されたが、性ホルモン量は性腺摘出前後で顕著な差がなく、その時点では性腺は

有意義な機能を発揮していなかつたと考えられる。副生殖器に雄性化傾向が認められることから考えると、少なくとも副生殖器の発分化段階においては雄性ホルモンが存在していたことが想像できるが、その量はミラー管の発生を十分に抑制するほど多くはなかつたのかもしれない。あるいは、ウォルフ管そのものにテストステロンに対する感受性が十分に備わっていなかつたのかもしれない。King ら (1964)³⁾も、副生殖器の雄性化に関して、性腺精巣部分に間細胞が豊富であることから、アンドロジェンの産生があつてこれがウォルフ管の部分的発育を促したと推測している。

このように、多くの研究者によつて性腺からのホルモン分泌が副生殖器の発分化を支配することが報告されており、また性染色体型と性腺の分化の関係については Ohno (1976)¹¹⁾の H-Y 抗原雄性決定説などが存在するが、まだ十分解明されていない問題も多く、これからの研究に期待が寄せられている。

稿を終るにあたり、御校閲を賜った本学家畜病理学研究室教授堀内貞治先生に深謝いたします。

文 献

- 1) Allen, W. E., Daker, M. G. and Hancock, J. L.: Three intersexual dogs. *Vet. Rec.*, 21: 468, 1981.
- 2) 稲葉俊夫, 清水亮佑, 藪守龍雄: 雄イヌ血中4-Androstenedione, Testosterone 及び 5 α -Dihydrotestosterone の動態, *家畜繁殖誌*, 23: 63, 1977.
- 3) King, N. W. and Garvin, C. H.: Bilateral hermaphroditism in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 145: 997, 1964.
- 4) 古山順一, 宇佐美謙治: 染色体研究法, *医学のあゆみ*, 73: 430, 1970.
- 5) Lawrence, J. and Meisels, R.: A lateral canine hermaphrodite. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 21: 171, 1952.
- 6) Lee, D. G. and Allam, M. W.: True unilateral hermaphroditism in a dog. *Univ. Pennsylvania Bulletin*, 128, 142, 1952.
- 7) 松永武三, 古山順一: 性染色質の迅速染色法についての再検討及びその改良, *日不妊誌*, 10: 91, 1965.
- 8) Murti, G. S., Gilbert, D. L. and Borgmann, A. R.: Canine intersex states. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 149: 1183, 1966.
- 9) 野村紘一, 藪守龍雄, 清水一郎, 浦東信夫: 犬真性半陰陽の一例とその Sex chromatin test, *日不妊誌*, 16: 6, 1971.
- 10) 野村紘一: XX 型の性染色体を示した犬雄性仮性半陰陽の一例, *日獣会誌*, 39: 520, 1986.
- 11) Ohno, S. (丹羽修身訳): 性と遺伝的調節機構, 蛋白質, 核酸, 酵素, 21: 345, 1976.
- 12) Phillips, J. M., Brief, B. J., Sutton, T. S. and Mills, J. W.: Hermaphroditism. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 95: 663, 1939.
- 13) Pullen, C. M.: True bilateral hermaphroditism in a beagle. *Am. J. Vet. Res.*, 31: 1113, 1970.
- 14) Selden, J. R., Wachtel, S. S., Koo, G. C., Haskins, M. E. and Patterson, D. F.: Genetic basis of XX male syndrome and XX true hermaphroditism: Evidence in dog. *Science*, 201: 644, 1978.
- 15) 鳥居隆三, 藪守龍雄: ウシの末梢血中 Progesterone, Estrone, Estradiol, Estriol, Cortisol 及び Corticosterone の測定法, *家畜繁殖誌*, 20: 153, 1975.
- 16) Vandeveld, J. E.: True hermaphroditism in a dog. *Can. Vet. J.*, 6: 241, 1965.
- 17) Walker, R. G.: Hermaphroditism in a bitch. A case report. *Vet. Rec.*, 73: 670, 1961.

True bilateral hermaphroditism in a Cocker Spaniel Dog.

Koichi Nomura

College of Agriculture, University of Osaka Prefecture

Satoshi Niya

National Cardiovascular Center Research Institute

Mamoru Katsurada

Veterinary Practitioner in Shiga Prefecture

Kiyoshi Inoue

Osaka Prefectural Institute of Public Health

The patient was an 11-month old cocker spaniel dog. This dog had a female like face and external genitalia with enlarged clitoris which looked like a phallus and had an underdeveloped penis. This dog showed the female karyotype (2n=78, XX) in the peripheral blood leucocytes and female sex chromatin pattern in the buccal epithelial smears.

The levels of testosterone, progesterone and estrogens in the circulating blood in this dog were lower than the male or female adult's value, and moreover they were unchanged significantly by the gonadectomy; the gonad must have fulfilled no useful functions to produce the sex hormones.

Histological examination clearly showed that this dog had both ovotestes, oviduct, uterus and

a vagina; both epididymides, vas deferens and no prostate.

as the true bilateral hermaphroditism with female chromosomal pattern.

From these findings, this dog was diagnosed

(受付: 昭和61年5月2日)

地方部会講演抄録

第85回日本不妊学会九州地方部会

日時 昭和60年10月27日(日) 9:00~16:00

会場 福岡県医師会館

1. HMG 治療時の間脳・下垂体系の反応について

一瀬俊介・山下隆則・石丸忠之
山辺 徹 (長崎大産婦)

目的と方法: HMG-hCG 療法において, 血中 estradiol の急激な上昇にもかかわらず, 内因性 LH surge が起こることはまれである. Littman らは, 正常月経周期のサルに HMG を投与すると, 卵巣より gonadotropin surge inhibiting factor が産生され, 下垂体に作用し, estradiol を介する LH surge を抑制すると報告している. そこで, 無月経婦人(卵巣性を除く)に HMG を連日筋注し, その投与前後に premarin テスト(20mg 静注: 前, 48時間後, 72時間後に血中 LH を測定), あるいは LH-RH テスト(200r 筋注: 前, 60分後, 120分後に血中 LH を測定)を行ない, 下垂体の予備能を検討した.

結果: LH の前値を100とした場合の peak 値は, premarin テスト(6例)では, HMG 投与前140.4±74.9, HMG 投与後81.0±29.4で, HMG 投与により抑制傾向を示した. 同様に, LH-RH テスト(7例)では, HMG 投与前377.3±151.8HMG 投与後408.0±328.3で, HMG 投与前後で差は認めなかった. また, LH-RH テストでは, 症例により反応が異なり, HMG 投与による影響は一定でなく, Littman らの報告と一致しなかった.

結論: HMG 投与によりヒトでも gonadotropin surge inhibiting factor が産生されているとすると, その物質は主として間脳の cyclic center に対して働き, LH surge を抑制している可能性があることが示唆された.

2. HMG 療法中の血中 Prolactin 値の変動

友成廉平・井上哲朗・小池貞徳
水谷勝美・森 宏之・木川源則
(大分医大産婦)

ヒトにおける卵胞発育や性ステロイド生成と prolac-

sin の関係については充分知られていない. 今回われわれは, HMG 療法中に上昇する Estradiol が prolactin を上昇させることによって卵胞成熟に影響するかどうか検討した. 高プロラクチン血症を除外した続発性無月経患者5例を対象とした. 方法は同一症例に HMG-HCG 療法と HMG-HCG+Bromocriptine 療法を行ない, PRL, E₂, Progesteron を測定し, また超音波断層法により卵胞成熟を観察し比較した. 結果は Bromocriptine 非投与群, 投与群の HMG 投与前の PRL は12.70±3.72ng/ml, 8.47±3.75ng/ml, pre-Ovulatory phase は9.12±5.31ng/ml, 4.11±3.91ng/ml, mid-luteal phase では, 19.34±7.39ng/ml, 19.42±30.44ng/ml で両者に差はなかった. E₂ では, HMG 投与前の非投与群, 投与群は, 34.16±15.72pg/ml, 38.83±16.54pg/ml, pre-ovulatory phase は591.73±306.25pg/ml, 1033.2±820.90pg/ml, mid-luteal phase は1705.75±1166.46pg/ml, 3226±1709.10pg/ml で投与周期で E₂ の増加傾向がみられた. Progesterone では, 非投与群, 投与群で pre-Ovulatory phase 0.65±0.06ng/ml, 1.29±0.70ng/ml で差はなく, mid-luteal phase では22.42±15.56ng/ml, 69.46±40.06ng/ml で投与群で増加傾向があつた. HMG total dose では非投与群1755±617.56IU, 投与群2115±834.15IU で有意の差はなかった. しかし PRL を低下させた時 E₂, Progesterone が pre-ovulatory, mid-luteal phase に高い傾向が示されたことは PRL が卵胞成熟・黄体機能の両者へ抑制的に働く可能性があると考えられる.

3. 高血圧症合併 PCOD 症例に対する bromocriptine の効果

伊藤昌春・松浦講平・愛甲 朗
松井和夫・藤崎俊一・前山昌男
(熊本大産婦)

症例は組織学的・内分泌学的に polycystic ovarian disease (PCOD) の診断をうけた33歳の主婦(OGOP)で, 卵巣楔状切除, HMG-HCG 療法, clomiphene 療法をうけるも排卵なく加療中, 高血圧症のため入院, 精査を行なった. 入院時の血圧は182-184/112-116mmHg で, testosterone: 98.0ng/dl と11-deoxycorticosterone (DOC): 0.41ng/ml が高値であつた. normoprolacti-

nemia ではあつたが、本症例に対し、bromocriptine (5 mg/day) 療法を開始した。投与後、急速な血圧の下降とともに testosterone と DOC とがそれぞれ 49ng/dl, 0.18ng/ml と減少し、LH もそれに遅れて減少した。また FSH は不変であつた。更に、bromocriptine 投与下で clomiphene 100mg/day 5 日間の併用により基礎体温上、排卵が認められた。現在、bromocriptine 投与 8 カ月間、血圧は正常に維持されている。

高血圧改善の機序に関して bromocriptine のもつ中枢性 dopamine 様作用、LH pulsatile pattern の改善により LH の低下→testosterone の低下→DOC の低下により高血圧の改善をもたらすことが考えられ、また、bromocriptine の腎の dopamine receptor への直接作用による降圧効果の可能性もある。

今後 bromocriptine は、DOC 高値を示す高血圧症合併 PCOD 症例に対して試みられるべき薬剤と考えられる。

4. Clomiphene citrate の黄体機能に及ぼす影響

小池弘幸・宮川勇生・谷山圭一
山口昌俊・鶴田憲一・森 憲正
(宮崎医大産婦)

目的: Clomiphene citrate (以下 CL と略す) の黄体機能へ及ぼす影響について検討した。

方法: 宮崎医科大学産婦人科不妊外来を訪れた 25 歳から 42 歳までの不妊患者 15 名を対象とした。その平均年齢は 30.4 ± 1.2 歳、不妊期間は 66.5 ± 12.8 カ月であつた。そのうち原発不妊 10/15 (66.7%)、続発不妊 5/15 (33.3%) であつた。月経周期 21~23 日に採血し、この周期を control 周期とした。続いて月経周期の第 5 日目より CL を 1 周期目は 50mg/日、2 周期目は 100mg/日を 5 日間、就寝前に投与した。この各周期 21 日~23 日に採血し、血清 LH, FSH, PRL, estradiol (E_2), progesterone (P) を測定した。

成績: この CL 投与中 3 例が妊娠したが、これらの症例は除外して検討した。血清 LH, FSH, PRL は CL 投与前後において有意差はなかつた。しかし、血清 E_2 は前値 183.2 ± 21.7 pg/ml ($n=13$)、50mg 投与後 385.6 ± 65.6 ($n=14$)、100mg 投与後 474.1 ± 82.2 pg/ml ($n=8$) となり CL 投与後は著増を示した。血清 P は前値 13.1 ± 1.6 ng/ml ($n=12$)、50mg 投与後 24.1 ± 3.6 ng/ml ($n=14$)、100mg 投与後 25.8 ± 4.6 ($n=7$) となり CL 投与後は増加傾向を示した。

結論: 以上の成績は、CL の排卵誘発作用のみならず、投与周期の黄体期の内分泌環境に、何らかの好影響を与

えていることを示唆するものである。

5. 黄体機能不全が原因と考えられる月経前症候群の 1 例

堂地 勉・有馬直見・藤野敏則
福元清吾・永田行博
(鹿児島大産婦)

月経前症候群 (PMS) は、重症な場合、日常生活に及ぼす影響が懸念される。しかし原因は諸説あり治療法も一定しない。今回私達は、典型的かつ重症な PMS を経験し治療したので報告する。

患者は高校 1 年。主訴は月経前にきまつて起こるイライラ感、抑うつ感、集中力低下、精神運動興奮、めまい、はきけである。症状が重症なため高校も欠席が多く成績は全く不振であつた。当院精神科受診にて精神科的因子の関与は否定されたが、症状が月経周期と関連して出現するため、婦人科的疾患が疑われ、当科紹介となる。当科独自の心身医学的検査でも安定したプロフィールを示したが、症状は黄体期のみ集中し、ひどい時は高校を 10 日も欠席する程であつた。PRL 11.3ng/ml であつたが、パーロデル 5.0mg/日 使用しても逆効果であり、デュファストン 20mg/日 DitE 200mg/日 も無効であつた。黄体期 P 値 1.1ng/ml と極端な黄体機能不全が判明したため、次周期よりクロミッド 100mg/日、5 日間投与したところ、黄体機能の著明な改善を見、頭痛、食欲亢進、甘味嗜好は完全消失した。またイライラ、ゆううつ、気分不安定等の精神症状は月経開始直前にわずかに見られる程度に軽快した。以上より黄体機能不全によつて起こる PMS は合成プロゲステロンよりクロミッドが有効である。PMS は本質的には月経開始直前に現われ、イライラ、ゆううつ、気分不安定等の精神症状が中核を形成し、頭痛、食欲亢進、甘味嗜好等の症状は中核をとりまく症状であることが示唆された。

6. IUD のマウス受精卵に及ぼす影響について (第 2 報)

竹内一浩・福元清吾・有馬直見
永田行博 (鹿児島大産婦)

現在、IUD の避妊機序としては子宮内膜反応説が一般的で、主に着床障害であろうと言われている。しかしながら受精卵に及ぼす影響を述べた文献は少ない。われわれは IUD 装着マウス (絹糸 5-0 を片側子宮に挿入) を用いて受精卵に及ぼす影響を検討してきた。今回、着床期の胚の運命を明らかにするために種々検討し、若干

の知見を得たので報告する。現在までの実験結果は以下のごとくであった。

1. マウスにおいて IUD は交配受精を阻止せず、また受精後 3 日目までの胚にもまったく影響を及ぼさなかった。

2. 受精後 4 日目で IUD 側ではいわゆる“tubl-locking”が生じ子宮内に下降した胚の減少をみたが、この胚盤胞は形態学的に正常であり、偽妊娠 2.5 日目（精管結紮雄マウスと交配させ、翌日腔栓を確認したものを偽妊娠 1 日目とした）の recipients に移植実験し、着床妊娠が成立した。

3. IUD を受精後 3 日目および 4 日目で抜去し検討したところ、3 日目抜去では対側に比して少数ではあったが着床妊娠が成立した。しかし 4 日目抜去ではいずれも着床しなかった。

4. IUD 挿入側では受精後 4.5 日目より 5 日目にかけて受精卵が変性し、変性卵はすべて Zona-intact であり透明帯の消失した胚はみられなかった。以上のことよりマウスでは IUD 挿入により受精後 4.5 日～5 日目に embryo-toxic environment の存在することが示唆され、また IUD と“hatching”との関連性も考えられた。

7. Scoring による外性子宮内膜症の非観血的診断に関する検討

増崎英明・石丸忠之・山辺 徹
(長崎大産婦)

外性子宮内膜症（内膜症）の非観血的診断は必ずしも容易ではない。そこで、腹腔鏡で内膜症と診断された 63 例（Ⅰ期 31 例、Ⅱ期 24 例、Ⅲ期 8 例）の不妊婦人の病歴、症状、内診所見、子宮卵管造影所見および一般不妊検査成績を対照の 63 例と比較することにより、内膜症の特徴的所見を抽出した。内膜症の特徴は、①月経痛および性交痛、②子宮後屈およびダグラス窩硬結、③子宮弛緩像、子宮辺縁粗大不整像および卵管采周囲癒着像（子宮卵管造影法）、④機能性不妊（基礎体温、精液検査、卵管疎通性検査および性交後試験がすべて正常）であった。

以上の個々の特徴的所見に、内膜症である可能性に応じた点数（月経痛、子宮弛緩像および子宮辺縁粗大不整像に 1 点、卵管采周囲癒着像および機能性不妊に 2 点、性交痛、子宮後屈およびダグラス窩硬結には 3 点）を与えて診断スコア表を作成し、scoring による総合的・非観血的な内膜症の診断法を検討した。すなわち、すべての検査項目を満たした 115 例（内膜症群 58 例および対照群 57 例）をスコア表に従って採点したところ、総合得点が 0

～4、5～8 および 9～16 の場合の正診率はそれぞれ 11% (4/38)、57% (25/44) および 88% (29/33) であった。

また、治療を終了した 30 例の内膜症のうち 17 例が妊娠したが、妊娠例の得点は非妊娠例に比べて低いものが多かった。さらに、総合得点の高い例ほど病変が進行している傾向が認められた。

8. 子宮内膜症における不妊因子の検討

— 腹水中の macrophage の動態を中心として —

倉田須和子・石丸忠之・増崎英明
黄 宏 駿・藤下 晃・今村定臣
山 辺 徹 (長崎大産婦)

軽症の子宮内膜症における不妊の原因は必ずしも明らかでなく、諸種の検討がなされている。最近、その原因に、腹腔内 macrophage の sperm 貧食作用、一部の腹腔内 macrophage より分泌されると考えられる prostaglandin 濃度の腹腔内上昇による卵管蠕動障害、さらに、子宮内膜における自己免疫現象による着床障害などが挙げられている。このように、不妊の原因として、macrophage を中心とした免疫現象の関与が注目されてきた。

そこで、私どもは腹腔鏡あるいは開腹により採取された腹水中の macrophage 数、補体 C_{3c} C₄ 値および免疫グロブリン濃度を測定した。そして、それぞれの結果を、子宮内膜症の有無および不妊の有無に分け、比較検討した。その結果、子宮内膜症では、対照例に比べて腹腔内 macrophage 数が多く、その病変の進行に伴って増加する傾向がうかがわれた。また同じく不妊をきたしているものの中でも、内膜症群では、非内膜症群に比べて、腹腔内 macrophage 数が多い傾向にあった。さらに、子宮内膜症を含む不妊例において、血中および腹水中の補体価が上昇している現象が認められた。免疫グロブリン濃度に関しては、子宮内膜症および不妊との間に一定の関係を認めなかった。以上の結果より、子宮内膜症による不妊症には、macrophage を中心とした何らかの免疫現象が関与していることが推察された。

9. 不妊婦人に対する内視鏡的診断、治療

松浦講平・荘田恭二・中村敏光
藤崎俊一・前山昌男
(熊本大産婦)

不妊婦人に対する診断的ならびに妊孕性促進操作を目的とした腹腔鏡の成績を報告した。対象は 44 例、適応は外来ルーチン検査で異常を認めない“機能性” 13 例、子宮内膜症 4 例、他の不妊因子の治療後 11 例、卵管・腹

膜因子疑 (HSG 5 例, 既往手術10例), その他 1 例であった。腹腔鏡検査により“機能性”13例中12例に異常所見 (卵管 4 例, 卵管周囲・腹膜 5 例, 子宮内膜症3例) がみられた。他の不妊因子の治療後11例では PCT 不良 3 例中 2 例が子宮内膜症, 1 例が卵管周囲癒着がみられた。乏精子症 5 例中 1 例のみが異常な人, 3 例に卵管因子, 1 例に腹膜因子がみられた, 排卵因子の 3 例は共に卵管・腹膜因子がみられた。腹膜因子疑15例のうち, 外妊後の 2 例は共に卵管因子が, また筋腫核出術と子宮内膜症の保存手術後の計 6 例はいずれも骨盤内性器腹膜の広汎な癒着がみられた。HSG の卵管疎通性, 癒着の所見との比較検討では, HSG での両側疎通5/25(20%), 片側疎通1/11 (10%) で卵管不妊がみられた。癒着では PTA 8/11(72%), PFA 6/11(54%) が正診であったが, PTA, PFA なしとした11/15(73%) が false negative であった。腹腔鏡下における妊孕性促進操作の成績では, 卵管周囲・骨盤腹膜の癒着剝離13例中 (完全6例, 不完全 7 例), 完全剝離の 1 例と PTA, PFA 剝離 5 例中 1 例が妊娠したが, 卵管采拡張術 7 例では妊娠例はなかった。処置不能が 6 例, 軽症子宮内膜症 1 例が処置なして妊娠, 他の卵管采凝集例が外来での通薬水後妊娠成立した。

10. ラパロスコプ施行時の麻酔法について

一不整脈発生に対する GOF と GOË との比較検討一

岩里桂太郎・角沖久夫・宇津宮隆史
門田 徹

(九州大生体防御医学研究所産婦)

ラパロスコプ施行時の麻酔法は各種あるが, 当科では挿管による全身麻酔管理を行ない, GOF(ハローセン) と GOË (エンフルラン, エトレン®) の両者を使用している。昭和59年12月より60年9月まで, 62例の不妊症の患者にラパロスコプを施行した (GOF 30例, GOË 32例)。導入はチオペンタール, サクシニルコリンを使用し, 挿管後炭酸ガスを用いて気腹を行ない, その後自発呼吸による呼吸管理をした。気腹圧は10mmHg 以下とした。両グループ間は年齢, 体重, 気腹時間, 分時呼吸量, 血圧, 脈拍等に差はなかった。術中動脈血ガス分析を各時点で行なつたが両グループ間に差はなかった。また術前, 術後 1 日目, 7 日目の生化学検査にも差はなく, 変動もなかった。不整脈の発生はハローセングループでは, P 波異常 1 例, 単源性心室性期外収縮 3 例, 多源性心室性期外収縮 1 例, 二段脈 4 例, 第 2 度 A-V ブロック 1 例の計10例 (33.3%) あり, エトレングループ

では二段脈 2 例, 単源性心室性期外収縮 1 例の計 3 例 (9.4%) であった。ハローセンはヒス・プルキンエ路を抑制し, 心室伝導時間を延長させ, エトレンはこれを短縮させる薬理作用の違いがあり, これが不整脈発生頻度の差となると考えられる。

11. 当科における卵管形成術について

内海善夫・石明 寛・中村元一
尾上敏一・中村正彦・中野仁雄

(九州大産婦)

女性の不妊症の中では卵管因子によるものが多く, 約 40% を占めると言われている。そのため卵管形成術の成績の向上は卵管因子による不妊症に対し, 重要な課題となっており, 当科においても最近ではマイクロサージェリーによる卵管形成術に取り組んでおり, これらを含めた最近 5 年間の治療成績を発表した。

対象は不妊原因が主に卵管因子によるものと考えられ, 昭和55年2月より, 昭和59年10月の間に卵管形成術を施行し, 1 年以上にわたって経過観察しえた27例であった。

27例のうちマクロサージェリーを施行したものは11例で, 3 例が妊娠し, マイクロサージェリーを施行したものは16例で 1 例のみが妊娠した。マイクロサージェリー群では75% が骨盤内癒着が高度であり, 25% に卵管溜水腫が合併していた。このことからマイクロサージェリーによつて疎通性は回復しても卵管がすでに不可逆性の変化を受けたものにまで, 手術適応を広げたため, 当院での治療成績が低くなった原因の一つと考えられた。以上をふりかえり, 術前の子宮卵管造影や腹腔鏡により, 骨盤内癒着や卵管溜水腫の高度なものはマイクロサージェリーの手術適応から除外すべきだと考えられた。

第21回日本不妊学会北陸支部学術総会

日時 1985年12月21日 (土) 午後 3 時
会場 金沢市文化ホール 3 階 大会議室

1. 当院における LH-RH test の検討

舟本 寛・館野政也
(富山県立中央病院産婦)

LH-RH test は視床下部・下垂体・卵巣系の調節機構障害部位の検査法として有用であることは広く認められている。今回, われわれは昭和58年1月から60年4月までに当院産婦人科不妊症外来を受診した44例の排卵障害婦人 (無排卵周期症 9 例, 続発性 1 度無月経15例, 続発

性2度無月経20例)に対して行なった LH-RH test につき比較, 検討したので報告する. LH-RH test は消退出血後10日前後に LH-RH を100 μ g 筋注し, 投与前, 投与後30分, 60分, 90分, 120分と採血し, RIA で LH, FSH を測定した. LH-RH test の診断基準は血中 LH の前値より, high, normal, low の3群に分け, LH-RH 投与後の peak 値により good および poor response と区別した. 無排卵周期症では low or normal good 型の視床下部性 (78.0%) がもつとも多く, 第1度無月経においても視床下部性 (60.0%) がもつとも多かつた. 第2度無月経では low or normal poor 型の下垂体性が65.0%を占め, 次いで high good 型の卵巢性が30.0%であつた.

clomiphene での排卵成功例では, normal good 型が76.9%であり, 同じ視床下部障害と思われる low good 型においては排卵成功例は認められなかつた.

2. β -Subunit hCG 測定キット MS-8501 の使用経験

国部久也・富田哲夫・高林晴夫
杉浦幸一・桑原惣隆
(金沢医大産婦)

現在, 妊娠の早期診断法として, 妊婦尿中の hCG を免疫学的に測定する HAIR, HAR, LAIR および LAR 法などの免疫学的な測定法は, 産婦人科の日常診療にとつて, 最も重要な検査法の一つである. しかし, 現在使用されている試薬は, 多クローン性抗 hCG 抗体を用いた Latex 凝集反応を用いたものが殆んどであり, このため試薬の感度が, 1.0~3.0IU/ml のものが多く, 妊娠6週以降より検出率が高くなってくる. このため従来の妊娠診断薬は, LH との交叉性の問題も含め, 尿中 hCG の低レベルである妊娠初期 (5週以前) や子宮外妊娠・早期の流産などの症例では, 陰性を示すことがあり, 診断に際し苦慮することが多い. 今回われわれは, 単クローン性抗 hCG 抗体を用いた高感度妊娠診断薬 MS-8501の使用の機会を得たので, 若干の臨床的考察を加え, 報告する. 対象患者は8例であり, うち5例が妊娠群, 3例が無月経, 月経遅延を訴え, 検査後非妊娠と確認し得た群である. 妊娠例5例のうち, 2例は妊娠5週までに妊娠と確認し, 1例は, 極めて早期の流産と確認したものである. この hCG 抗原特異性の高い2種類の単クローン性抗体を用いた妊娠診断薬 MS-8501は, 今回の我々の検討において, 妊娠の早期診断, 早期流産の予後判定に有用性を確認し, 今回検討されなかつた子宮外妊娠の症例も含め, さらに臨床的検討を加える予定である.

3. 多嚢胞性卵巣症候群 (PCO) における副腎皮質機能

中川俊信・村上 弘一・山城 玄
荒木克己・赤祖父一知・西田悦郎
(金沢大産婦)

PCO の内分泌動態を検索する目的で, 本症候群患者7例に対して dexamethasone (DXM)-HCG 負荷試験を施行し, 血中 testosterone (T), Δ^4 -androstenedione (ADD), progesterone (Prog), dehydroepiandrosterone (DHA), DHA-S, Cortisol, LH, FSH 値の変動について検討した. PCO は, (1) LH-RH 負荷試験の反応および血中 LH の基礎値の上昇 (>40mIU/ml), (2) 月経異常, (3) 多毛症, (4) 高T血症のうち少なくとも3項目以上の条件を満たす症例とした. DXM-HCG 負荷試験は, DXM 1日2mg, 7日間経口投与し, その5日目より3日間 HCG 1日5000IU, 筋注併用投与した. 事前に ACTH 負荷試験を行なった. LH-RH 負荷試験では, 血中 LH の過剰反応を認めた. ACTH 負荷試験では異常反応を示す症例は認めなかつた. DXM-HCG 負荷試験では血中 DHA-S が200 μ g/dl 以上の3例と200 μ g/dl 未満の4例に分けて, 血中 androgens (T, ADD, DHA) の変動について検討した. 血中 DHA-S が200 μ g/dl 以上の症例では200 μ g/dl 未満の症例と比べて, DXM による抑制率は高い傾向を示し, 特に ADD は有意に抑制された ($P < 0.05$). HCG 負荷による反応率も低い傾向を示した. 以上より, PCO の7例のうち, 血中 DHA-S が200 μ g/dl 以上の症例は3例認められ, これらの症例においては, 副腎由来の androgens 過剰状態が示唆された. 血中 DHA-S が200 μ g/dl 未満の症例は4例認められ, これらの症例においては, 卵巢由来の androgens 過剰状態が示唆された.

4. 過去5年間の流産の統計的考察

鈴木信孝・荒谷穰治・高橋義弘
加藤三典・飯田和質
(福井県立病院産婦・金沢大産婦)

昭和55年から59年までの5年間に流産徴候を示し福井県立病院に入院し予後の確認し得た妊娠16週未満の初期流産を対象として検討した. なお習慣性流産は12例みとめたが特殊な流産とみなし統計から除外した. 切迫流産例は178人, 自然流産は63人で, 5年間の総分娩数3773例に対しそれぞれ4.7%, 1.7%であつた. 発症年齢, 経産回数, 性周期において両者間に有意差はなく, また出

血、腹痛などの主訴、産科的合併症についても有意差はなかった。流産は職業婦人に多く、既往歴に自然流産を持つものが多かった。つわりの症状の有無は予後判定に意外に重要で、つわりを認めた人が自然流産になる率は低く(2%未満)、つわりのない人が流産してしまう率は高い(約45%)。出血の初発時期は切迫流産例で、6、7週に、自然流産例で9.11週に peak を示し、両者には、3~4週の time lag が存在した。また出血初発時期と妊娠継続率では、妊娠4~6週で90%、7~9週で72%、10~12週で56%、13週から15週では76%で、妊娠10~12週で出血してくる症例の予後が最も悪かった。完全流産も日常よく経験するが、そのほとんどが7~11週の間におこり、9週に peak となった。出血してから止血するまでの日数は、切迫流産では4~12週で平均2日、13~15週で5日と13週以降の出血は、止血に日数を要した。初診時に胎児心拍(-)の人が初めて心拍(+)となった時期は、妊娠6週で2.9%、7週で25.7%、8週で55.7%、9週で87.1%、10週で95.1%、11週で100%と正常対照に比し、約2週間遅延した。この事は切迫流産例では、胎児心拍出現が遅延する傾向があることを示唆しているかもしれない。われわれは、日常診療にあたり、週数変更、予定日変更を行つているが、そういう確率は切迫流産に多いのかもしれない。今後検討して行きたいと思つている。

5. 過去3回子宮外妊娠の既往のある1症例に対する治療経験

後藤健次・麻生武志・大月 澄
金嶋光夫・堂庭信男・紙谷尚之
小辻文和・富永敏朗

(福井医大産婦)

結核の既往を有し、過去3回の子宮外妊娠と極めて重篤な卵管性不妊因子をもつた一症例に対し、卵管形成術を行つた経験について報告する。症例は31歳続発性不妊、挙児希望で16歳時に肺結核に罹患し抗結核剤の内服にて軽快、妊娠歴では20歳時に人工流産、24歳時に結婚後、27歳時自然流産、28歳時左卵管膨大部妊娠流産にて卵管膨大部切除、29歳時右卵管采部妊娠流産にて妊卵と付属物様組織を摘除、30歳時腹腔妊娠手術を経験している。既往歴から挙児は極めて困難であると考えられたが、夫婦の強い希望があり不妊因子の検索に踏み切つた。HSG では子宮内腔の形態に異常はなく、右側卵管膨大部は Saktosalpinx を呈し、左側卵管は卵管峡部で盲端に終つていた。腹腔鏡検査でも右側 Saktosalpinx、左側、卵管は峡部より末梢が欠除、色素通過試験では、

左卵管は全く青染せず、右側卵管は Saktosalpinx の部分まで青染されたことを確認した。以上の所見より左側卵管は膨大部以遠が切除されており峡部に卵管開口術を行なつても術後の成績が悪いということより左卵管に対するアプローチは放棄し、右卵管の Hydrosalpinx 部に新しい卵管開口部を形成する方針とした。下腹正中切開にて腹腔内に到達、Hydrosalpinx 部を子宮側約1cmを残して切開、切開面より約2cm 子宮側に健常な卵管内膜が認められたため、同切開面に放射状8方向に6号エチコン糸を用いて卵管漿膜から内膜に至る結節縫合を施行、止血を確認後癒着防止にて縫合面にキセラン塗布を行つた。術後経過順調、3日目より消炎剤内服を行い、14日目より月経をみた。術後1か月目に行なつた Rubin テストでは CO₂ F 150mmHg にて通気性がみられ2か月目の同テストでも同様所見が得られており、卵管の疎通性が回復、将来の妊娠の可能性が残されたと考える。子宮外妊娠の手術に際しても将来の妊孕性を残す配慮がなされれば、術後卵管性不妊となつても手術療法により妊孕性の回復が期待できると考える。

6. 当科における不妊外来の統計的考察

長阪恒樹・泉 陸一
(富山医大産婦)

1979年10月に富山医科薬科大学附属病院が開院してから、1984年12月までの期間に当科不妊外来を受診した患者は294例で、原発性不妊症が206例(70.1%)を占めている。不妊期間は1~21年で、平均 5.83 ± 0.20 年であった。当科を受診する以前に、他院で診断・治療を受けていた患者は253例(86.0%)であるが、このうち当科で改めて不妊原因を検索し、診断が確定した228例について、前医が当科と同じ診断を下していたのは85例(37.3%)にすぎなかつた。これは、われわれが積極的にホルモン検査、子宮鏡、腹腔鏡、精液検査などを行なつているためと思われる。特に2つ以上の不妊原因が重複している場合の診断一致率が最低で、11.3%にすぎなかつた。不妊原因検索のため腹腔鏡検査を行なつた機能性不妊と思われた36例のうち、22例(61.1%)に不妊の原因と思われる卵管異常や子宮内膜症などが明らかとなつた。治療を開始した244例のうち、妊娠は69例(28.3%)に78回成功したが、このうち分娩は42例に48回、また子宮外妊娠は6例にみられた。主となる不妊原因別に妊娠成功率をみると、排卵因子44例中23例(52.3%)、卵管因子75例中15例(20.0%)、男性因子90例中16例(17.8%)、原因不明35例中15例(42.9%)に妊娠が成立した。妊娠成立した69例について、当科初診時の平均不妊期間を、主とな

る不妊原因別にみると、排卵因子群 43.1 ± 5.7 か月、卵管因子群 54.1 ± 9.6 か月、男性因子群 52.5 ± 8.4 か月、原因不明群 32.9 ± 8.2 か月であった。当科にて診断確定後、治療開始してから妊娠が成立するまでの期間を主となる不妊原因別にみると、排卵因子群 6.2 ± 0.9 か月、卵管因子群 5.3 ± 1.2 か月、男性因子群 9.7 ± 0.4 か月、原因不明群 4.7 ± 1.8 か月であった。

以上のことから、長期間不妊患者に対しては、改めて十分に不妊原因を検索した後に、適確な治療を行なうことが重要であると思われた。

7. 右交叉性精巢転位症の1例

酒本 護・梅田慶一・片山 喬
(富山医薬大泌尿器)

患者は、9か月の男子。主訴は、右陰囊内容の欠如、外尿道口の位置異常であり、家族歴は父30歳、母27歳、家族結婚でない。兄は3歳で外陰部に奇形を認めず健康である。現病歴：母が妊娠3カ月時切迫流産となり黄体ホルモン投与、シユロカー手術の治療をうけた。出生時、体重3050g、身長52cmであった。某泌尿器科医を受診し、右停留精巢、尿道下裂の診断をうけた。紹介にて富山医科薬科大学附属病院泌尿器科を受診した。現症：体重9130g、身長71cm、栄養中等度、胸腹部に異常を認めず。左精巢は、陰囊内にあるも左鼠径部との間で移動性を認める。右精巢は触知しない。外尿道口は、陰茎遠位部に開口し陰茎は下方へ軽度屈曲している。検査成績：血漿ホルモン LH 14mIU/ml, FSH 3mIU/ml, testosterone 0.5ng/ml, prolactin 13ng/ml。染色体構成46 XYで性染色質陰性である。IVP, 尿道造影, 胸部XPは異常を認めない。手術所見：右精巢は、左鼠径部にて左精巢と同一鞘膜内につつまれて存在した。両側精巢固定術を行なった。尿道下裂に対しては一次手術を行なった。尚、女性性器遺残、鼠径ヘルニアは認めなかつた。

交叉性精巢転位症の成因については、①アンドロゲン作用不足によるウォルフ管癒合説、②Müllianian inhibiting substanceの障害によるミュラー管遺残、発育説。③精巢導管異常説の仮説がある。交叉性精巢転位症は、自験例を含め69例の報告があるが、そのうち36例に女性性器遺残を認め、②の説が有力であるが、全ての症例を説明するには不十分で、①、③の説も関与していると考えられる。また本症では不妊症は、思春期以降の精巢の発育環境が原因と考えられ、精巢固定術を思春期前に行なうべきである。

8. 妊婦尿中 Catecholamines の GC-MS による解析

池田裕也・桑原惣隆
(金沢医大産婦)

妊婦尿中 Catecholamines 3分画, Adrenaline (A), Noradrenaline (NA) および Dopamine (DA) を GC/MS 系にて分析し成績を得たので報告する。

〔方法〕 対象は正常妊婦で初産婦12名と経産婦24名であり、被検尿は酸性とし、 -20°C に凍結保存した。アルミナ吸着法で抽出し、GC/MS 系により3分画を測定した。尚、測定値は creatinine 当量で表現した。

〔成績〕 初産婦において A, NA および DA の各平均値はそれぞれ、妊娠中期で54.7, 189.9および591.1 ng/mg Cr. であり、妊娠末期では105.0, 193.0および513.4ng/mg Cr. でAが軽度上昇し、他は不変であった。経産婦では妊娠中期で57.0, 138.0および344.7ng/mg Cr. 妊娠末期では133.1, 245.6および505.9ng/mg Cr. と妊娠末期に向け上昇傾向を示した。

〔結論〕 更に、代謝産物の測定を要するが、Catecholamine 3分画の妊娠中動態に初経産別で多少異なる成績を得た。

9. 雌ラット幼若期における血中 testosterone, estrogen の動態

生水真紀夫・富松 功光・原田文典
富田 嘉昌・赤祖父一知・西田悦郎
(金沢大産婦)

雌ラットの春機発動前における血中 testosterone (T), estrogen (E) などの動態について検討し、その性成熟過程における意義について考察した。

〔材料・方法〕 (I) 水および飼料を自由摂取させ、恒温・恒湿下に飼育した Wistar 系雌ラットを実験に供した。2, 5, 10, 15, 25日齢に軀幹血採血または断頭採血を行い、血中 T, E₂, LH, FSH を測定した。(II) 13日齢に、エーテル麻酔下で手術を行い、両側卵巣摘除群、両側副腎摘除群、片側副腎摘除群、偽手術群の4群(各4匹)をつくり、16日齢に断頭採血を行い、血中 T, E₂ を測定した。

〔結果〕 (I) 血中Tおよび E₂ は1日齢でそれぞれ 22 ± 6 ng/ml, 40 ± 2 pg/ml であつたが、2日齢以降では低下して、5日齢には 4 ± 3 ng/ml, 17 ± 3 pg/ml と最低値となつた。10日齢以後には上昇に転じ、15日齢で 64 ± 15 ng/ml, 35 ± 4 pg/ml とピークを示し、以後再び低下した。血中 LH および FSH にも、ほぼ同様の経日

的变化が認められた。(II) 偽手術群では、血中TおよびE₂はそれぞれ15±4 ng/ml, 67±12pg/mlであつたが、両側卵巣摘除群では6±4 ng/ml, 31±4 pg/mlといずれにも有意の低下が認められた(P<0.05)。また、両側副腎摘除群ではE₂(50±11pg/ml)には変化を認めなかつたが、Tは検出感度以下で有意に低下していた。片側副腎摘除群ではE₂が61±10pg/ml, Tが7±4 pg/mlで、Tに低下傾向が認められた(P<0.10)。

【まとめ】 幼若期雌ラットでは、15日齢前後において、体重のみならず、子宮および卵巣の相対重量の急激な増加が始まる。今回の検討では、この時期に一致して血中T, E₂, LH, FSHの一過性の増加が認められ、その後の性機能の発達に密接に関連していることが示唆された。また、副腎・卵巣の摘除実験から、ストレスの影響も考慮すべきであるが、E₂およびTの産生には卵巣のみならず副腎も関与していると考えられた。

10. 乳牛の卵管疾患について

泉 徳和・榊田星史
(石川県農短大畜産学科)
荒川和洋
(金沢市元町保健所)

目的：雌牛の不妊の原因として、卵管疾患に対してそれ程大きな関心が持たれていない。しかし卵管は采による卵の取り込みを始めとして、卵や精子の輸送、精子の受精能獲得、さらに受精卵の発育や子宮への下降に関与している。(Williams (1943), Lombard ら (1951), Dawson (1958) やその他の研究者によると卵管炎や卵管周囲炎、卵管水腫等の卵管疾患は不妊牛の約1～4割に存在すると報告している。絶対的不妊の原因である卵管閉鎖に関してはKoike ら (1959) が47頭の任意に抽出した牛屠場材料で1頭の両側性、5頭の一側性卵管閉鎖を報告している。しかしこれらは20年以上前の報告で、背景となる飼養環境が異なる。そこで演者らは1980年から6年間にわたって当地域における乳牛の屠場材料で卵管疾患を観察したので報告する。

材料および方法：石川県金沢食肉流通センターで屠殺されたホルスタイン種乳牛雌より任意に抽出した305頭の生殖器を材料とした。屠殺後4時間以内に肉眼観察し、次いでメチレンブルーによる卵管通水試験を行った。なお186頭の通水試験にはマノメーターと二連球付の自作器具を用いた。疎通性を欠いた卵管の一部は固定後病理組織学的観察を行った。

結果：305頭のうち13頭(4.3%)が卵管閉鎖を示し、いずれも一側性の卵管閉鎖であつた。150mmHg以上の

圧を要する難疎通性あるいは疎通性不良の卵管は610例中158例(25.9%)で、そのうち両側性は94例すなわち47頭(305頭の15.4%)で認められた。卵管閉鎖の原因として、卵管炎や卵管周囲炎により卵管の癒着したもの5頭、卵管水腫5頭、その他3頭であつた。卵管周囲の漿膜面における線維素析出は406例(66.7%)で、卵管周囲組織の脂肪沈着は555例(91.0%)、卵管峡部の線維結合組織化は453例(74.3%)で認められた。

11. 通水療法と濃縮 AIH にて妊娠した1例

金嶋光夫・小辻文和・堂庭信男
大月 澄・富永敏朗

(福井医大産婦)

通水療法により子宮卵管所見の改善をみ、精子濃縮法によるAIHとの組み合わせにより妊娠に至つた症例を経験したので報告する。

症例は、26歳、1回経妊未産婦で家族歴・既往歴に特記事項なし。23歳で結婚後、2年間不妊のために某医を受診、子宮卵管造影に異常を指摘され当科を受診する。月経周期は29日型で整調。22歳に現在の夫以外の男性との間に妊娠し、妊娠16週にて人工流産を経験している。

初診時、全身所見には異常なし。子宮は前傾前屈正常大で両側付属器には異常を認めないが、ダグラス窩に軽度の圧痛あり。基礎体温は二相性。通気・通水検査では卵管の疎通性を認めず、子宮卵管造影では左卵管は造影されず、右卵管に卵管水腫を認め腹腔内への造影剤の流出を認めない。腹腔鏡検査では、左卵管は左卵巣と癒着していたが、卵管采の構造には、異常を認めなかつた。右卵管は水腫様であり先端の構造は不明であつた。また精液検査にて乏精子症を認めた。

生食水20mlにウロキナーゼ25,000単位、ハイドロコーチゾン300mg, LMO×1.0gを溶解し、卵胞期後期6周期に通水療法を行なつたところ、通気試験では卵管疎通性の改善をみ、子宮卵管造影では左卵管が造影されるようになり右卵管水腫も軽減した。また両側卵管よりの造影剤の腹腔内への流出が観察されるようになった。

次に3回のAIHを施行したが妊娠には至らず、4回目にFicol法での精子濃縮法を用いてAIHを行なつたところ妊娠に至つた。現在妊娠14週であるが子宮腔内にGSと胎児像を認め、妊娠経過には異常を認めない。

12. 当科における卵子精子卵管移植の経験

本保喜康・瀬戸俊夫・山田武法
 由田 謙・高色昌輔

(国立金沢病院産婦)

新しい不妊症の治療法として、体外受精の他に卵子精子卵管移植による児の誕生が伝えられている。一般に卵移植法としては経卵管的、経子宮壁的、経頸管的方法がある。前二者は家畜などで以前から試みられており、また後二者は主として、人間の体外受精卵移植の場合、牛などで採用されている。われわれはマウスを用いてこれら三種類の卵移植法を実験したところ、この結果でも経卵管的移植は他の方法に比べ高い着床率を示した。

このような事から、われわれは卵子精子卵管移植法に注目していたが、昭和58年11月、この方法を適用するのに問題がないと思われる症例を得た。

患者は36歳、20歳で結婚、帝王切開にて2児を得ている。2回目の帝切時に卵管結紮を受けた。その後、離婚したが、昭和58年、再婚のため卵管の再吻合を希望して当科を受診した。本人および夫の紹諾を得て本法を行なった。

排卵誘発は HMG-HCG 法で行なった。手術時右卵巣には2個の卵胞が認められ、吸引した卵胞液中には2個の未受精卵が存在した。ただちに5% CO₂+95% 空気中の Hoppe and Petts 液中で培養し、その後洗浄した精子を添加した。吻合術終了時に左卵管の吻合部よりも子宮側寄りの点に、卵子精子を移植した。しかしこの結果は術後3週間たつて月経となり、われわれの試みは成功しなかった。その後、昭和59年春にも、全く同様の症例を得たが、この時は卵子の発見がないままに終わった。

本法は、不妊症の新しい治療法として、各種の卵管手術の際や、ラパロスコピー時、また免疫学的不妊症などに応用できる可能性があると考えられる。

13. 高度乏精子症妊娠例

林 政宏・甲藤政三・加藤 修
 (恵愛病院)

田谷 正 (田谷医院)

最近、当院では、Percoll 不連続密度勾配遠心法により、精子濃度、精子運動率の改善を認め、なかんずく活発な前進運動精子を得ることにより AIH に成功妊娠に至る症例が増加している。今回高度乏精症であった2症例の Percoll 精子洗浄濃縮 AIH 法により妊娠に至った症例について述べる。

症例1：精子濃度 $1.6 \times 10^6/\text{ml}$ 運動率5%の高度乏精子症が2か月間のメチコパール、HCG 投与と1か月間のカリクレイン、補中益気湯併用投与により精子濃度 $35 \times 10^6/\text{ml}$ 運動率50%に改善されたが、4周期通常の AIH 施行するも妊娠せず、5周期目、Percoll 精子洗浄濃縮 AIH 法にて妊娠に至った。

症例2 精子濃度 $10 \times 10^6/\text{ml}$ 運動率60%の乏精子症にカリクレイン、補中益気湯投与するも改善認められず。3周期通常の AIH 施行するも妊娠せず。4周期目 Percoll 精子洗浄濃縮 AIH 法にて妊娠に至った。

まとめ Percoll 精子洗浄濃縮法により、活発な前進運動精子を得ることができ、従来の AIH 法では無効であった、高度乏精子症、精子無力症に有効であった。これは Percoll 法により、精漿が除去され、精漿中の decapacitation, factor や prostagrandin が除去されること、また存在する症例での精漿中、細菌除去、抗精子抗体除去等の好影響が考えられる。

14. 両側精管欠損の2例

河野孝史・寺田為義・中田英浩
 片山 喬 (富山医薬大泌尿器)

今回われわれは両側精管欠損症の2例を経験したので報告する。症例1. 患者は30歳、男性で未婚。主訴は精液量の減少で、既往歴、家族歴には特記すべきことなし。現病歴では11年程前より精液量の少ない事を自覚、昭和60年6月に東邦大学医学部付属大森病院を受診し無精子症を指摘された。昭和60年6月17日当科紹介され受診。現症では、外陰部正常、陰毛發育良好、精巣は触診上正常で容量は両側とも22ml。精巣上体は両側正常だが精管は両側触知せず。精液検査では液量0.9ml、精子は認めず。局麻下にて両側陰囊内容物を検索するに、両側とも精巣、精巣上体頭部を認めるが、精巣上体尾部および精管は欠損していた。精巣生検では、両側ともほぼ正常な造精機能を示していた。なお患者の協力得られず精液中の果糖、超音波検査法による精囊の検索等を進めることができず。症例2. 患者は28歳男性で主訴は不妊。既往歴では21歳時に胃潰瘍の手術をうける。家族歴には特記すべきことなし。現病歴は昭和57年3月に結婚したが子供ができない。妻は産婦人科にて頸管粘液が少ないと指摘され治療し、治癒したといわれる。性欲および性生活は異常なし。精査希望にて昭和60年5月29日当科初診。現症では、外陰部正常、陰毛發育良好。精巣は両側正常で容量右27ml、左23ml。精液検査では液量1.2ml。精子は認めない。経直腸の超音波断層像で、非対称な精囊を認める。陰囊内容物の検索にて右は精巣上体

頭部、尾部を確認するも精管は認められず。左は精巢上体頭部のみ確認し、体部以降は結合組織におきかわつていた。これに対し、人工精液瘤を右は精巢上体尾部および体部の2カ所、左は精巢上体頭部に装着した。精巢組織所見では、両側造精機能は正常であつた。精管欠損症は、近年その報告例が増加しており、今回の本邦集計で、191例となつた。

15. 男子不妊症患者に対するカリクレインの治療成績

山口一洋・長野賢一・打林忠雄
久住治男 (金沢大泌尿器)

男子不妊症に対してキニン遊離酵素であるカリクレインの臨床効果について検討した。

対象症例は1984年1月から1985年9月までに男子不妊を主訴として当科を受診した乏精子症および精子無力症の18例である。患者の年齢は28歳から40歳までで、平均年齢は32.4歳である。カリクレインの投与量は一日100単位とし、朝夕2回の分割投与を行なつた。カリクレインの投与期間は3カ月から11カ月間で、平均投与期間は4.4カ月間であつた。効果判定は精液量、精子数、精子運動率、Fertility index の4項目について亀井ら(1980)の方法に準じて行なつた。

結果：精液量に関しては18例中5例に著効ないし有効の結果が得られたが、減少が2例に認められた。投与前の精液量が3.0ml以上の群では9例中4例に有効という結果が得られた。精子数に関しては18例中5例に著効ないし有効の結果が得られたが、減少が4例に認められた。著効ないし有効例では投与前の精子数がすべて $2000 \times 10^4/ml$ 以下であつた。精子運動率に関しては18例中9例に著効あるいは有効の結果が得られたが、減少が4例に認められた。投与前の運動率が40%以下の群では、11例中9例に運動率の改善が認められた。Fertility indexに関しては18例中3例に著効ないし有効の結果が得られたが、減少が1例に認められた。妊娠成立が得られた症例はなかつた。

以上の結果より、カリクレインの投与は精子運動率40%以下、精子数 $2000 \times 10^4/ml$ 以下、精液量3.0ml以上の症例に対しては有用な治療法となり得るのではないかと考えられた。

第93回日本不妊学会関東地方部会

日時 昭和61年1月31日

場所 新宿ワシントンホテル

1. EPF 活性からみた人工授精の受精率に関する検討

伊藤仁彦・末岡 浩・郭 宗正
安康善雄・長崎淳一・森 定優
飯塚理八 (慶応大産婦)

これまで早期妊娠診断として臨床応用されているhCGを、確実に検出できるのは着床以後であり、受精後着床までの段階における受精診断は不可能であつた。1974年オーストラリアのMortonらによつて報告された受精後超早期に母体血液中に出現する超早期妊娠関与蛋白であるEarly Pregnancy Factor (EPF)を測定することにより、種々の不妊因子における受精率を比較検討し、以下の知見を得た。

1) 人工授精例でのEPF陽性率は、AIH群では21.4%、AID群では68.3%と著明な差が認められ、AIH症例では受精率が低い可能性が示唆された。

2) 不妊原因別のEPF活性の検討により、EPF陽性率は性交後テスト陰性例で19.3%と著しく低く、精子減少症例および機能性不妊例では33.3%であり、性交後テスト陰性例での受精率は低く、精子減少症、機能性不妊がそれに次ぐことが示唆された。

2. 精子のDNA量による評価法について

遠藤勝英・末岡 浩・翁文 開
宮崎豊彦・久慈直昭・名取道也
小林俊文・飯塚理八

(慶応大産婦)

従来より、精子の機能の評価は精液量、精子濃度、運動率等のいわば間接的評価法にて行なわれていた。われわれは、精子のDNA量、size densityをflow cytometryを用いて分析することにより、男性不妊患者の精子機能の評価、あるいはX精子、Y精子の分離等に利用すべく検討を行なつてきた。今回は、flow cytometryを用いての精子の分析を行なうため必要な処理法および染色法について以下の知見を得た。

精子の前処理において、pepsin または papain を用いた処理法およびRNA aseを用いた処理法について検討し、pepsin または papain 処理に加えてRNA ase 処理を行なつた群において、より良好なCV値が

得られた。

染色液においての検討では、CV 値においてそれぞれの染色液で以下の値が得られた。

EB+mithramycin : 12.52, PI : 11.12.

DAPI : 9.26, bisbenzimidazole : 7.51.

Quinacrine mustard : 3.20.

3. AIH にて 2 度目の妊娠に成功した逆行性射精の 1 例

谷藤 匠・藤井徳照・吉田英機
今村一男 (昭和大泌尿器)
矢内原 巧 (昭和大産婦)

逆行性射精の 1 例で AIH により、2 回の妊娠に成功した症例を経験したので報告した。症例は 33 歳の警察官で、腰椎圧迫骨折に対する手術後、逆行性射精となり、当科を受診し、Hotchkiss 法に準じた処理後の精子を用いた 4 回目の AIH にて妊娠、分娩に成功し、3390g の男児を得た。その後、第 2 子を希望して再び来院し、膀胱内精子を検査したところ、精子濃度は十分であったが、運動率が悪かったため、7.5mMole caffeine 加 Ham's F-10 solution を用いた Layering method により、1 回目の AIH にて妊娠に成功させ得た。現在、妊娠 4 か月で経過は順調である。

4. 特発性男子不妊症に対する Methylcobalamin の長期治療成績

岩本晃明・岩崎 皓・広川 信
(藤沢市民病院泌尿器)
松下和彦 (同上 中検病理)
朝倉茂夫 (朝倉泌尿器科医院)

特発性男子不妊症の Methylcobalamin による長期治療成績を報告する。対象は 21 例で平均 33 歳である。不妊期間は平均 4 年 6 か月である。精液所見は中央値が $40 \times 10^6/\text{ml}$ 以下あるいは活動精子率 50% 以下を示した症例である。投与量は 1 日 3000 γ で期間は 6 ~ 9 か月、11 例 10 ~ 12 か月 4 例、13 ~ 18 か月 3 例、19 ~ 30 か月 3 例である。なお 3 例に Clomiphene citrate (1 日 25mg) との併用を試みた。

治療成績。精子濃度および活動精子率の両方が改善したもの 5.6%、精子濃度のみの改善をみたもの 27.8% であった。併用例では、1 例改善、1 例精子濃度のみの改善をみている。妊娠率は 16.7% であった。

本剤の長期投与により精子濃度の改善が期待される。男子不妊症の治療薬の少ない現在、Methylcobalamin

は有効な薬剤と考えられる。

5. 簡易洗浄精子人工授精法—その 2—

久保春海・安部裕司
(東邦大第 1 産婦)
島田美津枝
(大森赤十字)

一般外来で可能な洗浄精子 AIH 法を開発し、十分な成績を得たので報告する。従来、精液静置法では培養用チュウブやピペットによる操作を必要とし、コツも必要であった。また、ピペット操作や遠心を繰り返すことは精子に機械的損傷を与えることも考えられる。このため、今回はシリンジ法とも呼ぶべき、3 ~ 5 ml 容量のディスボ・シリンジ内で静置法を行ない、そのまま AIH を実施する方法を試みたところ、精子運動率、運動精子数ともに良好な結果が得られた。

結果：われわれの方法による、静置法前後の精子数、運動率の変化は前 $64.3 \pm 36.8 \times 10^6/\text{ml}$ 、 $61.8 \pm 14.0\%$ 、後 $20.7 \pm 17.9 \times 10^6/\text{ml}$ ($27.2 \pm 13.3\%$)、 $84.9 \pm 10.5\%$ であった。これは星ら (1983)、Lopata et al. (1976) の報告と比較しても良好であった。昭和 60 年 5 月より 12 月までに 18 例の不妊夫婦に対して、この方法を用いて、AIH を実施した。この結果、6 例 (精子因子 3 例、頸管因子 2 例、長期排卵障害 1 例)、33.3% が妊娠に成功した。

6. 精漿中の胎盤蛋白 (hCG, SP1, PP5, PP10) 濃度

高山雅臣・相馬 廣明・矢口誠一
舟山 仁・山辺克都子・藤原幸郎
(東医大産婦)

ヒト胎盤から多種の酵素やホルモンが発見されてきたが、それらの生物学的作用や妊娠中の分泌動態すら解明されていないものが多い。一方ヒト精漿中に hCG 様物質を認めたという報告があるので、本研究では hCG のほか SP1, PP5, PP10 などの胎盤蛋白の精漿中濃度測定を試みた。対象は不妊を主訴とする患者夫 23 名、年齢 24 ~ 26 歳で、採取精液を室温にて液化、遠沈後上清を -20°C に凍結保存した。濃度測定は、hCG- β -carboxy-terminal peptid-EIA, SP1 は Enzynost-SP1, PP5 及び PP10 は当教室開発 RIA によった。

結果：精漿中の濃度および含有量は hCG : $1.45 \pm 0.33\text{mIU}/\text{ml}$ 、 $5.0 \pm 2.4\text{mIU}$ 、SP1 : $6.5 \pm 2.5\text{ng}/\text{ml}$ 、 $15.5 \pm 8.0\text{ng}$ 、PP5 : 369.1 ± 195.4 、 $831.4 \pm 506.0\text{ng}$ 、PP10 : $10.1 \pm 4.8\text{ng}/\text{ml}$ 、 $24.0 \pm 11.7\text{ng}$ であった。各蛋

白濃度間には相関はみられない。また各蛋白濃度と精漿量、精子数、運動率、奇形率との相関も明らかでなかった。特に PP5 は妊娠満期血清平均濃度の 7 倍で、精子 acrosin 分泌との関与が考えられる。

7. マウス卵子の体外発育に及ぼす加齢の影響

小野寺政一・石島芳郎
(東農大畜産)

マウス卵子の生存能に及ぼす加齢の影響を知る目的で、2, 4, 7~9 および 10~12 か月齢の CF#1 系の末産雌マウスから過排卵処理により得られた排卵後 36~38 時間の卵子の 2 細胞期以上に発達した場合(分割率)、異常卵および 2 細胞期胚の体外での発育能について比較検討した。

その結果、2, 4, 7~9 および 10~12 か月齢の卵子の分割率は、それぞれ 87.4, 82.5, 83.5 および 62.3% で、母体の加齢とともに低下し、特に 10~12 か月齢では 2 および 4 か月齢に比べ有意に低い値を示した。また異常卵の出現率は、それぞれ 8.2, 6.8, 14.7 および 28.3% で、7~9 および 10~12 か月齢で有意に高い率を示した。次に、それぞれの月齢から回収した 2 細胞期胚を体外培養したところ、拡張胚盤胞への発生率は、それぞれ 90.1, 91.3, 85.7 および 75.8% で、10~12 か月齢のもので有意に発生率が低下した。これに伴い退行卵の割合は 10~12 か月齢が有意に高い値を示した。以上のことから、母体の加齢が進むと、初期発生過程で退行する卵子の割合および異常卵の出現率の高率化、さらに形態的に正常と判断される卵子でも、発育能力の低いものが含まれることが明らかとなった。

8. 家兎における子宮内受精の試み

山海 直・金山喜一・遠藤 克
佐久間勇次 (日大獣医生理)

近年、IVF & ET に比べて操作簡易な gamete intra-fallopian transfer (GIFT 法) が欧米諸国で試みられるようになり、わが国においても GIFT 法により産児が得られている。演者らは、さらに、より簡易な GIFT 法として、家兎を用いて卵管内に稀釈精液を注入して妊娠分娩させる卵管内人工授精に関する一連の研究を続けており、多くの受精、着床、妊娠および分娩の成果を得てそれらの成績を報告してきた。一方、子宮内受精について、Estes 氏手術を含めて、古くから検討されてきたが、ほとんど成功例は得られていない。そこで演者らは今回、家兎をモデルに子宮内受精に関する基礎的実験を

行ない、その可能性について検討した。

子宮内受精は、すでに精子が送りこまれている子宮内に卵子を移植する方法と、両配偶子を同時に子宮内に注入移植する方法が考えられるが、今回は、精子として精巢上体精子または射出精子、卵子として同一個体の卵胞卵子または排卵直後の卵子を用いて、同時に子宮内に注入移植する方法を試みた。供試家兎は 4 羽で、その成績は精液と共に 17 個の卵子を移植し、15~17.5 時間後に摘出子宮を灌流して、6 個の卵子を回収した。そのうち 2 個が 2cell で、3 日間培養し、2 個とも blastocyst に発育した。2 個の受精したと思われる卵子は、排卵直後の卵子と射出精子を用いたものである。ただし胚移植は試みていない。

以上のように、少数例ではあるが家兎の子宮内受精に成功したことは、今後、受精率の高いより有効な子宮内受精の可能性を示唆したものであり、将来、産婦人科領域における不妊治療および畜産領域における家畜の改良・増殖方法として応用できる可能性を示唆するものである。

9. Unruptured ectopic pregnancy の腹腔鏡による確定診断

篠崎百合子・武田佳彦
(東京女子医大産婦)
高木耕一郎・岩下光利・田辺清男
坂元 正一 (同 母子センター)

東京女子医大母子センターにおいて 1984 年 10 月から 1985 年 12 月の間に 28 例の子宮外妊娠例があつた。このうち 21 例は急性症状を呈した定型例であり即日手術が行なわれた。他の 7 例では臨床症状に乏しく、すぐに開腹手術をするのをためられた症例である。これらの症例に対し、われわれは入院後の連日の UCG 測定および超音波断層法を繰り返して行ない、両者の組み合わせにより子宮外妊娠の疑いを強め、さらに D & C を行ない、肉眼的・病理学的に絨毛のないことを確認した。

最終確定診断の意味で腹腔鏡検査を施行し、全例に卵管妊娠を認めた。腹腔鏡所見では種々の大きさの外妊腫瘍を認めたが、小さい腫瘍の 2 例では腹腔出血は全く認められなかった。これらの結果により急性症状を欠く子宮外妊娠の早期診断に対し腹腔鏡の有用性が認められた。

10. 当科における腹腔鏡施行症例の臨床的検討

内藤正文・田中玲子・寺田夏樹
小堀恒雄・高見沢裕吉

(千葉大産婦)

腹腔鏡は骨盤腔内を直視下に観察できるという利点を有し、また近年は手技や質の向上にもより産婦人科領域で広く利用されるようになった。今回、当科で最近2年間に本法を行なった81例につき臨床的な検討を加え以下の結果を得た。

1. 子宮外妊娠の疑いにて7例に本法を施行した。2例は外妊を否定することができ、他の5例は卵管流産の確診が得られた。
2. PIDの疑いにて5例に本法を施行し、2例に手術療法が行なわれ、他の3例には保存的治療がとられた。
3. 機能性不妊にて9例に本法を施行し、子宮内膜症が1例、卵巣腫瘍が1例みつき、片側卵管疎通障害例が4例あった。
4. 卵管性不妊の疑いにて20例に本法を施行したが、8例はそれが否定された。
5. 腹腔鏡施行81例のうち34例(42%)が内膜症であり、それらに対しては病勢の進行期により手術療法、ホルモン療法等の適切な治療がなされた。
6. 挙児希望症例52例のうち本法施行後10例の妊娠例が得られた。

11. マイクロサージェリーによる卵管形成術と卵管間質部閉塞の取り扱い方

長田尚夫・赤嶺和成・津端捷夫
高木繁夫 (日大産婦)

最近の卵管性不妊症の治療には、IVF & ET のみならず卵管内移植も行なわれるようになり、その適応はますます拡大されてきている。一方、卵管の疎通障害である卵管間質部閉塞の取り扱い方については、その診断・治療法に多くの意見があり、体外受精による胚移植を優先させている施設が多く、観血的治療による治療方針には不定的な意見が多いようである。この理由には、術後再閉塞が起こることと、術後成績(妊娠率)が低いことがあげられている。しかしわれわれのマイクロサージェリーによる成績では、必ずしも他の術式に比べ、特に悪いとはいえず、むしろ将来、卵管の端々吻合術と同様の成績が得られるものと考えている。本講演においては、われわれの卵管間質部閉塞の診断法とその治療法について解説し、われわれのマイクロサージェリーについての術後成績を紹介する。

特別講演

染色体異常と不妊性

吉田俊秀

(東京医大客員教授・国立遺伝研名誉所員)

(1) 染色体と生物の進化=クマネズミ(*Rattus rattus*) およびその近縁核の核学的研究から、染色体に基づく生物の進化には、次の3つの概念を導入すれば、矛盾することなく説明することがができる。(i) 核型には表型的と内部構成的とがある。両者、特に後者の分化が種進化に重要な役割を演ずる。(ii) 核型分化が一度起こると、それが引き金となつて連続的に起こる可能性がある(核型進化の連続性)、(iii) 近縁核間においては核型進化に平行性(類似性)がある。

(2) Y-染色体の転産と不妊性: ラットの NIG-III 系統に放射線を照射、その反対に常染色体 no. 11 と Y 染色体の転産個体が生れたアクロセントリックの Y 染色体の長腕部が動原体近くで、切断をおこし、切断端が no. 11 の短腕部に転移した。したがって no. 11 はアクロセントリックより、メタセントリックに変形し、動原体をもつ Y 染色体は点状となつた。この 11: Y 転産雄は妊性があり、それと正常雌との交配で 11: Y 転産雄と正常雌がほぼ半々に生れた。しかし 11: Y 転産染色体や点状 Y の不分離により 11: Y 転産をもつた雌数%の割合で点状 Y を持たない 11/11: Y, Y 型の雌が生れた。11: Y 転産をもつた雌は妊性があり、それと転産雄との交雑により転産ホモの雄(11; Y/11; Y, X/点状-Y)や転産ホモ雌(11; Y/11; Y, XX, 11; Y/11; Y, X) 等が生れた一般に転産ホモ雄は不妊となるか、転産ホモ雌は出生仔の数は少ないか妊性をもっている。現在まで数多く調べたが、no. 11 が正常で点状 Y をもつた個体は一頭も生れない。

以上の諸観察から、Y-染色体における雄性決定因子は動原体の極く近くにある。Y 染色体の長腕の大部分は性決定に無関係である。しかし正常な雄性器官の発達とは重要な関係がある。Y 染色体の長腕部が雌の妊性には直接関係がない。しかし 11: Y 転産ホモの雌の産児数は極度に少なくなるので、全く無関係とは考えられない。この点については今後追求すべき問題である。

(3) 科学映画: 染色体と生物の進化

日本学術振興会企画、吉田俊秀監修、シネサイエンス社製作。染色体に基づいて生物はいかに進化し分化したかという題を、ネズミを中心とし、人やチンパンジーの染色体を参照として解説した。

第28回日本不妊学会北海道地方部会

日時 昭和61年2月1日

場所 ホテルニューオータニ札幌

1. 子宮動脈分枝に及ぼす種々の因子の影響について

牧野田知・一戸喜兵衛
(北海道大産婦)下斗米啓介
(札幌第1病院産婦)

子宮動脈分枝の血管壁増殖が, Estrogen, Progesterone の性ステロイド, 通常性周期においてどのように変動するかを, 生後70~15日目のモルモットで ^3H -Thymidine の up take を用いて検討した.

その結果, Estrogen のみが, 血管壁増殖に大きな影響をあたえることが判明し, その投与量と血管壁増殖性の変化が dose-dependent であることが判明した. 通常性周期における子宮動脈分枝の血管壁増殖性も通常性周期における Estrogen 濃度に比例して変化し, 子宮内膜等の発育に重要な役割を果たしている子宮動脈分枝壁の増殖性が, Estrogen によつて control されていることが判明した.

2. マウスの卵管・子宮内膜上皮の表面構造に関する研究

一特に生殖周期, 過排卵処置および卵巣割去による変化について—

西山裕子・高橋芳幸・金川弘司
(北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学科)

ddY 系マウスの卵管膨大部, 峽部および子宮内膜上皮の生殖周期に伴う変化を, 走査型電子顕微鏡を用いて観察し, 併せて過排卵処置と卵巣割去手術およびエストロゲン投与を行なった場合の影響についても観察した. 卵管については, 内膜上皮における線毛細胞の占める割合を, 子宮については, 内膜上皮細胞の高さを, 光顕レベルで計測した.

その結果, 子宮内膜上皮は着床時に微絨毛が消失し表面が粗造になり, 特徴的变化をすること, 卵管の線毛は発情期に増加し休止期に減少することが確かめられ, 子宮の微絨毛と卵管の線毛はエストロゲンにより発達が促されると考えられた. また, 過排卵処置により卵管の線毛細胞数が著しく増加するが, 着床時に子宮内膜上皮の肥厚が認められなかった.

3. Bromocriptine のヒト月経黄体 steroidogenesis への直接作用の検討

遠藤俊明・東口篤司・田中昭一
橋本正淑 (札幌医大産婦)

近年, Bromocriptine (Br) の黄体機能不全に対する有効性が報告されるようになって来た. Br の作用は中枢を介して発現すると一般には考えられているが, その末梢作用の有無は明らかではなかった.

そこで今回われわれは, ヒト黄体細胞の単層培養法を用いて, Br の黄体 steroidogenesis への直接作用の有無を検討したので報告する.

Br は培養48時間後の medium change の際10pg/ml, 100pg/ml, 1 ng/ml, 10ng/ml の4種の濃度で添加し, 以後2日間の progesterone (P), 17β -estradiol (E_2) の分泌量を測定した.

control の P 分泌量は $112.40 \pm 26.15 \text{ ng/ml} / 1 \times 10^5 \text{ cells/2days}$ (mean \pm SE) であり, E_2 は 2.85 ± 1.25 分泌された. Br の10pg/ml, 100pg/ml 添加では control と P 分泌に有意差はなかったが, 1 ng/ml, 10ng/ml では, control の $124.84 \pm 7.38\%$, $124.25 \pm 8.81\%$ と有意に増加した ($P < 0.05$). 一方 E_2 分泌は4種の濃度とも, control との間に有意差はなかった.

4. 犬における採精頻度と精液性状の関係について

河野寛昭・中尾敏彦・森好政晴
河田啓一郎

(酪農学園大獣医学科)

犬における交配供与頻度ならびに人工授精に用いる際の適正な採精頻度を明らかにするとともに, 犬精液性状間の相関を知る目的で, 雄犬4頭を用いて72時間, 48時間および24時間の採精間隔で各々5回ずつ反復して手指法により採精を行ない, 精液性状を検査した. その結果, 採精頻度を72時間間隔から48時間間隔にしても精液性状への影響は殆どみられなかったが, 24時間間隔の採精では, 精液量の減少, 奇形率の増加, 生存指数の低下, 総精子数の減少などが著明にみられた ($P < 0.01$).

このことより, 48時間間隔の交配または採精頻度であれば, 十分な受胎率が得られる可能性のあることが示唆された. また, 奇形率, 生存指数, 総精子数の間には有意な相関が認められた ($P < 0.01$).

5. ハムスター卵利用の牛精子性染色体判別法

島田昌幸・上口勇次郎・立野裕幸
美甘和哉 (旭川医大生物学)
浜野光市
(家畜改良事業団技術センター)

牛の X, Y 精子を分離し、雌雄の生み分けを可能にする方法は畜産研究の重要課題の一つである。すでいくつかの方法が報告されているが、それらの有効性を短時間で正確に検定できる簡便な方法があれば、開発研究は大いに促進されるにちがいない。そこでわれわれは、透明帯除去ハムスター卵を用いて牛精子の X, Y 染色体を直接判別する方法の開発を試み、ある程度の目的を達したので報告する。

方法は、われわれの改良したヒト精子染色体分析法(上口・美甘, 1984, 1985)に準じたものであるが、用いた凍結保存牛精子の性質に合わせて精子受精能獲得法および媒精法に若干の修正を加えた。この方法による受精率は40~60%で、受精卵の大部分が第1卵割中期まで発生した。牛精子由来核板の染色体分析率はこれら分裂中期卵の50~60%であった。現在のところ、本法はなお改良を必要とする段階であるが、今回の報告は牛精子染色体を直接分析し得た最初のものである。

6. 凍結精液による犬の人工授精に関する基礎的検討

景山 忠・中尾敏彦・森好政晴
河田啓一郎
(酪農学園大獣医学科)

犬の人工授精は、精液の凍結融解後先体異常が生じ易いことと、精液の子宮内注入が技術的に困難なことから、実用化されるに至っていない。今回、犬の人工授精の実用化を図る目的で、egg-yolk-tris 液を希釈液として用い、フランス式コンピューター付自動凍結器によって凍結精液を作成し、凍結融解後の精子の生存性と先体異常の出現率の変化を調べた。また犬の人工授精における子宮内注入の方法についても検討した。35°C 30秒で融解後、精子の生存率は凍結直後では $\text{III}50\sim\text{III}90\%$ と良好であったが、保存期間の延長とともに約10週目で $\text{III}60\sim\text{III}75\%$ 、約15週目では $\text{III}50\sim\text{III}60\%$ に低下した。先体異常精子の出現率は凍結前で10%未満であったが、凍結融解後は約50%に増加した。また精液の子宮内注入は円筒状の腔鏡と照明器具を用い、直視下で外子宮口から細い金属性カテーテルを挿入することによって比較的容易に行えることがわかった。本法により約 2×10^8 個の精子を3頭に子宮内注入し、全頭に受胎が確認された。

7. 男子不妊症の臨床統計的検討

伊藤直樹・斎藤誠一・高木良雄
大野一典・熊本悦明
(札幌医大泌尿器)

昭和44年より59年までの16年間に札幌医大泌尿器科に男性不妊を主訴として受診し、精液所見に異常を認めた症例は754例、うち296例に睾丸生検を施行した。検討方法としては精液検査、睾丸組織、内分泌学的検査、ならびに治療効果について行なった。Spermatogenesis をより定量的に判定するために Germinal Cell Index (G. C. I. 各 germ cell 数/Sertoli cell 数)を用いた。治療は(3か月以上施行) Clomiphene, HCG+HMG, HCG, のHormone療法と、それ以外に Vitamine, Kallikrein を用いた。治療効果判定は妊娠した場合と精子数が $10\times 10^6/\text{ml}$ 以上増加した場合を有効とした。

各治療例の有効率は Clomiphene 療法37.8%, HCG+HMG 療法28.2%, HCG 療法20.0%, Vitamin 療法29.4%, Kallikrein 療法33.3%であった。組織所見を加味すると G. C. I. の低い症例に於て Hormone 療法は比較的効果的な傾向が認められた。

8. 幼若卵巣卵の成熟段階と急変する放射線感受性：生殖寿命、発生能、染色体に関する研究

立野裕幸・美甘和哉
(旭川医大生物学)

我々はチャイニーズハムスターの出生日の卵巣卵がすべて太糸期にあり、1Gy のX線によつても全く細胞死を蒙らないが、生後4日では大部分の卵が複糸期・網糸期に発達しており、著しい細胞死を蒙むことを発見した。

今回、新生仔期卵巣照射の晩発効果を検討する目的で、成熟後の生殖能及び生残卵子の発生能・染色体構成を調査した。出生日照射群の性成熟・生殖寿命は非照射群と差はなかつたが、4日照射群では卵細胞死の影響で性成熟は遅れ、生殖寿命も著しく短縮した。発生異常・染色体異常は増加しないことから、太糸期に照射された卵では発生能・染色体への障害はないと思われる。最後に、放射線と卵細胞死の関係については、これまでの大型動物やヒトの研究において根本的な誤解があつたと思われるので、これに修正を加えたい。

9. 顕微操作によるマウス 2 細胞期胚および 4 細胞期胚の発育能に関する研究

中田宏伸・高橋芳幸・金川弘司
(北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学科)

ddY 系未成熟雌マウスから回収した 2 細胞期胚および 4 細胞期胚にマイクロマニピュレーターによつて顕微操作を加え、透明帯を除去したり、割球を 1 個ずつ破壊したりしてから、体外培養を行なつて、透明帯の有無と割球数の減少が、胚の発育性、発育胚の体積および細胞数などにどのように影響するかを調べた。

その結果、割球数の減少によつて、正常な胚盤胞への発育率、発育胚の体積および細胞数は減少し、発育形態が異常な胚が増加することから、割球数の減少は、胚の発育に大きく影響すること、および透明帯の有無は割球の発育に大きな影響を与えていないことが解つた。

10. マウス胚の凍結・融解時における凍結保護剤の効果に関する研究

浦野浩司・高橋芳幸・金川弘司
(北海道大獣医学部家畜臨床繁殖学科)

1 価から 5 価までのアルコールおよび dimethyl sulfoxide (DMSO) を凍結保護剤として、8 細胞期胚から中期胚盤胞までのマウス胚を凍結し、融解後の生存性と融解後の凍結保護剤の希釈法について検討した。凍結保護剤は 5 段階に分けて添加し、最終濃度は 1.5M として冷却し、 -35°C に達した時点で液体窒素中に移した。融解は 37°C 温湯中で行い、融解胚は 0.5M sucrose 溶液中に平衡させるかあるいは直接 PBS 中に移して凍結保護剤を希釈し *in vitro* で培養して生存性を判定した。

その結果、本実験の条件下では ethyleneglycol, glycerol および DMSO は凍結保護剤として有効であるが methyl alcohol, erythritol, adonitol および xylitol は凍結保護剤として不適當と思われた。一般的には、sucrose 溶液を用いた希釈法が PBS を使用した希釈法よりも高い生存率を示す傾向にあり、胚の発育ステージによる生存率は一定の傾向を示さなかつた。しかし、ethyleneglycol は PBS のみの希釈法でも高い生存性を示した。

11. ヒト脱落膜の Prostaglandins (PGs) 産生—正常妊娠例と稽留流産例の比較—

笠茂光範・石川睦男・浅川竹仁
清水哲也 (旭川医大産婦)

着床は生殖生理学上極めて重要な現象であり、IVF-ET 成功の key point ともなっているがその機構については未だ不明である。動物実験では着床と PGs との密接な関連が指摘されておりこの点より今回、ヒト着床機構を探る一環として脱落膜の PGs 産生に関し、正常妊娠例と稽留流産例を対象として *in vitro* で比較検討した。

妊娠 12 週未満の正常妊娠例 (人工妊娠中絶例) あるいは稽留流産例より搔爬にて得られた脱落膜を Krebs-Ringer bicarbonate 液 (pH 7.4) 中で 95% O_2 + 5% CO_2 の条件下で 30 分間振盪培養した。得られた培養液を酢性化後、cyclohexane + ethylacetate にて抽出し、RIA によりその PGE, PGF 濃度を測定した。脱落膜の PGE 産生は正常妊娠例と稽留流産例の間で差はないが PGF 産生は、稽留流産例で正常妊娠例に比し有意に低値を示した。このことより、着床をはじめとする初期妊娠維持機構に脱落膜の PGF 産生が重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

12. 不妊症患者に対する排卵誘発療法の検討

三好正幸・神谷博文・永井莊一郎
酒井 潔 (斗南病院産婦)

排卵障害ばかりでなくひろく内分泌性因子を原因とする不妊症患者に対して各種排卵誘発療法が行なわれている。

しかし、これら治療法は未だ経験主義的な面が多くあまり理論的とはいえないようである。われわれは過去における排卵誘発療法の症例を臨床統計的に観察し、2, 3 の知見を得たので報告したい。

13. 妊孕能保存を目的とした円錐切除適応の設定と術後の長期観察について

守谷 修而・中島敬和
(社保中央病院産婦)
佐藤 博・戸喜兵衛
(北海道大産婦)
沓沢 武

(北海道対癌協会細胞診センター)

近年子宮頸癌の啓蒙と検診の普及にともなつて早期癌

発見が次第に若年化する傾向にある。それにもなつて妊孕能を保存する処置を切望する症例が目につくようになった。しかし妊孕能保存を目的とした腔部円錐切除術は安全に関しておのずと限界がある。今回、診断を目的に円錐切除し、その後摘出子宮の病巣遺残を検討して円錐切除の安全限界を確認すると共にこれに準じて行った円錐切除のみの症例を長期 follow up し妊孕能を検討した。

診断のため円錐切除を行った 0, I a 期 (95例) について 8~12ブロック組織標本を作成し、病巣の占めるブロック数、病巣中の腺腔内充填像の占める程度および初期浸潤像について検討し、更に切除後に摘出した子宮の病巣遺残の立体的な把握より病巣遺残率を算出した。この検討による適応基準に基づいて妊孕能保存を目的として行なつた円錐切除のみの 11 症例について妊娠率や妊娠、分娩時の障害有無について観察した。

14. hCG-負荷試験による雄ウマの精巣機能検査法の検討

池田 充・奥田 潔・佐藤邦忠
(帯広畜産大獣医学科)

井上 準

(家畜改良事業団前橋種雄牛センター)

雄ウマの特発性繁殖障害は 5~10%の発生率である。しかし、この原因について十分に検索されていない。そこで今回は、ヒトで臨床応用されている hCG-負荷試験について検討した。

材料と方法：試験には临床上異常の認められない雄ウマ 18 頭と、繁殖障害例 6 頭の合計 24 頭を使用した。試験の方法は hCG 5,000~10,000iu (帝国臓器) を筋肉内に注射し、投与後 5~7 日目まで血中 testosterone 値と、投与前の LH 値を求めた。また、精巣の組織所見は Haematoxyline-Eosin 染色標本を検索した。

結果：1) 正常例では、hCG-負荷後血中 testosterone 値は、2~3 日目まで最高値を示した。2) 精巣の組織所見に造精機転障害のみられた例では、hCG-負荷後の血中 testosterone 値の変動範囲が狭く、LH 値が高い傾向にあつた。

以上のことから、hCG-負荷試験は内分泌機能の異常に起因する、雄ウマ繁殖障害の臨床診断に応用が可能と考える。

15. 無精子症辜丸組織における Glutathione S-transferase による酵素抗体法の検討

足立祐二・野々村克也・小柳知彦
(北海道大泌尿器)

小杉雅郎 (滝川市立病院泌尿器)

Glutathione S-transferase (GST) は、成人男子辜丸組織において、Leydig 細胞にその局在が知られ、酵素抗体法 (PAP 法) を用いると Leydig 細胞のみが染色され、その形態、分布を容易に識ることができる。無精子症の診断のもとに生検した 10 症例について、FSH, LH 基礎値、HE 染色の組織所見と比較した、精管造影で精路通過障害と診断された 2 例では、FSH, LH に異常なく、精子形成能も保たれており、Leydig 細胞の分布も健常男子のそれと類似していた。Klinefelter 症候群の 1 例を含め、germ cell aplasia および精細管の障害を伴うその他 8 例では、FSH の上昇をみるとともに LH も高値をとる例がみられ、それらの組織の PAP 染色では、び慢性の Leydig 細胞の過形成とも言うべき所見が確認された。

16. 精巣上体内初期成熟過程におけるブタ精子抗原性の変化

平尾和義・森 健治・佐藤昭一
(酪農学園大学畜殖学)

初期成熟過程におけるブタ精巣上体内精子膜タンパク質の変化を知るため、精巣上体頭、体、尾精子および射出精子抗原性を免疫電気泳動により比較観察した。

精巣上体および射出精子各抗血清全体を通じ、精子各抗原には 1~6 の主要特異沈降線が分類された。検出沈降線数は精巣上体頭精子 2~3、体精子 1~2、尾精子 2~3 および射出精子 3~6 の範囲にあり、体精子で減少、射出精子で増加した。また精子各抗血清に対し、精巣上体および射出精子に共通する単一特異沈降線が陽極側に得られた。抗原吸収後、精子各抗原に検出された沈降線の大部分は消失したが、精巣上体尾および射出精子抗原吸収抗血清に対し消失せず、精巣上体尾以降新たなタンパク質が精子に付加されると考えられた。さらに、蛍光測定法により精巣上体移行に伴うこれら精子抗原性の変化も比較検討したい。

17. 各種手術後の卵巣ならびに卵管周囲の癒着について

—ラパロスコピーによる確認—

田中俊誠・及川 衛・桜木 範明
 出店正隆・日下真純・藤本征一郎
 一戸喜兵衛 (北海道大産婦)

昭和58年7月より61年1月まで北大産婦人科においてわれわれの HSG 読影基準ならびに既往歴から卵管因子による不妊が疑われた101症例に Laparoscopy が施行された。54症例には開腹手術の既往がなく、47症例には片側もしくは両側の卵巣嚢腫手術 (N=13, 摘出術, 核出術, および部分切除), 虫垂切除術 (N=9), 卵管妊娠手術 (N=8), 子宮筋腫摘出術 (N=5), 卵巣楔状切除術 (N=4), 卵管手術 (N=3, 開口術, および形成術), 腹式帝王切開術 (N=2), その他 (N=3) の手術歴があった。各手術後の卵管周囲癒着, および卵管閉塞の発生率 (左右卵管の平均) はそれぞれ 卵巣嚢腫において 92%, 65.5%, 虫垂切除術において 67%, 50%, 卵管妊娠手術において 81.5%, 25%, 子宮筋腫核出術において 90%, 60%, 卵巣楔状切除術において 100%, 25%, 卵管手術において 83.5%, 100%, および腹式帝王切開術において 100%, 100%であった。なお, 自然ないしは人工流産 (N=4) においては同様に 100%, 37.5%で, 手術の既往のない症例においては 69%, 40%であった。

以上の結果から, 1) 以上の手術の術後における卵管周囲癒着発生率は高い, 2) 卵巣嚢腫手術, 子宮筋腫核出術, および卵管手術の術後における卵管閉塞の発生率は高いことが示された。

18. 超音波断層法による卵管疎通性の評価

高田久士・千石一雄・浅川竹仁
 石川陸男・清水哲也
 (旭川医大産婦)

卵管通過性の評価は, 従来より通気法, 子宮卵管造影法 (以下 HSG), 手術または腹腔鏡下の通色素試験が用いられてきた。しかし, これらの検査法は生体への侵襲やX線被曝など多くの問題を有している。そこで今回, 超音波断層法による卵管通過性の評価が可能か否かに関し検討を試みた。対象は手術または腹腔鏡施行不妊患者 23名を対象とし, 膀胱充滿下に滅菌生理食水で通水を行ない, 子宮腔内, ダグラス窩の状態を超音波断層法により観察した。超音波法による卵管通過性の評価は液体貯留像の有無により判定し, その結果を開腹または腹腔鏡下の通色素試験, HSG と比較検討した。超音波法の一

致率は, 87.0%, HSG は78.3%であり, 超音波法, HSG の偽陽性率は各々8.7%, 13.0%であった。また, 偽陰性率は, 超音波法 0%, HSG 13.0%であった。よって, 不妊症患者の卵管通過性の評価法として, 超音波断層法による卵管疎通検査法は実施臨床上有用性が大きいことを確認しえた。

19. 卵管妊娠における卵管保存療法の検討

—卵管保存手術と MTX 療法の併用について—

岩崎 寛治・小野 宏・有賀 敏
 津田加都哉・松崎 登
 (天使病院産婦)

外妊の術後は70%前後が不妊になるとの報告もあり, 続発性不妊の原因の一つとして重要視されている。

近年, 超音波診断技術の進歩に伴って, 卵管妊娠の診断もかなり早期に行なわれるようになり, 卵管を温存し, その妊孕性保持をはかろうとする方向に考え方が変わってきつつあると思う。

特に一側卵管を過去に欠如し, 残存卵管に発症した卵管妊娠の取り扱いに関しては慎重ならざるを得ない。

昭和56年1月から昭和60年5月までの4年5カ月間に当科では57例の卵管妊娠を経験し, その13例に保存療法を行った。

4例に非観血療法即ち MTX 療法, 2例に卵管保存手術のみ, 7例には卵管保存手術+MTX 療法を試みた。

これらの症例の経過追跡結果につき検討を加えて報告する。

会長講演

「更年期妊娠と母性」

北海道大学医学部産婦人科教授
 一戸喜兵衛

特別講演

Gonadotropic regulation of the steroidogenic machinery in human granulosa cells

ペンシルバニア大学産婦人科教授
 Jerome F. Strauss

第102回日本不妊学会関西支部集談会

日時 昭和61年3月1日(土)午後2時より

場所 和歌山県立医科大学 別館7階大講堂

1. 不妊患者にみられる子宮卵管口ポリープについて

岩橋五郎 (和歌山市)

HSG や Rubin 検査により、卵管閉塞と診断した場合の正診率の低さは衆知の事実で、その原因は技術、心理的因子、医師の診断能力の差それに施行中の疼痛が子宮卵管角部の攣縮を起こし、卵管内にガス、造影剤が入らないため閉塞型と誤診されるという。しかしこれを証明したものはない。

私は不妊患者にたびたび子宮絶検査を施行するが、HSG, Rubin 検査で卵管の閉塞あるいは不全閉塞と考えられる症例の子宮卵管口ないしはその近くに、種々の型の独立した子宮内腹ポリープをみとめ、子宮内に注入する水圧を上昇させると、ポリープはあたかも卵管口を閉塞するが如き所見を認めた。このようなポリープは同時に左右の卵管口に存在することもある。

子宮内腹ポリープの存在は Linexyplained Infertility の原因の一つと推定し、さらに HSG negative false の一因と述べるものもあるが、その具体的根拠を示したものはない。ここに子宮内腔ポリープが、卵管口閉塞の可能性のあることを明らかにし、ポリープ切除の不妊治療上の意義について述べたい。

2. 高プロラクチン血症における下垂体睾丸系の機能

西 丈則・八木重尾・仲野良介

(和歌山医大産婦)

女子では高プロラクチン(PRL)血症が、卵巣のステロイド産生を障害し、視床下部一下垂体の estrogen feedback 機構が障害され無排卵、無月経を来すことをわれわれの以前のデータで示唆してきた。今回正常男子における高 PRL 血症の下垂体一性腺系機能を LH-RH 負荷試験により検討した。対照として、LH-RH $1\mu\text{g}/\text{min}$ で8時間持続投与し、投与開始後0分、30分、60分、90分、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間および24時間に採血した。その後同一対象について、スルピリド $150\text{mg}/\text{day}$ を連日経口投与し、投与開始後2週目に LH-RH 負荷試験を対照と同様に行なった。LH-RH 持続投与により、LH は対照および高 PRL 血症群ともに2相性の反応を示したが、第一相では高 PRL

血症群の方が対照群に比し有意な過剰反応を示した。testosterone 値は0分値で高 PRL 血症群に有意な低値を認めたものの、LH-RH 負荷後両者間に有意差なく、PRL の testosterone 分泌に対する抑制作用は軽微であった。

3. 高プロラクチン血症と卵胞発育

曾和正憲・辻 清・仲野良介

(和歌山医大産婦)

高プロラクチン血症により卵巣機能障害を認めることはよく知られているが、最近になってこの高プロラクチン状態の時期によつて障害の程度が異なることが報告されている。

そこで今回私たちは卵胞期中期から後期にかけてのスルピリド投与による一過性高プロラクチン血症(S群: $n=5$)が個々の卵胞にどのような影響を及ぼしているのかを知る目的で、卵胞期後期に開腹手術を受けた際、卵胞液を採取し testosterone (T), estradiol (E_2)を測定した。卵胞径が8mm以下の小卵胞群ではコントロール群($n=8$)に比してS群の卵胞液中 E_2 濃度は有意に低値で、T濃度は有意な高値を示した。しかし、大卵胞群(9mm以上)では E_2 , T は両者間に有意な差はみられなかつた。また、平均卵胞径はS群において有意に低値を示した。以上より卵胞期後期における一過性高プロラクチン血症の大卵胞に対する影響は小さいが、小卵胞に対しては強い抑制作用を有することが示唆された。

4. 精子不動化抗体の受精阻害作用

津久井伸一・野田洋一・福田愛作

松本 央・矢野樹理・森 崇英

(京都大産婦)

7.5%精子不動化抗体陰性血清、または陽性血清を含む培養液中にて処理したヒト精子を、高濃度塩類溶液中に保存していたヒト卵と共に培養した。培養終了後、ノマルスキー微分干渉顕微鏡にて観察したところ、精子不動化抗体陰性血清と共に培養した精子には、透明帯への貫通が認められたが、陽性血清と共に培養した精子には、貫通が認められなかつた。さらに Protein A-Sepharose を用いて、陰性血清および陽性血清より IgG 分画を抽出し、原血清相当量の IgG を用いて上記と同様の透明帯貫通試験を施行したところ、血清を用いた場合とほぼ同様の結果が得られた。そこで陰性血清由来 IgG 添加培養液、または陽性血清由来 IgG 添加培養液中で培養

した精子を、透過型電子顕微鏡にて観察したところ、陽性血清由来 IgG 添加培養液にて培養した精子は、陰性血清由来 IgG 添加培養液にて培養した精子と比較して、acrosome reaction を起こしている場合が減少していた。

5. 耐凍剤連続添加法によるマウス胚凍結保存

福田愛作・野田洋一・津久井伸一
松本 央・矢野樹理・森 崇英
(京都大産婦)

1972年 Whittingham がマウス胚の凍結保存に成功して以来、凍結保存技術は著しい発展を遂げ、ヒト凍結受精卵からの生児も既に得られている。しかし、状態の良い胚のみを用いているという条件を考慮すれば、凍結融解後の生存率は決して満足すべきものではない。そこでわれわれは胚の選別が許されないという特殊な条件をもつヒト受精卵の凍結保存を念頭に置き、更に生存率を高めるべく、原法より現在まで段階的添加法が用いられている耐凍剤の添加法に連続的添加法を試み、1段階法、3段階法、5段階法との比較を行なった。連続法にて最も良い成績を残したが、統計的有意差は3段階法との間にまでしか認められず、5段階法との間には有意差は認められなかつた。しかし連続法の操作の煩雑さを考慮すれば生存率は決して低いものではない。また連続的添加

法の簡略化や耐凍剤の除去時の連続法の応用が凍結融解後の胚の生存率を更に高める可能性も残されている。

6. カニクイザルの体外受精

井田憲司・矢野樹理・津久井伸一
福田愛作・辰巳賢一・松本 央
野田洋一・森 崇英
(京都大産婦)

ヒト体外受精の手法の改良、およびヒト初期胚の研究推進上、サル体外受精の技術を向上させる意義は大きい。しかし、サル体外受精はヒト体外受精に比し、いまだ、かなり手法の遅れがあり成功例も少ない。各種サルの体外受精の手法の確立が待たれるところである。われわれは、月経周期が28~29日で年周期性が無い等、ヒト生殖パターンに近いカニクイザルの体外受精を試み、各種条件の模索を行なった。その過程で受精例をみたのであわせ報告する。

現在までに、延べ22例に hMG-hCG 排卵誘発を行ない、体外受精を施した。採取卵数は、333個、そのうち、成熟卵18.9%、受精にいたった卵2個であつた。受精例はポリスペルミーであり、分裂には到っていない。採取卵数は、0個(6頭)から51個と個体差が大きく、月経の順、不順に大きく左右された。

お 知 ら せ

Vith World Congress on Human Reproduction

下記の要領で開催されます。奮って御参加下さい。

会 期：昭和62年10月25日（日）～30日（金）
会 場：笹川記念会館 東京都港区三田 3-12-12
会 長：飯塚理八（慶応義塾大学教授）

一般演題応募締切：昭和62年4月30日

| | | |
|----------------|-------------|---------|
| 参 加 費： | 昭和62年4月30日迄 | 5月1日以降 |
| 正 会 員 | 50,000円 | 60,000円 |
| 同 伴 者 | 25,000円 | 30,000円 |
| student（大学院など） | 20,000円 | 20,000円 |

主なる foreign guests (100名)：

A. Campos Da Paz (Brazil), L. Mastroianni (U.S.A.), H. Jones (U.S.A.),
E. E. Wallach (U.S.A.), D. Hanahan (U.S.A.), N. Gleicher (U.S.A.),
D. M. de Kretser (Australia), J. Zander (W. Germany), K. Semm (W. Germany),
L. Mettler (W. Germany), W. B. Schill (W. Germany), R. G. Edwards (U.K.),
M. Seppala (Finland), R. Eliasson (Sweden) など

学術プログラム：プレナリーレクチャー 19
シンポジウム 17
ワーク・ショップ 12
一般演題 260（採用予定）

学 会 事 務 局：(株) コンベックス

〒106 東京都港区麻布台 1-10-5 セントラル共立ビル
TEL. 03 (589) 3355

ファイナルサーキュラー（含一般演題応募用紙）は上記学会事務局に用意してありますので御申込下さい。

参 加 費 振 込 先：三井銀行 神谷町支店 普通預金
口座番号 5011725
口座名義 VIth World Congress on Human Reproduction

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原著、総説、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、原則として刷り上り6ページ以内とし、超過は4ページ(計10ページ)までを認める。超過ページならびに特に費用を要する図、表、写真は実費を著者負担とする。
 4. 原著、総説、論説、臨床報告などは必ず、400字以内の和文抄録ならびに、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。
 5. 図表ならびに写真は稿末に一括してまとめ、符号を記入し、かつ本文中に挿入すべき位置を明示する。
 6. 記述は和文または欧文とし、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：ページ数、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ページ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)：ページ数、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カ年間のわが教室における外来不妊患者の統計的観察, 日不妊誌, 4 : 13, 1956
 - b. 単行本の場合
著者名：題名、巻数：ページ数、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. 同一著者による論文の掲載は同一号に1編のみとする。
10. 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。
11. 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する。
12. 特別掲載を希望する論文は、受付順序によらず、速やかに掲載される。この場合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。
13. 掲載原稿に対しては、別冊30部を贈呈する。これ以上を必要とする場合は、原稿に別刷総部数を朱記する。なお、30部を越す分についての実費は著者負担とする。
14. 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 事務所とする。

編集会議からのお知らせ

原稿用紙はB5判横書き400字詰のものを使用し、組版に差支えないよう清書して下さい。ワープロを使用しても結構です。(昭和61年9月)

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 32 卷 1 号

昭和 61 年 12 月 25 日 印 刷

昭和 62 年 1 月 1 日 発 行

| | |
|--------|---|
| 編集兼発行者 | 飯 塚 理 八 |
| 印 刷 者 | 菊 池 達 長 |
| 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